

TCT 联合 HPV-DNA 及端粒酶检测在宫颈癌前病变筛查中的应用

马琛¹, 彭力^{1△}, 袁蔓丽², 陈静¹ (重庆市急救医疗中心: 1. 病理科; 2. 遗传研究室 400014)

【摘要】目的 研究液基薄层细胞学(TCT)联合高危型人乳头瘤病毒 DNA(HPV-DNA)、端粒酶在宫颈癌前病变检测中的临床应用价值。**方法** 对宫颈不同病变,包括慢性宫颈炎 55 例,宫颈上皮内瘤变(CIN) I 62 例、CIN II 112 例、CIN III 41 例,同时进行 TCT、HPV-DNA、端粒酶的检测,并对 3 项结果进行比较。**结果** TCT 单独检查 CIN 阳性率为 64.6%,其中 CIN II ~ III 诊断阳性率为 77.8%; HPV-DNA 诊断 CIN II ~ III 的阳性率为 96.7%,高于该组 TCT 的阳性率(77.8%),差异有统计学意义($P < 0.05$); CIN 端粒酶阳性表达率高于慢性宫颈炎($P < 0.05$); 3 项指标联合检测的灵敏度为 94.0%,特异度为 100.0%,阴性预测值为 80.9%,阴性预测值明显高于其他 2 项联合检测。**结论** TCT 联合 HPV-DNA 及端粒酶检测相互可以提高检出率,对于宫颈癌前期病变的早期诊断、疾病评估、治疗及预后具有较高的临床价值。

【关键词】 宫颈上皮内瘤变; 液基薄层细胞学; 人乳头瘤病毒; 宫颈癌前病变; 端粒酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0196-02

Application of TCT combined with HPV-DNA and telomerase detection in screening cervical precancerous lesions MA Chen¹, PENG Li^{1△}, YUAN Man-li², CHEN Jing¹ (1. Department of Pathology; 2. Department of Genetic Research Laboratory, Chongqing Municipal Emergency Medical Center, Chongqing 400014, China)

【Abstract】Objective To investigate the clinical application value of thinprep cytological testing(TCT) combined with high-risk type human papilloma virus (HPV) DNA and telomerase detection in cervical precancerous lesions. **Methods** The patients with different cervical lesions, including 55 cases of chronic cervicitis, 62 cases of intra-epithelial neoplasia (CIN) I, 112 cases of CIN II and 41 cases of CIN III, were simultaneously detected TCT, HPV-DNA and telomerase. The detection results were compared. **Results** The positive rate of CIN detected by single TCT was 64.6%, in which the diagnostic positive rate of CIN II - III was 77.8%, the positive rate of HPV-DNA for diagnosing CIN II - III was 96.7%, which was higher than 77.8% of TCT in this group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the positive expression of telomerase in CIN was significantly higher than that in chronic cervicitis ($P < 0.05$); the sensitivity in the combined detection of TCT, HPV and telomerase was 94.0%, the specificity was 100.0%, the negative prediction value was 80.9%, the negative prediction value was significantly higher than that in the combined detection of other two items. **Conclusion** TCT combined with HPV-DNA and telomerase detection can increase the detection rate of cervical diseases and has a higher clinical application value for the early diagnosis of cervical precancerous lesions, disease evaluation, treatment and prognosis.

【Key words】 CIN; thinprep cytological testing; HPV; human-telomerase; cervical precancerous lesion

宫颈癌是妇科高发的恶性肿瘤之一,宫颈上皮内瘤变(CIN)尤其是高级别(CIN II ~ III)早期诊断与早期治疗是防治宫颈癌的重要手段^[1]。本研究通过液基薄层细胞学(TCT)联合人乳头状瘤病毒(HPV)及端粒酶检测,探讨 TCT、HPV-DNA 及端粒酶检测在宫颈癌前病变筛查中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2014 年 1 月本院收治的宫颈病变患者 270 例,均为女性;年龄 19~73 岁,平均 39 岁;根据组织学病理诊断分为慢性宫颈炎 55 例、CIN I 62 例、CIN II 112 例、CIN III 41 例。所有诊断均经病理组织学确诊。

1.2 仪器与试剂 TCT 检测采用孝感德立森电子有限责任公司生产的 DCT 型液基细胞超薄制片机及配套材料。HPV-DNA 检测试剂盒、HPV 基因分型(23 型)检测试剂盒、珠海黑

马球医学 Hema9600 聚合酶链反应(PCR)仪、亚能生物 YN-H16 恒温杂交仪均购自亚能生物科技有限公司。端粒酶检测采用兔抗人端粒酶多克隆抗体、非生物素免疫组化 EliVision™ plus 检测试剂盒。二氨基联苯胺(DAB)显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 方法

1.3.1 TCT 检测 将塑料采集器上的脱落细胞浸入装有细胞保存液的小瓶中,经 DCT 型液基细胞超薄制片机进行程序化处理,制成直径 2 cm 的细胞薄层,然后用 95%乙醇固定 15 min,经巴氏染色法染色后晾干、封片。后经显微镜镜检,按照阴道细胞学的分类及报告细则(TBS)诊断标准,进行诊断和分类。

1.3.2 HPV-DNA 检测 用宫颈刷置于宫颈口,单方向旋转 5 周,取出并将宫颈刷头放入提取缓冲液中,充分洗脱,取 1

mL 液体经离心、裂解提取 DNA,再经 PCR 扩增后用基因分型膜条杂交、显色。每次试验同时设置阴性、阳性质控。

1.3.3 端粒酶检测 采用原位杂交应用检测试剂盒检测端粒酶的表达。主要步骤如下:常规 3 μm 连续切片、脱蜡、水化,枸橼酸盐缓冲液高温、高压抗原修复,3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,滴加一抗,4 °C 冰箱过夜,滴加聚合物增强剂,室温下孵育 20 min,滴加酶标抗鼠/兔聚合物,室温下孵育 30 min, DAB 显色、苏木精复染、封片。用磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。光镜高倍镜下(×400)对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 200 个肿瘤细胞,计数细胞阳性率。细胞呈棕黄色颗粒为端粒酶阳性表达,阳性细胞数小于 5% 为阴性,超过 5% 为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料以率表示,组间比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同病理类型 TCT、HPV-DNA、端粒酶检测结果比较 见表 1。TCT、HPV-DNA、端粒酶检测阳性率均随 CIN 病理类型分级的增高而呈上升趋势。CIN I ~ II 的 HPV-DNA 阳性率为 96.7%,与 TCT 阳性率 77.8% 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HPV-DNA 与端粒酶检测 CIN 的阳性率分别为 90.7%、91.6%,均高于 TCT 的 64.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。端粒酶检测 CIN 的阳性率高于慢性宫颈炎组织端粒酶阳性率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同病理类型 TCT、HPV-DNA、端粒酶检测结果比较[n(%)]

病理类型	n	TCT	HPV-DNA	端粒酶
慢性宫颈炎	55	—	0(0.0)	5(9.1)
CIN I	62	20(32.2)	47(75.8)	50(80.6)
CIN II	112	83(74.1)	107(95.5)	106(94.6)
CIN III	41	36(87.8)	41(100.0)	41(100.0)

注:—表示无数据。

2.2 单项及联合检测结果比较 HPV-DNA 及端粒酶单项检测 CIN 灵敏度均显著高于 TCT 单项检测($P < 0.05$)。TCT 与 HPV-DNA 联合检测 CIN 灵敏度较 TCT 单项检测明显升高,阴性预测值也明显升高。3 项指标联合检测,进一步提高检测 CIN 的灵敏度和阴性预测值,但特异度明显下降($P < 0.05$),见表 2。

表 2 单项及联合检测 CIN 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值(%)

检测项目	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
TCT	64.6	100.0	100.0	42.0
HPV-DNA	90.6	100.0	100.0	73.3
端粒酶	91.6	90.9	97.5	73.5
TCT+HPV-DNA	94.0	100.0	100.0	80.9
TCT+端粒酶	94.4	90.9	97.6	80.6
TCT+HPV-DNA+端粒酶	98.6	90.9	97.7	94.3

3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,其发生、

发展一般过程为 CIN I、CIN II、CIN III 进而发展到原位癌甚至浸润性癌。但各级别 CIN 病变中均有一些病例可发生逆转或长期维持原状,而非一成不变地从 CIN I 向 CIN II、CIN III 或宫颈癌发展^[2]。因此,判断 CIN 的恶性病变可能或风险非常重要。宫颈细胞学检查是临床常用的筛查宫颈癌和宫颈癌前病变的方法。随着医疗的技术的进步,TCT 检查逐渐代替了传统的宫颈刮片检查,该技术具有采集标本细胞数量更多,细胞制片质量更好的特点,能够对更多的宫颈癌前期病变进行诊断,有利于临床对宫颈癌进行早期干预^[3-6]。

端粒酶作为肿瘤标志物越来越受到关注^[7-8]。端粒酶激活是恶性肿瘤细胞无限增殖的分子基础^[9],Dhaene 等^[10]对近年来有关端粒酶与宫颈癌及其癌前病变的研究进行了抽样调查,结果显示在宫颈癌组织中,端粒酶阳性率为 80%~100%,健康对照组为 0%~10%,健康宫颈与宫颈癌组织端粒酶活性比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。罗琼等^[11]研究发现,端粒酶的激活是高危型 HPV 感染宫颈组织后由 CIN 向宫颈癌转化过程中的关键步骤。本研究结果也显示,端粒酶阳性表达率随着 CIN 病理类型分级的增高逐渐升高,与 HPV-DNA 检测结果有高度的一致性,均明显高于同病理类型 TCT 检测的阳性率($P < 0.05$)。说明端粒酶的活性增加与宫颈癌发生、发展有关。CIN 存在自然转归的问题,随着 CIN 级别的升高,病变的逆转率逐渐下降,病变的进展率逐渐升高,这与端粒酶激活的趋向性相反,提示端粒酶阳性表达的 CIN 癌变可能性更大。因此,对端粒酶阳性表达的 CIN 患者应注意密切随访。端粒酶的激活发生在宫颈癌的早期,并与其发展程度有关,端粒酶检测已成为宫颈癌诊断及预后的标记物及评估指标。

有研究表明测试 HPV-DNA 是检测子宫疾病和宫颈癌的最有效方法。在宫颈癌患者中,高危型 HPV 感染是其发生的主要诱因^[4]。有研究报道,TCT 联合高危型 HPV 检测是诊断宫颈病变的理想方法,两种方法联合检测可提高 CIN 的阳性预测值,比单纯使用一种方法的效果好,可以减少漏诊^[5-6]。本研究结果显示,HPV-DNA、端粒酶单项检测 CIN 的灵敏度和阴性预测值均明显高于 TCT 单项检测($P < 0.05$),而特异度无明显差异($P > 0.05$)。TCT 联合 HPV-DNA 检测 CIN 的灵敏度和阴性预测值,明显高于 TCT、HPV-DNA、端粒酶单项检测。3 项指标联合检测会进一步提高 CIN 的灵敏度和阴性预测值,但特异度明显下降。端粒酶的活性在正常组织中被抑制,在肿瘤中被重新激活,端粒酶参与恶性转化,但部分慢性宫颈炎患者中端粒酶也有阳性表达,可能该类人群为慢性宫颈炎发展成为 CIN 的高危人群;也可能慢性宫颈炎在进行血管重构时,端粒酶活性被激发出来;还可能个体雌激素对端粒酶的激活^[12],从而引起特异度降低,对该类人进行病理动态跟踪,可进一步诠释端粒酶在宫颈病理改变发生过程的作用。

综上所述,通过 TCT、HPV-DNA 及端粒酶的联合检测对宫颈癌前期病变患者的早期诊断及病情转归具有一定的临床意义。

参考文献

[1] 谢兰芬,张向春. TCT 联合 HPV 检测宫颈病变的临床意义[J]. 中国妇幼保健,2011,26(13):2053-2055.
 [2] 张建民,杨幼萍,朱扬丽. 宫颈鳞状细胞癌癌前病变分类系统的进展和争议[J]. 中华病理学杂志,2007,36(3):206-208. (下转第 200 页)

WBC 降低和肝细胞被破坏进而影响 SAA 和 CRP 的合成,但 SAA 还可以由心脏、骨骼肌和单核细胞系统等肝外组织器官产生^[5-7],因此 SAA 联合检测可对放疗患者感染疗效的检测和预后评估做出准确的判断^[8-11];至于少数其他原发疾病为非感染性疾病者合并感染时,可能是由于体内特殊的免疫机制抑制了 CRP 的合成,原因尚有待进一步分析。以上患者经临床诊断、病原学检查且抗感染治疗有效等均证实为合并感染者,由此可见 SAA 在临床常用的快速判断感染的四项指标中有不容忽视的重要性。

尽管 SAA 的敏感性均优于其他三个指标,然而在 127 例 SAA 和 CRP 结果不一致的病例中仍然出现有 9 例 CRP 增高而 SAA 正常的情况,所占比例仅为 7.09%(9/127)。对疾病类型进行分析时发现,其中 3 例恶性肿瘤并发感染者虽然 SAA 正常,但 WBC、NEU% 和 CRP 均升高;1 例葡萄球菌性烫伤皮肤综合征患儿和 1 例多发性脑梗合并肺炎者虽然 WBC、NEU% 和 SAA 均正常,但 CRP 却呈高水平表达;1 例病毒性脑炎患儿虽然 WBC 和 SAA 均正常且 NEU% 降低,但淋巴细胞比例升高(56.9%)且 CRP 轻度增高(14.09 mmol/L),予以抗感染和降颅压等对症治疗后痊愈,该患者与其他研究报道的 SAA 在病毒感染性疾病中敏感性优于 CRP 的结果并不一致,是否是由于患儿体内所感染病毒的型别特殊性所致,机制尚不明确。以上患者均说明,仅靠 SAA 一个指标来诊断感染是否发生也是不够严谨的,仍然应该结合 WBC、NEU% 和 CRP 来联合检测,防止漏诊。至于另外 3 例恶性肿瘤患者,WBC 均为正常或减低,虽然 NEU%、CRP 均较高但经病原学检查证实无感染,患者未使用抗菌药物治疗而仅进行营养支持对症治疗后即明显好转,在某种程度上可以说明在临床判断恶性肿瘤患者是否合并感染时,SAA 较 CRP 的特异性更高。

综上所述,在临床判断感染是否发生时 SAA 可以弥补其他三个指标的缺陷,其他三个指标同样也可以作为 SAA 阴性时感染存在的补充诊断证据。因此临床上对于感染性疾病的快速诊断指标的选择应该多项目参考,取长补短,四个项目中任何一项均应结合临床认真做出判断,防止漏诊或误诊,同时减少抗菌药物的滥用。

参考文献

[1] 邵天波,余丽萍,何增品. 121 例呼吸系统疾病患者血清淀粉样蛋白 A 测定结果的分析及临床意义[J]. 中国民族民间医药,2009,18(5):79-80.

[2] 兰亚明. SAA 联合 CRP 及 TNF- α 在急性胰腺炎中的诊断作用[J]. 亚太传统医药,2012,8(12):100-101.

[3] 徐忠玉,邓小军,林香. 严重烧伤患者血清 IL-6、CRP 和 SAA 水平变化[J]. 实验与检验医学,2011,29(3):242-243.

[4] 朱星成,段勇,黄革联,等. PCT、hs-CRP、SAA 对细菌与病毒感染的鉴别作用[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(22):3048-3050.

[5] 胡玲,苏雷,商琰红,等. 结直肠癌患者血清淀粉样蛋白、D 二聚体和 CA724 水平对肿瘤转移的预测[J]. 医学研究与教育,2014,31(1):17-20.

[6] 张珺,李慧明,叶素惠. 冠心病患者血清 SAA、IL-6、TNF- α 和 hs-CRP 检测及临床意义探讨[J]. 医学研究与教育,2012,7(10):1-3.

[7] 夏雨,王艳,宋学礼. 慢性肾衰竭病人血 SAA 和 CRP 水平与颈动脉内膜病变的相关性[J]. 青岛大学医学院学报,2012,48(1):45-47.

[8] 刘东红,张云,唐小万,等. 血清淀粉样蛋白 A 对早期胃癌诊断的研究[J]. 医学研究杂志,2014,43(6):107-110.

[9] 李前防,滕义建. 妇科化疗感染患者中 hs-CRP、SAA 的变化研究[J]. 中国社区医师,2010,12(22):200-201.

[10] 汪晓东,邓磊,吕东昊,等. 结直肠癌患者术前 SAA、CRP、CEA 和 CA199 水平的临床诊断价值[J]. 四川医学,2009,30(3):340-342.

[11] 周晓红,刘君. 血清中炎性介质 SAA 和 CRP 的含量以及 SAA、CRP、CEA 联合检测对术前评估结肠癌的临床价值[J]. 泰山医学院学报,2013,34(6):414-418.

(收稿日期:2015-04-27 修回日期:2015-07-22)

(上接第 197 页)

[3] 谢毅群. 薄层液基细胞学联合阴道镜检查对宫颈病变的诊断价值[J]. 中国现代药物应用,2011,5(12):52-54.

[4] 腾淑文,何晓丽. TCT+HPV 联合检测早期宫颈病变的临床观察[J]. 医疗设备,2008,8(1):41-43.

[5] 郝红艺,李兵,毛玲芝,等. 薄层液基细胞学与高危型人乳头瘤病毒检测在宫颈上皮病变筛查中应用价值[J]. 中国妇幼卫生杂志,2011,2(3):124-127.

[6] 丁环宇,李志勤. 液基薄层细胞学联合人乳头瘤病毒检测在宫颈病变中的应用价值[J]. 检验医学与临床,2010,7(4):633-634.

[7] Morelva T, Antonio LB. Immunohistochemical expression of ubiquitin and telomerase in cervical cancer[J]. Arch Intern J Pathol,2009,455(3):235-243.

[8] Tu Z,Zhang A,Wu R,et al. Genomic amplification of the

human telomerase RNA gene for differential diagnosis of cervical disorders [J]. Cancer Genet Cytogenet,2009,191(1):10-16.

[9] 高坚欣,高坚蓉,陈品. 宫颈癌中端粒酶与 bcl-2 表达的相关性研究[J]. 中国基层医药,2010,17(3):291-292.

[10] Dhaene K,van Marck E,Parwaresch R. Telomere,telomerase and cancer:an up-date [J]. Virchows Arch,2000,437(1):1-16.

[11] 罗琼,熊树华,戴泽文. 浸润性宫颈癌及宫颈上皮内瘤变组织中 HPV16、E7 蛋白和端粒酶的表达及意义[J]. 江西医学院学报,2009,49(2):64-68.

[12] Kyo S,Takakura M,Kanaya T,et al. Estrogen activates telomerase[J]. Cancer Res,1999,59(23):5917-5921.

(收稿日期:2015-05-11 修回日期:2015-08-01)