DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.049

开口数少，微绒毛少，纤毛细胞纤毛再生不全。仅在2例见到发育良好的胞饮小泡，而胞饮小泡的出现与消失与着床窗具有完全的同步性，被视为着床窗的特殊形态学标记[6]，这表明EM患者可能存在着床窗发育障碍，导致胚胎不易着床而引起不孕。透射电镜显示细胞有轻度变性，但两组孕激素水平在正常范围，表明EM患者的子宫内膜对正常孕激素存在异常反应，也可能与孕激素受体异常表达有关。EM患者子宫内膜超微结构的改变可能是其胚胎不易着床的重要原因，其机制尚不十分清楚，生化改变可能是其结构改变的基础，EM患者存在多种免疫异常，抗心鳞脂抗体水平升高，抗子宫内膜抗体阳性率升高，C3和C4补体局部沉积于子宫内膜表面，PRL升高，黄素化卵泡未破裂综合征等，均可引起内膜上皮细胞发生超微结构改变 导致胚胎与子宫内膜发育不同步，从而影响胚胎着床而致其不孕。

参考文献：

[1] 马良坤，郁 琦. 在位内膜与异位内膜的分子生物学研究[J]. 国外医学：妇产科分册，1995，26(5)：284－289.
[2] Arici A, Oral E, Bukulmez O, *et al*. The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University *in vitro* fertilization and embryo transfer program[J]. Fertil Steril, 1996, 65(3): 603－607.
[3] Giudice L C, Tazuke S T, Swiersz L. Status of current research on endometriosis[J]. J Reprod Med, 1998, 43(3 suppl): 252－262.
[4] Panidis D K, Matalliotakis I M. Subfertility associated with minimal to mild endometriosis. Main mechanism[J]. J Reprod Med, 1998, 43(12): 1 034－1 042.
[5] Fedele L, Marchini M, Bianchi S, *et al*. Structural and ultrastructural defects in preovulatory endometrium of normo-ovulating infertile women with minimal or mild endometriosis[J]. Fertile Steril, 1990, 53(6): 989－993.
[6] Develioglu O H, Hsiu J G, Nikas G, *et al*. Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors[J]. Fertil Steril, 1999, 71(6): 1 040－1 047.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2002)11-1357-02

个案与短篇

应用荧光定量PCR技术检测淋球菌等性传播疾病病原微生物

Detection of pathogens of sexual transmitted infections with real-time polymerase chain reaction

冯文曦，曹红卫，赵静怡，郑 红，钟白玉 （第三军医大学附属西南医院综合实验研究中心，重庆 400038）

在性传播疾病中，淋球菌(NG)，沙眼衣原体(CT)，解脲支原体(UU)的感染较为常见。我们采用的PCR方法结合了荧光探针的体外扩增和检测技术[1,2]，不仅把假阳性率降低到最低限度，同时还保留了常规PCR的高灵敏性和特异性。通过对人生殖道分泌物样本中以上3种病原体DNA的测定，检测了1 122例临床送检可疑标本，为上述3种病原体感染的早期诊断以及性病高危人群的初筛等，提供了核酸水平上的参考依据。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源及取材方法 标本均由本院门诊妇科、皮肤性病科以及泌尿科等科室从疑为NG，CT，UU感染者，取其尿道，宫颈分泌物送检。共检测标本1 122例(男性标本480例，女性标本642例)，其中NG269例，CT419例，UU434例。取材方法：采样时，将消毒棉拭子伸入男性尿道及女性宫颈口2～3 cm，转动一周以获得上皮细胞。将取样后的棉拭子放入1.0 ml无菌生理盐水中漂洗片刻，在管壁上挤干后丢弃。如果男性患者尿道口分泌物过少，则取前列腺液2～3滴。

1.1.2 仪器 美国BIO-RAD iCylcer荧光PCR检测仪。

1.1.3 试剂盒 NG，CT，UU核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒均为深圳匹基生物技术开发有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量PCR原理 该技术在常规PCR基础上，添加了一条标记了2个荧光基团的荧光双标记探针。一个标记在探针的5′端，另一个标记在探针的3′端。两者可构成能量传递结构，即5′端荧光基团所发出的荧光可被另一荧光基团吸收或抑制。探针的3′端羟基(-OH)已被去除或封闭，不具有延伸能力。探针在无特异性PCR发生时，荧光信号不改变。当有特异性PCR扩增发生时，探针会在PCR过程中被Taq酶的5′→3′外切酶活性作用切断，切下的3′端荧光基团抑制作用消失，从而引起切下的5′端荧光基团信号的增长。荧光信号伴随着PCR的进行，PCR产物的增长而增长[3]。

1.2.2 试剂盒使用方法 将标本13 000 r/min离心10 min，去上清液，采用常规碱裂解法提取NG、CT、UU-DNA。将各反应管放入BIO-RAD iCylcer荧光PCR检测仪上，按下列条件进行扩增：37℃5 min；94℃1 min；95℃5 s；60℃30 s。共作42个循环。反应体系设为40 μl。反应结束后，由电脑自动分析计算出结果。每次检验均做阳性和阴性对照。

1.2.3 统计学方法 直接使用BIO-RAD iCylcer携带的数据统计程序进行分析。

2 结果

使用BIO-RAD iCylcer进行结果分析时，严格按照试剂盒说明进行。FQ-PCR共检测标本1 122例，结果见表1。

（下转1360页）

作者简介：冯文曦(1972－)，男，重庆市人，主管技师。电话：(023)68754437
收稿日期：2001-10-20；修回日期：2002-03-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生长抑制和癌细胞的凋亡发生，从而参与到结直肠癌的发生发展。同时提示检测 ING1 mRNA 表达可能有助于临床对大肠癌远处转移的判断。

在本研究中观察到在 52 例结直肠癌病例中 p53 蛋白阳性率 46.2%。p53 蛋白表达与所观察的所有临床指标均无显著关系，关于 p53 蛋白表达与结直肠癌临床病理指标的关系目前尚不统一，多数文献认为 p53 的表达与结直肠癌的临床病理无显著关系，这种现象很难用突变型 p53 的致瘤性作用解释，一些学者认为可能与 p53 作用的阶段性有关[5]。

研究证实 p53 在结直肠腺瘤向腺癌的恶变中发挥重要作用，同时 p53 的突变和杂合子缺失也参与了溃疡性结肠炎－不典型增生－癌的恶变过程。研究报道在结直肠癌中 p53 突变率为 22% ~ 70%，平均约 50%[5]。研究亦表明在表达野生型 p53 的阳性细胞中，p53 的功能也很少被激活[6]。已有的研究证明 p53 与 ING1 在功能发挥上具有相互制约，需要两个基因的同时存在才能发挥生长抑制及抗凋亡作用。本实验显示，与 p53 蛋白表达阳性组比较，在 p53 蛋白阴性的肿瘤组织中 ING1 蛋白表达亦明显缺失或表达减弱。由于野生型 p53 半衰期短，免疫组化方法不能检测，而突变型 p53 因半衰期延长而能为免疫组化检测，目前普遍认为 p53 阴性的肿瘤细胞多数具有野生型 p53，在这些肿瘤中虽然具有野生型 p53 基因，但可能因为 ING1 的低表达甚至缺失，使得野生型 p53 抑制肿瘤细胞增殖及促进凋亡的作用不能发挥，从而加快了结直肠癌的发生及发展。

参考文献：

[1] Garkavtsev I, Grigorian I A, Ossovskaya V S, *et al*. The candidate tumor suppressor P33ING1 cooperates with P53 in cell growth control[J]. Nature, 1998, 391(6 664): 295－298.

[2] IGor Garkavtsev, Karl Riabowol. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the P33ING1 candidate tumor suppressor[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 2 014－2 019.

[3] Helbing C C, Veillette C, Riabowol K, *et al*. A novel candidate tumor suppressor: ING1, is involved in the regulation of apoptosis[J]. Cancer Res, 1997, 57(7): 1 255－1 258.

[4] Cheung KJ Jr, Li G. The tumor suppressor ING1: structure and function [J]. Exp Cell Res, 2001, 268(1): 1－6.

[5] 钱木华. 人大肠肿瘤组织 P53 基因突变表达及临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(5): 332－334.

[6] Lohrum M A, Vousden K H. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10(5): 197－202.

（编辑 王 红）

（上接 1357 页）

表 1 NG、CT、UU PCR 反应结果

	例数	阳性数	阳性率（%）	循环阈值（Ct）		
				最大值	最小值	平均值
NG	269	25	9.29	36.97	21.00	27.80
CT	419	30	7.16	37.00	21.77	29.90
UU	434	38	7.16	39.80	25.50	34.50

结果分析：Ct 值等于 0 或≥40 的样本为阴性。0＜Ct 值≤38 的为阳性。38＜Ct 值＜40 的样本重做。重做结果不等于 40 或 0 者为阳性，等于 40 或 0 为阴性（本次统计中出现 1 例结果 Ct 值大于 38，重做结果为阳性）。

3 讨论

快速，准确的诊断是正确指导临床、提高诊治水平的重要因素。传统的检测方法（细菌涂片，细菌培养，免疫学技术）普遍存在检出率低，周期长（48 h），特异性差的缺点。80 年代出现的 PCR 技术虽解决了检出率低，周期长的问题，但由于错误扩增和产物污染导致假阳性率高，不能正确指导临床实践。随着 PCR 技术的日臻成熟，已出现的荧光基因探针杂交定量 PCR 方法在常规 PCR 基础上，把目的基因扩增，特异分子杂交和荧光化学融为一体，利用基因扩增的灵敏性，分子杂交的特异性和光化学反应的精确性[3,4]，实时在线探测 PCR 过程中荧光信号强弱的变化，根据 PCR 反应的酶动力学特点，获得 DNA 模板的准确定量结果。由于该实验过程从扩增到检测均是在单管封闭条件下进行，并通过微机控制，实现了对扩增产物进行实时动态检测和结果的自动分析。与竞争性 PCR，PCR-EIIA 等定量 PCR 相比，荧光定量 PCR 不仅进一步提高了特异性，无需 PCR 后处理和冗长的电泳，紫外或染色检测，还具有定量范围宽，定量准确等优点，使假阳性率降低到最低限度，并且从根本上解决了 PCR 扩增产物污染的难题[2,5]。本研究应用荧光定量 PCR 方法对 1 122 例门诊送检标本进行检测，检出阳性感染患者 93 例，阳性率 8.29%。与最近欧美国家提供的社区筛检（NG/CT 8.7%）大体接近。据国内学者报告，通过 PCR 与传统方法比较，发现淋病治疗前镜检 85%阳性，培养 90%阳性，PCR 则为 100%阳性；而治疗后镜检 5%阳性，培养 10%阳性，PCR 为 35%阳性。由于荧光定量 PCR 具有上述特点，因此它不仅成为常规 PCR 的更新换代技术，还能正确指导临床做出诊断，为临床考评疗效提供依据。

关键词：荧光定量 PCR；淋球菌；沙眼衣原体；解脲支原体
中图法分类号：R446.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 程 钢，何蕴韶，周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(3): 135－138

[2] 赖宏芳，付晓野，董玉琳，邓志军. 荧光探针定量 PCR 检测 HBV-DNA[J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15(1): 18－19.

[3] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al*. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 986－994.

[4] Gibson, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 995－1 001.

[5] 邹先进，罗 凯，蔡 兰. 实时荧光定量聚合酶链反应检测沙眼衣原体等病原体感染[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(2): 86.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net