

• 专题研究:肿瘤 •

宿主DNA甲基化标志物在宫颈癌筛查中的应用:ZNF671的关键贡献与联合模型评价

王楹格¹,刘云龙²,王玲菲¹,户文静³,周国华³,武海萍^{1,3*}¹南方医科大学药学院,广东 广州 510515;²中国药科大学工学院,江苏 南京 210009;³东部战区总医院临床药学科,江苏 南京 210002

[摘要] 目的:探讨宿主基因SOX1、JAM3、ZNF671和DLX1的DNA甲基化水平在人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)16/18阳性人群中对宫颈上皮内瘤变2级及以上(cervical intraepithelial neoplasia 2 or worse, CIN2+)的诊断价值,构建风险分层模型,为优化宫颈癌筛查策略提供依据。方法:收集2023年4月—2024年5月在东部战区总医院就诊的HPV16/18阳性女性宫颈脱落细胞样本共141例,采用基于亚硫酸氢盐转化的焦磷酸测序技术检测上述4个基因的DNA甲基化水平。根据组织病理学结果分组,比较DNA甲基化水平在不同病变等级(正常、低级别组织学、高级别组织学、癌症)中的差异。进一步以CIN2+作为阳性结局,通过Logistic回归构建预测模型,评估模型在训练集和测试集中的诊断效能。结果:4个宿主基因的DNA甲基化水平随病变程度加重而升高,CIN2+组显著高于CIN1-组($P < 0.001$),均具有较高的诊断特异性。ZNF671在单基因分析中表现最佳,其曲线下面积(area under the curve, AUC)为0.741,联合SOX1构建的模型在训练集与测试集中的AUC分别为0.801和0.745,特异性可达87%,优于任意单一基因。结论:SOX1、JAM3、ZNF671和DLX1的DNA甲基化水平与宫颈病变严重程度密切相关,具有潜在的分流价值。尤其是在HPV16/18阳性人群中,ZNF671表现出良好的CIN2+预测性能,可作为识别癌前病变的辅助决策工具;联合SOX1构建的模型可进一步提高诊断效能。

[关键词] 宫颈癌;DNA甲基化;ZNF671;分诊策略;HPV16/18

[中图分类号] R737.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)09-1242-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN250520

Application of host DNA methylation biomarkers in cervical cancer screening: key contribution of ZNF671 and evaluation of a combined diagnostic model

WANG Yunge¹, LIU Yunlong², WANG Lingfei¹, HU Wenjing³, ZHOU Guohua³, WU Haiping^{1,3*}¹School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515; ²School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³Department of Clinical Pharmacy, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the diagnostic value of DNA methylation levels of the host genes SOX1, JAM3, ZNF671, and DLX1 for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse (CIN2+) in women positive for human papillomavirus (HPV) 16/18, and to construct a risk stratification model to optimize cervical cancer screening strategies. **Methods:** Cervical exfoliated cell samples were collected from HPV16/18-positive women attending the General Hospital of Eastern Theater Command between April 2023 and May 2024. DNA methylation levels of the four host genes were measured using bisulfite-converted pyrosequencing. Samples were grouped according to histopathological diagnosis (normal, low-grade histology, high-grade histology, cancer), and intergroup methylation differences were compared. Logistic regression was used to construct a predictive model for CIN2+, and its diagnostic performance was assessed in both training and testing datasets. **Results:** The methylation levels of all four host genes increased progressively with lesion severity and were significantly higher in the CIN2+ group than in the CIN1- group ($P < 0.001$), demonstrating high diagnostic

[基金项目] 国家自然科学基金(22474058, 61901527);江苏省“十四五”医学重点学科建设单位(JSDW202250);医院临床诊疗新技术项目(22LCZLXJS15)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wuhaiping@smu.edu.cn (ORCID: 0000-0001-7795-3422)

specificity. Among them, ZNF671 exhibited the best performance as a single biomarker, with an area under the curve (AUC) of 0.741. The combined model of ZNF671 and SOX1 achieved AUCs of 0.801 and 0.745 in the training and testing sets, respectively, with a specificity up to 87%, outperforming any individual gene. **Conclusion:** The DNA methylation levels of SOX1, JAM3, ZNF671, and DLX1 are closely associated with the severity of cervical lesions and exhibit potential value for triage. In particular, ZNF671 shows strong predictive performance for CIN2+ in HPV16/18-positive women, and may serve as an auxiliary biomarker for identifying precancerous lesions. The combined model incorporating SOX1 further improves diagnostic accuracy.

[Key words] cervical cancer; DNA methylation; ZNF671; triage strategy; HPV16/18

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(09): 1242-1250]

宫颈癌是全球女性常见的恶性肿瘤之一。据统计,2020年全球新发宫颈癌病例约60.4万例,死亡约34.2万例^[1],其中大多数发生在中低收入国家^[2],发病率和死亡率依然处于较高水平。近年来,我国宫颈癌发病率与死亡率持续上升,并且城乡发病率差距在扩大,成为严重威胁女性健康的公共卫生问题。大多数宫颈癌病例与高危型人乳头瘤病毒(high-risk human papillomavirus, hr-HPV),特别是HPV16和HPV18的持续感染密切相关。HPV16常见于鳞状上皮病变,而HPV18更倾向于腺上皮病变,且癌前期检出难度更高^[3-4]。在HPV疫苗尚未全面覆盖的中短期内,宫颈癌筛查与及时治疗仍是降低宫颈癌发病率和死亡率最直接、最有效的公共卫生干预措施^[5]。然而,当前筛查手段仍存在局限性。HPV基因分型因其高敏感性已被广泛用于宫颈癌初筛^[6],但其特异性较低,难以区分一过性感染与持续性感染,导致过度诊疗的发生^[7]。而细胞学检查因其灵敏度不高、主观性较强,容易出现漏诊或结果的偏差。我国现行指南建议所有HPV16/18阳性者直接转诊阴道镜检查^[8],但大量低级别病变患者接受了不必要的侵入性检查,增加了患者的心理及经济负担。

近年来,DNA甲基化在宫颈癌筛查中的应用受到了广泛关注,其异常改变早于组织学变化,且具有组织特异性和可量化的特征^[9-10]。研究证实,宿主DNA甲基化可作为新型生物标志物,与宫颈上皮内瘤变2/3级(cervical intraepithelial neoplasia 2/3, CIN2/3)和癌症的发生密切相关^[11-12]。

鉴于HPV16/18阳性人群的高风险特征及当前筛查策略的不足,迫切需要一种在该人群中具备良好的特异性并能够辅助分流判断的分子诊断手段。本研究通过系统文献检索^[13-16],比较当前国内已商业化的DNA甲基化检测试剂盒(如宫安丽[®]、禾宫康[®]、凯普)中各候选基因的诊断性能,结合检测可

及性,最终筛选出SOX1、JAM3、ZNF671和DLX1这4个在宫颈癌前病变进展中表现稳定、具有临床验证基础的宿主基因。基于此,本研究聚焦HPV16/18阳性人群,拟采用焦磷酸测序技术检测上述基因在宫颈脱落细胞中的DNA甲基化水平,系统分析其在宫颈癌变各阶段的特异性变化规律,构建高效的风险分层模型,旨在为优化筛查策略、减少不必要的阴道镜检查提供新思路,并探索其在精准诊断中的潜力。

1 材料和方法

1.1 材料

QIAamp DNA Mini Kit、EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit、PyroMark[®]Gold Q96 Reagents、PyroMark Q24 MDx 实时定量焦磷酸序列分析仪、PyroMark Q24 workstation、PyroMark Q24 2.0.6(QIAGEN公司,德国);GoTaq[®] Hot Start Polymerase、MgCl₂(25 mmol/L)、5×Green or Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer(Promega公司,美国);dNTP Mix(南京赛百盛生物有限公司);无水乙醇(江苏强盛功能化学股份有限公司);OneDrop[™]超微量紫外可见分光光度计(南京五义科技有限公司);A200型全触控屏梯度PCR仪、恒温混匀仪(杭州朗基科学仪器有限公司);Allegra X-30R冷冻离心机(Beckman Coulter公司,美国);实验用水均为灭菌双蒸水(ddH₂O),其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样本收集与患者纳排标准

本研究收集了2023年4月—2024年5月在东部战区总医院就诊并经HPV筛查后的残余宫颈脱落细胞样本。样本来源患者纳入标准:①HPV16/18阳性,且近3个月内行阴道镜检查并活检;②年龄20~75岁;③子宫颈完整。排除标准:①妊娠期;②子宫颈癌/癌前病变治疗史;③盆腔放疗史;④合并其他恶性肿瘤。研究经医院伦理委员会批

准(批号:2021DZGZR-YBB-096)。

1.2.2 DNA提取与亚硫酸氢盐转化

使用 QIAamp DNA Mini Kit 提取宫颈脱落细胞中的基因组 DNA,取 DNA 浓度在 5 ng/ μ L 以上且 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值为 1.6~2.2 的样本,使用 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 对提取的 DNA 进行亚硫酸氢盐转化和纯化。

1.2.3 DNA 甲基化水平检测

使用 MethMarkerDB 网站^[17]识别宿主基因的差异甲基化区域,并利用 PyroMark Assay Design 2.0 针对上述区域的 CpG 位点设计 PCR 扩增和焦磷酸测序引物,序列如表 1 所示。以纯化后的亚硫酸氢盐转化 DNA 为模板,使用 GoTaq[®]热启动酶分别对 4 个基因的目标区域进行 PCR 扩增。扩增体系为 10 \times Buffer 10.00 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 4.00 μ L, dNTPs (10.00 mmol/L) 1.00 μ L, GoTaq[®]热启动酶 0.25 μ L, 上、下游引物各 0.50 μ L, 并补充蒸馏水至 50.00 μ L, 其中 ZNF671 将引物投入量改为 1.00 μ L。SOX1、ZNF671、DLX1 的扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 40 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s), 72 $^{\circ}$ C 完全延伸 7 min; JAM3 的扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 45 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s), 72 $^{\circ}$ C 完全延伸 7 min。将 PCR 扩增产物作为焦磷酸测序的模板,并进行①单链制备:在 8 连管中分别加入 55 μ L 已配制好的链霉亲和素修饰的微球溶液,再分别加入 20 μ L PCR 扩增产物,震荡混匀 7 min;②平板加样:在焦磷酸测序专用的 24 孔板上加入 1 μ L 测序引物和 24 μ L Annealing Buffer;③引物退火与杂交:打开真空泵,把针头先在干净超纯水中洗涤,再将制备好的单链吸在针头上,经乙醇洗去残余核酸 5 s、NaOH 变性 5 s、Washing Buffer 10 s 后吸走所有液体,关闭抽真空阀门,与平板中的引物和 Annealing buffer 混匀,87 $^{\circ}$ C 变性 1 min 后,冷却至室温,使模板与引物退火杂交;④加试剂仓,并将其和 24 孔板放入 Q24 并运行,PyroMark Q24 2.0.6 自动计算每个 CpG 位点的甲基化水平。

1.2.4 研究结局定义

根据阴道镜引导下活检的组织学结果,将患者分为 4 组:①正常组(无病变或炎症);②低级别组织学组(CIN1);③高级别组织学组[CIN2、CIN3 和原位腺癌(adenocarcinoma *in situ*, AIS)];④癌症组(宫颈癌,包括鳞状细胞癌和腺癌)。本研究的主要结局是 CIN2+。将患者分为两组:正常或 CIN1 者归为低风险组,即 CIN1-;CIN2、CIN3、AIS 或宫颈癌患者

表 1 宿主基因甲基化检测的引物序列

Table 1 Primer sequences for host gene methylation

Gene	Primer	Sequence(5'→3')
DLX1	F	GTAGGAATGGTTTTTGGTAGATAGAG
	R	AAAATAACCCCTCCCAAACT
	S	GGGATTTTTTAGGTTTTTAGAATAG
ZNF671	F	GGAGTAGGAGAAAGGGTGATTGA
	R	ACATTTTATTTCTATCAAACCTATCCCTAAC
	S	GTTAGGAGGAAGTAGATTTTAT
JAM3	F	AGGGTTTTGGTAGGTTGG
	R	CCCCAAACCCTAATCTCCCA
	S	GTTGTAGTTGGTTTTTITAGTAATTT
SOX1	F	GGTTTTTTTAGGTTATTTGGGATTAGTA
	R	ACCTCCAACCTCCAAAACCTACAACCTCT
	S	GGGTATTTGGGATTAGTATA

F: forward primer; R: reverse primer; S: pyrosequencing primer.

归为高风险组,即 CIN2+。该分组方式符合宫颈癌前病变的临床分流标准,广泛用于评估筛查方法在分流 CIN2+ 中的效能。

1.3 统计学方法

本研究采用 R 4.4.1 进行数据分析,并利用 GraphPad Prism 10、SPSS 26.0、Medcalc 23 进行补充统计。所有统计检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.3.1 甲基化水平分析

多组间差异分析(正常/低级别组织学/高级别组织学/癌症):采用 Shapiro-Wilk 检验或 Kolmogorov-Smirnov 检验评估每组数据正态性,Levene 检验用于评估方差齐性。若数据符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析进行总体差异检验,事后两两比较采用 Tukey HSD 检验;若数据不符合正态分布或方差不齐,使用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 Dunn 检验,并选择 Benjamini-Hochberg 校正来控制假发现率,确定差异的具体组别。采用 Jonckheere-Terpstra 趋势检验评估甲基化水平是否随疾病进展呈单调变化趋势。

二分类分析(CIN1-/CIN2+):进行正态性检验,正态分布变量采用独立样本 t 检验,非正态分布变量采用 Mann-Whitney U 检验进行两组差异比较。通过箱线图展示 4 个基因的甲基化水平分布,并进行受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析,评估其作为单个生物标志物时的 ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC)、敏感度、特异度、准确度(accuracy, ACC)、阳性预测值(positive predictive value, PPV)、阴性预测值(negative

predictive value, NPV)等重要指标。

1.3.2 预测模型构建与评估

数据分组:按7:3比例将数据集划分为训练集和测试集,使用固定随机种子($n=742$)以保证实验的可重复性。对于训练集和测试集的基线数据差异,首先进行正态性检验,正态分布变量采用独立样本 t 检验,非正态分布变量采用 Mann-Whitney U 检验,分类变量则使用卡方检验或 Fisher 精确检验。

特征筛选与建模:采用逐步 Logistic 回归进行变量筛选,并以赤池信息准则(Akaike information criterion, AIC)作为模型选择标准,选择最具预测价值的变量,避免引入多余噪声和冗余特征。

模型评估与比较:为保证分析的严谨性,使用建模时划分的训练集和测试集,对单独或联合的宿主基因甲基化标志物进行 ROC 曲线分析,并根据各自标志物的训练集生成的截断值对测试集分析,分别报告模型的重要指标。

2 结果

2.1 患者一般资料

表2列出了患者的一般资料,本研究共纳入141例 HPV16/18 阳性受试者,其中 CIN1-组 91 例(64.54%), CIN2+组 50 例(35.46%),两组的年龄分布无显著差异($P=0.158$)。在整个研究队列中, HPV16 阳性 101 例, HPV18 阳性 40 例。其中, CIN1-组中 HPV16 占 70.33%, HPV18 占 29.67%; CIN2+组 HPV16 占比为 74.00%, HPV18 占比为 26.00%。两组 HPV 亚型分布差异无统计学意义($P=0.644$),表明单纯依赖 HPV16/18 感染状态无法有效区分 CIN2+。

表2 患者一般资料

Table 2 General characteristics of patients

Characteristic	Category		P
	CIN1-($n=91$)	CIN2+($n=50$)	
Age(years, $\bar{x} \pm s$)	42.23 \pm 11.71	45.30 \pm 9.49	0.158
HPV genotyping[$n(\%)$]			0.644
HPV16	64(70.33)	37(74.00)	
HPV18	27(29.67)	13(26.00)	

2.2 单个宿主基因标志物甲基化水平随宫颈病变等级增加显著增加

本研究共纳入正常样本 69 例,低级别组织学样本 22 例,高级别组织学样本 34 例,癌症样本 16 例。图 1 展示了 4 个宿主基因在不同病理等级(正常、低级别、高级别、癌症)中的 DNA 甲基化水平分布情

况,结果显示随病变程度加重,甲基化水平总体呈上升趋势,部分组间差异具有统计学意义。具体而言, SOX1、JAM3 和 DLX1 在高级别组织学组与癌症组之间的 DNA 甲基化水平有显著差异,而在低级别与高级别组织学组之间的差异没有统计学意义;相反, ZNF671 在低级别与高级别组织学组之间的 DNA 甲基化水平差异显著,但高级别组织学组与癌症组之间的差异未达到显著水平。 Jonckheere-Terpstra 检验结果表明宿主基因甲基化水平随疾病严重程度均表现出单调递增的趋势($P < 0.001$),为其作为潜在筛查标志物提供了生物学证据。

2.3 单个宿主基因标志物在 CIN1-与 CIN2+中诊断效果

与 4 级病理分组分析结果不同,图 2 基于临床常用的 CIN1-/CIN2+二分类分组,部分宿主基因在不同分组策略下的显著性表现存在差异。与 CIN1-组相比, CIN2+组中 SOX1(9.08% vs. 5.71%)、JAM3(4.94% vs. 3.14%)、ZNF671(6.95% vs. 4.00%)和 DLX1(12.34% vs. 9.2%)的甲基化水平均显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.001$),提示这些基因的甲基化升高与 CIN2+病变密切相关,在二分类分析中显示出更强的区分能力。

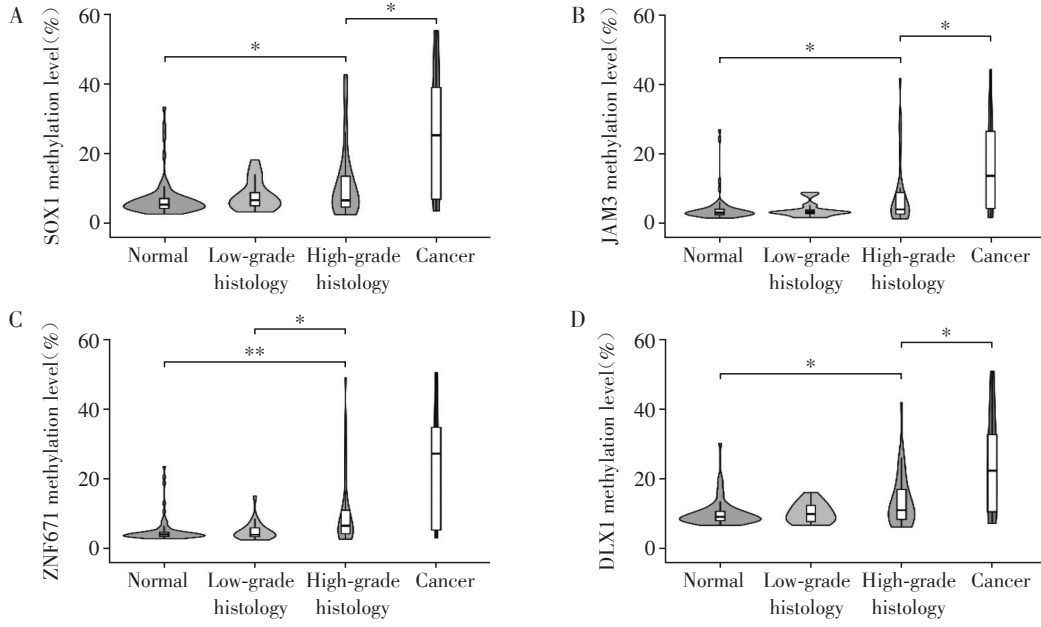
使用 ROC 曲线进一步评估单个宿主基因在区分 CIN2+组与 CIN1-组之间的诊断能力。结果如图 3 所示, ZNF671 在 CIN2+诊断中表现出最好的诊断效果,其 AUC 为 0.741(0.646~0.836)。根据 AUC 的高低,单个宿主基因标志物在 CIN2+诊断中的效果排序为: ZNF671、JAM3、DLX1、SOX1。

其他诊断性能评价指标结果如表 3 所示,每个宿主基因标志物对 CIN2+的诊断特异度较好,但灵敏度较低。其中, JAM3 的诊断特异度最高,为 0.923,并获得了最优的 PPV(0.767)。而 ZNF671 则获得了最优的 NPV(0.790)。这 4 个生物标志物均表现出良好的准确度。

2.4 单独或联合宿主基因甲基化标志物对 CIN2+诊断效果的比较

本研究以 7:3 的比例划分训练集与测试集,其中训练集包含 99 例样本,测试集包含 42 例样本,训练集与测试集在年龄、病理分类等基线特征间无统计学差异。

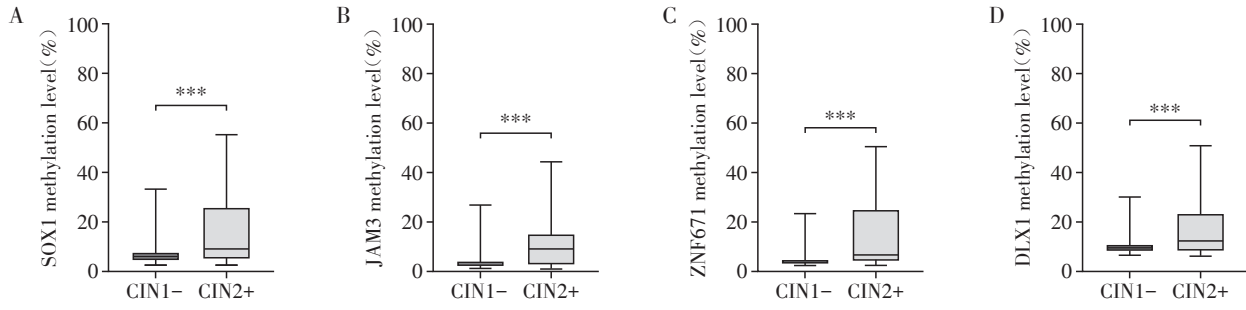
通过逐步 Logistic 回归构建联合宿主基因标志物的 CIN2+筛查模型。如表 4 所示,最终选择 SOX1、ZNF671 作为宿主联合甲基化标志物面板,后称联合模型,此时 AIC 值为 106.62。为所有候选模型中最



Methylation levels of SOX1(A), JAM3(B), ZNF671(C), and DLX1(D) in normal($n=69$), low-grade histology($n=22$), high-grade histology($n=34$), and cancer($n=16$) groups. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

图1 宿主基因DNA甲基化水平在不同病理等级中的分布

Figure 1 Distribution of host gene DNA methylation levels across different pathological grades



Methylation levels of SOX1(A), JAM3(B), ZNF671(C), and DLX1(D) in CIN1-($n=91$) and CIN2+($n=50$) groups. *** $P < 0.001$.

图2 CIN1-与CIN2+组中宿主基因甲基化水平的差异

Figure 2 Differences in host gene methylation levels between CIN1- and CIN2+ groups

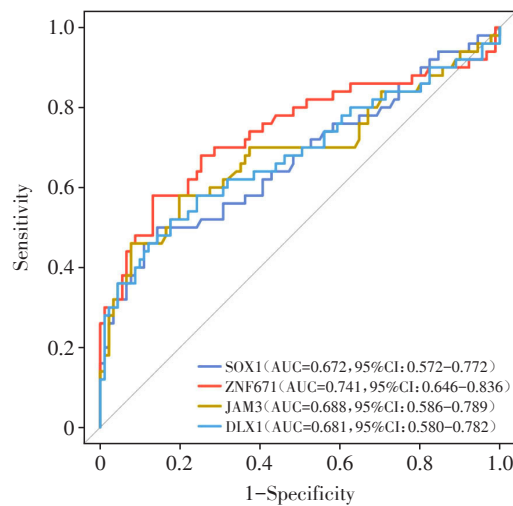


图3 单个宿主基因在区分CIN2+组与CIN1-组之间的诊断能力

Figure 3 Diagnostic capability of individual host genes in distinguishing between the CIN2+ group and the CIN1- group

表3 单个宿主基因标志物的诊断性能指标

Table 3 Diagnostic performance metrics of individual host gene biomarkers

Gene	Cut-off	AUC	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	ACC
SOX1	0.354	0.672	0.500	0.857	0.658	0.757	0.730
JAM3	0.359	0.688	0.460	0.923	0.767	0.757	0.759
ZNF671	0.309	0.741	0.580	0.868	0.707	0.790	0.766
DLX1	0.351	0.681	0.520	0.824	0.619	0.758	0.716

小值,提示该模型在拟合优度与复杂度之间达到最佳平衡。

表4 联合宿主基因的逐步Logistic回归模型构建

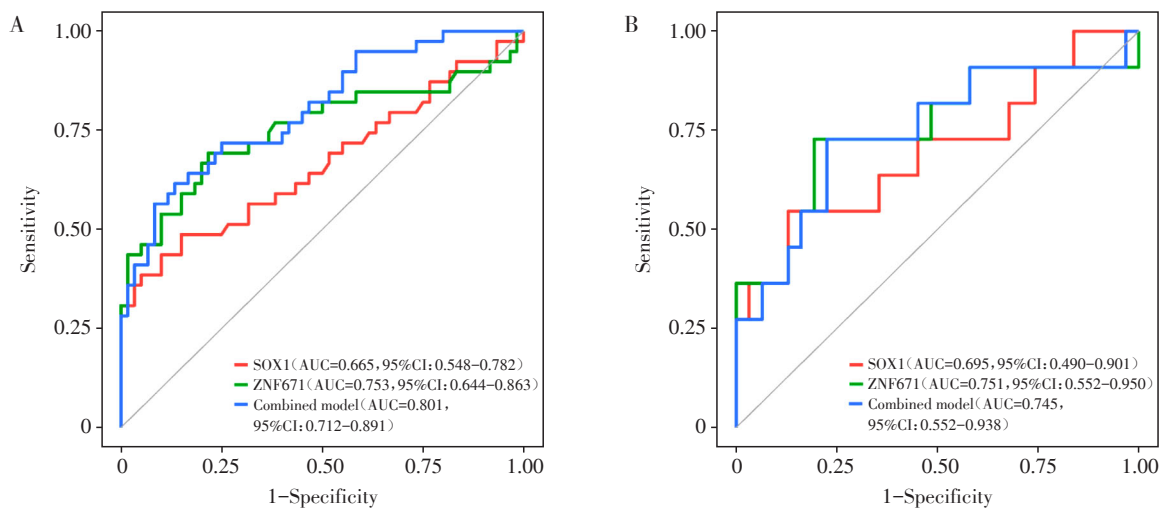
Table 4 Construction of a stepwise logistic regression model with combined host genes

Step	Selected variables	AIC
Initial model	SOX1, JAM3, ZNF671, DLX1	109.07
Step 1	SOX1, JAM3, ZNF671	107.08
Step 2	SOX1, ZNF671	106.62

为比较单独或联合宿主基因甲基化标志物对CIN2+的诊断效果,在所述的训练集和测试集中分别计算了联合模型及单个标志物的ROC曲线,如图4所示,该联合模型的AUC在训练集中为0.801

(95%CI:0.712~0.891),在测试集中为0.745(95%CI:0.552~0.938)。联合模型与ZNF671的ROC曲线相近,显著大于SOX1。

表5列出了联合模型、ZNF671、SOX1在训练集和测试集中的诊断性能参数。在训练集中,ZNF671的最佳灵敏度为0.692,特异度为0.783;SOX1的最佳灵敏度为0.487,特异度为0.850。在测试集中,ZNF671与联合模型的灵敏度均为0.727,但特异度不同,分别为0.677和0.581,SOX1似乎因其高特异性弥补了ZNF671的不足。进一步的统计学检验显示,联合模型在AUC上显著优于单基因SOX1($P = 0.010$);与ZNF671相比虽有提升($P = 0.070$),但差异无统计学意义。



A: ROC curve of the models in the training set. B: ROC curve of the models in the testing set.

图4 联合模型、ZNF671、SOX1在训练集和测试集中的ROC曲线

Figure 4 ROC curves of combined model, ZNF671, and SOX1 in the training and testing sets

表5 联合模型、ZNF671、SOX1在训练集和测试集中的诊断性能参数

Table 5 Diagnostic performance parameters of the combined model, ZNF671, and SOX1 in the training and testing sets

Model	Dataset	Cut-off	AUC	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	ACC
Combined model	Training	0.361	0.801	0.615	0.867	0.750	0.776	0.768
	Testing	0.361	0.745	0.727	0.677	0.444	0.875	0.690
ZNF671	Training	0.288	0.753	0.692	0.783	0.675	0.797	0.747
	Testing	0.288	0.695	0.727	0.581	0.381	0.857	0.619
SOX1	Training	0.422	0.665	0.487	0.850	0.679	0.718	0.707
	Testing	0.422	0.695	0.545	0.871	0.600	0.844	0.786

3 讨论

本研究证实,随着病理进展,SOX1、JAM3、ZNF671、DLX1 4个宿主基因的DNA甲基化水平呈现递增趋势,且在CIN2+组中显著高于CIN1-组,这一现象与表观遗传学理论高度一致:癌变过程中全基因组呈现整体低甲基化^[18]及抑癌基因启动子区高甲基化的特征性改变^[19]。

需要指出的是,不同组织学分组策略下,部分基因的统计显著性存在差异。虽然SOX1、JAM3和DLX1的DNA甲基化水平在低级别与高级别组织学组间差异不显著,但在CIN1-/CIN2+二分类中差异显著。这种差异可归因于甲基化的累积性改变、二分类分析更强的统计效能;此外,CIN2+是当前指南建议的干预节点,对应的DNA甲基化水平可能已达到功能失调阈值,更易在分析中显示出差异。因此,本研究支持采用CIN2+作为临床分流的关键节点,并进一步验证DNA甲基化标志物在此背景下的应用价值。

ZNF671在单基因分析中表现最佳,其灵敏度和特异性的平衡性优于其他基因,且具有较高的诊断效能。商业化试剂盒宫安丽[®]在其诊断评分中也对ZNF671赋予较大权重,特异性约87%,但灵敏度一般^[20],这与本研究结果一致,提示该标志物更适用于高特异性筛查场景,如HPV16/18阳性人群的分流。ZNF671属于转录因子KRAB-ZF家族,广泛参与细胞增殖、迁移和转移等生物过程的调控^[21]。已有研究表明,ZNF671在多种肿瘤中存在表达下调现象,作为多个致癌信号通路的负调节因子,呈现一定的组织特异性作用。例如,ZNF671能够结合MAPK6启动子区并抑制其转录,从而阻断MAPK6介导的细胞增殖和迁移通路^[22];也能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路及其下游靶基因CyclinD1和MMP9的表达,进而抑制肿瘤的生长与转移^[23]。本研究发现ZNF671在CIN2+中出现高频甲基化,这一表观遗传改变可能导致基因沉默,并在宫颈病变的发展过程中发挥重要作用。尽管ZNF671性能优异,但单基因标志物可能无法全面反映疾病异质性。

多位点联合检测被认为是提高DNA甲基化检测性能的有效策略^[24],但如何科学组合不同标志物以覆盖宫颈病变进展的关键阶段,仍缺乏系统研究。SOX1在宫颈癌中作为抑癌基因,主要通过抑制Wnt/ β -catenin通路活性以及下游靶基因表达,进而抑制细胞生长、侵袭与转移^[25]。在系统评估单基

因诊断性能的基础上,本研究首次提出将ZNF671与SOX1联合建模,构建CIN2+诊断模型。其中ZNF671主要反映从低级别到高级别组织学结果的表观遗传改变,提示其可用于早期预警,而SOX1则在高级别组织学向癌症进展中更具诊断价值,倾向指示癌变进展。两者在不同病程阶段的甲基化特征表现出互补性,使得联合模型在训练集与测试集中展现出优于单基因的性能指标,特异性进一步提升。本研究不仅验证了ZNF671作为关键标志物在临床分流中的价值,并构建了覆盖“早期预警-晚期进展”更广泛病程的DNA甲基化联合模型,拓展了宫颈癌分流策略的精准诊断新路径。

在HPV筛查背景下,如何在高敏感性的基础上提升分流的特异性,是当前筛查策略优化的关键。本研究构建的联合模型能够在HPV16/18阳性人群中提供额外风险信息,尽管灵敏度一般,但特异度达到87%,有望作为有效的补充筛查工具,帮助降低不必要的阴道镜转诊率。需注意的是,模型性能高度依赖截断值设定。在临床推广中,如高危人群识别的初筛可采用高灵敏度截断值;避免过度阴道镜检查的分流则优先高特异度截断值,以实现场景化应用。

此外,目前已有多项研究探讨了其他宿主基因在宫颈癌甲基化筛查中的应用价值。例如,PAX1基因甲基化在HPV阳性女性中用于CIN2+检测时,其灵敏度为73.50%、特异度为70.28%;当与HPV16/18分型联合筛查时,灵敏度提升至80.34%,但特异度下降至46.50%^[26]。在hr-HPV阳性人群中,PAX1甲基化检测的灵敏度为53.85%,特异度为86.52%^[27]。另有一项纳入44例hr-HPV感染者的小样本研究显示,CADM1甲基化检测对CIN2+的灵敏度为80.9%、特异度为40%^[28]。不同研究间结果存在一定差异,可能与研究人群构成、样本量规模、检测技术平台及甲基化截断值设定等因素相关。因此,未来仍需在统一检测体系与标准化评价框架下,在多中心、大样本队列中系统性比较不同甲基化标志物组合在各类筛查人群中的诊断效能与适用性,为筛查策略优化提供更充分的循证依据与转化应用基础。

尽管本研究构建的联合模型表现出良好的诊断效能,但仍存在一些局限性。目前研究证明血浆^[29]或尿液^[30-31]来源的样本也能进行DNA甲基化分析,后续研究可探索其在无创筛查中的应用价值。此外,单独依赖宿主基因甲基化可能会限制检测性能。本研究未整合HPV数据,而既往研究表

明,HPV病毒突变与宿主基因的表现遗传改变密切相关^[32],HPV DNA甲基化水平增加与病毒DNA整合至宿主基因组之间存在关联^[33-34]。因此,未来研究可进一步探索病毒与宿主双重甲基化标志物的联合检测策略,以提升对CIN2+的识别效能,更好地服务于精准筛查与风险分层。

综上所述,宿主基因甲基化作为一种新的生物标志物,在宫颈癌筛查分流中展现出广阔应用前景。ZNF671在本研究中表现出最优单基因性能,联合SOX1构建的模型进一步提升CIN2+诊断效能,为宫颈癌精准筛查策略的优化提供了理论依据与实践工具。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

All of the authors have no conflict of interests to declare.

作者贡献声明:

王韞格负责课题设计、数据收集与分析,撰写论文初稿;刘云龙协助研究设计,参与资料收集;王玲菲、户文静负责临床样本采集,参与论文审阅与修订;周国华提出方法学思路,参与论文审阅与修改;武海萍负责研究全过程的监督与指导,参与写作指导与终稿审阅。

Author's Contributions:

WANG Yunge was responsible for study design, data collection and analysis, and drafting the manuscript. LIU Yunlong assisted in research design and contributed to data collection. WANG Lingfei and HU Wenjing were involved in clinical sample collection and participated in the review and revision of the manuscript. ZHOU Guohua proposed methodological approaches and critically revised the manuscript. WU Haiping supervised and guided the entire research process, and was responsible for the writing instruction and final review of the manuscript.

[参考文献]

- [1] SINGH D, VIGNAT J, LORENZONI V, et al. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative [J]. *Lancet Glob Health*, 2023, 11(2): e197-e206
- [2] MOMENIMOVAHED Z, MAZIDIMORADI A, MAROOFI P, et al. Global, regional and national burden, incidence, and mortality of cervical cancer [J]. *Cancer Rep(Hoboken)*, 2023, 6(3): e1756
- [3] KUSAKABE M, TAGUCHI A, SONE K, et al. Carcinogenesis and management of human papillomavirus - associated cervical cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2023, 28(8): 965-974
- [4] BULK S, BERKHOF J, BULKMANS N J, et al. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in the Netherlands [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(1): 171-175
- [5] LIAO C L, CAESAR M A P, CHAN C, et al. HPV associated cancers in the United States over the last 15 years: has screening or vaccination made any difference? [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(15_suppl): 107
- [6] MALAGÓN T, FRANCO E L, TEJADA R, et al. Epidemiology of HPV-associated cancers past, present and future: towards prevention and elimination [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(7): 522-538
- [7] HORTLUND M, VAN MOL T, VAN DE POL F, et al. Human papillomavirus load and genotype analysis improves the prediction of invasive cervical cancer [J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(3): 684-691
- [8] 李明珠, 李静然, 李 晓, 等. 中国子宫颈癌筛查指南(二) [J]. *现代妇产科进展*, 2025, 34(1): 1-9
- [8] LI M Z, LI J R, LI X, et al. Guidelines for cervical cancer screening in China II [J]. *Progress in Obstetrics and Gynecology*, 2025, 34(1): 1-9
- [9] ZHANG F F, ZHANG X, ZHANG H K, et al. Pan-precancer and cancer DNA methylation profiles revealed significant tissue specificity of interrupted biological processes in tumorigenesis [J]. *Epigenetics*, 2023, 18(1): 2231222
- [10] MACLENNAN S A, MARRA M A. Oncogenic viruses and the epigenome: how viruses hijack epigenetic mechanisms to drive cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9543
- [11] ZHANG L, ZHAO X L, HU S Y, et al. Triage performance and predictive value of the human gene methylation panel among women positive on self-collected HPV test: results from a prospective cohort study [J]. *Int J Cancer*, 2022, 151(6): 878-887
- [12] HAN Y X, JI L Y, GUAN Y F, et al. An epigenomic landscape of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer using single - base resolution methylome and hydroxymethylome [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(7): e498
- [13] DE WAARD J, BHATTACHARYA A, DE BOER M T, et al. Identification of a methylation panel as an alternative triage to detect CIN3+ in hrHPV - positive self - samples from the population - based cervical cancer screening programme [J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1): 103
- [14] CHEN X Y, JIANG H M, XU H B, et al. Cervical cancer screening: efficacy of PAX1 and JAM3 methylation assay in the triage of atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US) [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1):

- 1385
- [15] SHI L Y, YANG X, HE L, et al. Promoter hypermethylation analysis of host genes in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers on histological cervical specimens[J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 168
- [16] LIU Y X, CHEN Y, XIONG J, et al. Performance of DNA methylation analysis in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse (CIN3+): a cross-sectional study[J]. *Infect Agent Cancer*, 2023, 18(1): 77
- [17] ZHU Z X, ZHOU Q W, SUN Y H, et al. MethMarkerDB: a comprehensive cancer DNA methylation biomarker database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D1380–D1392
- [18] THUMBOVORN R, BHATTARAKOSOL P, CHAIWONGKOT A. Detection of global DNA methylation in cervical intraepithelial neoplasia and cancerous lesions by pyrosequencing and enzyme-linked immunosorbent assays[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23(1): 143–149
- [19] JI H H, LI K H, JIANG W X, et al. MRV11 and NTRK3 are potential tumor suppressor genes commonly inactivated by DNA methylation in cervical cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 11: 802068
- [20] FAN C L, MA Q F, WU X F, et al. Detection of DNA methylation in gene loci ASTN1 DLX1 ITGA4 RXFP3 SOX17 and ZNF671 for diagnosis of cervical cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2023, 15: 635–644
- [21] ZHANG J, ZHENG Z Q, ZHENG J L, et al. Epigenetic-mediated downregulation of zinc finger protein 671 (ZNF671) predicts poor prognosis in multiple solid tumors[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 342
- [22] ZHANG W, LIU T, LI X Y, et al. Increased methylation of ZNF671 suppresses tumor progression by promoting MAPK6 transcription in laryngeal carcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(8): 2443–2457
- [23] ZHAN W, LI Y Z, LIU X H, et al. ZNF671 inhibits the proliferation and metastasis of NSCLC via the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 599–610
- [24] KONG L H, WANG L H, WANG Z Y, et al. DNA methylation for cervical cancer screening: a training set in China[J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 91
- [25] LIN Y W, TSAO C M, YU P N, et al. SOX1 suppresses cell growth and invasion in cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(1): 174–181
- [26] CHAN K K L, LIU S S, LAU L S K, et al. PAX1/SOX1 DNA methylation versus cytology and HPV16/18 genotyping for the triage of high-risk HPV-positive women in cervical cancer screening: retrospective analysis of archival samples[J]. *BJOG*, 2025, 132(2): 197–204
- [27] LIN C Y, ZHU C Y, XIE M H, et al. Analysis of the triage value of multigene methylation testing for CIN2+ in hrHPV-positive patients[J]. *Infect Agent Cancer*, 2025, 20(1): 22
- [28] MOLANO M, MACHALEK D A, TAN G, et al. Performance of CADM1, MAL and miR124-2 methylation as triage markers for early detection of cervical cancer in self-collected and clinician-collected samples: an exploratory observational study in Papua New Guinea[J]. *BMJ Open*, 2024, 14(6): e081282
- [29] BU Q W, LUO X P, HE L L, et al. Septin9 DNA methylation as a promising biomarker for cervical cancer[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2023, 43(1): 2151356
- [30] VAN DEN HELDER R, STEENBERGEN R D M, VAN SPLUNTER A P, et al. HPV and DNA methylation testing in urine for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer detection[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(10): 2061–2068
- [31] VAN KEER S, PATTYN J, TJALMA W A A, et al. First-void urine: a potential biomarker source for triage of high-risk human papillomavirus infected women[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2017, 216: 1–11
- [32] HUANG C J, XIAO X, AI W C, et al. HPV-16 E6 mutation and viral integration related host DNA methylation implicate the development and progression of cervical cancer[J]. *Infect Dis(Lond)*, 2025, 57(1): 66–80
- [33] ZENG X, WANG Y, LIU B H, et al. Multi-omics data reveals novel impacts of human papillomavirus integration on the epigenomic and transcriptomic signatures of cervical tumorigenesis[J]. *J Med Virol*, 2023, 95(5): e28789
- [34] DA SILVA M L R, DE ALBUQUERQUE B H D R, ALLYRIO T A M F, et al. The role of HPV-induced epigenetic changes in cervical carcinogenesis(review)[J]. *Biomed Rep*, 2021, 15(1): 60

[收稿日期] 2025-05-05

(本文编辑:蒋莉)