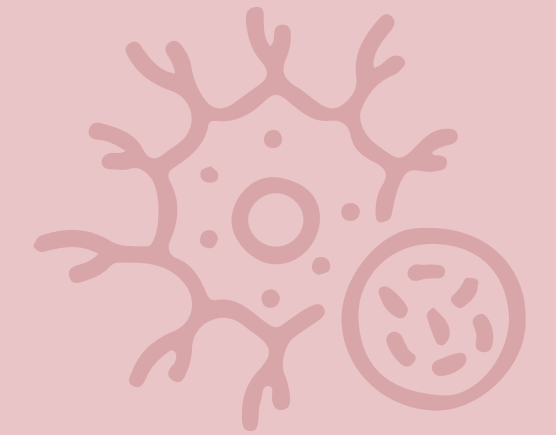
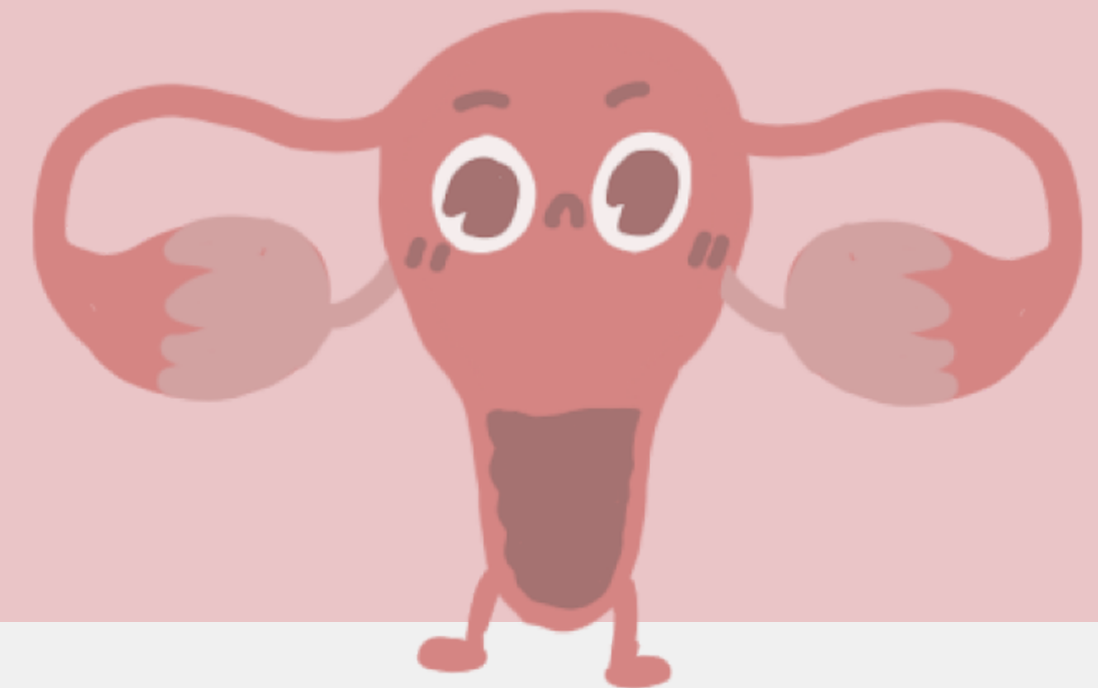
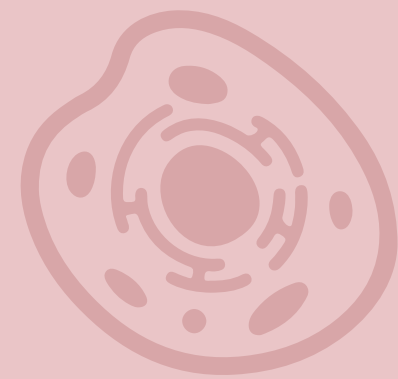
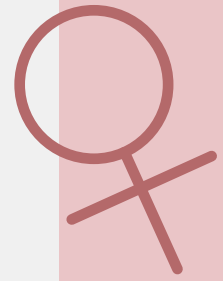




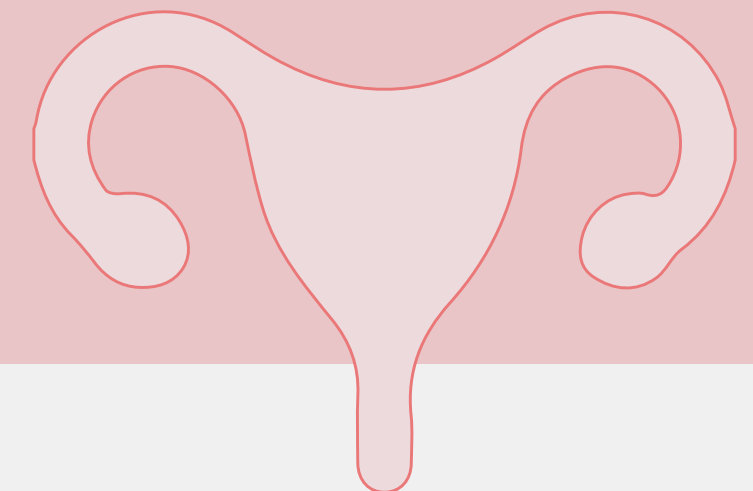
如何在子宮頸刮落細胞內使用RNAscope 方法檢測HPV E6E7的RNA分佈並判斷疾病進程





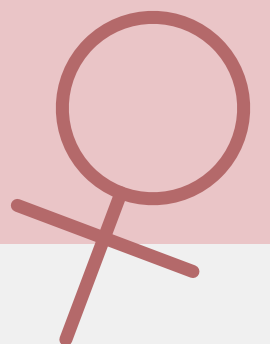
學習解讀北京婦產醫院吳玉梅課題組新近發表在Virology Journal文章

美國Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司的RNAscope技術作為新一代的RNA原位雜交技術，通過其專利的雙Z探針設計原理以及訊號放大系統，可以兼容由於空氣中RNase對於RNA的部分降解導致一定程度的組織RNA缺損，從而達到對組織和細胞內的RNA進行高效的原位檢測。近年來，伴隨著該技術的逐漸成熟，國內外臨床相關領域專家嘗試使用這類技術探究解決與疾病相關的多種檢測。

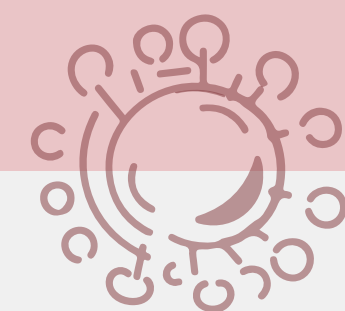




例如在原發性肝癌和繼發性肝癌的鑑別診斷中，可以透過對ALB這一分泌型蛋白的檢測進行快速鑑別，以判斷原發性肝癌的存在。但是由於ALB屬於分泌型蛋白，使用免疫組織染色的方法很難將該蛋白進行原位定位，故包括國外的蓋辛格醫療中心（Geisinger Medical Center）在內的多家檢測平台使用Bio-Techne旗下ACD公司的RNAscope技術對ALB的mRNA進行原位雜交檢測，幫助進行鑑別診斷。類似的臨床輔助診斷應用還有很多，包括使用RNAscope技術對於CXCL13這一細胞趨化因子的mRNA進行檢測，幫助血管免疫母細胞性T細胞淋巴瘤（AITL）的鑑別診斷，以及使用對應RNAscope探針快速鑑別結核以及非結核分枝桿菌感染等。這其中最廣為使用的一類檢測指標為針對人類乳突病毒HPV的E6/E7探針進行RNAscope原位檢測的應用。



眾所周知，HPV的檢測對於子宮頸病變的進展推斷以及頭頸癌疾病的治療方案具有醫學界公認的指標性意義。在子宮頸檢測中，通過對病理活檢樣本中HPV病毒的檢測可以判斷子宮頸惡化的程度，幫助腫瘤醫生選取治療方案。在眾多的HPV檢測方法中，PCR法是目前最常用的方法之一，可以判斷HPV病毒的類型。該方法敏感度高，但缺乏原位資訊，無法判斷病毒的分佈特點以及豐度，同時由於HPV的PCR法只針對HPV DNA進行檢測，而非真正導致細胞癌變的是HPV病毒活化後轉錄的E6/E7蛋白，故PCR法有可能檢測到局部非活化的既往感染HPV病毒的存在，從而導致過度治療的潛在危險。另一方面由於HPV E6/E7無法做出相對應的抗體，故通過免疫組織染色法直接對HPV E6/E7蛋白進行IHC檢測無法實現。為了能夠盡可能的對HPV病毒進行原位免疫組織染色檢測，目前較為常用的檢測方法為使用p16免疫組織染色法，該方法的基本原理可以理解為在HPV病毒活化時，會轉錄產生HPV的E7蛋白，該蛋白與宿主細胞內Rb蛋白相結合，從而去除了Rb蛋白對於p16基因合成的抑製作用，引發細胞內p16蛋白產生增加。



故通過監測p16蛋白的豐度來評估HPV是否活化。這一間接方法目前廣泛應用於子宮頸頸HPV病理檢測中。

在HPV導致的子宮頸頸病變後期，即CIN III以及子宮頸頸原位癌中p16免疫組化與HPV的相關性很好，但是對於HPV早期感染的子宮頸病例其相關性並不高。故採用RNAscope在子宮頸頸樣本中進行HPV的E6/E7mRNA檢測是目前唯一一款可以在組織原位直接對於HPV病毒是否活化，以及病毒分佈和病毒豐度進行檢測的方法。這一方法在國內外廣泛應用於子宮頸頸初級病變的病人樣本中。



以上所說的原位檢測均為子宮頸活檢樣本，而臨床上大量病人在門診檢測中，使用到的多為子宮頸抹片，只有在發現確實存在一定病變的基礎上臨床才會對病人進行活檢檢測。如果能夠在子宮頸初篩即子宮頸刮落細胞內進行RNAscope HPV檢測，則在很大程度上可以幫助判斷病人是否存在HPV活化感染，同時也可以評估病毒效價(Titer)以及分佈情況，幫助婦科醫生對疾病進行評估。然而在過去的很多年內，由於子宮頸刮落細胞本身的特性原因，無法進行細胞貼片以及RNAscope原位檢測，使得這一想法一直無法實現。





由首都醫科大學附屬北京婦產醫院婦科腫瘤科吳玉梅教授所帶領的課題組發表在2022年一月 Virology Journal的一篇文章，針對子宮頸刮落細胞進行研究，摸索出一種可以適用於RNAscope檢測的有效子宮頸刮落細胞樣本製備的方法，並針對近100位病人的子宮頸刮落細胞進行18種高危險型以及16種低危險型HPV的RNAscope檢測，對比其與PCR的檢測結果。與此同時使用RNAscope對於一種與癌症有顯著相關性的長鏈非編碼RNA-TERC進行了原位檢測，評估子宮頸病變的發生和發展。



檢測結果提示RNAscope法可以敏感檢測到HPV病毒的E6/E7 mRNA在子宮頸刮落細胞的分佈，同時可以觀察到游離的HPV病毒以及存在於細胞內的HPV病毒兩種不同的HPV RNA形式。與PCR法相比，兩者檢測的一致性為70%。在這些HPV RNAscope 以及PCR法結果一致的病人樣本中，RNAscope法可以見到HPV E6/E7 mRNA大量分佈或者少量分佈的結果差異，同時這些mRNA有的只少量呈簇狀分佈在細胞外側（游離病毒），而另外有一些則呈現點狀分佈在細胞質以及細胞核內（見圖1）。

Zhao et al. *Virology Journal* (2022) 19:18
<https://doi.org/10.1186/s12985-021-01696-9>

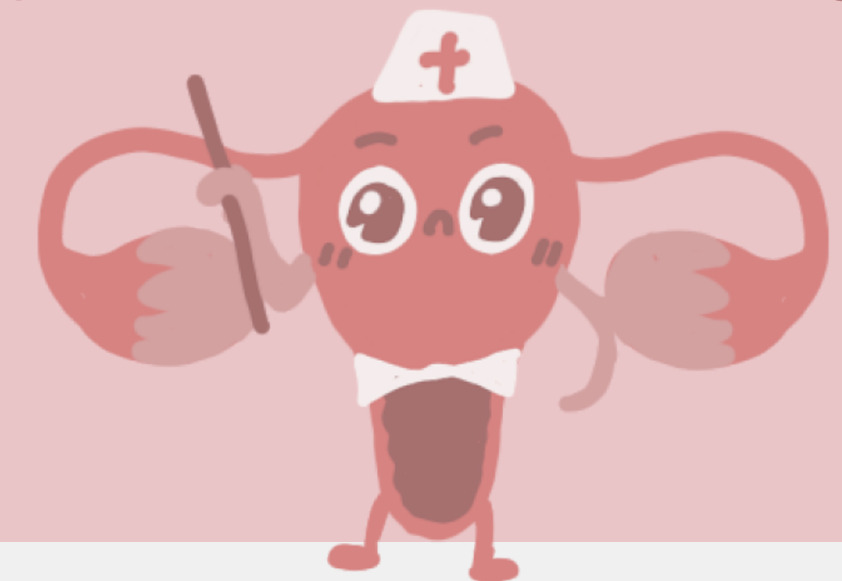
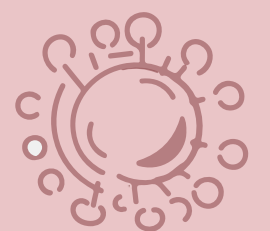
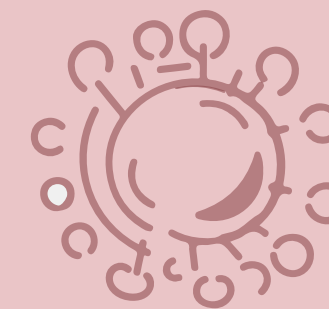
Virology Journal

RESEARCH

Open Access

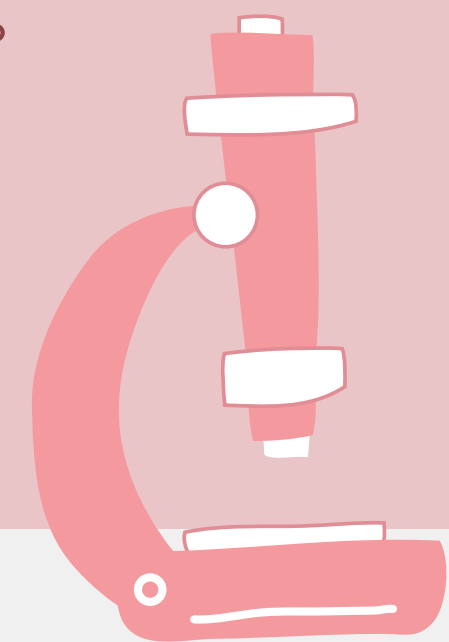
Human papillomavirus E6E7 mRNA and TERC lncRNA in situ detection in cervical scraped cells and cervical disease progression assessment

Hui Zhao, Yue He, Bei Fan, Yan Wang and Yu-Mei Wu*



進一步為臨床醫生對於HPV感染的情況提供了參考依據。在30%的非一致檢測樣本中，RNAscope陽性而PCR法陰性樣本共8例，其中3例具有LEEP手術史。RNAscope陰性而PCR法陽性樣本共9例，其中有一例有CKC手術史。另外有12例樣本雖然兩種方法檢測均為陽性，但是高危險和低危險型上出現不一致，也被列舉出來。

文章的最後，該研究團隊綜合RNAscope檢測到的HPV18種高危險型中RNA的分佈規律，病毒訊號數量，長鏈非編碼RNA-TERC的RNA陽性結果以及病人的追蹤結果，提出RNA-scope檢測到HPV E6/E7 RNA陽性訊號點大於等於10同時伴隨TERC這一長鏈非編碼RNA陽性的病人樣本，具有更快向惡性發展的趨勢，這類病人值得更密切關注。



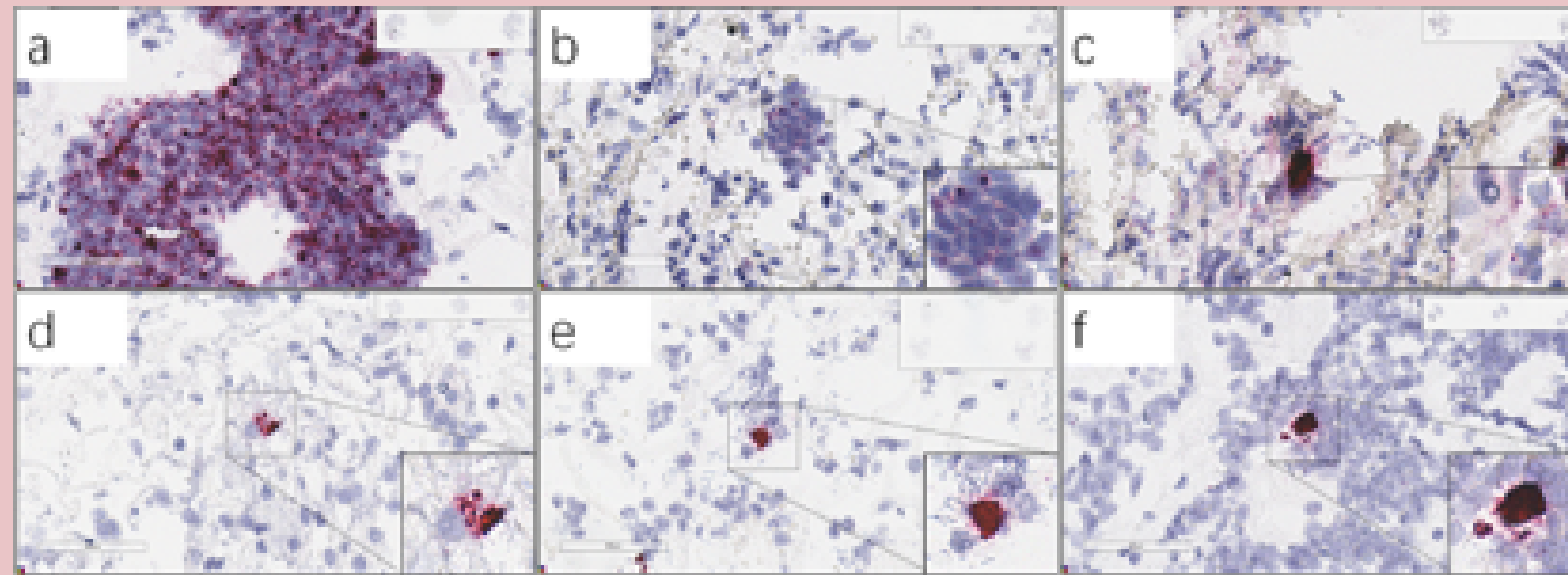


Fig. 1 RNAscope HPV-HR18 representative images. a-f, Patient #20 (a), #40 (b), #28 (c), #75 (d), #49 (e) and #57 (f). HPV PCR results of the patients were positive

圖1，RNAscope法檢測子宮頸刮落細胞內的HPV E6/E7 mRNA。圖中紅色訊號點位RNAscope陽性。

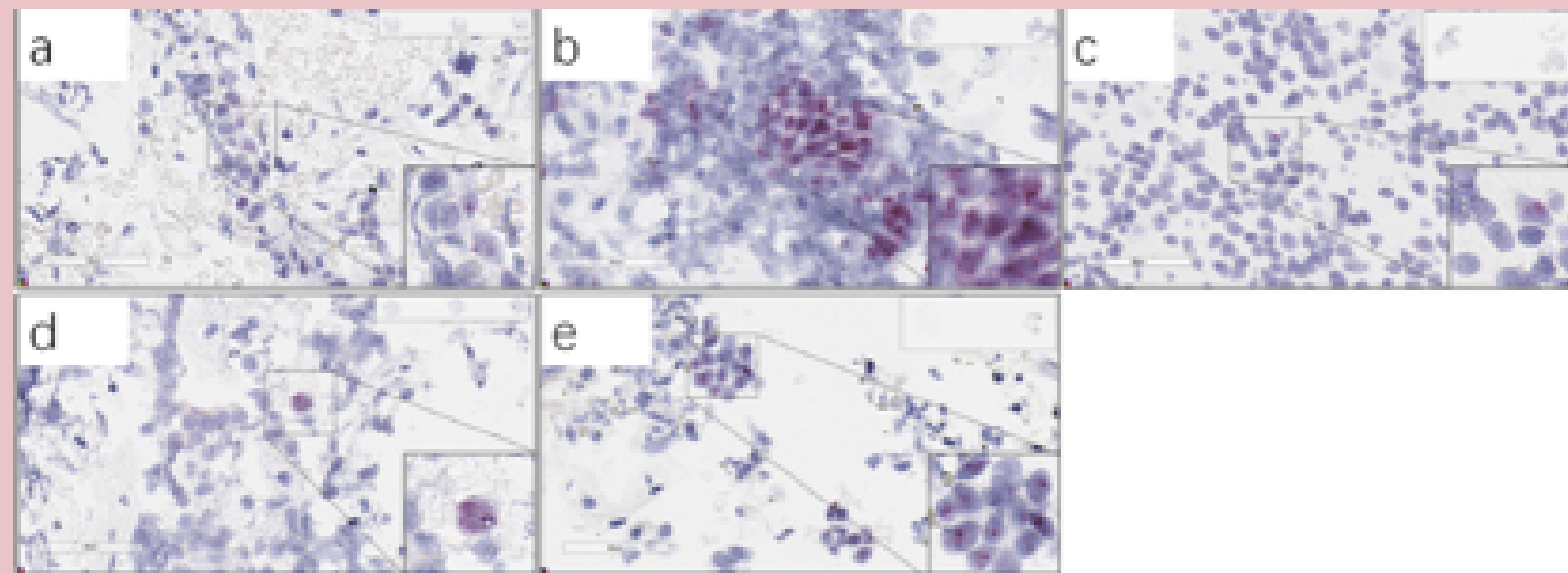


Fig. 2 RNAscope Hs-TERC representative images. a-e, Patient #77 (a), #20 (b), #60 (c), #75 (d), #40 (e). HPV PCR results of the patients were all HPV-high risk positive

圖2：RNAscope法檢測子宮頸刮落細胞內的長鏈非編碼RNA-TERC。圖中紅色訊號點位RNAscope陽性訊號。

RNAscope技術是由Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope技術屬於新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA。該方法的具體優勢如下：

- 1 應用廣泛：**使用RNAscope®技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope®技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。
- 2 特異性強：**RNAscope®獨特的雙Z（ZZ）探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z探針不會產生完整的訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫洗掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要4週時間即可完成。



- 3** **靈敏度高：**RNAscope®方法檢測每個RNA 分子時，只需三對雙Z（ZZ）探針即可完成雜交和訊號的可視化。
- 4** **單分子檢測和單細胞定量：**使用RNAscope®技術雜交上三對及以上雙Z 探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。ACD公司建議的分析軟件更可以定量每一個單細胞內RNA 的表現量。
- 5** **兼容降解的RNA：**由於RNAscope®三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z 探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。



6 檢測結果穩定一致性：RNAscope® 技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冰凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼壁細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNAscope® 技術檢測結果具有穩定性和一致性。除了可以在實驗室進行手工操作外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平台上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。

7 多通道多目標同時檢測：由於RNAscope® 技術可以同時進行多通道探針雜交以及訊號放大，故在可見光檢測中可以在同一張切片上同時檢測兩個目標；而在螢光檢測過程中，可以在同一張切片上檢測三個或三個以上目標RNA。

Reference:

Virol J. 2022 Jan 24;19(1):18. doi: 10.1186/s12985-021-01696-9. Human papillomavirus E6E7 mRNA and TERC lncRNA in situ detection in cervical scraped cells and cervical disease progression assessment.

