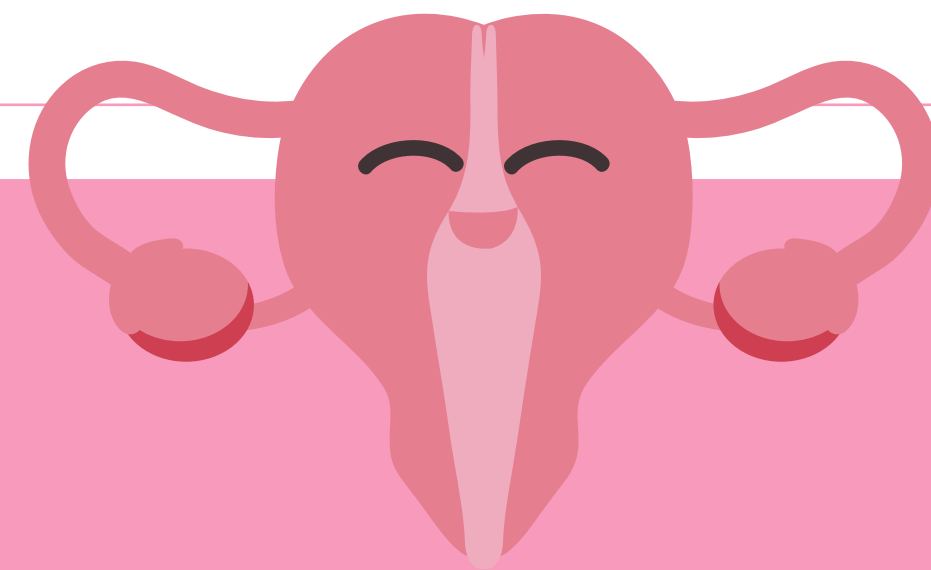




RNAscope 鑑定 HPV 感染子宮頸外層類器官模型

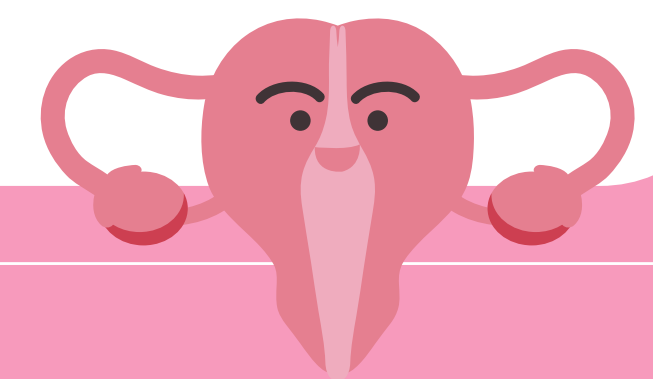


長期以來，人們已經證明人類乳突病毒（HPV）會導致癌症。事實上，90%以上的子宮頸癌中都能發現HPV感染。然而，HPV並不是唯一的罪魁禍首。儘管超過80%的女性在其一生中會感染HPV，但因此患上癌症的女性甚至都不到2%。一段時間以來，人們注意到，子宮頸癌患者往往不僅感染人類乳突病毒，而且還同時感染細菌病原體沙眼衣原體。這一觀察結果表明，HPV病毒和細菌的合併感染可能導致子宮頸癌。HPV可將致癌基因HPV E6E7整合到宿主細胞，並且在90%的子宮頸癌患者中能發現這一現象。E6和E7基因是癌變過程的啟動因子，高危險型HPV的E6和E7蛋白在子宮頸癌組織內持續表現，是致癌的關鍵因素。但是沙眼衣原體如何作用於子宮頸癌的發展仍是不清楚的。2023年2月，來自Max Planck感染生物學研究所和Würzburg大學的研究人員在Nature Communications上發表的一篇題為“Modeling Chlamydia and HPV co-infection in patient-derived ectocervix organoids reveals distinct cellular reprogramming”的文章，通過建立成體幹細胞來源的子宮頸外層類器官，利用RNAscope、轉錄組分析等技術揭示了HPV和沙眼衣原體合併感染的致癌分子機制。



子宮頸分爲兩部分，外子宮頸和內子宮頸，目前缺乏合適的上皮初代細胞模型來概括人類子宮頸外層上皮的疾病發展，因此研究人員構建了不同的子宮頸外層類器官模型。一種是來自健康捐贈者子宮頸幹細胞的子宮頸外層類器官(稱爲hCEcto)，一種是用攜帶HPV16 E6E7癌基因的慢病毒轉導hCEcto幹細胞，對這些細胞進行基因修飾，使E6E7整合到宿主細胞基因組中，構建出模擬HPV感染特性子宮頸外層類器官(稱爲hCEcto E6E7)。經實驗驗證，轉導了HPV E6E7的類器官產生了與子宮頸上皮內瘤變(CIN)相似的表現型。

爲了驗證類器官模型是否支持高效的HPV生命週期，研究人員利用RNAscope方法檢測了E7基因與病毒粒子組裝所必需的晚期基因L1在hCEcto、hCEcto E6E7以及含游離HPV16基因組的初代角質形成細胞生成的類器官(稱爲KC-epi)中的表現(圖1)。結果發現hCEcto E6E7類器官中E7基因大量表現，但未檢測到L1基因的訊號。相比之下，KC-epi細胞生成的類器官在腔細胞中表達E7和L1基因，表明類器官模型支持高效的HPV生命週期，這些類器官培養條件爲研究HPV和合併感染生物學開闢了一條途徑。



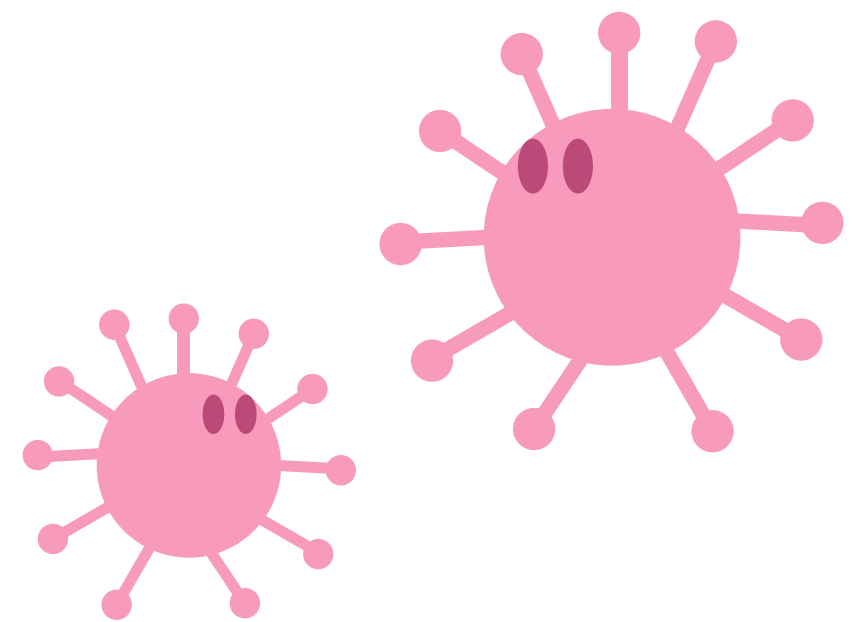
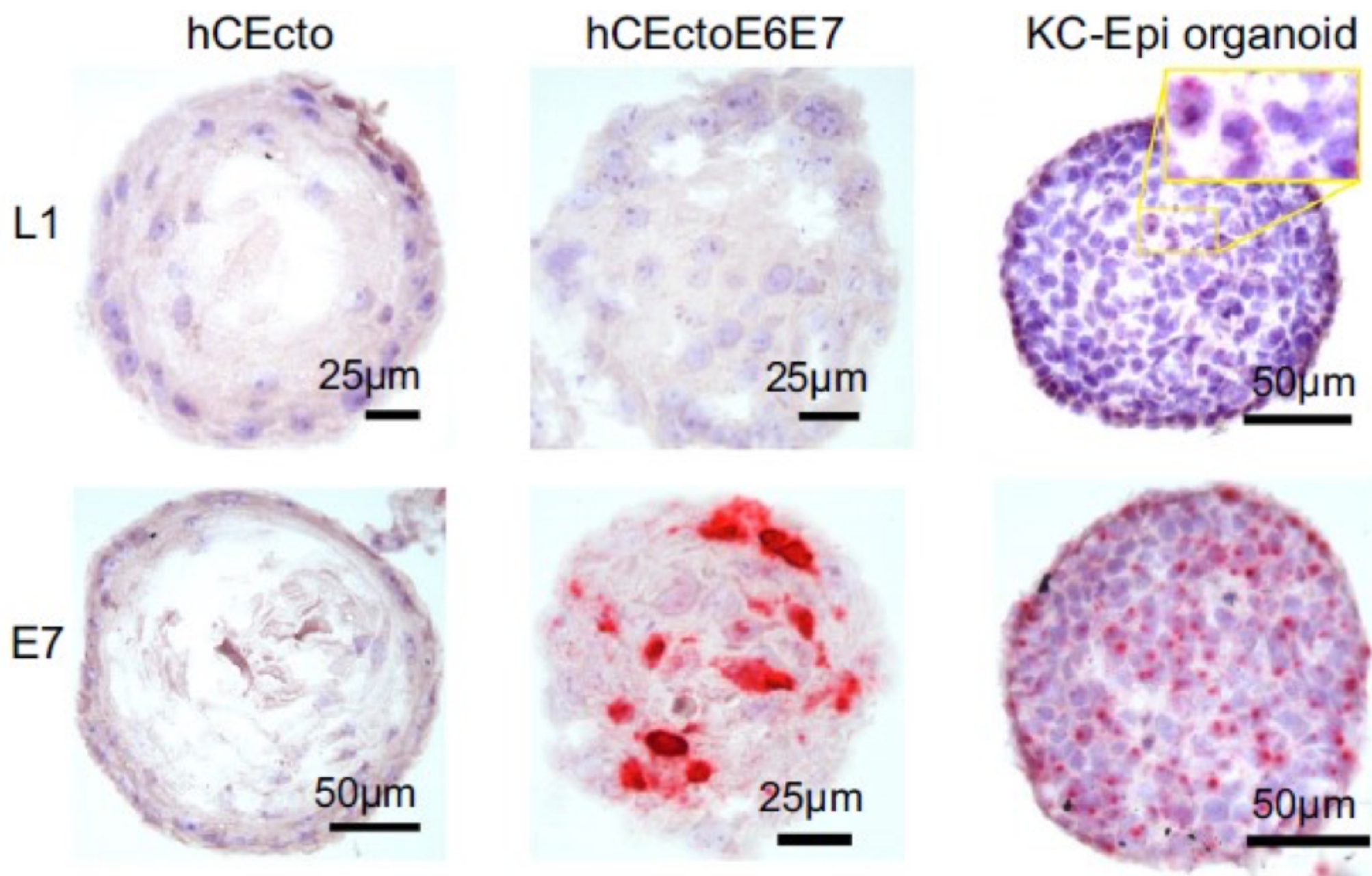


圖1.
RNAscope在類器官模型中檢測HPV L1與
E7基因的表達。

建立了HPV感染特徵的類器官模型後，研究人員後續用沙眼衣原體感染類器官，建立了HPV和沙眼衣原體共同感染模型。通過轉錄組分析，發現HPV E6E7和沙眼衣原體能以不同的方式增加或降低宿主基因轉錄表現量，引起細胞產生與子宮頸上皮內瘤變(CIN)類似的轉錄圖譜。並且沙眼衣原體的共同感染能抑制HPV E6E7基因引起的宿主基因轉錄水平變化。最後研究人員揭示了HPV E6E7和沙眼衣原體共感染能引發宿主細胞獨特的重編程，二者從相反的方向影響細胞和基因組穩定性，從而促進腫瘤的形成。

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2~4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檢測。
- 4 單分子檢測和單細胞定量：**使用RNAscope技術雜交接上三對及以上雙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公司建議的分析軟體更可以定量每一個單細胞內RNA的表現量。



5 相容降解的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（冷凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼附細胞等）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自動平臺上運行，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。





RNAscope 鑑定 HPV
感染子宮頸外層類器官模型

