

• 论著 •

核酸荧光定量 PCR 检测“疣毒净”洗剂对体外人乳头瘤病毒清除作用的实验研究 *

吴元胜 范瑞强 禰国维 江光明 孙静

(广州中医药大学第二附属医院皮肤性病科 广东广州 510120)

摘要:目的:观察中药“疣毒净”洗液在体外对 HPV 的影响,以阐明其治疗机理。方法:从临床切除的 CA 标本中提取 HPV,加入中药“疣毒净”后,提取 HPV-DNA,用 FQ-PCR 法测定其病毒含量。结果:含 HPV 的试管加入“疣毒净”后,经 3 次反复测试,24h 即不能测出 HPV,而对照管及非相关中药管均含同等浓度的 HPV-DNA 拷贝。结论:“疣毒净”具有明确的杀灭 HPV 的作用,这可能是它治疗 CA 的机制。

关键词:尖锐湿疣; HPV; “疣毒净”; FQ-PCR

Abstract: Purpose: Observation of the influence of Chinese medicine " Verrucous Abluent " liquid to HPV in vitro, in order to expose the curing mechanism of it .Method:After drawing HPV from the CA sample cut off in clinic and adding Chinese medicine " Verrucous Abluent " liquid into the HPV, draw out HPV-DNA and measure its virus content by FQ-PCR . Result:By 3 times measuring repeatedly , HPV could not be surveyed out in 24 hours in the testing tube of " Verrucous Abluent " liquid while contrast tube and non-correlative Chinese medicine tube both had equal concentration of HPV-DNA copy . Conclusion:" Verrucous Abluent " liquid has exact action of killing HPV, which perhaps is its mechanism of curing CA.

Keyword: point condyloma; HPV; Verrucous Abluent; FQ-PCR

中图分类号:R 287.7

文献标识码:B

文章编号:1671-4040(2003)02-0001-02

人乳头瘤病毒(HPV)属乳头瘤病毒多型空泡形病毒 A 亚群,含有双链环形 DNA,对鳞状上皮具有组织亲和性,多见于宫颈、外阴、阴茎、肛周的尖锐湿疣(CA)和恶性肿瘤组织中。目前已发现的 HPV 病毒大约有 80 多型,其中有 30 多型引起外生殖器 CA。目前在世界上尚无能杀灭该病毒的药物,临床复发率极高。近年来我们一直应用中药外用制剂“疣毒净”洗液配合“疣毒净”胶囊口服治疗 CA 取得了较好疗效。近期我们在临床观察中发现部分患者单用“疣毒净”洗液治疗 CA 也可使疣体明显消退,这种单纯局部处理能治愈疾病的机理,有可能是它具有杀灭病毒的功效。为从分子水平探讨“疣毒净”洗液治疗 CA 的作用机理,我们采用核酸荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)观察了“疣毒净”洗液对离体 CA 皮损中 HPV-DNA 的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 HPV 来源 来自我院皮肤性病专科门诊收集符合临床标准的发生于外阴部位的典型新鲜 CA 疣体标本 2 份(分别取自 2 个 CA 患者)。诊断标准:参照全国性病防治中心叶干运等主编的《实用性病学》^[1] 标准。标本切取后,用生理盐水洗去血液,每 1

份用电子天平精确称其重量后,在无菌条件下,将标本剪碎,加生理盐水研磨成匀浆备用。2 份标本分别制备。

1.1.2 实验药物 “疣毒净”外洗液由我院制剂室提供,同时用我院生产的中药止咳糖浆(由枇杷叶、桔梗、百部、远志等组成)、生理盐水作为非针对性用药对照和空白对照。采用双盲法,将药物分别标号。

1.1.3 试剂与仪器 采用中山大学达安基因诊断中心提供的荧光定量 HPV6/11、HPV16/18 诊断试剂盒。仪器:美国 PE 公司生产的 7700Sequence Petector 荧光定量 PCR 仪。

1.2 试验方法

1.2.1 方法 取 CA 组织匀浆 0.6mL,分别加中药标本 2.4mL,对照管加生理盐水 2.4mL,置 4℃冰箱内,按 40uL/mg 加入浓度为 500ug/mL 的 DNA 提取液,充分震荡摇匀,56℃温浴 2h,37℃过夜。沸水裂解 10min 后离心 15 000r/min 10min,提取 DNA。第 1 次实验及第 2 次实验系同一病人的 CA 组织匀浆,第 3 次实验系另一病人的标本匀浆。

1.2.2 FQ-PCR 反应步骤 取 DNA 0.2mL 入薄壁反应管中,同时加入一定浓度的引物、F-PROBE、dNTP、DNA 聚合酶及缓冲液等,放入 PE7700 荧光 PCR 仪,按下列温度运行:93℃ 2min 预变性;93℃

* 广东省自然科学基金“中药‘疣毒净’抗尖锐湿疣复发机理的研究”资助项目。

件自动分析计算出初始拷贝数的定量结果。

2 结果

见表 1、2、3。两份标本均为 HPV6/11 型感染。疣毒净管 3 次实验结果 HPV 拷贝量均为 0。

表 1 第 1 次实验结果			
时间 /d	对照中药管 / 拷贝·mL ⁻¹	空白对照管 / 拷贝·mL ⁻¹	疣毒净管 / 拷贝·mL ⁻¹
1	3.1×10 ⁷	2.9×10 ⁷	0
2	2.9×10 ⁷	2.8×10 ⁷	0
5	2.5×10 ⁷	2.5×10 ⁷	0
7	2.5×10 ⁷	2.5×10 ⁷	0
8	1.9×10 ⁷	2.4×10 ⁷	0
9	1.8×10 ⁷	2.1×10 ⁷	0
13	1.8×10 ⁷	1.9×10 ⁷	0

表 2 第 2 次实验结果		
时间 /d	对照中药管 / 拷贝·mL ⁻¹	疣毒净管 / 拷贝·mL ⁻¹
1	2.85×10 ⁷	0
2	2.7×10 ⁷	0
7	2.3×10 ⁷	0
13	1.9×10 ⁷	0

表 3 第 3 次实验结果			
时间 /d	对照中药管 / 拷贝·mL ⁻¹	空白对照管 / 拷贝·mL ⁻¹	疣毒净管 / 拷贝·mL ⁻¹
1	1.8×10 ⁷	1.56×10 ⁷	0
2	1.7×10 ⁷	1.45×10 ⁷	0
5	1.3×10 ⁷	1.25×10 ⁷	0
7	1.25×10 ⁷	1.15×10 ⁷	0

3 讨论

据报道我国 CA 发病率仅次于淋病，居第 2 位^[2]。近几年发病率仍居高不下。CA 的长期存在可致癌变，约 5%~15% 的生殖器癌与此有关^[3]。目前的治疗多采用局部物理或药物治疗。但无论化学的、物理的或药物的方法均是以局部破坏瘤体为目的，破坏 CA 的上皮细胞使之坏死脱落，除形成局部的创面、痛苦、易感染外，对 HPV 无杀灭作用。采用激光、电灼、手术切除及局部外涂药物等疗法虽能将 CA 临床治愈，但无法杀灭病毒，病情易潜伏和复发。目前世界上尚无有效的杀灭 HPV 的药物，在我国采用中医药的抗病毒作用及对机体免疫功能调节有一定的优势，是目前防治 CA 的热点。

中医认为 CA 的病因病机是由于房事不洁或间接接触污秽之品，湿热淫毒从外侵入外阴皮肤粘膜，导致肝经郁热，气血不和，湿热毒邪搏结而成疣。由于湿毒为阴邪，其性粘滞，缠绵难去，容易耗伤正气，正虚邪恋以致容易复发，难以根治。在治疗上多采用扶正固本、清热解毒、活血化瘀、软坚散结等法。CA 以局部病变为主，故外治法在治疗中占重要地位。疣毒净是我们近年研制用于治疗 CA 的外用中药制剂，外洗液的主要药物是板蓝根、虎杖、鸦胆子、紫草、莪术、川贝母、枯矾等，具有清热解毒、燥湿散结、腐蚀赘疣的作用，临床治疗取得了较好

实用中西医结合临床 2003 年 4 月第 3 卷第 2 期
疗效^[4,7]。目前有关 CA 文献资料临床报道较多，实验研究甚少，尤其是中药抗 HPV 的药物筛选及药理毒理等的研究几乎空白。FQ-PCR，是在 PCR 扩增系统中加入一个与靶基因序列特异互补的双荧光标记探针，5' 端标记荧光报告基因，3' 端标记荧光淬灭基团。探针完整时，由于淬灭基团作用，报告基团不产生荧光。有靶基因存在时，引物沿模板延伸至标记探针结合部时，DNA 聚合酶将探针 5' 端荧光报告基团切下，荧光报告基团淬灭作用被解除，产生荧光发射。通过光谱分析仪检测荧光强度，即可测知扩增产物的量。它融汇了 PCR 技术的高灵敏性、DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精确定量等优点，直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化以获得定量的结果，不需要 PCR 后处理或电泳检测，完全闭管操作，一举克服了常规 PCR 技术易污染和不能定量，探针杂交灵敏性不高、分离和洗脱条件不易控制等不足，极大地提高了试验的特异性与灵敏性，保证了实验的可靠性。

本研究发现 CA 标本中的病毒在 4℃ 冰箱中存活至 13d 仍可测出为 1.8~2.5 拷贝 /mL。CA 的组织匀浆在加入中药“疣毒净”后，自 24h 至 13d，FQ-PCR 恒定地不能再检出病毒，而空白对照管及中药对照管却仍继续维持原有浓度，说明中药“疣毒净”在体外能快速有效地破坏病毒 DNA，具有杀灭病毒的能力。本实验设空白对照及非相关中药对照，并经过 3 次重复测试，其结果均相同，有一定的重复性及可信性。“疣毒净”在临床上对部分患者单纯外用即能治愈 CA，而且极少复发这一事实的机理，可能是由于它具有直接降解病毒 DNA，杀灭病毒的功能所致。本研究只是初步从分子水平探讨“疣毒净”洗液治疗 CA 的作用机理，对不同型别的病毒作用机制并不清楚，本研究尚需扩大标本量并在许多环节进一步完善和深入。

参考文献

[1] 叶干运,徐文严,邵长庚,等.实用性病学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,1991.89-95
[2] 叶干运.性传播疾病诊断及预防[M].广州:广东科技出版社 1996.25
[3] 吴志华.现代性病学[M].广州:广东科技出版社,1996.158
[4] 范瑞强,禤国维.疣毒净制剂治疗尖锐湿疣的初步疗效观察[J].新中医,1997(9):41
[5] 范瑞强,禤国维.中药疣毒净治疗尖锐湿疣的随机对照观察[J].中国医药学报,1999(2):40
[6] 禤国维.疣毒净治疗尖锐湿疣的多中心临床观察[J].广州中医药大学学报, 1998,15(4):251
[7] 池凤好,范瑞强.疣毒净胶囊及外洗液治疗尖锐湿疣激光术后复发疗效观察[J].中医杂志,1999,40(4):231