

TCT 联合 HPV E6/E7 在宫颈癌筛查中的应用

陈 颖¹, 林文毅^{2△}, 周 萍¹

(四川省成都市妇女儿童中心医院:1. 妇科;2. 病理科 610091)

摘要:目的 探讨薄层液基细胞学(TCT)和人乳头瘤病毒致癌基因 E6/E7(HPV E6/E7)检测对宫颈癌筛查的临床价值分析。方法 选择该院 7 434 例同时进行 TCT 和 HPV E6/E7 联合筛查宫颈病变的女性患者作为研究对象。对筛查结果异常的患者进行进一步检查,即进行阴道镜检查或活体组织检查。结果 7 434 例女性就诊者中阴性患者 6 375 例,阳性患者 1 059 例,阳性率为 14.27%;在阳性患者中,HPV E6/E7 mRNA 拷贝数为 1~1 000 共 407 例,HPV E6/E7 mRNA 拷贝数≥1 000 共 652 例。随着 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数的增加,HPV-mRNA 的表达水平也在增强,患者患宫颈上皮内病变及宫颈癌的风险也在增加。同时,将 TCT 单独筛查结果与 TCT 联合 HPV E6/E7 mRNA 两组相比较,TCT 单独筛查灵敏度 59.12%,特异度 36.03%;TCT 联合 HPV E6/E7 mRNA 筛查组灵敏度 85.74%,特异度 76.73%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。将 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数 1~1 000 及拷贝数≥1 000 两组联合 TCT 筛查方案进行比较,前者灵敏度 74.00%,特异度 91.88%;后者灵敏度 81.77%,特异度 55.83%,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 TCT 联合 HPV E6/E7 进行宫颈癌筛查,可以对宫颈上皮内病变的进展进行有效的风险评估,能更准确的判断宫颈上皮内病变的程度及预后发展。

关键词:薄层液基细胞学; 人乳头瘤病毒致癌基因 E6/E7; 宫颈癌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.018 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)15-2216-03

Analysis of clinical value of combined detection of TCT and HPV E6/E7 in screening of cervical lesions

CHEN Ying¹, LIN Wenyi^{2△}, ZHOU Ping¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Pathology, Chengdu Women's and Children's Central Hospital, Chengdu, Sichuan 610091, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical value of the combined detection of liquid-based cytology(TCT) and human papilloma virus oncogene E6/E7(HPV E6/E7) in cervical cancer screening. **Methods** A total of 7 434 women in our hospital were screened for cervical lesions by TCT and HPV E6/E7. And for the abnormal results screed out, colposcopy and biopsy were used to detect further. **Results** In the 7 434 women, 6 375 cases had negative results, and 1 059 cases had positive results, and the positive rate was 14.27%. In the positive patients, the copy number of HPV E6/E7 mRNA from 1 to 1 000 had 407 cases, and the copy number of HPV E6/E7 mRNA higher than 1 000 had 652 cases. With the increase of the copy number of HPV E6/E7 mRNA, the expression level of HPV-mRNA was also increased, and the risk of cervical intraepithelial lesion and cervical cancer was also increased. At the same time, the sensitivity of TCT alone was 59.12% and the specificity was 36.03%. The sensitivity of TCT combined with HPV E6/E7 mRNA screening group was 85.74% and the specificity was 76.73%, the difference was statistically significant($P<0.05$). The sensitivity and specificity of HPV E6/E7 mRNA (copy number 1-1 000) and (copy number higher than 1 000) were compared with TCT screening program, the former sensitivity was 74.00%, the specificity was 91.88%; the latter sensitivity and specificity were 81.77% and 55.83%, differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** TCT combined with HPV E6/E7 mRNA for cervical cancer screening, can be effective in the development of cervical intraepithelial lesions risk assessment. It could be more accurate to determine the extent and prognosis of cervical intraepithelial lesions and development.

Key words: layer liquid based cytology; human papillomavirus oncogene E6/E7; cervical cancer

近年来大量研究证实,宫颈癌和癌前宫颈病变均与人乳头瘤病毒(HPV)有重大关联^[1]。我国宫颈癌每年新发病例占全世界 1/4,为 130 000/年。目前,随着宫颈癌的筛查技术的开展和普及,HPV 的检测已成为宫颈癌筛查、预防的重要手段之一。如今,临床常用的 HPV 检测方法有高危型 HPV 脱氧核糖核酸(hrHPV-DNA)和 HPV 分型两种,而全球最新的 HPV 致癌基因 E6/E7 信使核糖核酸(HPV E6/E7 mRNA)检测技术与单纯检测脱氧核糖核酸(DNA)相比,更能体现致癌基因是否发挥作用,从而提示病毒活动度及致癌风险,可以有效减少对一过性 HPV 病毒感染的检出。此项技术的广泛应用也将为我国宫颈癌筛查及预防领域开启新的篇章。本院妇科门诊 2014 年 1 月至 2015 年 8 月 31 日采用薄层液基细胞学

(TCT)联合 HPV E6/E7 mRNA 检测患者 7 434 例,现将筛查结果汇报如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1 月 1 日至 2015 年 8 月 31 日本院病理科进行 HPV E6/E7 mRNA 检测+TCT 检测患者 7 434 例,按照 2013 年美国阴道镜及宫颈病理学会(ASCCP)的宫颈癌筛查策略对筛查结果异常的患者进行进一步检查,即进行阴道镜检查或活检,以组织学诊断为金标准。患者年龄 18~66 岁,平均(42.0±1.8)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 擦净宫颈口分泌物后,用细胞采集刷从宫颈外口置入,沿宫颈外口绕行,固定中心在颈管内旋转 8~10

圈, 10 s 后取出, 置于专用保存液瓶中保存。

1.2.2 HPV E6/E7 mRNA 检测 高危型 HPV E6 离心后加入裂解剂, 水浴后待测。检测步骤: 自 -20 °C 冰箱取出探针溶液(每孔 1 μL)以及单链 HPV 核酸阳性质控溶液(每孔 2 μL)复温。配制好检测缓冲液后, 与检测探针溶液、阳性对照液以及处理后的标本分别混合为每孔总容积 100 μL 的反应液, 加入 96 孔板中; 取纯探针溶液作为空白对照, 孵育 3.5 h。加入荧光物质标记的底物后, 在培养板光度计上检测。检测结果为光子数, 经 Diacarta 公司计算软件自动判断结果。

1.2.3 TCT 检查结果解读 根据 2001 年 TBS 分类系统, 做出描述性诊断报告, TCT 正常: 无上皮内病变或恶性改变(NILM); TCT 异常: 鳞状细胞异常和腺细胞异常, 前者包括不典型鳞状细胞(ASC)、低度鳞状上皮内病变(LSIL)、高度鳞状上皮内病变(HSIL)和鳞状细胞癌(SCC); 后者包括不典型腺细胞(AGC)和腺癌。

1.2.4 组织病理学检测 HPV 阳性、TCT 异常 经阴道镜检查不能排除异常者, 行阴道镜下多点活检。取下组织行常规 HE 染色、封片, 由高资历病理医师阅片。组织病理诊断分为慢性宫颈炎、低级别 CIN(CIN I 级)、高级别 CIN(CIN II 级和 CIN III 级)、宫颈浸润癌。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学软件进行分析。计数资料采用百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

本院从 2013 年 1 月开展 HPV E6/E7 mRNA 检测以来, 共检测就诊者 7 434 例, 其中阴性患者 6 375 例, 阳性患者 1 059 例, 阳性率为 14.27%; 在阳性患者中, HPV E6/E7 mRNA 拷贝数为 1~1 000 共 407 例, TCT 结果为正常及炎症共 341 例, 无明确诊断意义的 ASC(ASCUS)以上 66 例; 组织病理诊断为慢性宫颈炎 357 例、CIN I 级 43 例、CIN II 级和 CIN III 级 7 例、宫颈浸润癌 0 例。HPV E6/E7 mRNA 拷贝数 $\geq 1 000$ 共 652 例, TCT 结果为正常及炎症共 108 例, ASCUS 以上 544 例; 组织病理诊断为慢性宫颈炎 120 例、CIN I 级 152 例、CIN II 级和 CIN III 级 365 例、宫颈浸润癌 15 例。通过不同拷贝数发现, 随着 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数的增加, HPV-mRNA 的表达水平也升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明宫颈病变程度严重性与拷贝数量具有一定相关性。将 TCT 单独筛查结果与 TCT 联合 HPV E6/E7 mRNA 两组相比较, TCT 灵敏度 59.12%, 特异度 36.03%; 联合 HPV E6/E7 mRNA 灵敏度 85.74%, 特异度 76.73%, 组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。再将 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数 1~1 000 及拷贝数 $\geq 1 000$ 两组联合 TCT 筛查方案进行分层比较发现, 前者灵敏度 74.00%, 特异度 91.88%; 后者灵敏度 81.77%, 特异度 55.83%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1~4。

表 1 TCT 单独检测结果(n)

TCT	炎症	CIN I	CIN II~III	宫颈癌	合计
阴性	2 424	198	88	3	2 713
阳性	4 303	273	137	8	4 721
合计	6 727	471	228	8	7 434

表 2 TCT 联合 HPV E6/E7 mRNA 筛查结果(n)

TCT+HPV E6/E7 mRNA	炎症	CIN I	CIN II~III	宫颈癌	合计
阴性	366	57	26	0	449
阳性	111	138	346	15	610
合计	477	195	372	15	1 059

表 3 HPV E6/E7 mRNA(拷贝数 1~1 000)联合 TCT 筛查结果(n)

TCT+HPV E6/E7 mRNA(拷贝数 1~1 000)	炎症	CIN I	CIN II~III	宫颈癌	合计
阴性	328	11	2	0	341
阳性	29	32	5	0	66
合计	357	43	7	0	407

表 4 HPV E6/E7 mRNA(拷贝数 ≥ 1000)联合 TCT 筛查结果(n)

TCT+HPV E6/E7 mRNA(拷贝数 ≥ 1000)	炎症	CIN I	CIN II~III	宫颈癌	合计
阴性	67	18	37	0	108
阳性	53	134	328	15	544
合计	120	152	365	15	652

3 讨 论

经过数十年研究表明, HPV 感染是宫颈癌发生和发展的主要原因。研究表明宫颈癌筛查可以有效降低宫颈癌的发生率。因此, 从 2013 年开始, hrHPV-DNA 联合细胞学的宫颈癌联合筛查方案被美国阴道镜及宫颈病理协会推荐使用^[2]。随着这一方案的推进, 研究者们发现它仍存在许多局限与不足。首先 hrHPV-DNA 检测虽然灵敏度较高, 但其特异度相对较低, 也就是说对于宫颈病变的进展性不能进行有效的风险评估; 而 HPV E6/E7 mRNA 检测在特异度上远远优于 hrHPV-DNA 检测。2006 年欧洲生殖器感染和肿瘤研究组织(EUROGIN)将 HPV E6/E7 mRNA 检测作为宫颈癌筛查的重点研究内容之一^[3]。

已有研究证实, 从感染 HPV 到发展为宫颈癌前病变或者浸润癌有数十年时间, 这期间只要及时发现, 及时治疗随访, 在癌前病变阶段具有可逆性^[4-5]。hrHPV-DNA 联合细胞学筛查虽然灵敏度高, 但是这仅仅是病因学检查, 尚无法判定病毒的活动情况, 而且只有少部分患者持续 HPV 感染才有可能进展为高级别病变。因此, 与检测 DNA 不同, hrHPV-DNA 检测主要是通过对 RNA 的检测来了解转录病毒的活性。当 HPV 早期编码区中的 E6/E7 病毒一旦与宫颈上皮细胞接触后, 随之与细胞 DNA 整合, E6/E7 mRNA 转录生成 E6、E7 癌蛋白。当癌蛋白与宿主细胞的抑癌基因 P53 以及 Rb 蛋白等相结合, 将会导致细胞周期发生失调从而诱发癌前病变甚至癌变^[6]。Tuney 等^[7]研究发现 HPV E6/E7 是病毒癌基因转录产物, 它们的表达以及转录数量的多少将导致宿主细胞恶性转化。HPV E6/E7 mRNA 作为有活性的癌基因在宫颈组织中表达, 如若癌基因没有表达, 则提示该癌基因没有活性, 则不会发生癌变^[8]。因此, 检测 HPV E6/E7 mRNA 的表达可以对宫颈上皮内病变的进展进行有效的风险评估, 能更准确的判断宫颈上皮内病变的程度、预后及发展。

本院从 2014 年 1 月开展 HPV E6/E7 mRNA 检测以来,

共检测患者 7 434 例,其中阴性患者 6 375 例,阳性患者 1 059 例,阳性率为 14. 27%;本研究发现由于 HPV 感染的普遍性和感染后一过性消除的特点,检测 HPV E6/E7 mRNA 的表达较之检测病毒 DNA 更精准、有效,且 HPV E6/E7 mRNA 表达水平与病变的严重程度相关,故 HPV E6/E7 mRNA 检测对于鉴别是短暂的宫颈异常或是进一步发展的宫颈病变有较大意义。所以本研究建议对于宫颈癌早期筛查方案推荐 hrHPV-DNA 和 TCT 的联合检测,然后以 HPV E6/E7 mRNA 检测进行分流,对于宫颈细胞学阳性包括 ASCUS 以上的患者应同时进行 HPV E6/E7 mRNA 检测,对于宫颈上皮内病变术后的患者随访应进行 HPV E6/E7 mRNA 和 TCT 联合检测。国内学者研究发现将 ASCUS 患者进行 HPV E6/E7 mRNA 分流的检测,而 HPV E6/E7 mRNA 阴性患者大多是低级别病变,而阳性患者大都是高级别病变,甚至建议 HPV E6/E7 mRNA 检测可作为 ASCUS 患者是否需要阴道镜检查的一项指标^[9-10],当然这样的结论还需要大样本的随机对照研究才能明确。同时研究还表明,随着 HPV E6/E7 mRNA 表达的增强,宫颈病变的程度增加,且 mRNA 表达差异存在统计学意义($P < 0. 05$);对预测高级别 CIN,尤其对评估癌症风险有着重要的临床价值^[11-12]。因此宫颈 HPV E6/E7 mRNA 检测,可以对宫颈上皮内病变的进展进行有效的风险评估,能更准确的判断宫颈上皮内病变的程度及预后发展。

综上所述,HPV E6/E7 mRNA 检测宫颈病变特异性及阳性预测值较高,有望成为宫颈疾病筛查更好的指标,对于宫颈癌的预防、治疗及降低宫颈癌发病率和病死率具有一定的指导意义。

参考文献

[1] Wang HY, Kim G, Cho H, et al. Diagnostic performance of HPV E6/E7, hTERT, and Ki67 mRNA RT-qPCR assays on formalin-fixed paraffin-embedded cervical tissue specimens from women with cervical cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(3): 510-516.

[2] 马丁,李双. 2013 年美国阴道镜及宫颈病理协会宫颈癌筛查新指南解读和启示[J/CD]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2014, 10(5): 568-571.

[3] Li Y, Rong S. Detection of cervical intraepithelial neoplasia with HPV E6/E7 mRNA among women with atypical squamous cells of unknown significance[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2017, 137(2): 145-149.

[4] Vishnoi K, Mahata S, Tyagi A, et al. Cross-talk between Human Papillomavirus Oncoproteins and Hedgehog Signaling Synergistically Promotes Stemness in Cervical Cancer Cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34377.

[5] Shen-Gunther J, Wang Y, Lai Z, et al. Deep sequencing of HPV E6/E7 genes reveals loss of genotypic diversity and gain of clonal dominance in high-grade intraepithelial lesions of the cervix[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 231.

[6] Yao YL, Tian QF, Cheng B, et al. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA detection in cervical exfoliated cells: a potential triage for HPV-positive women[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017, 18(3): 256-262.

[7] Tuney I, Altay A, Ergunay K, et al. HPV types and E6/E7 mRNA expression in cervical samples from Turkish women with abnormal cytology in Ankara, Turkey[J]. *Turk J Med Sci*, 2017, 47(1): 194-200.

[8] Faridi R, Zahra A, Khan K, et al. Oncogenic potential of Human Papillomavirus(HPV) and its relation with cervical cancer[J]. *Virol J*, 2011, 8(1): 1-8.

[9] 潘婧微,陈育梅,潘嘉佳,等. HPV E6/E7 mRNA 检测用于 ASCUS 患者诊断分流的临床研究[J]. *中国计划生育学杂志*, 2015, 23(7): 417-473.

[10] 孙玲玲,陈伟. 宫颈细胞学不典型鳞状细胞诊断及检测的研究进展[J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(7): 499-502.

[11] 王华,陈亚宝,叶丽华,等. 应用支链 DNA 技术检测人乳头瘤病毒 E6/E7mRNA 在宫颈疾病筛查中的价值[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(15): 4362-4366.

[12] 黄宝英,周伦顺,富显果,等. HPV E6/E7mRNA 检测对宫颈癌筛查意义的初步评价[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(14): 1061-1064.

(收稿日期:2017-01-18 修回日期:2017-03-26)

(上接第 2215 页)

[5] Raymond DP, Seder CW, Wright CD, et al. Predictors of Major Morbidity or Mortality After Resection for Esophageal Cancer: A Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery Database Risk Adjustment Model[J]. *Annals of Thoracic Surgery*, 2016, 102(1): 207-214.

[6] 杨洪顶. 食管癌三切口根治术中误伤胃网膜右动脉一例[J]. *临床误诊误治*, 2015, 28(3): 78-79.

[7] 其强,刘静魁,曾先文,等. 中西医结合治疗食管癌术后胃肠功能紊乱的临床疗效[J]. *临床合理用药杂志*, 2015, 8(11C): 125-126.

[8] 钮林霞. 早期肠内营养联合优化护理对食管癌切除术后患者营养状态及胃肠道恢复的应用价值[J]. *国际护理学杂志*, 2016, 35(20): 2782-2784.

[9] 李昆,韩晓东,张频. 嚼口香糖对腹腔镜胃旁路术后胃肠动力恢复的疗效观察[J]. *腹腔镜外科杂志*, 2015, 19(1):

10-12.

[10] 曹廷宝,韩晓鹏,李坤,等. 咀嚼口香糖对腹腔镜胃癌 D2 根治术后胃肠功能恢复的疗效观察[J]. *中国现代普通外科进展*, 2014, 17(3): 192-195.

[11] 贺敬,张琦,蒋侠,等. 早期咀嚼口香糖对消化道穿孔术后胃肠功能恢复的护理研究[J]. *安徽医药*, 2015, 18(9): 1825-1826.

[12] 赵日升,汪挺. 咀嚼口香糖在术后胃肠功能恢复中的作用[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 17(7): 412-413.

[13] 刘天贶,孙众,王琦. 咀嚼口香糖对促进腹部手术后胃肠道功能恢复的应用研究现状[J]. *护理学报*, 2014, 19(20): 27-30.

[14] 陈香,孙丹莉. 咀嚼口香糖对胃切除术后影响胃肠功能恢复的探讨[J]. *西部医学*, 2012, 24(10): 2003-2004.

(收稿日期:2017-03-04 修回日期:2017-05-12)