

• 论 著 •

HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变筛查中的价值*

宋汉韬¹, 刘小娟^{1,2}, 刘芳^{1,2}, 常莉^{1,2}, 滕洁^{1,2△}

1. 四川大学华西第二医院检验科, 四川成都 610041; 2. 四川大学妇儿疾病与出生缺陷教育部重点实验室, 四川成都 610041

摘要:目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)DNA 与 HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变筛查中的价值。方法 选取 2021 年 9 月至 2022 年 8 月于四川大学华西第二医院进行宫颈病变筛查的 619 例患者作为研究对象, 以其病理结果为标准, 评估 HPV DNA 与 HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变筛查中的价值。结果 619 例患者中, HPV DNA 检测的阳性率为 64.78%(401/619), HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率为 60.74%(376/619)。宫颈病变筛查主要以 30~<40 岁和 40~<50 岁的性活跃人群为主。HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率均随宫颈病变级别的升高而升高。两种方法联合检测的灵敏度、阳性预测值、阴性预测值均高于 HPV DNA 检测或 HPV E6/E7 mRNA 检测的结果。结论 两种方法联合检测可面向各个病理阶段的宫颈病变筛查, 在临床诊疗中能发挥更大的指导价值。

关键词: 宫颈病变; 人乳头瘤病毒; 宫颈癌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.04.016

中图法分类号: R737.33

文章编号: 1673-4130(2024)04-0467-04

文献标志码: A

The value of HPV DNA and HPV E6/E7 mRNA detection in screening for cervical lesions*

SONG Hantao¹, LIU Xiaojuan^{1,2}, LIU Fang^{1,2}, CHANG Li^{1,2}, TENG Jie^{1,2△}

1. Department of Clinical Laboratory, West China Second University Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Key Laboratory of Obstetric and Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the value of human papillomavirus (HPV) DNA and HPV E6/E7 mRNA detection in screening for cervical lesions. **Methods** A total of 619 patients who were screened for cervical lesions in West China Second University Hospital from September 2021 to August 2022 were selected as the study objects. The value of HPV DNA and HPV E6/E7 mRNA detection in cervical lesion screening was evaluated based on their pathological results. **Results** The positive rate of HPV DNA detection was 64.78% (401/619) and that of HPV E6/E7 mRNA detection was 60.74% (376/619) in 619 patients. Cervical lesion screening was mainly conducted in sexually active people aged 30—<40 years and 40—<50 years. The positive rates of HPV DNA and HPV E6/E7 mRNA increased with the increase of cervical lesion grade. The sensitivity, positive predictive value and negative predictive value of the two methods were higher than those of HPV DNA or HPV E6/E7 mRNA detection. **Conclusion** The combined detection of the two methods can be used for screening cervical lesions at various pathological stages, which can provide greater guidance value in clinical diagnosis and treatment.

Key words: cervical lesions; human papillomavirus; cervical cancer

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 发病率在女性恶性肿瘤中居第二位, 近年来有年轻化趋势, 严重危害女性健康。据统计, 每年约有 27.5 万女性最终死于宫颈癌。1995 年, 世界卫生组织(WHO) 指出高危型人乳头瘤病毒(HPV) 的持续性感感染是宫颈癌的主要病因, 长期感染可使患宫颈癌的风险增加 250

倍^[1-2]。宫颈癌早期常无明显症状和体征, 一旦出现阴道流血、排液等症状时多提示宫颈癌已进展到中晚期阶段且有侵犯周围组织和器官甚至发生转移的可能, 此时患者多已失去最佳治疗时机。因此, 对宫颈癌的精准诊断, 尤其对高危人群的早期癌前筛查就具有极为重要的意义。目前针对宫颈病变筛查的实

* 基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2022YFS0242)。

作者简介: 宋汉韬, 男, 技士, 主要从事医学检验相关工作研究。△ 通信作者, E-mail: 854560484@qq.com。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20240109.0925.002.html>(2024-01-09)

实验室检测手段主要包括基于分子生物学的 HPV 核酸检测技术、基于形态学的液基细胞学检测技术和基于病理学的组织活检技术,可分别从病因、细胞病变、组织病变实现检测。作为及早遏制宫颈癌发生的最早期筛查技术,核酸检测技术标本易得、结果可靠、操作简便、临床实用性较高,主要分为 DNA 检测和 RNA 检测。DNA 检测针对双链环状的 HPV 本身,而 RNA 检测针对被激活的癌基因 E6、E7 过表达后转录产生的 E6/E7 mRNA^[3]。虽然二者的意义明确,但是两种方法的检测策略与临床疾病进展相关性的研究还有待进一步深入。本研究以宫颈病变的病理诊断为标准,通过对比 619 例行宫颈病变筛查女性的 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测结果,探讨两种方法在宫颈病变筛查中的诊断价值和意义,为实现宫颈癌早期预防和精准诊断提供帮助。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2021 年 9 月至 2022 年 8 月于四川大学华西第二医院进行宫颈病变筛查的 619 例患者作为研究对象。纳入标准:(1)在同一时间采集标本进行 HPV DNA、HPV E6/E7 mRNA 和宫颈液基细胞学技术(TCT)检查或组织活检且病例资料完善;(2)性生活史超过 1 年;(3)既往未接受过任何形式的宫颈治疗;(4)所有纳入患者均对各项宫颈癌筛查检测知情同意;(5)非妊娠女性。排除标准:(1)有任意一项检查结果来自外院;(2)既往有 HPV 感染史或任何手段宫颈治疗史;(3)存在其他脏器恶性肿瘤;(4)曾有全身化疗或盆腔放射治疗史;(5)标本采集不满意的患者。

1.2 仪器与试剂 HPV DNA:检测板和采样工具包均购置于 QIAGEN 公司;实验使用 QIAGEN DML3000 冷光仪检测相对化学发光强度,使用 Microplate Heater 1 恒温加热器为探针杂交提供条件;HPV E6/E7 mRNA:检测试剂和采样工具包购置于 HOLOGIC 公司。检测一体机为 HOLOGIC 公司全自动核酸检测系统 PANTHER。

1.3 方法

1.3.1 HPV DNA 检测 标本采集:窥阴器暴露宫颈,用一次性宫颈刷深入宫颈管,向同一方向旋转 6~10 周,将已经刷取下脱落细胞的宫颈刷放入装有细胞保存液的采集管中进行漂洗。

检测原理:QIAGEN 公司高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒(杂交捕获二代法,简称 HC2)是基于微孔板上抗体的特异性捕获和由酶催化的化学发光信号放大原理,应用全长 8 000 个碱基对的 RNA 探针进行体外核酸杂交,可同时定性检测被 WHO 确认的 13 种高危型 HPV 亚型,包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型。操作步骤:(1)按 2:1 比例,向采集管(保存液 1 mL)中加入 500 μ L 变性裂解

液,充分振荡混匀后置于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 45 min(校准品和质控品的处理同标本)使标本充分裂解,释放标本中 HPV DNA 单链;(2)用探针稀释液稀释全长病毒 RNA 探针,向微孔板中每孔分配 25 μ L 稀释好的探针,依次加入 75 μ L 裂解后的标本至各孔中充分混匀,置于 65 $^{\circ}$ C 金属浴孵育 1 h 使 RNA 探针和 HPV 病毒靶 DNA 充分杂交形成 RNA-DNA 杂交体;(3)将微孔板中的液体全部转入捕获板中,并于摇床上以 1 100~1 200 r/min 震荡 1 h,使 RNA-DNA 杂交体被包被在微孔板上的特异性抗体捕获;(4)吸出液体弃掉,在吸水纸上用力拍打至干;(5)向捕获板各孔加 75 μ L 碱性磷酸酶溶液,室温静置 30 min,使固相界面的杂交体与碱性磷酸酶结合;(6)用预先配置的清洗液反复清洗捕获板,尽量保证每孔冲洗的力度和时间一致,每板平均清洗 6~8 次,再次在吸水纸上用力拍打至干;(7)向充分清洗后的捕获板各孔中加入 75 μ L 显色液,室温、避光放置 15 min 后,用 QIAGEN DML3000 冷光仪检测相对化学发光值信号并记录结果。

1.3.2 高危型 HPV E6/E7 mRNA 检测 标本采集:同 HC2,将采样后的拭子置于 HOLOGIC 公司 HPV E6/E7 mRNA 检测专用的新柏氏保存液中待检。检测原理:HOLOGIC 公司 Aptima HPV E6/E7 mRNA 检测是基于转录介导的恒温扩增技术,以 HPV 致癌基因 E6/E7 的 mRNA 为检测靶标,通过对标本裂解、目的 mRNA 捕获、转录介导的等温扩增和杂交保护测定对扩增产物进行化学发光检测,可筛查 14 种高危型 HPV 亚型,分别包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66 和 68 型。检测流程:将保存液中的液体充分混匀,吸取 1 mL 加入配套的标本裂解管中,通过 Aptima 一体机和 HPV E6/E7 定性检测试剂检测标本是否存在 HPV mRNA。

1.3.3 TCT 检查 TCT 检查采用颈管刷收集宫颈外口及宫颈管的脱落细胞于装有保存液的小瓶中,后经自动化系统处理制成薄层细胞涂片,再经 95%酒精固定、HE 染色,最后进行光镜检查。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析处理,计数资料以例数和百分率表示,组间比较用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各年龄段患者两种方法检测的阳性率比较 619 例患者中 HPV DNA 检测的阳性率为 64.78%(401/619),HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率为 60.74%(376/619)。将 619 例患者按年龄分为 <20 岁、20~<30 岁、30~<40 岁、40~<50 岁、50~<60 岁和 ≥ 60 岁 6 个年龄段,统计各年龄段患者 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测结果。宫颈病变筛

查主要以 30~<40 岁和 40~<50 岁的性活跃人群为主。619 例患者中因<20 岁患者偏少仅占 3 例,两种方法检测的阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。其余各年龄段患者 HPV DNA 检测的阳性率均高于 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 不同组织病理结果中 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率比较 619 例患者根据病理结果进行程度分级,分别是炎症组、意义不明的非典型鳞状细胞(ASCUS)组、低度鳞状上皮内病变(LSIL)组、高度鳞状上皮内病变(HSIL)组和鳞/腺癌组。HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率均随宫颈病变级别的升高而升高。炎症组 HPV DNA 检测的阳性率(55.46%)高于 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率(29.21%),而 ASCUS 组、LSIL 组、HSIL 组和鳞/腺癌组 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率均显著高于 HPV DNA 检测的阳性率,ASCUS 组、LSIL 组、HSIL 组和鳞/腺癌组两种方法检测的阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3 两种方法对病理分级程度为 HSIL 以上患者诊断价值的评价 以研究对象病理学诊断结果为标准,将其病理分级程度为 HSIL 以上的患者(包括 HSIL

组和鳞/腺癌组患者)统归为 HSIL⁺患者,用两种方法(HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测)对 HSIL⁺患者的诊断效能进行比较。如表 3 所示,HPV DNA 检测的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值均低于 HPV E6/E7 mRNA 检测结果,而两种方法联合检测的灵敏度、阳性预测值、阴性预测值均高于 HPV DNA 检测或 HPV E6/E7 mRNA 检测的结果。两种方法联合检测的特异度(38.67%)低于 HPV E6/E7 mRNA 检测的特异度(39.65%),但高于 HPV DNA 检测的特异度(37.50%)。HPV E6/E7 mRNA 检测的总体符合率均明显高于 HPV DNA 检测和两种方法联合检测的总体符合率。

表 1 各年龄段患者两种方法检测的阳性率比较						
年龄 (岁)	HPV DNA 检测			HPV E6/E7 mRNA 检测		
	阳性 (n)	阴性 (n)	阳性率 (%)	阳性 (n)	阴性 (n)	阳性率 (%)
<20	3	0	100.00	3	0	100.00
20~<30	82	42	66.13	78	46	62.90
30~<40	129	71	64.50	124	76	62.00
40~<50	103	52	66.45	93	62	60.00
50~<60	63	46	57.80	61	48	55.96
≥60	21	7	75.00	17	11	60.71

表 2 不同组织病理结果中 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率比较									
组别	n	HPV DNA 检测			HPV E6/E7 mRNA 检测			χ^2	P
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)		
炎症组	202	112	90	55.46	59	143	29.21	28.48	<0.05
ASCUS 组	159	96	63	60.38	105	54	66.04	1.10	>0.05
LSIL 组	151	103	48	68.21	111	40	73.51	1.03	>0.05
HSIL 组	76	62	14	81.58	71	5	93.42	4.87	>0.05
鳞/腺癌组	31	28	3	90.32	30	1	96.77	1.07	>0.05
合计	619	401	218	64.78	376	243	60.74	—	—

注:—表示无数据。

表 3 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测 HSIL ⁺ 患者的诊断效能评价(%)					
项目	灵敏度	特异度	阳性 预测值	阴性 预测值	总体 符合率
HPV DNA 检测	84.11	37.50	21.95	91.87	45.56
HPV E6/E7 mRNA 检测	94.39	39.65	24.63	97.13	54.60
两种方法联合检测	98.13	38.67	25.06	99.00	48.95

3 讨 论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,90%以上的宫颈癌发生与 HPV 感染密切相关^[4]。HPV 共有 200 多种型别,根据致癌能力的大小可分为高危型 HPV 和低危型 HPV^[5]。低危型 HPV 主要与一些疣

和轻度鳞状上皮内病变相关,高危型 HPV 持续感染是导致宫颈癌发生的主要原因^[6]。目前临床筛查癌前病变和宫颈癌的常用方法是 TCT 检查和 HPV DNA 检测^[7]。其中,TCT 是目前唯一能够替代传统巴氏涂片,且在筛查癌前病变和宫颈癌较传统巴氏涂片更科学、更准确的一种宫颈防癌筛查技术。该技术虽然有效克服了传统涂片固有的局限性如涂片质量差、涂片时细胞丢失等,但是比较依赖阅片者对细胞形态学的主观判断,缺少客观标准,若涂片标本血液和黏液多也会出现假阳性结果,因此在临床实际的应用中有一定局限性。HPV DNA 检测是通过杂交捕获技术或聚合酶链反应检测 HPV 的衣壳蛋白和 E1 基因的高度保守区域实现对病毒 DNA 的检测。但是

这只能反映病毒是否存在,无法判断感染的活跃状态,也不能评估致癌风险^[8]。WHO 宫颈癌前病变筛查和治疗指南明确提出增加 HPV E6/E7 mRNA 检测作为宫颈癌的筛查项目^[9]。高危型 HPV 的持续感染可诱导 E6/E7 癌基因通过多种途径改变细胞微环境,造成宫颈角质细胞永生^[10-11];随宫颈病变细胞的进一步恶化,无包膜的双链 HPV DNA 可与人体基因组发生整合,病毒致癌活性被激活,经反转录过程表达高水平的 HPV E6/E7 mRNA,这是导致细胞高级别病变的基础^[12-13]。检测编码 E6/E7 癌蛋白的 E6/E7 mRNA 更具特异度且能直接反映 HPV 致癌基因的转录活性,便于筛选出可能发展为宫颈高级别病变的女性群体^[14-15]。

本研究结果显示,炎症组 HPV DNA 检测的阳性率(55.46%)高于 HPV E6/E7 mRNA(29.21%)检测,这主要是因为绝大多数 HPV 感染属于一过性或非持续性感染,病原体可通过机体免疫力的提高而清除,不会进一步引起细胞或组织病变;随着病变进展,HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率明显高于 HPV DNA 检测的阳性率,提示通过检测 HPV E6/E7 mRNA 转录物的存在可反映 HPV 癌基因的活化状态。与 HPV DNA 检测相比,HPV E6/E7 mRNA 检测不受 HPV 一过性感染的干扰,可以更加准确地判断疾病进展,HPV DNA 检测阳性的患者可通过 HPV E6/E7 mRNA 检测进行精确分流。此外,值得关注的是,年龄<20 岁患者的 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率均为 100.00%,这可以在一定程度上证实过早开始性生活是诱发 HPV 感染的高危因素,但因该年龄段的患者偏少,缺乏统计学意义。

综上所述,本研究表明两种方法联合检测既能提示 HPV 感染现状,又能反映高危型 HPV 的致癌潜力,两种方法在灵敏度和特异度方面的优势互补有利于早期、精准预防宫颈癌的发生,避免对一过性 HPV 感染导致良性病变的检测和过度治疗,降低 HPV 感染的漏诊率和癌症发生率,同时又能减轻患者的心理和经济负担,提升女性群体的健康水平。

参考文献

[1] HU Z, MA D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications[J]. Cancer Med, 2018, 7(10): 5217-5236.

[2] CHORNY J A, FRYE T C, FISHER B L, et al. Human papillomavirus detection with genotyping by the cobas

and aptima assays: significant differences in HPV 16 detection[J]. Diagn Cytopathol, 2018, 46(7): 568-571.

[3] 刘红丽, 刘智荣, 赵淑芳, 等. HPV-E6/E7-mRNA 和 HPV-DNA 检测在宫颈病变筛查中的应用价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2023, 15(2): 205-213.

[4] TOMMASINO M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2014, 26(1): 13-21.

[5] 吴赛青, 程平, 胡丽娟, 等. HPV E6/E7 mRNA 与 DNA 检测法在子宫颈癌前病变筛查中的对比分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2022, 38(8): 985-987.

[6] BRIANTI P, DE FLAMMINEIS E, MERCURI S R. Review of HPV-related diseases and cancers[J]. New Microbiol, 2017, 40(2): 80-85.

[7] 黄美园, 杨珍玉, 邓爽, 等. 高危型 HPV E6/E7 mRNA 在不同年龄段宫颈病变筛查中的应用价值[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(5): 1179-1184.

[8] 杨琼秀, 熊平安, 洛若愚. 宫颈病变患者 HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测的临床意义[J]. 武汉大学学报(医学版), 2019, 40(5): 752-755.

[9] 胡尚英, 赵雪莲, 张勇, 等. 《预防宫颈癌: WHO 宫颈癌前病变筛查和治疗指南(第二版)》解读[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(34): 2653-2657.

[10] 田莉, 陈文, 骆元斌, 等. HPV E6/E7 mRNA 与 HPV E6/E7 DNA 在筛查宫颈鳞状上皮内病变中的应用价值[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(12): 2300-2304.

[11] 刘晓旭, 梁建梅, 苏学艳, 等. HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变诊治中应用价值的比较[J]. 国际妇产科学杂志, 2021, 48(4): 462-466.

[12] 张晓童, 姚宗花, 刘钰, 等. 高危型 HPV 分型检测、HPV E6/E7mRNA 检测及 DNA 倍体分析在宫颈 HSIL+ 病变筛查中的应用价值[J]. 滨州医学院学报, 2022, 45(3): 182-185.

[13] DERBIE A, MEKONNEN D, WOLDEAMANUEL Y, et al. HPV E6/E7 mRNA test for the detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): a systematic review[J]. Infect Agent Cancer, 2020, 15(1): 9-19.

[14] DABESKI D, DUVLIS S, BASHESKA N, et al. Comparison between HPV DNA testing and HPV E6/E7 mRNA testing in women with squamous cell abnormalities of the uterine cervix[J]. Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki), 2019, 40(1): 51-58.

[15] 郑智, 曹晓恩, 张红萍. 高危型 HPV E6/E7 mRNA 检测对高级别宫颈病变的诊断价值[J]. 浙江医学, 2016, 38(14): 1154-1157.