

论著·临床研究

HPV E6/E7 mRNA 检测在 CIN2 级及以上病变筛查中的应用价值分析*

吴 琼¹, 莫洪敏^{2△}

(1. 广州军区桂林疗养院疗一科, 广西桂林 541000; 2. 解放军第 181 医院妇幼中心妇科, 广西桂林 541000)

摘 要:目的 探索人乳头瘤病毒(HPV)E6/E7 mRNA 检测在宫颈上皮内瘤变(CIN)2 级及以上病变筛查中的应用价值。方法 选取 2014 年 1 月至 2016 年 9 月于该院就诊的 CIN 和疑似宫颈癌患者 120 例, 根据患者的病理检查结果分组, 把病检结果为 CIN2、CIN3、浸润癌的 60 例患者作为研究组, 把病检结果正常、CIN1 的 60 例患者作为对照组, 检测并记录液基薄层细胞检查(TCT)、HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 的检查结果并分析。结果 120 例患者中 TCT 总阳性率为 55.0%, HPV DNA 总阳性率为 87.5%, HPV E6/E7 mRNA 总阳性率为 60.8%; 对照组 HPV E6/E7 mRNA 的阳性率为 78.3%, 显著高于 HPV DNA 阳性率(36.7%), 研究组中 HPV E6/E7 mRNA 的阳性率为 85.0%, 显著低于 HPV DNA 阳性率(96.7%), 且差异具有统计学意义($P<0.05$); CIN1、CIN2、CIN3、浸润癌的 HPV E6/E7 mRNA 定量值分别为(4 867.31±694.84)、(8 943.51±986.23)、(28 243.10±10 963.21)、(3 610.84±412.64)copies/mL; CIN3 的 HPV E6/E7 mRNA 定量值显著高于 CIN2、CIN1、浸润癌和对照组, 且差异具有统计学意义($P<0.05$), CIN2 的 HPV E6/E7 mRNA 定量值显著高于 CIN1、对照组, 且差异具有统计学意义($P<0.05$)。HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 两种检测方法在筛查 CIN2 及以上病变中, HPV DNA 的灵敏度(93.8%)高于 HPV E6/E7 mRNA 的灵敏度(84.5%), HPV E6/E7 mRNA 的特异度(53.6%)高于 HPV DNA 的特异度(21.6%), 且差异具有统计学意义($P<0.05$); HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 在筛查 CIN2 及以上病变的 ROC 曲线下面积分别为 0.581、0.681。结论 HPV E6/E7 mRNA 检测在 CIN2 及以上宫颈病变的特异性和准确性高于 HPV DNA, 对 CIN2 及以上宫颈病变的筛查有重要意义。

关键词: HPV E6/E7 mRNA; 宫颈上皮瘤变; 诊断价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.025

中图法分类号: R711.74/R446.9

文章编号: 1673-4130(2018)07-0851-04

文献标识码: A

Analysis of the value of HPV E6/E7 mRNA detection in screening lesions at grade CIN2 and above*

WU Qiong¹, MO Hongmin^{2△}

(1. Guangzhou Military District Guilin Sanatorium, Guilin, Guangxi 541000, China; 2. Women's and Children's Hospital of PLA 181st Hospital of Gynaecology, Guilin, Guangxi 541000, China)

Abstract: Objective To explore the clinical value of HPV E6/E7 mRNA in screening lesions at grade CIN2 and above. **Methods** A total of 120 cases with CIN and suspected cervical cancer treated in our hospital from January 2014 to September 2016 were selected. According to the results of pathological examination, 60 patients with CIN2, CIN3 and invasive cancer were selected as the research group. 60 patients with normal CIN1 and CIN1 were selected as control group. The results of TCT, HPV DNA and HPV E6/E7 mRNA were detected and analyzed. **Results** In 120 patients, the total positive rate of TCT was 55%, the total positive rate of HPV DNA was 87.5%, the total positive rate of HPV E6/E7 mRNA 60.8% HPV E6/E7; control group mRNA positive rate of 78.3% was significantly higher than the positive rate of HPV DNA 36.7% ($P<0.05$), HPV in the study group were E6/E7 mRNA positive rate of 85.0% was significantly lower than the positive rate of HPV DNA (96.7%); HPV E6/E7 mRNA CIN1, quantitative CIN2, CIN3 and invasive carcinoma were (4 867.31±694.84), (8 943.51±986.23), (28 243.10±10 963.21), (3 610.84±412.64)copies/

* 基金项目: 广西桂林市科学技术局科学研究与技术开发计划资助项目(20080217)。

作者简介: 吴琼, 女, 主治医师, 主要从事妇科研究。 △ 通信作者, E-mail: 474594636@qq.com。

本文引用格式: 吴琼, 莫洪敏. HPV E6/E7 mRNA 检测在 CIN2 级及以上病变筛查中的应用价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7): 851-854.

mL; HPV E6/E7 mRNA quantitative CIN3 values were significantly higher than that of CIN2, CIN1 and infiltration of cancer and the control group ($P < 0.05$), E6/E7 mRNA CIN2 quantitative HPV the value of CIN1 was significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). Two methods of detecting HPV DNA and HPV E6/E7 mRNA in the screening of CIN2 and above lesions, the sensitivity of 84.5% DNA 93.8% HPV sensitivity was higher than that of HPV E6/E7 mRNA ($P < 0.05$) HPV E6/E7 21.6%; specificity the specificity of mRNA was 53.6% higher than that of HPV DNA ($P < 0.05$), HPV DNA. HPV ROC curve E6/E7 mRNA were 0.581 and 0.681, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The specificity and accuracy of HPV, E6/E7 and mRNA in detecting cervical lesions over CIN2 and above are higher than those of HPV and DNA. It is of certain diagnostic value for screening cervical lesions over CIN2 and above.

Key words: HPV E6/E7 mRNA; CIN; diagnostic value

人乳头瘤病毒(HPV)持续感染可导致宫颈上皮内瘤变(CIN),宫颈癌前病变包括 CIN1、CIN2、CIN3 3 个等级,CIN 分级反映了宫颈癌的演变过程,低级别上皮内瘤变 CIN1 即异型增生占上皮全层的下 1/3,重度上皮内瘤变 CIN2 即异型增生占上皮全层的下 2/3,高度上皮内瘤变 CIN3 即非典型增生代替上皮全层,是原位宫颈癌^[1-2]。随着 HPV DNA 细胞学检测技术的革新,临床广泛应用于宫颈癌的筛查以降低宫颈癌的发生。HPV DNA 的主要癌基因是 E6/E7,转录、翻译、表达 E6/E7 相关的蛋白是致癌的关键因素,E6/E7 mRNA 的表达能反应 HPV 的基因活性^[3]。本研究探索 HPV E6/E7 mRNA 检测在 CIN2 级及以上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 选取 2014 年 1 月至 2016 年 9 月就诊于本院的 CIN 和疑似宫颈癌患者 120 例,根据患者的病理检查结果分组,病理诊断参考《病理学》诊断标准^[4]:正常,未见异型细胞;CIN1,细胞异型性轻,异常增生的细胞仅限于上皮层的下 1/3;CIN2,细胞异型性明显,异常增生的细胞限于上皮层的下 2/3,未累及表层;CIN3,细胞异型性显著,异常增生的细胞占据上皮内 2/3 以上或达上皮层全层,以及穿透基底膜且间质浸润小于 5 mm;浸润癌,癌组织穿破基底膜,侵入间质大于 5 mm。把病检结果为 CIN2、CIN3、浸润癌的 60 例患者作为研究组,把病检结果为正常、CIN1 的 60 例患者作为对照组。研究组年龄 26~83 岁,平均(45.6 ± 6.9)岁;对照组年龄 23~81 岁,平均(46.3 ± 7.3)岁。纳入标准:(1)有性生活史且取标本前 3 d 无性生活;(2)无宫颈手术史;(3)排除妊娠;(4)无盆腔放射史;(5)3 d 内未阴道用药;(6)此次患病行阴道镜下宫颈病例活检,且完善 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检查。

1.2 方法

1.2.1 液基薄层细胞学检查(TCT) 采用专用宫颈取样的新柏氏毛刷,充分在宫颈管内和鳞柱上皮交界

处采集脱落细胞,并将细胞涮洗在专用细胞取样瓶内,采用全自动液基细胞离心机制片,染色后镜检,按照国际癌症协会推荐的 TBS(2001)分类法对宫颈细胞进行诊断。

1.2.2 HPV DNA 检查 采用 PCR 反向点杂交技术进行测定,HPV 基因分型试剂盒、专用毛刷、细胞保存液和检测仪器均购自中山大学达安基因股份有限公司,专用毛刷取材,将采集的细胞涮洗在专用细胞保存液中,严格按照试剂盒的步骤操作;碱性溶液裂解 DNA 为核苷酸单链,核糖核酸-氧核糖核酸探针特异性结合为杂交物并进行捕获,加入第二抗体与杂交物结合,通过光的强弱可确定碱性磷酸酶含量,复核结果以提高检测结果准确性。

1.2.3 HPV E6/E7 mRNA 检查 使用 TCT 检查剩余标本,宫颈稳态检测专用试剂盒、仪器购自河南中美合资料蒂亚生物技术有限公司,严格按照试剂盒的步骤操作,QuantiVirus™ 冷光仪检测,结果为光子数,计算机将光子数计算、转换为拷贝数(copy/mL),复核结果以提高检测结果准确性。由两位有经验的医师采用双盲法对所有患者行阴道镜下宫颈活检,宫颈组织的病理诊断包括:正常、炎症、CIN1、CIN2、CIN3 及宫颈癌,若两位医师诊断结果不一致,则医师在双头镜下达成一致。

1.3 观察指标 TCT 检测结果:TCT 检测结果包括未见上皮内病变及恶性细胞(NILM)、非典型鳞状细胞(ASCUS)、上皮低度病变(LSIL)、上皮高度病变(HSIL)、不典型腺细胞(AGC),将 NILM、ASCUS 记为检查结果阴性,LSIL、HSIL、AGC 记为检查结果阳性;HPV DNA 检测结果:HPV-DNA ≥ 1 pg/mL 记为阳性;HPV E6/E7 mRNA 检测结果:HPV E6/E7 mRNA 定量值 $> 4\,000$ copies/mL 记为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件包进行数据处理,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料的比较采用方差分析,组内进一步两两比较采用 SNK- q 检验;计数资料用 χ^2 检验;采用受试

者工作特征曲线(ROC)评价两种方法的诊断效能;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同病检结果的 TCT、HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 表达情况 120 例患者中 TCT 总阳性率为 55.0%, HPV DNA 总阳性率为 87.5%, HPV E6/E7 mRNA 总阳性率为 60.8%;对照组 HPV DNA 的阳性率 78.3%, 显著高于 HPV E6/E7 mRNA 阳性率 36.7%;研究组中 HPV E6/E7 mRNA 的阳性率 85.0% 显著低于 HPV DNA 阳性率(96.7%), 且差异

具有统计学意义($P<0.05$);见表 1。CIN1、CIN2、CIN3、浸润癌的 HPV E6/E7 mRNA 定量值分别为 $(4\,867.31\pm694.84)$ copies/mL、 $(8\,943.51\pm986.23)$ copies/mL、 $(28\,243.10\pm10\,963.21)$ copies/mL、 $(3\,610.84\pm412.64)$ copies/mL; CIN3 的 HPV E6/E7 mRNA 定量值显著高于 CIN2、CIN1、浸润癌和对照组, 且差异具有统计学意义($P<0.05$), CIN2 的 HPV E6/E7 mRNA 定量值显著高于 CIN1、对照组, 且差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 不同病检结果的 TCT、HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 表达情况[n(%)]

组别	n	TCT		HPV DNA		HPV E6/E7 mRNA	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
对照组	60	32(53.3)	28(46.7)	47(78.3)	13(21.7)	22(36.7)	38(63.3)
研究组	60	34(56.7)	26(43.3)	58(96.7)	2(3.3)	51(85.0)	9(15.0)
χ^2		0.130		9.220		30.260	
P		0.855		0.004		0.000	

表 2 不同病理分型 HPV E6/E7 mRNA 定量值结果比较($\bar{x}\pm s$, copies/mL)

组别	n	HPV E6/E7 mRNA 定量值
对照组		
正常	49	2 986.12±694.84*#
CIN1	11	4 867.31±694.84*#
研究组		
CIN2	26	8 943.51±986.23*
CIN3	23	28 243.10±10 963.21
浸润癌	11	3 610.84±412.64*
F		124.300
P		0.000

注:与 CIN3 比较,* $P<0.05$;与 CIN2 比较,# $P<0.05$

2.2 CIN2 级及以上病变中两种不同方法的诊断效能比较 HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 两种检测方法在筛查 CIN2 及以上病变中, HPV DNA 的灵敏度为 93.8%, 显著高于 HPV E6/E7 mRNA 的灵敏度(84.5%); HPV E6/E7 mRNA 的特异度为 53.6%, 显著高于 HPV DNA 的特异度(21.6%), 且差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 诊断 CIN2 及以上病变的 ROC 曲线分析 把阴道镜下宫颈活检的病检结果作为“金标准”, CIN2 及以上为阳性, CIN2 以下为阴性, 绘制 ROC 曲线, HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 的 ROC 曲线下面积分别为 0.581、0.681。见图 1。

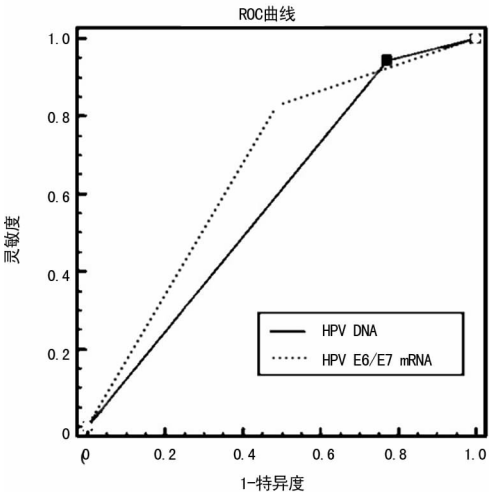


图 1 HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 诊断 CIN2 及以上病变的 ROC 曲线

3 讨 论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤, HPV 持续感染是导致宫颈癌发生、发展的主要因素, 研究发现 99% 的宫颈癌患者宫颈癌标本可检出 HPV[4]。2003 年美国食品与药品管理局批准, 将 HPV 的细胞学检测用于中老年女性宫颈癌的筛查。目前 HPV DNA 用于病因诊断, 不能分析 HPV 的病毒、癌基因活性, 大量临床资料显示, 大部分 HPV 筛查阳性的中老年女性不会发生宫颈癌或宫颈癌前病变, HPV DNA 检测易导致过度检查、过度治疗[5]。

HPV 编码区的病毒癌基因是 E6/E7 基因, 当病毒 DNA 被整合到人体宿主细胞时, E6/E7 基因可被

大量复制,不受抑制地表达 E6/E7 mRNA,影响宿主周期蛋白的调控,使细胞周期调节失控,增加宫颈细胞的恶化易感性^[6-8]。研究显示,CIN2、CIN3 是高级别的宫颈上皮内瘤变,需要有创操作干预,在 CIN1、CIN2、CIN3、浸润癌中 HPV E6/E7 mRNA 的表达呈上升趋势,且在 CIN2、CIN3、浸润癌即 CIN2 及以上病变中阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),故本研究将 CIN2 及以上病变作为研究对象^[9-11]。本研究中 TCT 总阳性率为 55.0%,HPV DNA 总阳性率为 87.5%,HPV E6/E7 mRNA 总阳性率为 60.8%;对照组 HPV E6/E7 mRNA 的阳性率(78.3%)显著高于 HPV DNA 阳性率(36.7%),研究组中 HPV E6/E7 mRNA 的阳性率(85.0%)显著低于 HPV DNA 阳性率(96.7%),且差异具有统计学意义($P<0.05$)。CIN3 的 HPV E6/E7 mRNA 定量值显著高于 CIN2、CIN1、浸润癌和对照组,CIN2 的 HPV E6/E7 mRNA 定量值显著高于 CIN1、对照组,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。在宫颈病变的进程中,HPV E6/E7 mRNA 水平逐渐增高,进入高度鳞状上皮内病变后 HPV E6/E7 mRNA 的量显著上升,但进入浸润癌阶段 HPV E6/E7 mRNA 的表达明显降低,表明 HPV E6/E7 mRNA 的检测对于患者宫颈的高度鳞状上皮内病变的判断有重要意义。本研究纳入病例数较少,不排除偶然性,具体的机制有待进一步研究。本研究中 HPV E6/E7 mRNA 的特异度(53.6%)高于 HPV DNA 的特异度(21.6%),且差异具有统计学意义($P<0.05$);HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 的 ROC 曲线下面积分别为 0.581、0.681。可见 HPV E6/E7 mRNA 在检测 CIN2 及以上宫颈病变中较 HPV DNA 精确度更高,可以反映出宫颈病变的发生发展,预测细胞学病变恶化的风险^[12-13]。HPV 感染到发展为宫颈癌有漫长的过程,HPV 可能处于静止期、病毒癌基因缓慢转录,所以对于 HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 阳性的患者需要长期随访,观察病情变化。

综上所述,HPV E6/E7 mRNA 检测在 CIN2 及以上宫颈病变的特异度和准确度高于 HPV DNA,对 CIN2 及以上宫颈病变的筛查有重要意义,在一定程度上可以减少过度检查、治疗。

参考文献

- [1] 赵旭晔,崔勇,姜淑芳,等.高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的意义[J].中华医学杂志,2014,94(43):3432-3435.
- [2] SPATHIS A, KOTTARIDI C, CHRANIOTI A, et al. mRNA and DNA detection of human papillomaviruses in women of all ages attending two colposcopy clinics[J]. PLoS One, 2012, 7(11):e49205.
- [3] MUNOZ B J, OLMEDO N L, CONTRERAS P A, et al. Regulation of the wnt/beta-catenin signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins[J]. Viruses, 2015, 7(8):4734-4755.
- [4] 李玉林主编.病理学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013.
- [5] SHEN Y, GONG J, HE Y, et al. Corrigendum to "quantivirus" HPV E6/E7 RNA 3.0 assay(bDNA) is as sensitive, but less specific than hybrid capture 2 test [J]. J Virol Methods, 2013, 193(2):729.
- [6] MÖCKEL J, QUAAS J, MEISEL H, et al. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing has higher specificity than Liquid-Based DNA testing in the evaluation of cervical intraepithelial neoplasia[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2011, 33(6):311-315.
- [7] GALAROWICZ B, JACH R, KIDZIERSKA J, et al. The role of mRNA E6/E7 HPV high oncogenic risk expression in colposcopy of cervical intraepithelial neoplasia (CIN)[J]. Przegląd Lekarski, 2012, 69(9):651-657.
- [8] FONTECHA N, BASARAS M, HERNÁEZ S, et al. Assessment of human papillomavirus E6/E7 oncogene expression as cervical disease biomarker[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1):852-860.
- [9] RATNAM S, COUTLEE F, FONTAINE D, et al. Clinical performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the Hybrid Capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(8):2779-2785.
- [10] 刘佳佳,冯姝,瞿全新,等.高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 在宫颈病变筛查中的作用研究[J].中国全科医学,2014,17(10):1140-1143.
- [11] SZAREWSKI A, MESHER D, CADMAN L, et al. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6):1867-1873.
- [12] RAMPIAS T, BOUTATI E, PECTASIDES E, et al. Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(3):433-443.
- [13] PEREZ C S, CID L A, PATO M M. Human papillomavirus(HPV) E6/E7 mRNA as a triage test after detection of HPV 16 and HPV 18 DNA. [J]. J Med Virol, 2013, 85(6):1063-1068.