

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.07.0858

L1 C 末端共同序列多肽诱导单克隆抗体应用于宫颈脱落细胞 HPV 的检出

成帆¹,李志英^{2*},肖长义¹,王乐¹

1. 三峡大学医学院组织胚胎学教研室,宜昌 443002

2. 三峡大学第二临床医学院妇产科,宜昌 443001

[摘要] **目的** 考察由人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)主要外壳蛋白(L1)C末端保守序列多肽诱导的单克隆抗体对宫颈脱落细胞内的 HPV 感染是否具有可应用于临床的检测能力。**方法** 收集三峡大学第二临床医学院妇科门诊宫颈脱落细胞标本,一式两份,其中一份标本用于医院检验科 HPV 分型检测试剂盒检测,另一份以 HPV L1 C 末端保守序列多肽诱导的小鼠单克隆抗体运用免疫组化方法检测标本中的 HPV L1,比较两种方法检测结果的差异。**结果** 收集到的 384 例妇科门诊宫颈脱落细胞标本中, HPV 分型检测试剂盒检测出 HPV 阳性感染 63 例,阳性率为 16.41%(63/384);用免疫组化检测了其中 380 例标本,共检出阳性标本 120 例,阳性检出率为 31.58%(120/380),与 HPV 分型检测试剂盒检测结果相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 初步证明了 HPV L1 C 末端保守序列多肽诱导的小鼠单克隆抗体对宫颈脱落细胞内 HPV 的感染具有良好的检出能力,并且检测能力高于现临床所用的市售 HPV 分型检测试剂盒。该单克隆抗体在开发用于宫颈癌预防性筛查的 HPV 检测试剂盒方面具有一定的潜力。

[关键词] 人乳头瘤病毒;主要外壳蛋白;单克隆抗体;宫颈脱落细胞

[中图分类号] R 446.6; R 737.33

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)07-0858-05

L1 C-terminal conserved sequence polypeptide monoclonal antibody in detecting human papillomavirus in cervical exfoliated cells

CHENG Fan¹, LI Zhi-ying^{2*}, XIAO Chang-yi¹, WANG Le¹

1. Department of Histology and Embryology, College of Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Clinical Medicine College, China Three Gorges University, Yichang 443001, Hubei, China

[Abstract] **Objective** To observe whether the polypeptide monoclonal antibody induced by human papillomavirus (HPV) major capsid protein (L1) C-terminal conserved sequence polypeptide can be applied to detect HPV in cervical exfoliated cells. **Methods** Two copies of cervical exfoliated cells specimens were collected from the gynecology clinic, The Second Clinical Medicine College, China Three Gorges University; one was subjected to detection via Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit in the clinical laboratory of hospital, and the other was subjected to detection of HPV L1 via immunohistochemistry (IHC) with the mouse monoclonal antibody induced by HPV L1 C-terminal conserved sequence polypeptide. The detection results of HPV of the two methods were analyzed. **Results** In a total of 384 cervical exfoliated cell samples, 63 were found positive for HPV by the Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit, with a positive rate of 16.41% (63/384); while IHC identified 120 positive cases, with a positive rate of 31.58% (120/380), being significantly higher than that of the former method ($P<0.05$). **Conclusion** It is indicated that HPV L1 polypeptide mouse monoclonal antibody has a better detection performance for HPV infection in cervical exfoliated cells compared with Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit, and it may have a future in developing kit for the prevention screening of cervical cancer.

[Key words] human papillomavirus; major capsid protein; monoclonal antibody; cervical exfoliated cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(7): 858-862]

[收稿日期] 2016-01-23 **[接受日期]** 2016-04-15

[基金项目] 湖北省自然科学基金(2011CDC002). Supported by Natural Science Foundation of Hubei Province (2011CDC002).

[作者简介] 成帆,硕士生. E-mail: 15071798338@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0717-6554478, E-mail: zhiying9628@126.com

宫颈癌是导致女性死亡的第三大原因^[1]。世界范围大样本研究表明,几乎所有的宫颈癌及大多数宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)都存在人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染^[2-3]。宫颈癌的发生是一个多因素、多步骤、多基因共同作用的结果,从 HPV 感染到癌变形成需经历一个漫长的过程,大约需要 10~20 年,且感染大多呈潜伏状态,早期开展大规模 HPV 感染的筛查是预防宫颈癌发生的关键性措施。目前应用于临床预防宫颈癌筛查的方法有细胞病理学检测和分子生物学检测 2 种^[4],即基于薄层液基细胞学检测(TCT)系统进行的细胞病理学检测和以实时定量 PCR 和分子杂交为基础的分子生物学检测,但这 2 种方法都具有检测成本高、检测效率低、检测型别覆盖率不全面等缺点。因此,寻求一种高准确性、低成本、覆盖型别全面的检测方法很有必要。本课题组前期找到了一段可用于诱导识别所有 HPV 主要外壳蛋白(major capsid protein, L1)的抗体诱导物,是一段长 30 个氨基酸残基的多肽,位于 HPV L1 C 末端一段高度保守的序列内^[5-6],本研究基于本课题组前期对该 HPV L1 C 末端保守序列诱导的单克隆抗体检测能力的研究^[7],来探讨 HPV L1 C 末端共同序列诱导的单克隆抗体对宫颈脱落细胞内 HPV 的检测能力,探索研发用于临床筛查 HPV 广谱 ELISA 试剂盒的可行性。

1 材料和方法

1.1 HPV L1 C 末端共同序列多肽诱导的单克隆抗体的制备及其反应位点和效价的检测 委托上海耀强生物有限公司人工合成一段 30 个氨基酸长度的 HPV L1 C 末端保守序列多肽,序列为 EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLQAGLKAK,其 C 末端连接一个半胱氨酸得到 EC31,并合成以该保守序列为基础的 15 个氨基酸残基长、N 端起相互错开 5 个氨基酸残基的 4 个小肽(EF15、EK15、DA15、PK15)。单克隆抗体委托北京天成生物有限公司制备。方法简述如下:将合成的 EC31 分别与载体蛋白钥孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)偶联,形成 EC31-KLH(免疫抗原)和 EC31-BSA(检测抗原),将 EC31-KLH 溶于生理盐水中,加入等体积佐剂制成乳化剂,免疫雌性 BALB/c 小鼠,取免疫后的小鼠脾细胞,与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合,制备杂交瘤细胞株。采用 ELISA 方法筛选出阳性杂交瘤细胞株,经多次克隆获得稳定的单克

隆细胞株,以腹水瘤的形式生产抗体,对抗体进行纯化,得到 2 株纯化小鼠单克隆抗体 3A9 和 5A4,并且将以上抗体进行生物素化标记,形成生物素标记化单克隆抗体,检测 2 株单克隆抗体的反应位点及其效价,然后分装、冻干备用。

1.2 标本采集 收集 2014 年 4 月至 2015 年 6 月于三峡大学第二临床医学院妇科门诊进行宫颈脱落细胞 HPV 感染检查的剩余标本,均达到满意标本量。所有标本均来自妇科门诊首诊患者,均于-80℃保存备用。所有受检者在获取其标本之前均被告知研究意义,并签署患者知情同意书。

1.3 临床检验结果的取得 所有标本均经检验科使用广东凯普生物科技有限公司生产的 HPV 分型检测试剂盒(国药准字 S20060011)进行 HPV 分型检测,该分型检测试剂盒是已经获得国家批准的可以应用于临床检测的试剂盒,其能检出 21 种 HPV 型别(6、11、42、43、44、16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、CP8304)的感染。检验科 HPV 阳性检出结果包括阳性感染及其感染的型别。从病理科取得其中做过 TCT 检查标本的检查结果,TCT 诊断采用 2001 年国际癌症协会推荐的 TBS (the Bethesda system) 诊断标准,诊断包括:(1)无上皮内病变或恶性病变(NIML);(2)鳞状细胞异常,包括意义不明确的非典型鳞状细胞(ASC-US)、不典型鳞状细胞不能除外高级别鳞状上皮内病变(ASC-H)、低级别鳞状上皮内病变(LSIL)、高级别鳞状上皮内病变(HSIL)、鳞状细胞癌(SCC);(3)腺细胞异常(AGUS);(4)腺癌(AC)。

1.4 宫颈脱落细胞标本免疫组化检测 将宫颈脱落细胞保存液离心,取脱落细胞,PBS 清洗 3 次,均匀滴在免疫组化防脱载玻片上,室温晾干,75%乙醇固定,3% H₂O₂ 处理内源性过氧化物酶,5%牛血清白蛋白室温封闭。采用 1:2 000 稀释的生物素标记的小鼠单克隆抗体 3A9 和 5A4 混合作为一抗,4℃过夜,PBS 冲洗,加入 1:5 000 稀释的亲的和素标记的辣根过氧化物酶,DAB 显色,苏木精复染细胞核,最后洗涤、脱水、透明、树胶封片,显微镜观察,留图。用生殖器尖锐湿疣病理切片作为免疫组化阳性对照。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理,计数资料以率(百分比)表示,组间差异的比较采用 χ^2 检验和 Kappa 一致性检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HPV L1 C 末端共同序列多肽诱导的单克隆抗体的反应位点和效价 经北京天成生物有限公司 ELISA 方法检测,纯化单克隆抗体 3A9 的效价为 1:640 000(D 值 1.372 2),5A4 效价为 1:640 000 (D 值 1.390 0)。经小肽封闭实验检测 3A9 的反应位点和 5A4 的反应位点,3A9 反应表位在 DA15 和 PK15 氨基酸序列区间内,而 5A4 反应表位在 EK15 和 DA15 的氨基酸序列区间内。

2.2 检验科分型检测试剂盒检测结果 共收集到 384 例临床标本,患者年龄为 18~76 岁,集中于 25~50 岁(占 86.46%,332/384)。检验科 HPV 分型检测试剂盒测得阳性例数为 63 例,阳性检出率为 16.41%(63/384)。

2.3 病理科 TCT 检测结果 在 384 例标本中,做过 TCT 检查的标本数为 339 例,患者年龄为 21~76 岁,集中于 30~55 岁(占 82.60%,280/339)。诊断为宫颈病变者 15 例,检出率为 4.42%(15/339),

其中 ASC-US 11 例、LSIL 3 例、HSIL 1 例,未见腺细胞异常和宫颈癌病例。

2.4 检验科分型检测试剂盒检测 TCT 阳性标本结果 这 15 例细胞学阳性患者,临床医院检验科应用 HPV 分型检测试剂盒检测阳性例数为 6 例(ASC-US 3 例,LSIL 2 例,HSIL 1 例),总检出率为 40.00%(6/15),其中 ASC-US 检出符合率 27.27%(3/11)、LSIL 检出符合率 66.67%(2/3)、HSIL 检出符合率 100%(1/1)。

2.5 光镜免疫组化方法检测标本 HPV 感染结果 共对 380 例宫颈脱落细胞标本进行了免疫组化检测,共检测出 120 例 HPV 阳性标本,HPV 总检出率为 31.58%(120/380),对 HPV 分型检测试剂盒检出阳性的 61 例标本以单克隆抗体进行免疫组化检测,阳性例数为 56 例,符合率为 91.80%(56/61)。有 HPV 感染的阳性细胞表现为细胞核或者胞质着色,呈黄褐色,且细胞核常较大,或呈异形性。无 HPV 感染的细胞为阴性反应,胞质不着色,或颜色浅淡,细胞核小,且呈蓝色(图 1)。

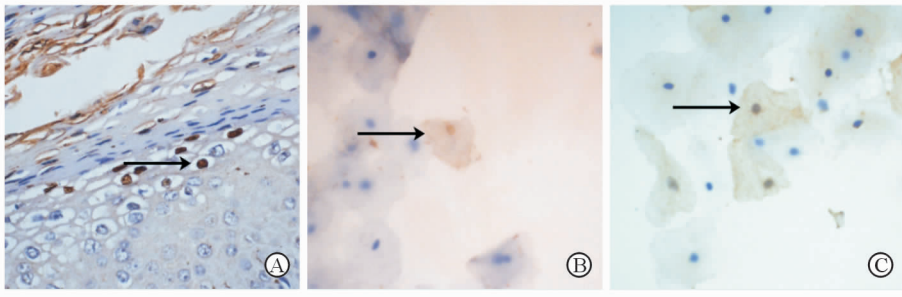


图 1 生殖器疣及宫颈脱落细胞标本的免疫组织化学检测

Fig 1 Immunohistochemical staining of genital condyloma acuminatum and cervical exfoliated cell specimens

A: The positive control of paraffin section for genital condyloma acuminatum; B: The smear of cervical exfoliated cells which Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit shows positive (type 39) and TCT shows negative; C: The smear of cervical exfoliated cells which Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit shows negative and TCT shows LSIL. Black arrows indicate HPV-positive cells. TCT: ThinPrep cytology test; LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion. Original magnification: $\times 400$

2.6 TCT 阳性细胞的免疫组化检测结果 进行免疫组化检测的 380 例标本中,有 14 例 TCT 检查阳性标本,免疫组化方法检测阳性例数为 10 例,检出率为 71.43%(10/14);对这 14 例 TCT 异常标本而言,HPV 分型检测试剂盒阳性检出例数为 5 例,并且这 5 例阳性标本应用免疫组化检测也全部是阳性;另外这 14 例标本通过免疫组化均可看出细胞病理学有异常(表 1)。说明免疫组化对 TCT 阳性标本的检出符合度高于分型检测试剂盒。病变标本的免疫组化结果见图 2。其余 4 例免疫组化检测阴性的标本,HPV 分型检测试剂盒检测也为阴性,但其免疫组化涂片染色结果也显示出细胞形态的改变。

表 1 TCT 阳性细胞的免疫组化检测结果

Tab 1 The detection result of TCT positive specimens by IHC

Category	N=380		
	TCT positive n	IHC positive n(%)	IHC cytology abnormality n(%)
HSIL	1	1(100.0)	1(100)
LSIL	3	2(66.7)	3(100)
ASC-US	10	7(70.0)	10(100)
Total	14	10(71.43)	14(100)

TCT: ThinPrep cytology test; IHC: Immunohistochemistry; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion; ASC-US: Atypical squamous cell of undetermined significance

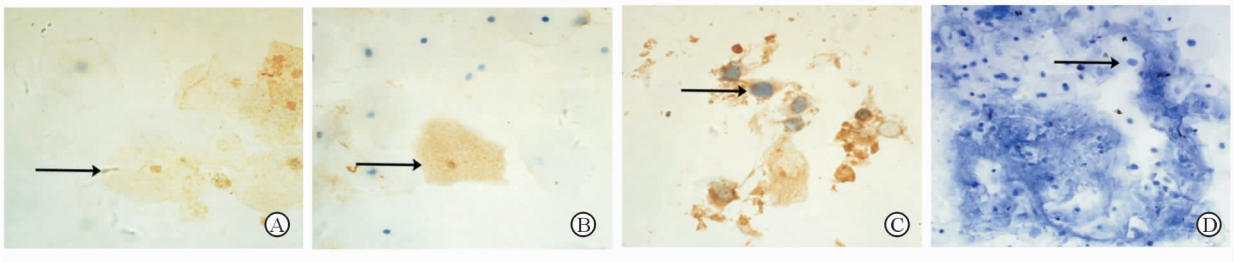


图2 TCT阳性标本的免疫组化检测

Fig 2 Immunohistochemical staining of the TCT positive specimens

A: Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit shows positive (type 52) and TCT shows LSIL; B: Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit shows negative and TCT shows ASC-US; C: Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit shows positive (type 52) and TCT shows HSIL; D: Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit shows negative, immunohistochemical staining shows negative and TCT shows LSIL. Black arrows indicate HPV-positive cells in A, B, and C, and indicate HPV-negative cells in D. TCT: ThinPrep cytology test; LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion; ASC-US: Atypical squamous cell of undetermined significance; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion. Original magnification: $\times 400$ (A-C), $\times 200$ (D)

2.7 统计学分析结果 经 χ^2 检验分析,分型检测试剂盒检测和免疫组织化学检测对宫颈脱落细胞标本内 HPV 检查结果差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。两种结果进行 Kappa 一致性分析,得到 Kappa=0.52。

表 2 免疫组化法检测结果与分子生物学检测结果比较

Tab 2 Comparison of IHC detection result and Human Papillomavirus Genotyping Diagnosis Kit result

IHC	Parting detection kit		Total
	Positive	Negative	
Positive	56	64	120
Negative	5	255	260
Total	61	319	380

IHC: Immunohistochemistry

3 讨论

宫颈癌是妇科常见恶性肿瘤之一,目前的统计数据显示宫颈癌已经成为继乳腺癌之后第二大威胁女性生命的恶性肿瘤,在某些发展中国家甚至超过乳腺癌位于第一位。全世界每年约有 371 200 例新发病例,其中 80% 在发展中国家。我国宫颈癌的发生率和死亡率约占全世界的 1/3,每年平均有 132 300 例新发宫颈癌患者,总发病率为 0.27%^[8]。

西方发达国家由于经济条件允许,可以广泛开展 HPV 感染的分子生物学筛查。据报道发达国家通过有组织的宫颈癌筛查,使宫颈癌发病率减少 30%~60%^[9]。现已上市的检测 HPV 的方法有多种,如二代杂交捕获(HC II)技术、PCR 或基因芯片

技术等,但是由于 HPV 基因变异的问题,新的 HPV 型别还在不断出现,现有的型别又在不断变异^[10-11],以通用性引物为基础的 PCR 检测出现漏检和错检是很正常的。也就是说现今商用的分子生物学检测没有一个能做到型别全覆盖,经常出现错检、漏检。因此,寻求一种高准确性、低成本、覆盖型别全面的检测方法很有必要。

本课题组前期研究对由 HPV L1 C 末端共同保守序列多肽制备的抗 HPV L1 单克隆及多克隆抗体采用 ELISA、蛋白免疫印迹法及免疫组织化学方法,分别从免疫学和形态学角度对抗体的检测能力进行了鉴定,结果证实这些单克隆抗体或多克隆抗体可以特异性地检测出多型别的 HPV L1,对型别相同的 HPV 其检测能力与市售的多价抗 HPV L1 单克隆抗体(Millipore 公司生产,可检测 HPV 1、6、11、16、18、31 型别)基本相当^[7]。

本研究按国家免疫组织化学检测试剂盒制备规范要求,采用 HPV L1 C 末端共同序列诱导的 2 种不同反应位点的生物素标记单克隆抗体 3A9 和 5A4 混合作为检测抗体,进行直接法的免疫组化检测,并采用高敏感性的生物素-亲和素系统显色。作为由 HPV 感染的鳞状上皮的良性病变,尖锐湿疣在上皮的表层有晚期蛋白 L1 和 L2 的表达,用以组装形成完整的病毒颗粒^[12],因此,尖锐湿疣可以作为良好的 L1 表达阳性对照。本研究用于对照的基于 PCR 技术的广东凯普生物科技有限公司生产的 HPV 分型检测试剂盒是已经获得国家批准的可以应用于临床检测的试剂盒,我们选择该试剂盒作为检测的金标准,以检测我们制备的单克隆抗体对有

HPV 感染的临床标本的 HPV 检测能力。检测结果显示,受检标本及阳性对照标本中某些细胞细胞核和(或)胞质被染成黄褐色,与邻近正常细胞相比差异明显,说明反应是特异性的,这些细胞有 HPV L1 蛋白表达。在本实验中可见以细胞病理学的检测结果为对照,凡是 TCT 检测阳性的标本,只要 HPV 分型检测试剂盒检测为阳性,本组单克隆抗体免疫组化检测也全部是阳性;免疫组化检测阳性的 TCT 标本,即便是分型检测结果为阴性,其细胞病理学均有异常。说明本组抗体既与 HPV 分型检测试剂盒有很高的检出一致性,也与 TCT 细胞病理学的检测结果高度符合。因此,本组抗体的免疫组化结果具有较高的可信度。单克隆抗体的检出率高于分型检测试剂盒的检出率,2 种检测方法相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。对这 2 种检测方法结果进行 Kappa 一致性分析,虽然一致性一般,但是这是由于 2 种检测方法差异具有统计学意义造成的。另外本实验标本 HPV 阳性检出率明显高于 HPV 分型检测试剂盒的检出率,分析差异如此明显的原因,可能系 HPV 分型检测试剂盒能够检出的型别有限。而本研究的免疫组织化学检测方法标本处理简单,抗原损失少,且本抗体为广谱 HPV 检测抗体,故阳性检出率相对较高。此外,本实验应用单克隆抗体免疫组化方法既可以检出 HPV 的感染,又可以清楚看到宫颈脱落细胞的形态改变,包括细胞大小、细胞核的大小、细胞形状等形态方面的改变,可以为宫颈脱落细胞的筛查提供 HPV 检测和细胞病理形态双重诊断依据。

综上所述,本研究初步证实本研究制备的单克隆抗体对宫颈脱落细胞内的 HPV 具有良好的检出能力,同时,对多型别 HPV 具有良好的广谱性反应能力。这一结果为后继研制经济、高效、广覆盖的 HPV 筛查试剂盒奠定了良好的基础。

[参考文献]

- [1] ZAGOURI F, SERGENTANIS T N, CHRYSIKOS D, FILIPITS M, BARTSCH R. Molecularly targeted therapies in cervical cancer. A systematic review[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 126: 291-303.
- [2] SÁNCHEZ-LANDER J, CORTIÑAS P, LOUREIRO C L, PUJOL F H, MEDINA F, CAPOTE-NEGRÍN L, et al. Human papillomavirus in invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 in venezuela: a cross-sectional study [J]. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36: e284-e287.
- [3] DE S S, QUINT W G, ALEMANY L, GERAETS D T, KLAUSTERMEIER J E, LLOVERAS B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11: 1048-1056.
- [4] KITCHENER H C, ALMONTE M, GILHAM C, DOWIE R, STOYKOVA B, SARGENT A, et al. ARTISTIC: a randomised trial of human papillomavirus (HPV) testing in primary cervical screening[J]. *Health Technol Assess*, 2009, 13: 1-150, iii-iv.
- [5] 姜波玲,肖长义,叶红. HPV L1 共同保守序列多肽对多价性 HPV 阳性临床标本的检测[J]. *肿瘤*, 2008, 28: 864-868.
- [6] 孙伟,肖长义,李志英,叶红,王雅琴,袁太宁,等. L1 C-末端共同序列多肽抗体检测宫颈液基细胞学标本中人乳头瘤病毒[J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35: 873-878.
SUN W, XIAO C Y, LI Z Y, YE H, WANG Y Q, YUAN T N, et al. L1 C-terminal common sequence polypeptide antibody in detecting human papillomavirus in liquid-based cervical cytology specimens[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2014, 35: 873-878.
- [7] 孙金娥,肖长义,付冰冰,李志英,叶红,黎家华,等. 抗 HPV L1 小鼠单克隆抗体及兔多克隆抗体的制备[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29: 1079-1083.
- [8] WU Y, CHEN Y, LI L, YU G, ZHANG Y, HE Y. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China[J]. *Clin Virol*, 2006, 35: 264-269.
- [9] PARKIN D M, BRAY F J, FERLAY J, PISANI P. Global cancer statistics, 2002 [J]. *CA Cancer Clin*, 2005, 55: 74-108.
- [10] BELLO B, SPINILLO A, ALBERIZZI P, CESARI S, GARDELLA B, SILINI E M. Time trends of human papillomavirus type distribution in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 115: 262-266.
- [11] FREITAS A C, GURGEL A P, CHAGAS B S, COIMBRA E C, DO AMARAL C M. Susceptibility to cervical cancer: an overview[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 126: 304-311.
- [12] DOORBAR J, QUINT W, BANKS L, BRAVO I G, STOLER M, BROKER T R, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses [J]. *Vaccine*, 2012, 30(Suppl 5): F55-F70.

[本文编辑] 尹茶