

· 生物技术与方法 ·

人乳头瘤病毒 16 型 E6 和 L1 蛋白荧光免疫层析检测方法的建立

刘馨儿^{1,3}, 赵印震², 牛楠楠², 李灵轲², 杜学利², 郭晋祥², 张应福⁵,
王继创³, 张怡青⁴, 王云龙^{1,3,4*}

1 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

2 洛阳职业技术学院, 河南 洛阳 471099

3 河南省生物工程技术研究中心, 河南 郑州 450000

4 郑州职业技术学院, 河南 郑州 450010

5 河南省职工医院, 河南 郑州 450002

刘馨儿, 赵印震, 牛楠楠, 李灵轲, 杜学利, 郭晋祥, 张应福, 王继创, 张怡青, 王云龙. 人乳头瘤病毒 16 型 E6 和 L1 蛋白荧光免疫层析检测方法的建立[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4266-4276.

LIU Xin'er, ZHAO Yinzhen, NIU Nannan, LI Lingke, DU Xueli, GUO Jinxiang, ZHANG Yingfu, WANG Jichuang, ZHANG Yiqing, WANG Yunlong. A fluorescence immunochromatography method for detection of human papillomavirus type 16 E6 and L1 proteins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4266-4276.

摘要: 本研究旨在建立同时测定人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)16 型 E6 蛋白和 L1 蛋白浓度的时间分辨荧光免疫层析定量检测方法。通过优化载有镧系元素荧光微球标记抗体量、包被抗体浓度和反应时间, 制备联合检测试纸条, 对所建立的联合检测方法进行性能及临床一致性评价。HPV16 L1 及 E6 抗体最佳标记量分别为 8 μg 、10 μg , 包被划膜量均为 1.5 mg/mL; 最佳检测时间为加样后 10 min; 检测 HPV16 L1 及 E6 蛋白线性范围分别为 5–320 ng/mL、2–64 ng/mL; 最低检测限分别为 1.78 ng/mL、1.09 ng/mL; 与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、梅毒螺旋体(*Treponema Pallidum*, TP)、HPV18 E6 及 L1 蛋白无交叉反应; 回收率在 97%至 107%之间; 采用本研究制备的试纸条检测样本, 区分宫颈癌及癌前病变患者与健康人的灵敏度为 97.46%, 特异性为 90.57%, 诊断准确率为 95.32%, 受试者工作特征曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.980 1, 95%置信区间(confidence interval, CI) (0.956 5, 1.000 0)。本研究制备的时间分辨荧光免疫层析联合定量检测 HPV16 型 E6 蛋白与 L1 蛋白试纸条可为宫颈癌及癌前病变患者的早期筛查及病程评估提供辅助诊断方法。

关键词: 人乳头瘤病毒; 时间分辨荧光免疫层析; 快速检测; 宫颈癌

资助项目: 中原学者工作站资助项目(234400510005)

This work was supported by the Zhongyuan Scholars Workstation Funded Project (234400510005).

*Corresponding author. E-mail: biowyl@126.com

Received: 2024-02-06; Accepted: 2024-06-20; Published online: 2024-06-21

A fluorescence immunochromatography method for detection of human papillomavirus type 16 E6 and L1 proteins

LIU Xin'er^{1,3}, ZHAO Yinzhen², NIU Nannan², LI Lingke², DU Xueli², GUO Jinxiang², ZHANG Yingfu⁵, WANG Jichuang³, ZHANG Yiqing⁴, WANG Yunlong^{1,3,4*}

1 The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

2 Luoyang Polytechnic, Luoyang 471099, Henan, China

3 Henan Bioengineering Technology Research Center, Zhengzhou 450000, Henan, China

4 Zhengzhou Technical College, Zhengzhou 450010, Henan, China

5 Henan General Hospital, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: This study aims to establish a time-resolved fluorescence immunochromatography method for simultaneous determination of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and L1 protein concentrations. The amount of lanthanide microsphere-labeled antibodies, the concentration of coated antibodies, and the reaction time were optimized, and then a test strip for the simultaneous determination of the protein concentrations was prepared. The performance of the detection method was evaluated based on the concordance of the results from clinical practice. The optimal conditions were 8 μg and 10 μg of HPV16 L1 and E6-labeled antibodies, respectively, 1.5 mg/mL coated antibodies, and reaction for 10 min. The detection with the established method for L1 and E6 proteins showed the linear ranges of 5–320 ng/mL and 2–64 ng/mL and the lowest limits of detection of 1.78 ng/mL and 1.09 ng/mL, respectively. There was no cross reaction with human immunodeficiency virus (HIV), treponema pallidum (TP), or HPV18 E6 and L1 proteins. The average recovery rate of the established method was between 97% and 107%. The test strip prepared in this study showed the sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of 97.46%, 90.57%, and 95.32%, respectively, in distinguishing patients with cervical cancer and precancerous lesions from healthy subjects, with the area under the curve (AUC) of 0.980 1 and 95% Confidence Interval (CI) of 0.956 5 to 1.000 0. The time-resolved fluorescence immunochromatography combined with the test strips prepared in this study showed high sensitivity, high accuracy, simple operation, and rapid reaction in the quantitation of HPV16 E6 and L1 proteins. It thus can be used as an auxiliary method for the diagnosis and early screening of cervical cancer and precancerous lesions and the assessment of disease course.

Keywords: human papillomavirus; time-resolved fluorescence immunochromatography assay (TRFIA); rapid detection; cervical cancer

宫颈癌作为女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一，其在全球范围内的发病率位居妇科恶性肿瘤的第二位，而在中国女性中更是高居首位^[1]，高危型人乳头瘤病毒(high-risk human papillomavirus, HR-HPV)的持续感染已被广泛认为是宫颈癌及其癌前病变发展的关键因素^[2-3]，其中高危型

HPV16 型最为常见，占比 70%–75%^[4]。HR-HPV 持续感染且未进行干预，可进展为宫颈低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)和宫颈高度鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)，最终出现癌变^[5]。

在宫颈癌及癌前病变的演进过程中, E6 蛋白在宫颈上皮细胞中的表达量会显著上升, 这种上升与病变的进展和严重程度紧密相关, 呈现出明显的正相关, 因此 E6 蛋白被视为宫颈癌及癌前病变筛查的关键生物标志物^[6]。HPV L1 蛋白的表达含量与宫颈病变程度的进展呈负相关, 并在宫颈癌细胞中不表达。HPV L1 蛋白的检测对低级别宫颈上皮内病变有明显的诊断价值, 对高级别宫颈上皮内病变有重要的指示价值, 能够作为生物标志物对高风险癌变人群进行宫颈癌前病变进展的预测和癌变的评估^[7-8]。联合检测 HPV16 型 E6 和 L1 蛋白能够为辅助诊断提供依据, 有利于在宫颈癌及癌前病变的早期阶段发现病变, 提高了诊断准确性, 降低宫颈癌的发病率和死亡率^[9], 有利于综合评估患者发生宫颈病变的风险^[10-11]。目前针对 HPV16 的 E6 和 L1 标志物检测, 常用的方法有 ELISA、PCR 和免疫组化。然而, 这些方法普遍存在操作繁琐、检测时间长以及设备成本高昂的问题。时间分辨荧光免疫层析技术因其灵敏度高、检测速度快、结果稳定等, 在快速检测领域中得到广泛应用^[12], 该技术利用荧光微球与抗体结合形成荧光标记抗体, 通过抗原-抗体反应检测目标蛋白。

本研究拟建立一种快速定量联合检测 HPV16 型 E6 蛋白与 L1 蛋白荧光免疫层析联合检测方法, 以期 HPV 检测提供一种新的辅助手段, 实现基层医院即时检测及监测, 并为后续产品研发提供数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂与仪器设备

硝酸纤维素膜购自青岛吉景新型材料有限公司; Eu³⁺羧基荧光微球购自 Bangs Laboratories 公司; PVC 背板、玻璃纤维棉(SAP-Z90)、吸水

纸购自怀远县通成纸制品有限公司; 羊抗鼠 IgG、HIV 重组蛋白、TP 重组蛋白、HPV18 L1/E6 蛋白均由河南省生物工程技术研究中心提供。XYZ 三维划膜喷金仪(HM3030)、微电脑自动斩切机(ZQ2002)购自上海金标生物科技有限公司; 365 nm BK-M4v 荧光检测灯购自宁波圣兰特电子科技有限公司; 台式免疫层析分析仪(FIC-S2011-D5)购自杭州峰航科技有限公司; 化学纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司; 临床样本由郑州大学第一附属医院提供, 相关实验经河南省生物工程技术研究中心伦理委员会审批(批准号: HNBCLL2022021)。

1.1.2 蛋白参考品与抗体

蛋白参考品、单克隆抗体由河南省生物工程技术研究中心提供; 原核表达 HPV16 L1/E6 蛋白(SDS-PAGE 验证蛋白纯度>98%)制备参考品, HPV16 L1 线性参考品浓度为 5、10、20、40、80、160、320 ng/mL; HPV16 E6 线性参考品浓度为 2、4、8、16、32、64、128 ng/mL; HPV16 L1 配对单克隆抗体效价为 1:20 000; HPV16 E6 配对单克隆抗体效价为 1:80 000 (经间接法 ELISA 测定 HPV16 L1 单克隆抗体效价为 1:20 000, HPV16 E6 单克隆抗体效价为 1:80 000, 经 Western blotting 和免疫组化验证可与蛋白产生阳性反应)。

1.2 方 法

1.2.1 荧光微球标记物制备

本研究采用 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS)两步法活化微球羧基进行偶联^[13-14], 取荧光微球 20 μ L, 加入 1 mL 浓度为 20 mmol/L 的 MES 溶液, 通过漩涡振荡使其充分混合, 加入 20 μ L 浓度为 10 mg/mL 的 EDC 溶液, 混匀后再加入 200 μ L NHS 溶液(20 mg/mL), 继续混匀, 将混合液置于摇床上

低速振荡活化 1 h; 随后, 以 15 000 r/min 的速度离心 15 min, 弃去上清液, 用 1 mL 的 20 mmol/L MES 溶液重新将沉淀物悬起, 并利用超声破碎仪分散微球; 向溶液中加入 L1 和 E6 蛋白标记单抗各 10 μg , 放在摇床上进行 2 h 的偶联反应; 完成后, 再次以 15 000 r/min 的速度离心 15 min, 除去上清液, 用 1 mL 封闭液重新悬起沉淀, 超声处理后放入摇床振荡 2 h; 最后, 以相同的条件离心处理, 弃去上清液后, 加入 600 μL 微球保护液复溶沉淀, 经过超声处理后存 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 试纸条制备及检测

使用三维喷金仪 L1 和 E6 包被抗体(浓度均为 1.0 mg/mL), 羊抗鼠 IgG (1.0 mg/mL) 按照 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的划膜参数均匀涂布在硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)上, 形成三条线, 分别为检测线 T1、检测线 T2 和质控 C 线。随后, 将包被后的 NC 膜在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥 4 h, 完成包被板的制备。将按 1.2.1 中方法制备好的微球-抗体复合物混匀后, 按 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷球参数均匀喷在玻璃纤维棉上, 制备微球垫, 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥 4 h; 按照吸水纸, 包被有 T1 线、T2

线、C 线的 NC 膜, 微球垫, 样品垫的顺序, 依次在 PVC 板上进行组装, 用自动斩切机将板进行裁切, 裁为宽度 4.0 mm 的试纸条干燥备用。

取 70 μL 样品滴加于检测卡加样孔中, 反应 15 min 后, 将试纸条置于免疫荧光定量检测仪上检测, 读取 T1 线、T2 线和 C 线的荧光强度, 荧光强度与待测样本中特定蛋白的浓度成正比。可以通过荧光灯检测荧光信号来判断样本中是否含有 HPV16 型的 L1 或 E6 蛋白, 如果样本中存在 HPV16 型 L1 蛋白, 则 T1 线会发出荧光; 若存在 HPV16 型 E6 蛋白, 则 T2 线会发出荧光; 若样本为阴性, 即不含这两种蛋白, 则仅质控线 C 线会发出荧光。质控线无荧光时, 则证明试纸条无效。HPV16 L1/E6 蛋白检测荧光免疫层析试纸条结构如图 1 所示, 结果判读如图 2 所示。

1.3 工艺优化

1.3.1 抗体标记量与检测线包被抗体浓度的优化

分别取 3、5、8、10、15、20 μL 的 1 mg/mL HPV16 L1 (HPV16 E6) 单克隆抗体加入到荧光微球溶液中进行偶联反应, 按照 1.2.2 中的方法

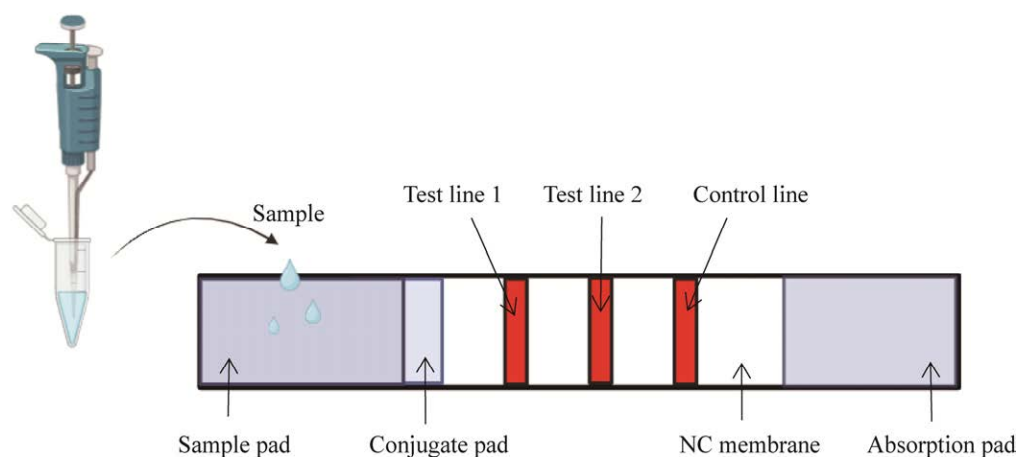


图 1 HPV16 E6 及 L1 蛋白联合检测荧光免疫层析试纸条结构示意图

Figure 1 Diagrammatic representation of the fluorescence immunochromatographic test strip for dual detection of HPV16 E6 and L1 proteins.

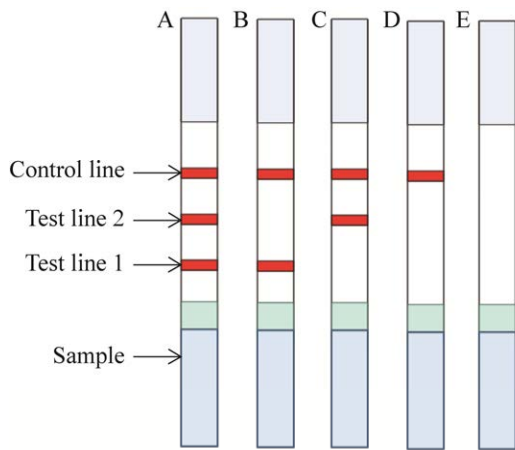


图2 HPV16 E6及L1蛋白联合检测荧光免疫层析试纸条结果判读

Figure 2 Interpretation of fluorescent immunochromatographic strip results for detection of HPV16 E6 and L1 protein. A: HPV16 L1(+) HPV16 E6(+). B: HPV16 L1(+) HPV16 E6(-). C: HPV16 L1(-) HPV16 E6(+). D: HPV16 L1(-) HPV16 E6(-). E: Invalid.

制备不同标记量的微球垫；检测线采用不同浓度的 HPV16 L1(HPV16 E6)包被抗体，分别稀释至 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL，质控 C 线为 1 mg/mL 的羊抗鼠 IgG，使用三维喷金仪进行划膜，划膜参数设置 1 μ L/cm。组装好各试纸条，重复检测阴性、阳性参考品(L1 参考品浓度为 80 ng/mL，E6 参考品浓度为 16 ng/mL) 5 次。记录质控线及检测线的荧光信号值，计算检测 T/C 的平均值，根据荧光信号强度和 T/C 值选择 HPV16 E6、L1 最佳标记抗体量和包被抗体浓度。

1.3.2 检测时间优化

确定检测时间需要进行动力学分析。采用经过实验优化后的最佳标记量和划膜量组合制备 HPV16 E6 及 L1 联检荧光免疫层析试纸条，低、中、高浓度检测参考品(L1/E6 参考品浓度为：20/4、80/16、320/64 ng/mL) 70 μ L，每个浓度重复 3 次，加样 2、5、7、10、15、20 min 后分别检测 T/C 值随时间的变化情况，建立试纸条 T/C 值随时间变化的曲线，确定试纸条的

最佳检测时间。

1.4 性能评价

1.4.1 标准曲线的建立

将 L1 蛋白高值参考品 320 ng/mL 和 E6 蛋白高值参考品 64 ng/mL 进行倍比稀释(L1 线性参考品浓度：5、10、20、40、80、160、320 ng/mL，E6 线性参考品浓度：2、4、8、16、32、64、128 ng/mL)，采用已确定的最优工艺制备 HPV16 E6 及 L1 联检荧光免疫层析试纸条，每个浓度的参考品进行 3 次重复检测，计算检测 T/C 的平均值。以参考品浓度的对数值为纵坐标，T/C 值对数值作为横坐标，采用 Log-Logit 函数模型对两者的关系进行拟合，即 $\text{Logit}(Y)=A+B\times\text{Log}(X)$ ，建立标准曲线。

1.4.2 最低检测限的确定

对阴性参考品进行重复测定 20 次，计算 20 次检测结果的 T/C 平均值(\bar{x})及标准差(s)，将 $\bar{x}\pm 2s$ 代入 1.4.1 中确定的线性标准曲线，计算出的浓度即为最低检出限。

1.4.3 特异性评价

将 HIV 重组蛋白(1 μ g/mL)、梅毒重组蛋白(1 μ g/mL)、HPV18 L1 蛋白(1 μ g/mL)及 HPV18 E6 蛋白(1 μ g/mL)分别与 HPV16 L1 参考品(160 ng/mL)及 HPV16 E6 参考品(64 ng/mL)等体积混合后用本研究自制试纸条进行检测，重复检测 5 次，测定 HPV16 L1 与 E6 蛋白浓度，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，评价试纸条特异性。

1.4.4 准确度评价

采用最优工艺制备的试纸条对高、中、低这 3 种浓度参考品(L1/E6 参考品浓度为：20/4、80/16、320/64 ng/mL)进行检测，重复测定 10 次，记录质控线及检测线的荧光信号值，计算 T/C 值。将 T/C 值代入线性标准曲线，获取对应的测量浓度，按照以下公式计算各浓度回收率：

$$\text{回收率}=(\text{实测浓度}/\text{预测浓度})\times 100\%。$$

1.4.5 样本检测

采用本研究建立的荧光免疫层析联合检测试纸条检测经临床病理确诊的宫颈癌患者样本 42 份、HSIL 患者样本 40 份、LSIL 患者样本 36 份及 HPV DNA 阴性样本 53 份, 检测 L1 与 E6 蛋白含量, 并进行诊断性能分析。

2 结果与分析

2.1 最佳抗体标记量与 T 线包被抗体浓度

当 HPV16 L1 单克隆抗体的标记量为 8 μg , HPV16 L1 包被抗体划膜量为 2.0 mg/mL 时, 其检测结果 T 值与 T/C 值较高(图 3A、3B); 当 HPV16 E6 单克隆抗体的标记量为 10 μg , HPV16 E6 包被抗体划膜量为 2 mg/mL 时, 其 T

值荧光信号较高(图 3C、3D)。综合考虑荧光信号强度、阴性本底和成本, 选择 HPV16 L1 单克隆抗体的标记量为 8 μg , HPV16 L1 包被抗体划膜量为 1.5 mg/mL; HPV16 E6 单克隆抗体的标记量为 10 μg , HPV16 E6 包被抗体划膜量 1.5 mg/mL 为最佳条件。

2.2 检测时间优化结果

在制备 HPV16 E6 及 L1 蛋白联合检测荧光免疫层析试纸条时选用了经过优化后的最佳标记量和划膜量组合, 检测低、中、高浓度的 E6 蛋白(L1 蛋白)参考品。加样 2、5、7、10、15、20 min 后分别检测 T/C 值随时间的变化情况, 建立试纸条 T/C 值随时间变化的曲线, 确定试纸条的最佳检测时间。

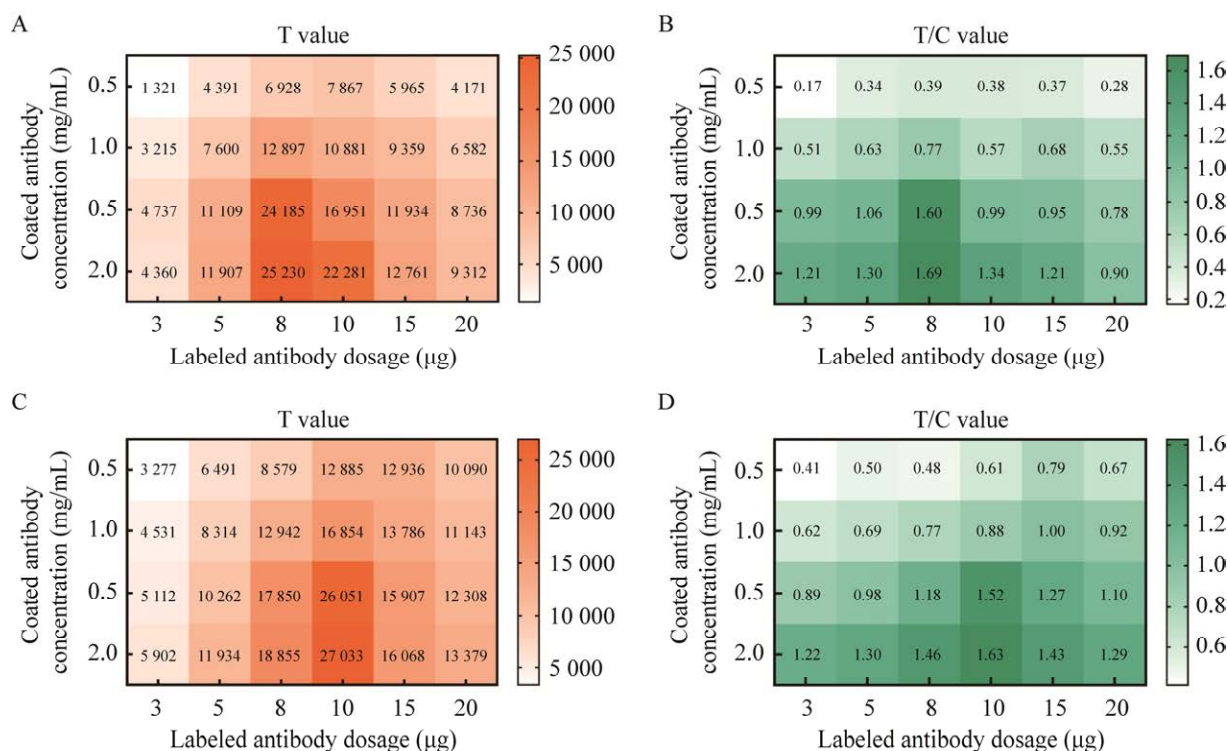


图 3 HPV16 E6/L1 抗体标记量及包被浓度优化图

Figure 3 Optimization diagram of HPV16 E6/L1 antibody labeling amount and coating concentration. A: L1 antibody labeling amount and coated concentration condition paired T value. B: L1 antibody labeling amount and coated concentration condition paired T/C value. C: Paired T value of E6 antibody labeling amount and coated concentration condition. D: Matching T/C values of E6 antibody labeling amount and coated concentration condition.

通过观察联检试纸条检测不同浓度样本的 T/C 值随时间的变化(图 4), 发现随着反应时间的增长, T/C 值呈现上升趋势。然而, 当反应时间超过 10 min 后, 各浓度样本的 T/C 值变化曲线趋于稳定, 这反映出抗原抗体结合已达到动态平衡。基于此确定了联合检测试纸条的最佳检测时间为加样后 10 min。

2.3 标准曲线及检测线性范围

重复检测不同浓度线性参考品 3 次, 以各浓度检测的 T/C 平均值的对数值为横坐标, 并以相

应检测浓度的对数为纵坐标, 通过 log-logit 逻辑回归模型进行拟合, 即 $\text{Logit}(Y)=A+B \times \text{Log}(X)$, 绘制 L1/E6 蛋白浓度与 T/C 的反应曲线, 结果如图 5 所示, HPV16 L1 蛋白在 5–320 ng/mL 范围内线性关系为 $y=1.0039x+1.7325$, $R^2=0.9947$; HPV16 E6 蛋白在 2–64 ng/mL 范围内线性关系为 $y=1.0174x+1.0124$, $R^2=0.9931$ 。时间分辨荧光免疫层析联合检测试纸条在检测的浓度范围内, 其荧光强度比值 T/C 与参考品浓度之间呈现出良好的线性相关性。

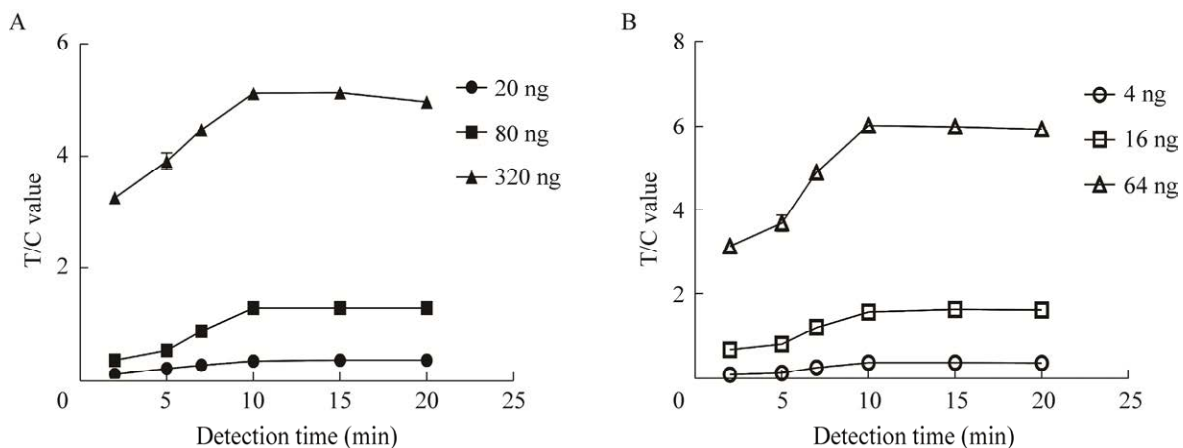


图 4 HPV16 E6/L1 最佳检测时间优化图

Figure 4 Optimal detection time of HPV16 E6/L1. A: Optimal detection time of L1 fluorescent test strip. B: Optimal detection time of E6 fluorescent test strip.

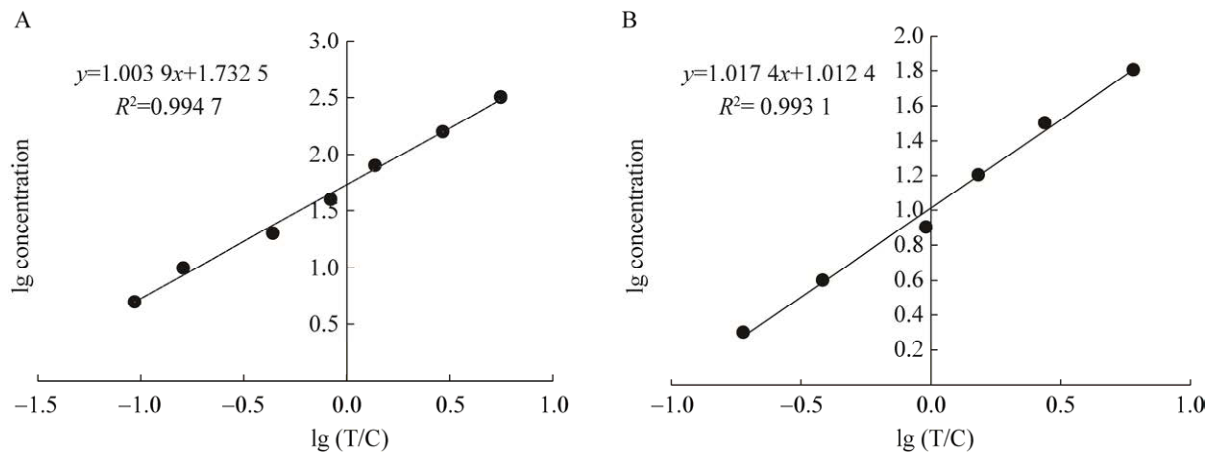


图 5 HPV16 L1/E6 荧光免疫层析试纸条标准曲线的建立

Figure 5 Standard curve for the HPV16 E6/L1 fluorescence immunochromatographic test strip. A: HPV16 L1 protein standard curve. B: HPV16 E6 protein standard curve.

2.4 最低检测限

重复检测 20 次阴性样本, 计算测定结果 T/C 的平均值(\bar{x})和标准差(s), 之后计算 T/C 的平均值加 2 倍标准差($\bar{x} \pm 2s$), 结果如表 1 所示, 将计算结果代入建立的标准曲线, 计算出对应的浓度值, 即为最低检出限浓度。经测定, HPV16 L1 最低检测限为 1.78 ng/mL, HPV16 E6 最低检测限为 1.09 ng/mL。

2.5 特异性

如表 2、表 3 所示, HIV、梅毒、HPV18 E6 蛋白、HPV18 L1 蛋白对 HPV16 E6 及 L1 蛋白联合检测荧光免疫层析试纸条的检测结果并未产生显著影响, 表明方法特异性较好。

表 1 最低检测限结果

Table 1 Minimum detection limit results

Sample	\bar{x}	s	$\bar{x} \pm 2s$
HPV16 L1	0.041 7	0.002 3	0.046 4
HPV16 E6	0.062 8	0.004 5	0.071 9

表 2 HPV16 L1 蛋白特异性检测结果

Table 2 Assessment of the specificity for HPV16 L1 protein detection

Interfering substance and concentration	Theoretical concentration (ng/mL)	Actual concentration (ng/mL)
HIV (1 μ g/mL)	80.00	78.39 \pm 0.86
TP (1 μ g/mL)	80.00	77.48 \pm 0.32
HPV18 E6 (1 μ g/mL)	80.00	77.86 \pm 0.40
HPV18 L1 (1 μ g/mL)	80.00	79.52 \pm 0.59

表 3 HPV16 E6 蛋白特异性检测结果

Table 3 Assessment of the specificity for HPV16 E6 protein detection

Interfering substance and concentration	Theoretical concentration (ng/mL)	Actual concentration (ng/mL)
HIV (1 μ g/mL)	32.00	33.23 \pm 0.66
TP (1 μ g/mL)	32.00	33.19 \pm 0.43
HPV18 E6 (1 μ g/mL)	32.00	34.09 \pm 0.45
HPV18 L1 (1 μ g/mL)	32.00	33.16 \pm 0.55

2.6 准确度

试纸条针对 HPV16 E6/L1 不同检测样品的准确度与偏差结果如表 4 所示, HPV16 L1 的回收率在 97.47%–106.82%之间, HPV16 E6 的回收率在 96.83%–98.91%之间, 准确度均较好。

2.7 临床一致性

以病理学检测为金标准, HPV16 E6、HPV16 L1、HPV16 E6 联合 L1 检测灵敏度为 68.64%、33.9%、97.46%; 特异性为 92.45%、96.22%、90.57%; 诊断准确率为 76.02%、53.22%、95.32%。单一 HPV16 E6 或 L1 检测特异性较高, HPV16 E6 联合 L1 检测灵敏度及诊断准确率最高。结果如表 5、表 6 所示。

HPV16 E6 联合 L1 检测的 AUC 为 0.980 1, 95%CI (0.956 5, 1.000 0), 结果如图 6 所示, 故联合检测的诊断准确率高。

表 4 回收率检测结果

Table 4 Recovery rate detection

Sample	Addition concentration (ng/mL)	Determination of concentration (ng/mL)	Recovery rate (%)
HPV16 L1	10.00	9.74 \pm 0.40	97.47
	40.00	42.73 \pm 0.67	106.82
	160.00	160.96 \pm 4.00	100.60
HPV16 E6	4.00	3.96 \pm 0.11	98.91
	16.00	15.50 \pm 0.18	96.83
	64.00	62.85 \pm 3.13	98.21

表 5 不同病理诊断结果受检者 HPV16 E6 蛋白检测阳性率、HPV16 L1 蛋白阳性率比较[例, (%)]

Table 5 Comparison of positive rates of HPV16 E6 protein and HPV16 L1 protein in different pathological diagnosis results [n , (%)]

Group	n	HPV16 E6 ⁺	HPV16 L1 ⁺
Normal or cervical inflammation	53	4.00 (7.55)	2.00 (3.78)
LSIL	36	4.00 (11.11)	31.00 (86.11)
HSIL	40	35.00 (87.50)	9.00 (22.50)
SCC	42	42.00 (100.00)	0.00 (0.00)

表 6 不同检测指标对 \geq LSIL 宫颈病变诊断价值的比较Table 6 Comparison of diagnostic value of different detection indexes in \geq LSIL cervical lesions

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	AUC (95% CI)
HPV16 E6 ⁺	68.64	92.45	76.02	0.840 6 (0.783 6, 0.897 6)
HPV16 L1 ⁺	33.90	96.22	53.22	0.703 6 (0.627 0, 0.780 3)
HPV16 E6 ⁺ +L1 ⁺	97.46	90.57	95.32	0.980 1 (0.956 5, 1.000 0)

HPV16 E6⁺+L1⁺: A positive result is defined as either a positive result for HPV16 E6 protein or a positive result for L1 protein, or both.

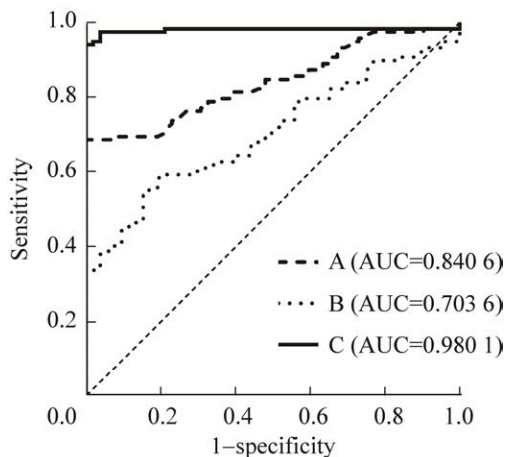


图 6 受试者工作特征曲线

Figure 6 Receiver operating characteristic curve. A: HPV16 E6. B: HPV16 L1. C: Combined detection of HPV16 E6 and L1.

3 讨论与结论

有研究报道,在宫颈癌前病变及宫颈癌的发生发展过程中,高危型 HPV 的 E6 基因扮演着关键角色,高危型 HPV 通过持续的增殖分裂和 E6 蛋白的恒定表达,促进了疾病的发生和发展^[15],本研究对 171 例患者进行 HPV16 E6 蛋白含量检测,结果显示随着病变进展,癌前病变及宫颈癌患者 E6 检出率不断升高,证实 E6 蛋白作为恶化因子,对于评估患癌风险、监测病变的进程非常有意义^[16]。但在低级病变组别中, E6 蛋白检测灵敏度较低(11.11%),可能因为疾病刚开始发展时,病毒复制速度相对较慢,导致 HPV E6 蛋白阳性检出率有所下降,因此对宫颈癌前病变早期阶段诊断灵敏度较低^[17]。

HPV L1 蛋白是 HPV 的主要衣壳蛋白,是 HPV 的主要特异性抗原,也是宫颈局部细胞免疫的重要靶点,在 HPV 整合到宿主基因后 HPV L1 蛋白表达缺失^[8,18],本研究观察到, HPV L1 检测阳性的患者病变多处于早期阶段(\leq LSIL),而在宫颈癌患者中则发现 HPV L1 蛋白表达显著降低甚至不表达, HPV L1 蛋白随着疾病发展其表达量逐渐下降。 HPV L1 蛋白的存在意味着非进展性病变,而其表达的下或缺失则可能预示着 HPV 相关的恶性转化风险增加^[19],同时意味着对于高级病变的诊断结果较差^[20]。本研究同时检测两种标志物对宫颈癌及癌前病变患者进行诊断,可实现两种诊断方式优势互补,提高宫颈癌前病变各个阶段病变检出率,提升对于宫颈癌及癌前病变的诊断准确度及敏感度。

即时检验(point-of-care testing, POCT)因其快速简便、能够现场分析等特点,在基层医疗领域中得到广泛应用, POCT 两大主流技术中,胶体金技术具有原理明确、试剂化学性质稳定、方便快捷等优点。胡仁建等^[21]研制了一种高危型人乳头瘤病毒 16 E6 的免疫胶体金试纸条,该试纸条在检测 HPV16 E6 蛋白时能够有相应颜色指示,此方法只可通过比色来判断检测结果。荧光免疫层析技术以胶体金技术为基础,提升了灵敏度和特异性^[22],本课题组石英杰等^[23]在前期研究中建立了 HPV16/18 型 E6 蛋白荧光免疫层析联合检测方法,对于 HPV16 E6 蛋白灵敏度可达 0.8 ng/mL,同时对于宫颈癌及

宫颈上皮内瘤变三级患者样本的检出具有较好的灵敏度和特异性, 相较于胶体金, 此方法可实现对于蛋白浓度的定量检测, 能够更好地判断和监测疾病进展。本研究基于前期研究的结果增加 L1 蛋白检测指标, 提升对于 LSIL 低级别病变的检出率, 同时提高宫颈癌及癌前病变患者的诊断准确度, 为后续试剂盒的开发及临床应用提供数据支撑。但如果样品含有低病毒, 接近试剂盒的检测限, 则会给出弱阳性或阴性结果; 如果样品含有病毒浓度低于检测限, 则会给出阴性结果, 因此对于感染初期的样本检出率较低。

为了尽快在临床中应用并进行进一步推广, 还需要对方法进行优化, 在后续研究中, 将进一步提高检测灵敏度, 扩大线性范围, 收集更多样本进行验证, 同时增加感染 HPV 其他型别患者样本来验证本试纸条的特异性, 并对该方法与其他联检试剂盒的一致性和符合率进行进一步研究。本研究建立的针对 HPV 16 型感染患者的荧光免疫层析试剂条能够提高宫颈癌及癌前病变患者检出率, 可以作为 HPV 16 型相关宫颈癌及癌前病变检测的辅助方法。

综上所述, 本研究建立的荧光免疫层析联合检测人乳头瘤病毒 16 型 E6 和 L1 蛋白方法, 能够实现 HPV 即时检测, 在宫颈癌的现场筛查中具有广泛应用价值, 可为其他型别 HPV 检测方法的建立提供借鉴, 为进一步试剂盒的开发和临床应用提供参考。

REFERENCES

- [1] KUSAKABE M, TAUGUCHI A, SONE K, MORI M, OSUGA Y. Carcinogenesis and management of human papillomavirus-associated cervical cancer[J]. *International Journal of Clinical Oncology*, 2023, 28(8): 965-974.
- [2] GRAHAM SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review[J]. *Clinical Science*, 2017, 131(17): 2201-2221.
- [3] HU Z, MA D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications[J]. *Cancer Medicine*, 2018, 7(10): 5217-5236.
- [4] AMIN FAS, UN NAHER Z, ALI PSS. Molecular markers predicting the progression and prognosis of human papillomavirus-induced cervical lesions to cervical cancer[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2023, 149(10): 8077-8086.
- [5] 袁书凝, 钱程, 邢燕. 人乳头状瘤病毒(HPV)基因整合与宫颈病变[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2021, 30(5): 481-487.
YUAN SN, QIAN C, XING Y. Human papillomavirus (HPV) gene integration and cervical lesions[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2021, 30(5): 481-487 (in Chinese).
- [6] BILLINGSLEY CL, CHINTALA S, KATZENELLENBOGEN RA. Post-transcriptional gene regulation by HPV 16E6 and its host protein partners[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1483.
- [7] HU HY, ZHAO JJ, YU W, ZHAO JW, WANG ZW, JIN L, YU YY, HAN LF, WANG L, ZHU HT, LI F. Human papillomavirus DNA, HPV L1 capsid protein and p16INK4a protein as markers to predict cervical lesion progression[J]. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2019, 299(1): 141-149.
- [8] KI EY, PARK JS, LEE A, KIM TJ, JIN HT, SEO YB, GEN Y, PARK MY, LEE SJ. Utility of human papillomavirus L1 capsid protein and HPV test as prognostic markers for cervical intraepithelial neoplasia 2+ in women with persistent ASCUS/LSIL cervical cytology[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2019, 16(8): 1096-1101.
- [9] CHOI YJ, LEE A, KIM TJ, JIN HT, SEO YB, PARK JS, LEE SJ. E2/E6 ratio and L1 immunoreactivity as biomarkers to determine HPV16-positive high-grade squamous intraepithelial lesions (CIN2 and 3) and cervical squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Gynecologic Oncology*, 2018, 29(3): e38.
- [10] ALCANIZ BOADA E, CUSCHIERI K, GRAHAM C, MONCUR S, BHATIA R. Agreement between L1 and E6/E7-based assays for detection of high-risk HPV in cervical, oropharyngeal and penile cancers[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2023, 76(7): 467-473.
- [11] TJALMA WAA, DEPUYDT CE. Cervical cancer screening: which HPV test should be used: L1 or E6/E7?[J]. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 2013, 170(1): 45-46.

- [12] QIN Q, WANG K, YANG JC, XU H, CAO B, WO Y, JIN QH, CUI DX. Algorithms for immunochromatographic assay: review and impact on future application[J]. *The Analyst*, 2019, 144(19): 5659-5676.
- [13] 张永生, 王云龙, 王继创, 李玉林, 王晓军, 王旭东. 软骨寡聚基质蛋白荧光免疫层析定量检测方法建立[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 2332-2341.
ZHANG YS, WANG YL, WANG JC, LI YL, WANG XJ, WANG XD. Development of a fluorescence immunochromatography for quantitative detection of cartilage oligomeric matrix protein[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(6): 2332-2341 (in Chinese).
- [14] 崔云会, 陈楠, 王云龙, 明亮, 李玉林, 王继创. 人乳腺珠蛋白荧光免疫层析检测方法的建立[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(8): 975-978.
CUI YH, CHEN N, WANG YL, MING L, LI YL, WANG JC. Establishment of fluorescence immunochromatography for detection of human mammaglobin[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2021, 37(8): 975-978 (in Chinese).
- [15] FERRERA A, VALLADARES W, CABRERA Y, deLa LUZ HERNANDEZ M, DARRAGH T, BAENA A, ALMONTE M, HERRERO R. Performance of an HPV 16/18 E6 oncoprotein test for detection of cervical precancer and cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2019, 145(8): 2042-2050.
- [16] VIEIRA GV, SOMERA dos SANTOS F, LEPIQUE AP, Da FONSECA CK, INNOCENTINI LMAR, BRAZ-SILVA PH, QUINTANA SM, SALES KU. Proteases and HPV-induced carcinogenesis[J]. *Cancers*, 2022, 14(13): 3038.
- [17] 黄美园, 杨珍玉, 邓爽, 陈栋良. 高危型 HPV E6/E7 mRNA 在不同年龄段宫颈病变筛查中的应用价值[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(5): 1179-1184.
HUANG MY, YANG ZY, DENG S, CHEN DL. Application value of high-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA in screening cervical lesions of different ages[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(5): 1179-1184 (in Chinese).
- [18] BUCK CB, DAY PM, TRUS BL. The papillomavirus major capsid protein L1[J]. *Virology*, 2013, 445(1/2): 169-174.
- [19] PRZYBYLSKI M, PRUSKI D, MILLERT-KALIŃSKA S, KRZYŻANIAK M, de MEZER M, FRYDRYCHOWICZ M, JACH R, ŻURAWSKI J. Expression of E4 protein and HPV major capsid protein (L1) as a novel combination in squamous intraepithelial lesions[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(1): 225.
- [20] 刘继英, 龚云辉, 王芳, 邵靖. 免疫细胞化学法检测 HPV L1 壳蛋白在宫颈脱落细胞中的表达及临床价值探讨[J]. *黑龙江医药*, 2020, 33(5): 1132-1134.
LIU JY, GONG YH, WANG F, SHAO J. Immunocytochemical detection of HPV L1 shell protein expression in cervical shed cells and its clinical value[J]. *Heilongjiang Medicine Journal*, 2020, 33(5): 1132-1134 (in Chinese).
- [21] 胡仁建, 蔡家利, 徐佳缘, 张贵, 梁晓媛, 李夏庆, 郭萍, 郑洋. HPV16 型免疫胶体金诊断试纸条的制备[J]. *重庆理工大学学报(自然科学版)*, 2010, 24(2): 34-39.
HU RJ, CAI JL, XU JY, ZHANG G, LIANG XY, LI XQ, GUO P, ZHENG Y. Preparation of HPV16 immanecolloidal gold diagnostic strip[J]. *Journal of Chongqing University of Technology (Natural Science)*, 2010, 24(2): 34-39 (in Chinese).
- [22] TSUBOI I, IINUMA K. Immunochromatography-application example and POCT type genetic testing[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2021, 69(10): 984-988.
- [23] 石英杰, 王云龙, 明亮, 李玉林, 王继创, 潘维成. HPV16/18 E6 蛋白荧光免疫层析联合检测方法的建立[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(6): 534-538, 546.
SHI YJ, WANG YL, MING L, LI YL, WANG JC, PAN WC. Establishment of fluorescence immunochromatography for detection of HPV16/18 E6 protein[J]. *Immunological Journal*, 2018, 34(6): 534-538, 546 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)