

HPV 病毒 E1 蛋白多克隆抗体制备及在宫颈上皮病变检测的运用

张爱英 沈 棋 龚一蕾 侯 琳 张 波

(北京大学医学部病理学系 北京 100083)

摘要 目的:研制人乳头瘤病毒(HPV)E1 蛋白抗体,并运用于组织病理学免疫组织化学检测。方法:通过基因重组、原核表达并纯化 HPV E1 蛋白片段;经免疫制备多克隆抗体,并经免疫印迹及基因转染鉴定特异性;免疫组织化学法检测 13 例宫颈病变中 E1 蛋白,经原位杂交验证。结果:将 PCR 扩增的 E1 蛋白保守功能域(第 362~456aa)基因片断重组于原核表达载体 pEK-318 的 6×His 标签下游,经诱导表达和亲和层析,纯化出 14kD His-E1 蛋白。制备的多克隆血清经免疫印迹法检测显示不仅可与 His-E1 蛋白结合,也与 HeLa 细胞内源性 E1 蛋白反应。运用免疫血清检测 7 例宫颈尖锐湿疣和 6 例宫颈上皮内瘤病(CIN)III 级病例显示:7 例宫颈尖锐湿疣 6 例为阳性染色,阳性反应主要分布于病灶中挖空细胞的胞核。同时 6 例 CINIII 级病变全部阳性,着色主要为非典型增生鳞状上皮细胞核。为了确定上述病例中 E1 蛋白免疫组化检测的准确性,运用原位杂交法进行了验证。结果显示:7 例宫颈尖锐湿疣均为 HPV6/11 型杂交阳性,6 例 CINIII 级病变全部为 HPV16 型杂交阳性,显色部位与免疫组化基本一致。结论:本研究结果显示研制的 HPV E1 蛋白抗体可以用于病理组织学 HPV 病毒检测。

关键词:人乳头瘤病毒;抗体;免疫组化;原位杂交

中图分类号:R737.3 **文献标识码:**A

Development of polyclonal antibody against E1 protein of HPV and application in detection of cervic lesions

ZHANG Ai-ying, SHEN Qi, GONG Yi-lei, et al

Department of Pathology, Health Science Center of Peking University, Beijing 100083, China

ABSTRACT Objective: To develop polyclonal antibody against E1 protein of HPV (human papilloma virus) and apply to immunohistochemical analysis in histopathology. **Methods:** A portion of E1 protein of HPV was purified by DNA recombinant and prokaryotic expression. Polyclonal antibody was generated by immunization of rabbits and its specificity was identified by immunoblotting and gene transferring. The expression of E1 in 13 cases of cervic lesions was analyzed by immunohistochemistry and existence of HPV genome was identified by in situ hybridization. **Results:** A DNA fragment encoding conservative domain of E1 amplified by PCR was inserted into the downstream of 6×His tag of pEK-318 vector. His-E1 (14kD) was purified by affinity chromatography after induced expression in E. coli. The prepared polyclonal antibody from immunized rabbit could recognize His-E1 and native E1 expressed in both original and HPV-transfected HeLa cells by immunoblotting. The immunohistochemical staining in using the prepared antisera showed that 6/7 of condyloma acuminatum were positive and all 6 cases of cervical intraepithelial neoplasia III (CIN III) were positive. The positive distribution in condyloma acuminatum was mainly in nuclei of atypical hyperplasia cells in CIN III. The results of immunohistochemical staining were verified by in situ hybridization, proving that all cases were positive in detection of HPV genome and the distribution was consistent with those of immunohistochemistry. **Conclusions:** The prepared polyclonal antibody against E1 protein of HPV could be used in the detection of HPV in histopathology.

Key words: Human papilloma virus; Antibody; Immunohistochemistry; In situ hybridization

前言

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一种双链的小 DNA 病毒,可感染全身皮肤和粘膜,引起皮肤和粘膜的良恶性病变,尤其与宫颈癌、宫颈尖锐湿疣病变密切相关。HPV 目前已发现并鉴定出 200 多种亚型,依据其致癌性分类为低危型和高危型。前者主要包括 HPV 6、11、42 等亚型,一般引起尖锐湿疣或低级别鳞状上皮内瘤病(CIN I 级),而高危型主要包括 HPV 16、18、58 等亚型,通常导致高级别鳞状上皮内瘤病(CIN II 或 III 级),其中 HPV 16、18 可以在绝大多数宫颈癌中发现。另外,部分上呼吸道癌和肺癌也与 HPV 的感染有关。HPV 16、18 的 E6、E7 基因已证实为具有癌基因的作用^[1-5]。由于 HPV 感染的普遍性以及宫颈上皮病变的密切关系,HPV 的检测已成为临床的常规项目。HPV 难于用传统的病毒

培养及血清学技术检测,因此主要实验诊断为核酸杂交。尽管抗 HPV 编码蛋白抗体已商品化,但病理免疫组织化学实际的检测效果不尽理想。

本研究通过开发抗 HPV E1 蛋白抗体并运用于病理免疫组织化学,丰富了 HPV 病毒的组织学检测。

1 材料与方法

1.1 免疫血清制备

设计并合成引物 HP1(5'-gaattctggcctacgataatgac-3'), HP2(5'-ggatccaaatggcataaactctacac-3')(HPV16: 1950~2230 nt),将 HPV 16 为模板经 PCR 扩增,产物经纯化并克隆于 pGEM-T 载体, DNA 测序鉴定。酶切克隆 HPV 片断(EcoRI 和 BamHI)并重组于原核表达载体 pEK-318。转化 XL-BLUE 大肠杆菌,于对数生长期加入 IPTG 诱导表达,以 Ni-NTA 亲和层析纯化蛋白。取 1mg 蛋白,加等体积完全弗氏佐剂乳化后,免疫新西兰大白兔。加强免疫、效价测定、血清收集按文献^[6]。

1.2 免疫印迹检测

作者简介:张爱英,女,北京大学医学部病理系硕士。

研究方向:肿瘤分子生物学 E-mail: zhangaiping@yeah.net

(收稿日期:2006-04-10 接受日期:2006-05-20)

SDS-PAGE 电泳、凝胶转移按文献^[6]。硝酸纤维素膜上,经脱脂奶粉封闭后,用制备兔血清(1:1000)37℃1小时结合。1X 磷酸缓冲液洗涤后,生物素化羊抗兔 IgG(1:500)室温 1 小时,加链卵白素-碱性磷酸酶(1:500)室温 1 小时结合,NBT-BCIP 显色。免疫前兔血清作对照。

1.3 基因转染

含 HPV6、16 型病毒全基因组质粒经 Tfx-20(Promega 公司,美国)转染试剂盒转染人 HeLa 细胞,按指南进行。转染 48 小时后,提取细胞全蛋白^[6]。

1.4 免疫组织化学

组织切片依次经二甲苯脱蜡、酒精水化、过氧化氢清除内源性过氧化物酶的活性,微波抗原修复、血清封闭非特异结合位点,滴加一抗(1:300)4℃ 过夜,洗涤,加 EVISION 抗兔抗体,DAB 显色,苏木精复染、中性树胶封片。

1.5 探针标记

将含有 HPV6、16 型基因组的 pGEM 质粒 BamHI 酶切线性化后,按体外转录法标记生物素^[6]。

1.6 原位杂交

组织切片经二甲苯脱蜡、乙醇水化后,微波 95℃ 20 分钟,90% 冰乙醇脱水,滴加杂交液 20μl,入 42℃ 温浴 1 小时。经过洗涤后,加链卵白素-碱性磷酸酶(1:500)室温 20 分后,NBT-BCIP 显色,甲基绿复染,明胶封片。

2 结果

2.1 抗 HPV 病毒 E1 蛋白多克隆抗体制备

为了制备 E1 蛋白免疫原,用 PCR 法扩增编码 E1 蛋白保守功能域(1085~1367 nt, 362~456 aa)约 282 bp 基因片断,并重组于原核表达载体 pEK-318 的 6× 组氨酸标签下游,重组质粒经酶切鉴定(图 1)正确。转化大肠杆菌后经 IPTG 诱导和

Ni-NTA 亲和层析,纯化出带有多聚组氨酸约 14 kD HPV E1 蛋白(图 2)。

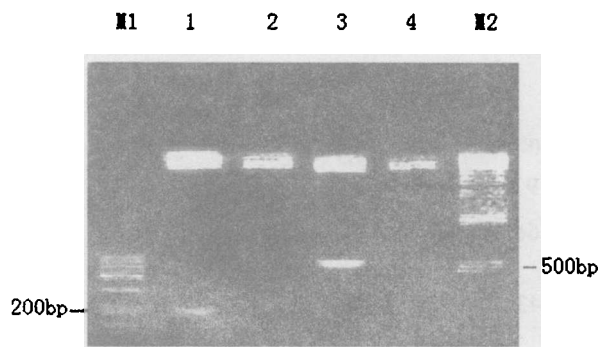


图 1 pEK-318-HPV E1 重组质粒电泳鉴定。

MaP 1 The recombinant DNA vector was detected by electrophoresis

M1:100bp DNA Marker; M2:500bp DNA Marker

1:EcoRI 和 BamHI 酶切后的 pEK-318-HPV 重组质粒

1:The combinant DNA vector pEK-318-HPV is cut up with restriction enzyme EcoRI and BamHI

3:EcoRI 和 HindIII 酶切后的 pEK-318-HPV 重组质粒

3:The combinant DNA vector pEK-318-HPV is cut up with restriction enzyme EcoRI and HindIII

2.2:未酶切 pEK-318 重组质粒

2.2 The combinant DNA vector pEK-318

以纯化蛋白免疫新西兰大白兔后,制备出免疫血清。Western Blotting 法检测显示血清可与 HPV E1 蛋白片断相结合(图 3)。并且,通过转染 HPV6 和 16 型病毒基因组于 HeLa 细胞发现,免疫血清可与 HeLa 细胞内源性表达的天然 E1 蛋白(约 68 kD)反应,而转染细胞则出现 E1 蛋白表达增高(图 4)。

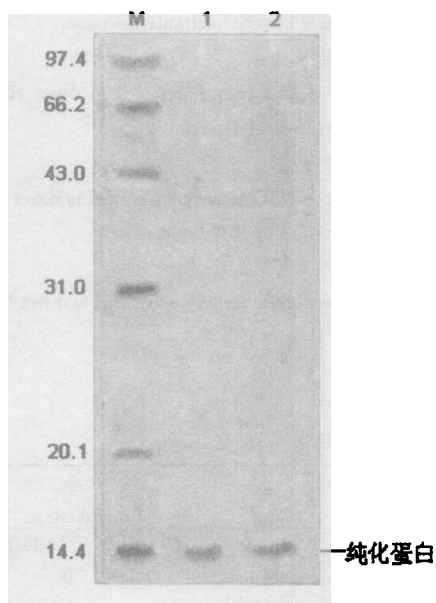


图 2 His-E1 蛋白经 Ni-NTA 金属亲和层析法纯化。纯化获得的蛋白经免疫印迹法鉴定。

MaP2 The fusion protein His-E1 were purified with Ni chelated affinity chromatography followed with gel elution and recovering after SDS-PAGE.

F: 蛋白 Marker

M:Protein Marker

1,2:纯化 His-E1 蛋白

1,2: Protein His-E1

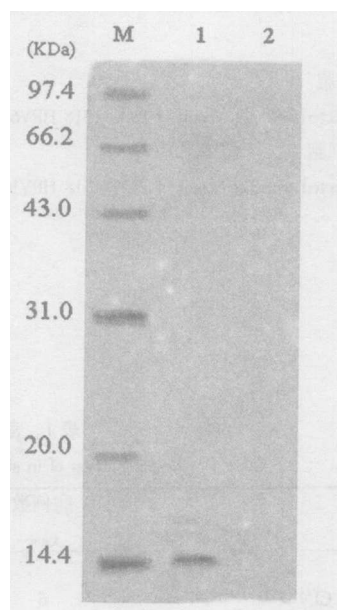


图 3:免疫印方法迹检测制备的多克隆抗 HPV E1 血清

Map 3 The polyclonal antibodies serum was detected by Western blotting

M:Protein Marker

1:Protein His-E1

2:大肠杆菌蛋白

2:Protein E. coli

2.2 宫颈上皮病变 HPV 病毒免疫组织化学检测

运用免疫血清检测 7 例宫颈尖锐湿疣和 6 例宫颈上皮内瘤病(CIN)III 级病例显示:7 例宫颈尖锐湿疣 6 例为阳性染色,阳性反应主要分布于尖锐湿疣中上层细胞核,尤其是挖空细

胞的细胞核(图 5A)。6 例 CINIII 级病变全部阳性,着色主要为非典型增生鳞状上皮细胞核,分布为中上层鳞状上皮细胞(图 5B)(结果见表 1)。

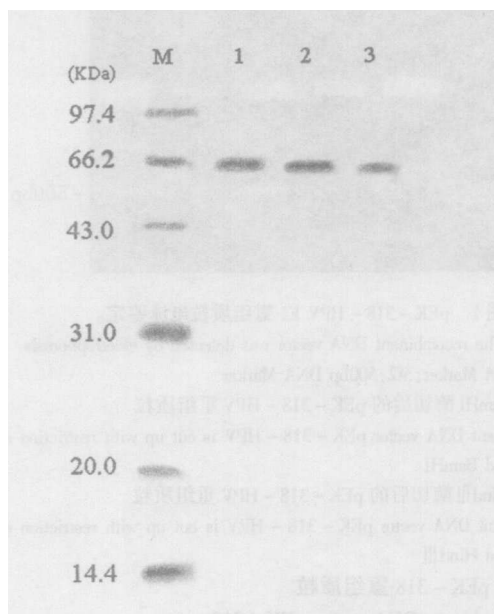


图 4 运用抗 HPV-E1 蛋白多克隆血清免疫印迹方法检测 HPV 转染 HeLa 细胞 E1 蛋白

Map 4 The protein E1 of HeLa was detected with the polyclonal antibodies serum by Western blotting

M:蛋白质 Marker;

M:Protein Marker

1:HPV6 转染 HeLa 细胞

1:HeLa cell was transfected with the vector of PEK-318 HPV6

2:HPV16 转染 HeLa 细胞

2:HeLa cell was transfected with the vector of PEK-318 HPV16

3:HeLa 细胞

3:HeLa cell

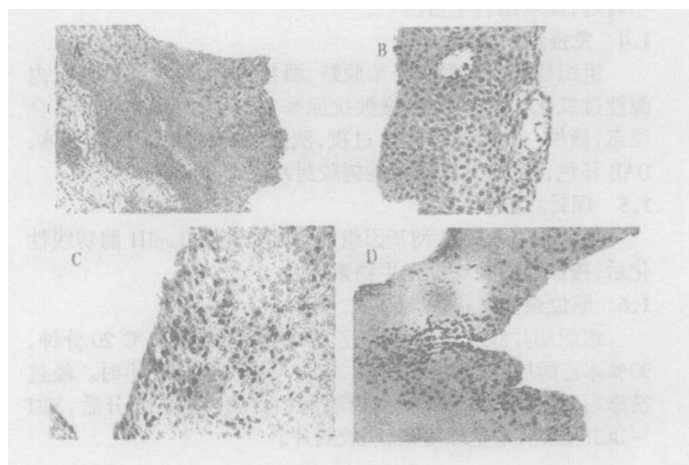


图 5 宫颈上皮病变的免疫组化检测和原位杂交检测。

Map 5 Immunohistochemical and In situ hybridization (ISH) techniques were used to detect HPV in cervix lesions

A:尖锐湿疣免疫组化

A: Immunohistochemical technique was used to detect HPV protein in condyloma acuminata tissues by polyclonal antibodies serum

B:CINIII 级免疫组化

B: Immunohistochemical technique was used to detect HPV protein in CINIII tissues by polyclonal antibodies serum

C:尖锐湿疣 HPV6 杂交

C: In situ hybridization (ISH) technique was used to detect HPV6 - DNA in condyloma acuminata tissues by HPV 6 probes.

D:CINIII 级 HPV16 杂交

D: In situ hybridization (ISH) technique was used to detect HPV16 - DNA in CINIII tissues by HPV16 probes.

表 1 宫颈上皮病变免疫组化与原位杂交比较

Table 1 the comparison of in situ hybridization and immunohistochemical staining in cervix lesions

	病例数 case	免疫组化		原位杂交			
		Immunohistochemistry		In situ hybridization			
				HPV6		HPV16	
CIN	6	0	6	6	0	0	6
尖锐湿疣	7	1	6	0	7	7	0
condyloma accuminatum							

2.3 宫颈上皮病变 HPV 病毒原位杂交检测

为了确定上述病例中 E1 蛋白免疫组化检测的准确性,运用原位杂交法进行了验证。结果显示:7 例宫颈尖锐湿疣均为 HPV6/11 型杂交阳性,主要分布于尖锐湿疣病变中的挖空细胞的胞核(图 5C)。6 例 CINIII 级病变全部为 HPV16 型杂交阳性,见于非典型增生细胞的胞核(图 5D)。

3 讨论

HPV 具有严格的宿主和组织特异性,主要存在于人和动物的皮肤、粘膜的上皮细胞。病毒进入易感宿主活的细胞后,

(下转第 20 页)

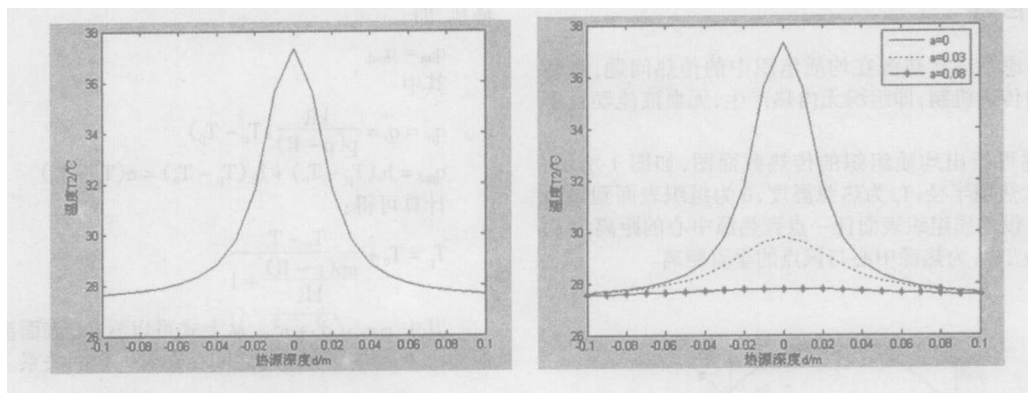


图4 a一定时,不同深度d对应的温度分布

Figure 4 Relationship between T and d when a is stated

由上述分析可以看出,温度 T_1 和 T_2 的分布曲线都是高斯曲线,且均质组织表面温度分布与内部热源深度存在着一定的关系。通过式(2-10)可以看出,由均质组织表面温度分布可获得内部热源大小及热源深度的相关信息,从而为确定人体复杂条件下体表温度分布与体内热源间的关系提供了一定的理论基础,进一步促进现有医用红外热像技术的发展和诊断准确性的提高。

4 结论

本文基于生物传热学理论推导出了均质组织中表面温度分布与内部热源之间的关系,由此可从组织表面的温度分布获得内部热源的相关信息。但在上述的模拟和分析中,只考虑了单点热源的作用,且并未涉及到血液灌注对传热的影响,而这与真实人体有很大的区别。该初步的结论验证了体表温度分布与体内热源之间存在着某种关系。在这基础上,多热源和各向异质组织等复杂条件下体表温度分布与体内热源间的关系将在以后进一步研究讨论。

参考文献

[1] 刘静,王存诚.生物传热学[M].北京:科学出版社,1997:31-45

- [2] J.C.切托著,徐云生,钱壬章译.生物传热学基础[M].北京:科学出版社,1991:9-35
- [3] 吴士明,张传富,曾品菊等.医用红外热像技术临床应用研究[J].激光杂志,2003,24(1):63-65
- [4] Michael Anber. Clinical thermal imaging today[J]. IEEE engineering in medicine and biology, July/August 1998:25-33
- [5] H.H.Pennes. Analysis of Tissue and Arterial Temperatures in the Resting Human Forearm[J]. Journal of Applied Physiology, Vol.1, 1948:93-122
- [6] Tang Xianwu, Ding Haishu, Wang Guangzhi, et al. Relationship between surface temperature distribution and internal heat source size of the in-vitro tissue[C]. EMBC 2004. Conference Proceedings. 26th Annual International Conference of the Volume 1, 2004:873-878
- [7] 王存诚,陈槐卿.生物医学中的热物理探索[M].北京:科学出版社,1994:27-34
- [8] 沙斌,袁修干.数值求解人体生物热方程是边界条件的处理方法[J].北京航空航天大学学报,1992,2:46-50
- [9] 唐一峰,黄钦煌.生物组织热传导方程的解[J].闽江学院学报,2004,25(2):17-19,61
- [10] 蔡睿贤,张娜.生物导热方程的一维不定常解析解[J].自然科学进展,1998,8(3):331-336

(上接第14页)

借助于宿主细胞为其提供的原料能量和酶类等必要条件,以自我复制的方式合成子代病毒的核酸和蛋白质,装配成完整病毒颗粒并释放到细胞外。进入其他细胞再复制,反复进行。HPV的复制和繁殖使宿主细胞发生细胞周期紊乱,迅速分裂并消耗受损,产生增殖性损伤,表现为疣状增生,以至细胞癌变^[1,3]。HPV E1蛋白为病毒DNA复制起关键作用,通过与宿主多种蛋白作用而诱导病毒DNA合成^[7]。因此,本研究选择E1蛋白作为检测的靶点,其表达的存在可以反应病毒是否处于活跃的增殖状态。同时,E1蛋白在各型之间存在高度保守性,其检测具有广谱性,可很好地与PCR或原位杂交的分型相结合^[1,5]。

在抗体的鉴定中,制备免疫血清不仅可以与免疫原的部份E1蛋白相结合,也可与HeLa细胞内源性或转基因表达的全长(约68 kD)天然E1蛋白反应,表明了制备抗体的结合能力和特异性。

免疫组化显示在尖锐湿疣、CIN I级等病变,阳性细胞主要为挖空细胞或具有非典型增生细胞的胞核,与原位杂交结果一致。但免疫组化阳性细胞较原位杂交略多,可能部分感染细胞由于病毒拷贝低而原位杂交呈阴性。

HPV病毒引起的生殖器官疾病已成为目前主要的性传播疾病,尤其是宫颈癌的发病率和死亡率方面在女性是仅次于乳腺癌的最常见的肿瘤。因此,HPV病毒的检测对于性传播

疾病和宫颈癌前病变的早期诊断和治疗具有重要的意义。本研究的结果将有助于这些疾病的早期防治。

参考文献

- [1] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia[J]. Microbiol Mol Biol, 2004,68:362-372
- [2] Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins[J]. Int Cancer, 2004,109:157-162
- [3] Stoler MH. The virology of cervical neoplasia: an HPV-associated malignancy[J]. Cancer, 2003,9:360-367
- [4] Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation[J]. Oncogene, 2003,22:5201-5207
- [5] Seedorf K, Oltersdorf T, Kramer G, et al. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells[J]. EMBO, 1987,6:139-144
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 GF, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1989: 816-856
- [7] Sun S, Thomer L, Lentz M, Macpherson P, et al. Identification of a 68 - Kilodalton Nuclear ATP - Binding Phosphoprotein Encoded by Bovine Papillomavirus Type 1[J]. Virology, 1990,64:5093-5105