



E7蛋白检测技术在宫颈癌早期筛查中的应用

简介

宫颈癌是中国女性第二大最常见的恶性肿瘤，也是发展中国家女性癌症死亡的主要原因。我国每年新增宫颈癌病人13万多，每年约有5万人死于宫颈癌，且发病年龄明显趋于年轻化，35岁以下的宫颈癌病例出现上升趋势，严重危害妇女健康，因此宫颈癌的筛查和预防具有重要意义。

宫颈癌的发展一般需要10年左右时间，在这期间，若能及早发现癌前病变，就可以有效预防癌症的发生。《2015年美国癌症筛查指南》推荐：

1) 21-29岁女性，应单独进行宫颈细胞学检查，每3年1次；

2) 30-65岁女性，优先推荐细胞学和HPV联合筛查，每5年1次，也可每3年1次细胞学筛查；

3) 对于前10年内细胞学检测连续3次阴性或细胞学和HPV联合筛查连续2次阴性且最后一次筛查在5年内的女性，65岁后应停止任何形式的筛查；

4) 任何年龄段都不需要通过任何方式每年筛查。

目前临床常用的宫颈癌筛查方法包括：传统的巴氏细胞学检测、液基薄层细胞涂片、HPV DNA分子检测等。近年来，宫颈癌筛查出现了一系列新技术包括：HPV mRNA检测、“替代性生物标志物”（surrogate marker）检测等。

E7癌蛋白的表达和功能是宫颈癌发生和发展的重要条件

大量研究发现，人乳头瘤病毒（Human papilloma viruses, HPV）与宫颈癌发生发展关系密切，是所有宫颈鳞状细胞癌（SCC）和大部分宫颈腺癌的致癌病原体。目前已经有200多种的HPV亚型被鉴定^[1]，根据其致癌性分为高危型HPV（hrHPV）和低危型HPV（lrHPV），其中14种主要高危型HPV与宫颈癌的发生和演变有关。虽然HPV感染的人群比例很大，但HPV感染不等于宫颈癌，一过性的阳性携带者中80%以上在6到12个月内会自然清除，只有很少一部分会进展到宫颈病变或癌症。持续性的hrHPV感染，使病毒基因得以整合到人体细胞基因组内，启动病毒致癌基因E6，E7蛋白表达。E6，E7蛋白被证明是驱动宫颈癌发展的主要致癌因子^[2, 3]。高表达的E7蛋白与Rb结合使Rb-E2F复合物解离，E2F从pRb蛋白中释放，Rb通路失控，反馈刺激p16INK4A、Ki67、细胞周期蛋白A（CyclinA）和细胞周期蛋白E（CyclinE）等在内的众多细胞增殖相关基因的表达，使宫颈上皮细胞的细胞周期发生紊乱。因此，“E7蛋白表达是维持宫颈癌及其高级别癌前病变发展必需的。”——E7蛋白表达与宫颈癌发展存在因果关系。

细胞学诊断技术进展

自Papanicolaou发明巴氏涂片法以来，巴氏涂片细胞学检查作为宫颈癌的筛查方法已有70多年的历史，作为第一代细胞学检测技术巴氏涂片的假阴性率在50%以上；而本世纪初以液基细胞学（liquid based cytology）为代表的第二代细胞学检测技术改善了样本的制片质量，但检测灵敏度在50~70%之间仍不能满足临床需求；以免疫细胞学（immuno-cytology）为代表的第三代细胞学检测技术，代表性产品为罗氏的CINtec PLUS（p16INK4A/Ki67双染），据PALMS研究报道，p16INK4A/Ki67的灵敏度能够达到85%以上^[4]。这些替代性的蛋白标志物在正常宫颈细胞中也有内源性表达，由此影响了它们在宫颈癌诊断方面的应用。而仅在高危型HPV转化的宫颈癌细胞中表达的E7癌蛋白无疑是宫颈癌早期诊断的理想标志物^[5]。

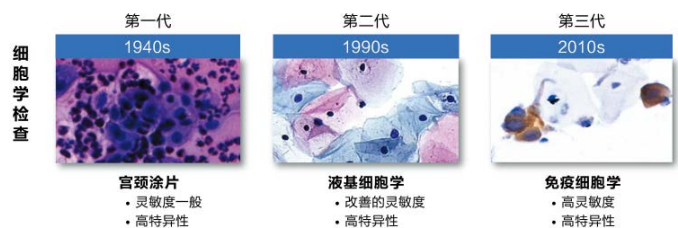


图1 细胞学诊断技术发展三阶段

E7蛋白标志物在细胞学上的应用

E7-ICC是针对宫颈上皮脱落细胞中来自于HPV基因编码的 E7癌蛋白表达的临床检测新方法，通过使用E7单克隆抗体，能够特异性识别表达 E7蛋白的癌变细胞（试验操作过程如图2所示）。检测结果在细胞样本中出现明显的棕色胞质染色，即可认为该细胞为E7-ICC阳性染色。（临床实验室2016年第9期）。

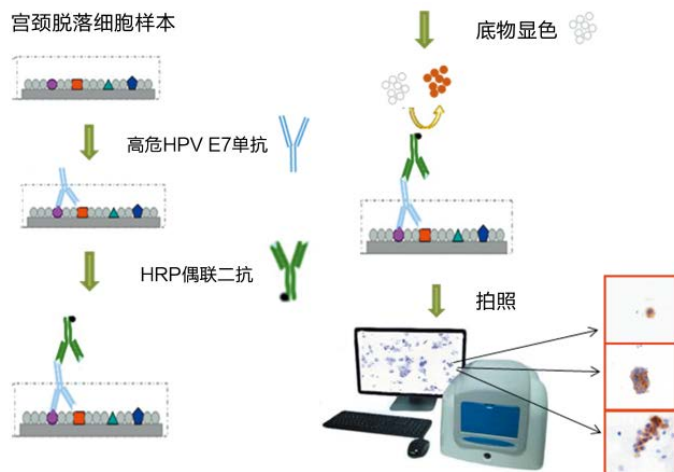


图2 E7-ICC技术试验程序

采用的液基细胞学制片技术评估E7-ICC技术的临床应用。图3中阳性对照采用高级别鳞状上皮内病变（HSIL）的临床样本，阴性对照为未见上皮内病变（NILM）的正常宫颈上皮细胞临床样本。结果如图所示：在表达E7蛋白的转化细胞中呈现棕色染色，且定位于形态学为HSIL的细胞中（图3A，C）；而在NILM的样本中未检测到E7单抗的染色。值得注意的是，E7癌蛋白是否表达可以用来评估LBC报告（如HSIL，LSIL和ASC-US等）中不同级别宫颈损伤程度的恶变倾向，证明了使用特定的生物标志物解释细胞学结果的可行性。这对于细胞形态学某些不确定病例的分流是非常有必要的，例如ASC-US。如图3E所示：该病例传统细胞学报告为ASC-US，在癌前病变细胞中检测除了E7癌蛋白的表达。

另外，E7-ICC检测技术与目前市场上绝大部分的国产（安必平、泰普、迪安、迪艾、宝太等）或进口的液基细胞固定液（新柏氏、碧迪）是兼容的。同时，E7-ICC技术也可以直接应用于传统方法制作的巴氏涂片。

E7蛋白标志物在组织学上的应用

E7-IHC 检测方法原理与E7-ICC相同，但需要不同的抗体试剂配方。经抗体特异性结合E7抗原靶点，并在酶联二抗的催化作用下使底物显色，宫颈组织癌变细胞中出现明显的棕色颗粒状胞质染色，即可认为该细胞为E7-IHC阳性染色。

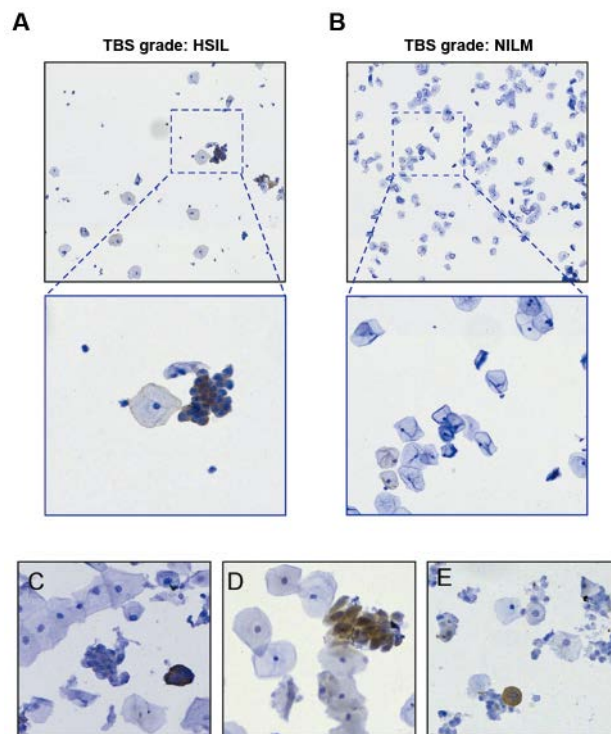


图3 鳞状上皮细胞E7-ICC检测结果图例

(A, B)：E7单克隆抗体在HSIL样本中使癌变细胞染色（A），但在NILM样本中无染色（B）。
(C-E)：E7单克隆抗体在不同损伤级别宫颈细胞中的染色。HSIL（C），LSIL（D），ASC-US（E）。

为进一步验证E7抗体检测技术可以特异性识别宫颈癌细胞中的E7蛋白分子，艾托金研究组研究了E7单克隆抗体原位染色与RNA原位杂交（In situ hybridization, ISH）的平行对照分析。证实了在E7阳性的相同的组织样本中同时存在HPV基因的mRNA表达。如图4所示，E7单克隆抗体和E7 mRNA探针在载玻片上的染色位点或区域显示相似的定位，即在这组试验中，E7 mRNA与抗体染色反应的E7蛋白强度和定位一致。这些数据进一步证实了E7单克隆抗体对于宫颈病变组织中内源肿瘤抗原蛋白E7的结合具有高度特异性。

宫颈癌临床诊断及治疗的“金标准”为病理诊断。为了评估E7抗体在宫颈组织病理诊断中的应用可行性，采用抗E7兔单克隆抗体试剂与宫颈癌替代性标志物p16^{INK4A}进行了平行对比试验。如图5所示：兔抗E7单抗在宫颈组织顶部的癌变细胞胞质中呈现棕色颗粒状染色，而在底部正常组织中无染色。另外，在不同级别的癌前病变或癌变组织中，E7单克隆抗体染色模式与p16^{INK4A}抗体一致（图5A，5B）。随着病变程度的增加，E7阳性细胞增多，即E7蛋白表达量与宫颈上皮癌变发展程度呈正相关性。E7和p16^{INK4A}抗体在阳性和阴性临床样本中的染色模式基本相似，明显的不同之处在于p16^{INK4A}抗体在形态学正常的宫颈细胞中呈现局灶性染色，而E7抗体呈现大体

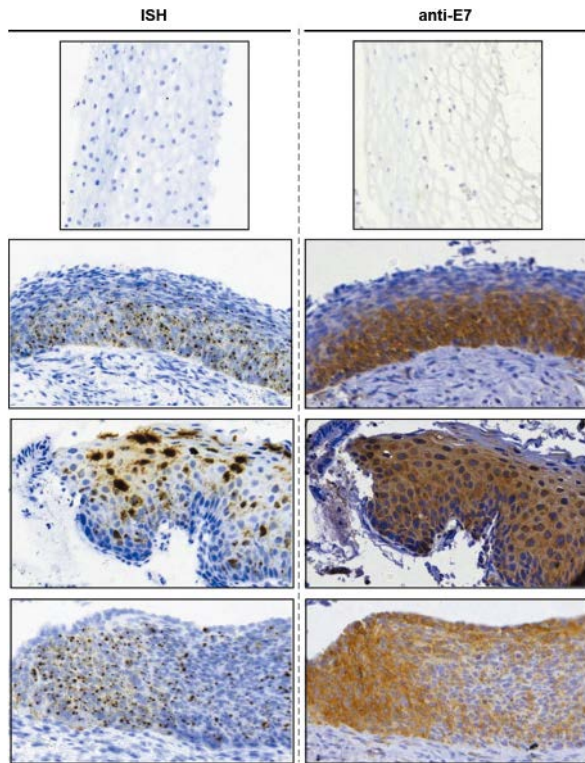


图4 宫颈病变组织ISH和IHC检测结果

宫颈癌组织的相邻切片分别采用以E7 mRNA为探针的原位杂交（左图）或E7-IHC技术（右图）进行检测。顶部正常宫颈组织为两种检测的阴性对照。

与之相似的染色模式但对宫颈癌变细胞具有更为显著的特异性（图5B CIN1）。

为了评估E7-IHC在大样本上的检测性能，我们收集了116例具有病理报告的临床样本进行双盲试验，p16^{INK4A}也同时进行了平行试验，采用病理诊断金标准作为仲裁。结果如表1所示：E7免疫染色在LSIL，HSIL和SCC中呈现上升的阳性率，分别为31.1%，90.6%和100%。p16^{INK4A}染色组结果与E7染色组相似。这些结果表明这两种蛋白标志物在宫颈癌检测方面呈现高度的重叠性。

表1. E7和p16^{INK4A}单克隆抗体IHC结果

蛋白表达		LSIL		HSIL		SCC	
		例数	(%)	例数	(%)	例数	(%)
E7	阴性	31	(68.9%)	6	(9.4%)	0	(0%)
	阳性	14	(31.1%)	58	(90.6%)	7	(100%)
	合计	45		64		7	
p16 ^{INK4A}	阴性	35	(77.8%)	4	(6.3%)	0	(0%)
	阳性	10	(22.2%)	60	(93.7%)	7	(100%)
	合计	45		64		7	

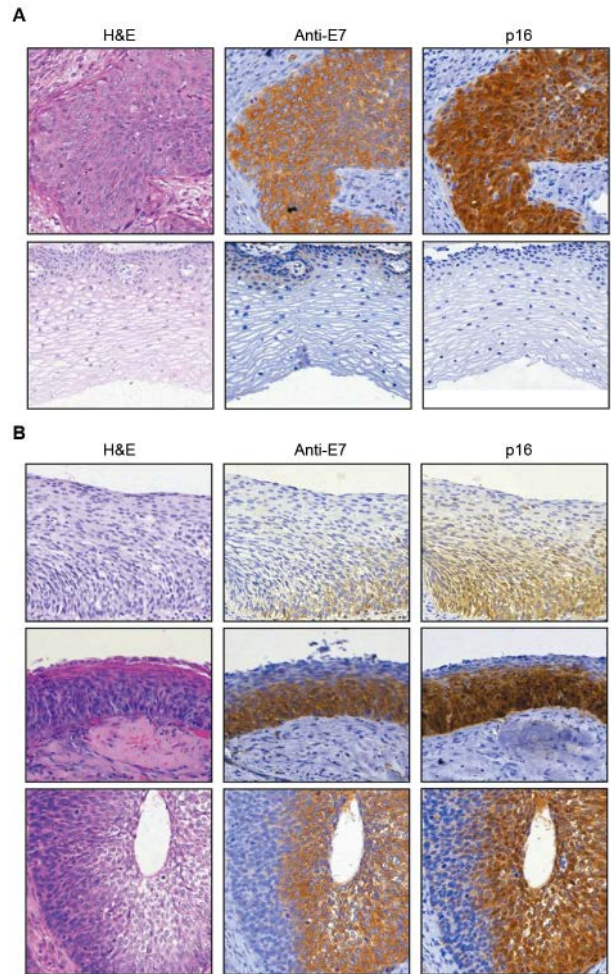


图5 E7和p16^{INK4A}抗体免疫组化染色结果图例

- (A)：E7和p16^{INK4A}染色的宫颈癌组织（顶部）和未染色的正常宫颈组织（底部）。
- (B)：E7和p16^{INK4A}检测的代表性样本CIN1（顶部），CIN2（中部），CIN3（底部）。最左侧为传统的H&E染色结果。

结束语：

根据中国全国肿瘤登记中心发布的数据，2015年中国宫颈癌的发病率为15/100,000，这仍然是威胁中国妇女健康的主要恶性肿瘤之一^[6]。宫颈癌是目前唯一可以早期预防和治愈的癌症，巴氏涂片和液基细胞学的应用极大的降低了宫颈癌的发病率和死亡率。然而细胞学检测结果的低灵敏度限制了细胞学作为初筛的有效手段。有研究报道巴氏涂片和液基细胞学的灵敏度和准确性在不同地域和研究机构中存在较大的差异，从30~87%^[7]。一项大样本研究表明30~60%的宫颈浸润癌在3~5年前的巴氏检测结果正常，表明宫颈细胞学检测存在较差的阴性预测值（negative predictive value, NPV）^[8]。相反的，HPV分子检测大大提高了检测灵敏度，但是存在较低的特异性和低的阳性预测值（positive predictive value, PPV）^[9, 10]。

宫颈病变早期诊断迫切需要及时发现癌前病变，同时避免HPV一过性感染、ASC-US和LSIL的过度诊断和/或治疗。

HPV E7蛋白在病变宫颈细胞中会高度特异性表达，目前已被公认为是检测宫颈癌的合适的候选生物标志物。多篇研究报道过使用多克隆或单克隆抗体检测E7蛋白的技术。Maria Lidqvist和Olle Nilsson等人描述了HPV E7蛋白的小鼠单克隆抗体的制备方法，并将其用于LBC载玻片样本的检测。但是，目前尚未见报道其临床评估的数据。Valentina Faoro等人也制备过一种新的E7抗体，但其仅报道了少量的抗体性质数据，并且此抗体在LSIL和HSIL组别的结果无显著性差异。总之，现有的报告缺乏对E7抗体特异性的全面研究，亦未建立一项以E7蛋白作为生物标志物进行诊断性检测的有效方法。

本研究建立了一种可以制备特异性识别HPV 16、HPV 18以及其他高危型HPV E7蛋白的单克隆抗体的方法，为临床上对宫颈病变的筛查工作提供一种全新技术方法。为了制备这些单克隆抗体，使用HPV 16、HPV 18等亚型的E7蛋白抗原免疫小鼠和兔，利用对包括HPV 16、HPV 18在内的多种高危型HPV病毒型别（HPV31，33，35，39，45，52，58和59）E7蛋白的特异性结合来筛选、鉴定和纯化单克隆抗体。证实了这些选择性的单克隆抗体可以特异性结合人类宫颈癌细胞（CaSki，HeLa，SiHa）中内源性的HPV E7蛋白。最后，我们通过ICC或IHC方法测试液基细胞学载玻片和FFPE组织载玻片中的细胞内源E7蛋白，结果表明了E7单克隆抗体在临床样本中能特异性识别表达E7的宫颈细胞。有意思的是我们在ASC-US样本的研究结果提示了基于E7蛋白的细胞学早期筛查是一项极具潜力的辅助手段。

我们还注意到，在IHC分析中，E7抗体诊断试剂结果与p16^{INK4A}免疫染色有较强的一致性，表明使用E7蛋白作为鉴定宫颈癌前病变的特异性生物标志物的可行性。

综上所述，HPV病毒基因组编码的 E7蛋白只在病变的人类细胞中表达，是早期检测癌前病变的理想生物标志物。E7蛋白表达的检测可以有效区分恶性病变与短暂一过性HPV感染。本文所述E7蛋白鉴定技术可应用于ICC和IHC检测，并提供更可靠的临床检验结果，以提高宫颈癌筛查和早期诊断的效率。

参考文献

1. Parkin DM, B.F., Devesa S S., Cancer burden in the year 2000. The global picture. . Eur J Cancer, 2001. 37(8): p. 4-66.
2. Gravitt, P.E., The known unknowns of HPV natural history. J Clin Invest, 2011. 121(12): p. 4593-9.
3. Yugawa, T.a.T.K., Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. . Rev Med Virol, 2009. 19 (2): p. 97-113.
4. Bergeron C, I.H., Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, Alameda F, Keller T, Rehm S, Ridder R; , PALMS Study Group. Prospective evaluation of p16 INK4a/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. Cancer Cytopathol. , 2015. 123(6): p. 373-81.
5. Stiasny, A., et al, Immunohistochemical Evaluation of E6/E7 HPV Oncoproteins Staining in Cervical Cancer Anticancer Res, 2016. 36(6): p. 3195-8.
6. Chen, W., et al., Cancer statistics in China 2015. CA Cancer J Clin, 2016. 66(2): p. 115-32.
7. Nanda, K., et al., Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. Ann Intern Med, 2000. 132(10): p. 810-9.
8. Katki, H.A., et al., Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. Lancet Oncol, 2011. 12(7): p. 663-72.
9. Goodman, A., HPV testing as a screen for cervical cancer. Bmj, 2015. 350.
10. Zazove, P., et al., Low false-negative rate of PCR analysis for detecting human papillomavirus-related cervical lesions. J Clin Microbiol, 1998. 36(9): p. 2708-13.

■ 艾托金生物医药（苏州）有限公司 供稿