

宫颈病变细胞中 L1 壳蛋白表达检测的临床意义

叶廷军 樊绮诗 蔡祺 陆盈 林佳菲

作者单位:200025 上海市,上海交通大学附属瑞金医院检验科

通讯作者:樊绮诗, E-mail: rjyk@yahoo.com.cn

【摘要】 目的 探讨乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染宫颈上皮细胞病变中 L1 壳蛋白表达测定及其对提示有无宫颈癌的发生及病变进展的临床意义。**方法** 选取 20 例健康体检者的宫颈细胞样本作为对照组, 182 例不同级别宫颈病变的宫颈细胞样本为病例组, 分别做 L1 壳蛋白免疫组织化学染色、提取 DNA 做 HPV-PCR 荧光检测。**结果** 对照组的 L1 壳蛋白检测及 HPV-PCR 检测均呈阴性。182 例患者标本中的 L1 壳蛋白表达为阳性结果显示:未见明显宫颈细胞学病变组(Non-SIL)为 29 例,总阳性率 34.5%(29/84);低度宫颈鳞状上皮细胞病变组(LSIL)为 26 例,总阳性率 47.2%(26/55);高度宫颈鳞状上皮细胞病变组(HSIL)为 9 例,总阳性率 31.0%(9/29);宫颈癌组(SCC)1 例,总阳性率为 6.6%(1/15)。HPV-PCR 检测阳性结果显示:Non-SIL 组为 32 例,阳性率 38.0%(32/84);LSIL 组为 30 例,阳性率 54.5%(30/55);HSIL 组为 10 例,阳性率 34.5%(10/29);SCC 组为 3 例,阳性率 20.0%(3/15)。在各组中 L1 壳蛋白检测及 HPV-PCR 检测阳性率差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。二者对于检测高危型 HPV 感染的病例较为敏感, L1 壳蛋白及 HPV-PCR 的检测阳性率随病变早期表达呈上升趋势, 晚期呈明显下降。高危型的 L1 壳蛋白表达及 HPV-PCR 阳性率结果高于低危型及混合型。**结论** HPV L1 壳蛋白的表达与宫颈病变程度有关, 可以作为宫颈癌癌前病变的随访指标。

【关键词】 人乳头瘤病毒; L1 壳蛋白; 免疫组织化学; 宫颈癌

Expression significance of L1 capsid protein in cervical lesion cells

YE Ting-jun, FAN Qi-shi, CAI Qi, et al. Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University of Medicine, Shanghai 200025, China

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of the expression of L1 capsid protein in cervical lesion cells which infected with human papilloma virus(HPV), for the prevention of cervical cancer and suggestion of progression and probability of potential lesions. **Methods** Cervical cell samples of 20 normal physical examination people and 182 different levels of cervical lesion patients were collected. Immunohistochemical staining for L1 capsid protein and DNA extraction followed by HPV-PCR fluorescent detection were employed. **Results** Both L1 capsid protein detection and HPV-PCR test were negative in the normal group. The positive rates of the expression of L1 capsid protein in 182 patients showed that, in 84 cases of no significant cervical cytology lesions (Non-SIL), the total positive rate was 34.5%(29/84); in 55 cases of low-grade cervical squamous cell lesions (LSIL), the total positive rate was 47.2%(26/55); in 29 cases of high-grade cervical squamous cell lesions (HSIL), the total positive rate was 31.0%(9/29); in 15 cases of cervical cancer (SCC), the total positive rate was 6.6%(1/15). HPV-PCR assays showed that, in 84 cases of Non-SIL, the positive rate was 38.0%(32/84); in 55 cases of LSIL, the positive rate was 54.5%(30/55); in 29 cases of HSIL, the positive rate was 34.5%(10/29); in 15 cases of SCC, the positive rate was 20.0%(3/15). There were statistical significance in the difference of detecting positive rate among different groups in L1 capsid protein detection and HPV-PCR detection($P < 0.01$). Collectively, the detection results of L1 capsid protein and HPV-PCR were on the rise in the early phase of cervical lesion, however, declining in the late phase of cervical lesion. And the L1 capsid protein expression and HPV-PCR positive rate in high risk group were higher than that of in the low-risk group and compound group. **Conclusion** The expression of HPV L1 capsid protein associates with the degrees of cervical lesion, which may serve as an indicator of cervical precancerous lesions of the follow-up.

【Key words】 Human papilloma virus; L1 capsid protein; Immunohistochemistry; Cervical carcinoma

L1 壳蛋白是人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)合成的晚期蛋白, 仅在病毒壳粒装配阶

段表达, 因此该蛋白可能作为判断 HPV 是否处于活跃复制阶段的标志^[1,2]。本文通过研究 L1 壳蛋白表

达探讨宫颈病变感染 HPV 和宫颈癌发生的关系,为预防宫颈癌的发生、发展提供一个较为客观的早期诊断指标。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集我院 2009 年 2 月至 2009 年 5 月期间于妇产科门诊及病房做 HPV DNA 检查宫颈液基细胞学的患者 182 例,年龄为 23~73 岁。其中未见明显宫颈细胞学病变患者 (Non-SIL 组) 83 例,低度宫颈鳞状上皮细胞病变患者 (LSIL 组) 55 例,高度宫颈鳞状上皮细胞病变患者 (HSIL 组) 29 例;宫颈癌患者 (SCC 组) 15 例。每位患者采集两份宫颈标本,一份做 HPV L1 壳蛋白免疫组化染色和 HE 染色,进行 HPV L1 壳蛋白表达的观察,另一份标本作 HPV-PCR 核酸检测。实验根据宫颈病变感染情况分为高危型、低危型、混合型。选取我院正常妇科体检标本 20 例作为对照组,年龄 25~50 岁。

1.2 试剂和仪器 HPV-PCR 荧光检测试剂盒为深圳港龙生物技术有限公司产品。L1 壳蛋白 CytoReAct 赛泰-细胞/组织试剂盒由美国爱迪旺斯医疗科技责任有限公司提供。PCR 检测仪为瑞士 ROCHE LightCycler 荧光 PCR 扩增检测仪。

1.3 方法 宫颈细胞的 DNA 提取:(1)取待测标本 50 μ l,加入 50 μ l 核酸提取液 A,振荡混匀 15 s,于离心半径 47 cm,13 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入核酸提取液 B 100 μ l,振荡混匀 15 s,于 100 $^{\circ}$ C 干浴 10 min 后,以离心半径 47 cm,10 000 r/min 离心 3 min,取上清液 (DNA 样品) 备用。(2)荧光 PCR 扩增检测。PCR 反应液的配制按照试剂盒说明书操作。步骤为:取提取好的 DNA 样品 5 μ l,50 $^{\circ}$ C 1 min;94 $^{\circ}$ C 2 min;93 $^{\circ}$ C 20 s;51 $^{\circ}$ C 90 s,进行 40 个循环。最后读取荧光信号结果。(3)L1 壳蛋白的免疫染色:在室温条件下用 3% 的过氧化氢阻断剂处理 5 min 来清除内源性过氧化物酶的活性。PBS 缓冲液清洗擦干后于玻片上滴 1 滴 L1 壳蛋白抗体,在室温下孵育 30 min。然后滴加 DNA 标记探针聚合物及二抗混合液,在室温下孵育 30 min。缓冲液清洗后,在玻片上滴两滴 (100 μ l) 过氧化物酶,室温下静置 15 min。缓冲液清洗后在玻片上滴两滴 (100 μ l) AEC 色原液,室温下静置 15 min。随后将玻片浸入蒸馏水缸内清洗 1 min,取出玻片用厚纸巾垂直吸干残余液体,最后将玻片浸泡在 Mayer's 苏木素内快速浸染 15 s 后流水冲洗 2 min,最后用甘油封片。随后便可进行显微镜下阅片。

1.4 PCR 检测结果和 L1 壳蛋白免疫染色结果的判

断 高危型 HPV 的 PCR 结果判断:阴性对照以及阴性标本无数值显示,临界阳性对照 CT 值在 30~36 范围内,CT 值大于 37 的样本,或者 CT 值在 37~45 之间,重新检测结果,CT 值大于 45 的,均为高危型 HPV 阳性。HPV L1 壳蛋白为核蛋白,所以只有细胞核呈红色才是特异性阳性染色,其它部位的红染均为非特异性染色。只要有一个被红染的细胞核即可诊断为 HPV L1 壳蛋白阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件对 HPV L1 壳蛋白 PCR 检测阳性率与 HPV L1 壳蛋白表达阳性率进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 L1 壳蛋白在宫颈上皮细胞的表达特征与阳性结果 HPV 感染者的宫颈上皮细胞核表达呈阳性,染色呈红色 (图 1),极少部分细胞浆呈红色,轻度感染的细胞着色往往较淡,病变后期的细胞染色着色较差 (图 2)。182 例标本经 L1 壳蛋白免疫组化染色,其阳性结果显示:Non-SIL 组为 29 例,总阳性率为 34.5% (29/84);LSIL 组为 26 例,总阳性率 47.2% (26/55);HSIL 组为 9 例,总阳性率 31.0% (9/29);SCC 组为 1 例,总阳性率 6.6% (1/15)。

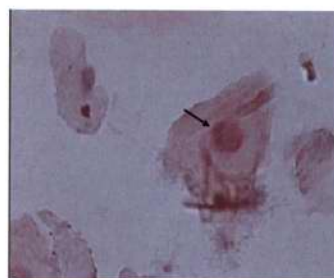


图 1 HPV 感染早期的宫颈上皮细胞 L1 壳蛋白表达呈阳性 ($\times 40$)

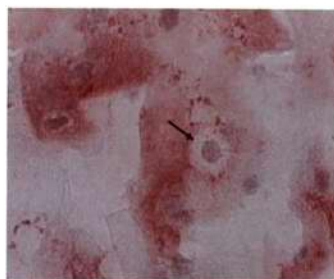


图 2 HPV 感染后期的宫颈上皮细胞 L1 壳蛋白表达呈阴性 ($\times 40$)

2.2 HPV 阳性 PCR 检测结果 182 例宫颈癌病变患者中,Non-SIL 组为 32 例,阳性率 38.0% (32/84);

LSIL 组为 30 例, 阳性率 54.5%(30/55); HSIL 组 10 例, 阳性率为 34.5%(10/29); SCC 组为 3 例, 阳性率 20.0%(3/15)。

2.3 L1 壳蛋白表达与 HPV-PCR 检测阳性结果比较 由表 1 得出各组间 L1 壳蛋白检测阳性率的差异具有统计学意义($P<0.01$), 且 L1 壳蛋白检测对高危型 HPV 感染的病例较为敏感。由表 2 得出各组间宫颈细胞 DNA HPV-PCR 检测阳性率的差异亦具有统计学意义($P<0.01$), 且 HPV-PCR 检测对高危型 HPV 感染的病例亦较为敏感。由表 1、2 可知, L1 壳蛋白及 HPV-PCR 的检测阳性率随病变早期表达呈上升趋势, 晚期则明显下降, 且二者对高危型检测阳性率高于对低危型及混合型检测的阳性率。

表 1 不同宫颈细胞病变组 L1 壳蛋白表达
阳性率的比较[n(%)]

组别	例数	L1 壳蛋白阳性率			χ^2 值	P 值
		高危型	低危型	混合型		
对照组	20	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	20.30	0.00
Non-SIL 组	83	18(19.0)	8(9.50)	3(3.5)		
LSIL 组	55	17(30.9)	7(12.7)	2(3.6)		
HSIL 组	29	9(31.0)	0(0.0)	0(0.0)		
SCC 组	15	1(6.6)	0(0.0)	0(0.0)		

表 2 不同宫颈细胞病变组 HPV-PCR
检测阳性率比较[n(%)]

组别	例数	HPV-PCR 阳性率			χ^2 值	P 值
		高危型	低危型	混合型		
对照组	20	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	22.56	0.00
Non-SIL 组	83	20(23.8)	8(9.5)	4(4.7)		
LSIL 组	55	18(32.7)	5(9.0)	7(12.7)		
HSIL 组	29	10(34.5)	0(0.0)	0(0.0)		
SCC 组	15	3(20.0)	0(0.0)	0(0.0)		

3 讨论

L1 壳蛋白是一种核蛋白质, 它在包浆合成后迅速进入细胞核内, 作为一个晚期蛋白, 仅在 HPV 复制阶段表达, 当人体表面细胞感染后, 利用人体该细胞的包浆蛋白合成 L1 壳蛋白, 初始的 HPV L1 壳蛋白具有人类蛋白的特性, 并存在于人体细胞浆和细胞核内, 因此该蛋白检测可能用作判断 HPV 复制的标志。Yoshida 等^[3]对 63 例不同级别宫颈上皮内瘤变及宫颈癌患者的脱落细胞标本分别进行 L1 壳蛋白和 P16 蛋白(宫颈癌的标志物)分析。发现随着宫颈病变程度越来越高, L1 壳蛋白的表达越来越少, 宫颈癌时 L1 壳蛋白不再表达。与本文研究结果中 L1

壳蛋白随病变早期表达呈上升趋势, 晚期则明显下降相符。本文研究结果显示: Non-SIL 组、LSIL 组、HSIL 组、SCC 组 L1 壳蛋白表达的总阳性率分别为 34.5%、47.2%、31.0%、6.6%, 提示 L1 壳蛋白表达测定对诊断 HPV 感染及宫颈癌的检测有一定的临床意义。Hagensee 等^[4]对宫颈病理切片和宫颈脱落细胞涂片进行 L1 壳蛋白检测, 也发现该蛋白的表达与年龄无关, 但与宫颈的病变程度呈显著负相关。本文对 182 例宫颈脱落细胞标本分析发现, L1 壳蛋白在非 HPV 感染标本和低危型 HPV 感染标本中表达较低, 而高危型 HPV 感染标本阳性表达率上升, 但随着病变的恶化, 阳性率逐渐降低, 在宫颈癌时的表达较低。提示 L1 壳蛋白不仅能够判断 HPV 的复制状态, 也能作为宫颈早期病变的诊断标志。

荧光 PCR 是近年发展起来的核酸检测技术, 他与常规 PCR 的区别是添加了标记 2 个荧光基因的荧光双标记探针, 进一步提高了检测的特异性。多重荧光 PCR 能对 10 种常见的导致妇女宫颈癌的 HPV 型别进行检测, 尤其在低拷贝数宫颈细胞标本的 HPV 检出能力方面具有一定优势^[5,6]。本文研究结果显示在 20 例健康对照者宫颈标本中, HPV-PCR 结果均为阴性, 而有病变的标本中, 不论病变程度的高低, HPV-PCR 检测结果均呈阳性, 提示 HPV 感染可能是宫颈病变的最直接原因, 同时也说明 PCR 检测法对于鉴别 HPV 感染与否具有高度的灵敏度和特异性。但其缺点是不能较直观的看到病变细胞的形态变化, 因此不适用于鉴别宫颈病变的程度^[7,8]。

总之, PCR 检测虽然对于鉴别 HPV 感染具有高度的灵敏度和特异性, 但不能直观的反映细胞形态的病变程度, 因此在一定程度上不能区分 HPV 的潜伏、复制和整合, 特别不能用于分辨持续感染、亚临床感染或者临床相关感染。同时 HPV-PCR 的操作过程非常复杂, 假阳性率较高, 而 L1 壳蛋白仅在宫颈良性病变时表达, 在宫颈癌时即不再表达。L1 壳蛋白免疫组化分析对 HPV 具有高度的特异性, 操作过程简单、准确、易于掌握, 还可结合细胞形态作出较为准确的判断。因此该蛋白可以作为诊断宫颈癌前病变的一个良好指标。

4 参考文献

1 Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. EMBO, 2002, 21: 4754-4762.
2 钟煜, 邱文元. 人乳头瘤病毒 HPV-16 衣壳蛋白的结构特征. 化学研究, 2005, 16: 92-100.
3 Yoshida T, Sano T, Kanuma T, et al. Immunochemical Analysis of

- HPV L1 Capsid Protein and p16 Protein in Liquid-based Cytology Samples From Uterine Cervical Lesions. Cancer, 2008, 114: 83-88.
- 4 Hagensee ME, Koutsky LA, Lee SK, et al. Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. J Infect Dis, 2000, 181: 1234-1239.
- 5 余剑敏, 沈智君. 第二代杂交捕获法与多重荧光 PCR 在检测高危型人乳头状瘤病毒中的应用比较. 检验医学, 2008, 23: 484-487.
- 6 Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, et al. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. Acta Cytol, 2003, 47: 124-128.
- 7 Griesser H, Sander H, Hilfrich R, et al. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. Anal Quant Cytol Histol, 2004, 26: 241-245.
- 8 Yildiz IZ, Usubutun A, Firat P, et al. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. Pathol Res Pract, 2007, 203: 445-449.

(收稿日期: 2010-05-24)

(本文编辑: 陈淑莲)

2010 中国长江医学论坛—检验与医学发展

中国医师协会检验医师分会、江苏省医学会、江苏省医师协会和临床检验杂志编辑部将于 2010 年 9 月 27-30 日在南京联合举办“2010 中国长江医学论坛—检验与医学发展”。论坛除进行学术交流外, 还将邀请国内外著名专家作专题讲座。本次论坛设“中国长江医学论坛优秀论文奖”, 获奖论文将优先向《临床检验杂志》等推荐发表。欢迎广大从事相关专业的医技、护理人员踊跃投稿, 积极参与! 参加学习交流的代表, 经考核合格后均可获得相应的继续医学教育 I 类学分(国教: 2010-11-00-048, 10 分)。现将论坛征文及报名的有关事项通知如下。

1 征文内容

检验医学方面的新理论、新技术及其在临床和临床检验工作中的应用。包括临床基础检验、血液学检验、生化学检验、免疫学检验、微生物学检验、分子生物学检验、临床检验质量管理以及检验与临床的联系等。

2 征文要求

2.1 内容要求 应征论文必须具有科学性、先进性、实用性和重点突出; 文字力求准确、精练与通顺; 摘要中不要附图表, 但应包括目的、方法、结果和结论四部分。

2.2 稿件格式 提交全文及 800~1000 字摘要各一份, 摘要应按“论文题目、作者姓名、作者单位、邮编及正文”的顺序, 文稿一律以 A4 纸小 4 号字打印(自留底稿)。

2.3 投稿方式

书面投寄: 江苏省医学会 朱闻天 收(地址: 南京市中央路 42 号, 邮编: 210008); 投寄的论文请在信封上注明参加论坛名称。

E-mail: jsjyfh@gmail.com

电话: 025-83620678

2.4 截稿日期: 2010 年 8 月 7 日(以邮戳为准)

3 优秀论文奖

本次论坛设“中国长江医学论坛优秀论文奖”, 获奖论文将优先向《临床检验杂志》等推荐发表。

4 论坛时间

2010 年 9 月 27-30 日(27 日报到, 28-29 日开会, 30 日上午撤离)。

5 论坛地点

南京曙光国际大酒店(地址: 南京市龙蟠路 107 号, 总机电话: 025-68888888)。

交通路线: 火车站向西步行 100 米到酒店。机场至酒店可乘机场大巴至火车站, 步行 100 米。

6 费用

注册费: 500 元/人, 在读研究生 200 元/人。

住宿费: 150 元/床/天(标间), 住宿统一安排, 费用自理。

所有费用按规定回单位报销。

7 有关论坛的最新信息请登录江苏省医学会网站

会议地点: 南京市

联系人: 朱闻天

电话: 025-83620678

E-mail: jsjyfh@gmail.com