

人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 的检测在宫颈癌筛查中的初步评价

姜俊^{1*}, 陈宜刚¹, 王华², 叶军², 冯蕾¹

(¹泰州职业技术学院医学技术学院医学基础系, 江苏 泰州 225300; ²泰州市人民医院妇产科, 江苏 泰州 225300)

[摘要] 目的:评价支链 DNA 技术(bDNA)对 HPV-E6/E7 mRNA 的检测及其临床价值。方法:对 167 例宫颈癌筛查妇女宫颈脱落细胞用液基细胞薄层涂片技术行宫颈细胞学检查,同时采用 bDNA 技术检测 HPV-E6/E7 mRNA。另从中随机选择 43 例患者[11 例非典型鳞状上皮细胞(ASCUS)、17 例低度鳞状上皮内病变(LSIL)、15 例高度鳞状上皮内病变(HSIL)]检测 HPV-E6/E7 DNA。结果:①HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV-E6/E7 DNA 相关性分析显示:HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV-E6/E7 DNA 检测结果呈现显著正相关($r = 0.465, P = 0.002$);②总体人群 HPV-E6/E7 mRNA 检出阳性率为 43.1%,随着病理级别的升高,HPV-E6/E7 mRNA 阳性率($\chi^2 = 41.396, P < 0.001$)和 copies 量($H = 39.350, P < 0.001$)均呈现趋势性升高;③HPV-E6/E7 mRNA 对 LSIL⁺诊断的灵敏度为 67.1%(95%CI:56.1%~78.1%)、特异性为 74.2%(95%CI:65.5%~82.9%)、准确性为 71.3%(95%CI:64.4%~78.1%)、阳性预测值为 65.3%(95%CI:54.3%~76.3%)、阴性预测值为 75.8%(95%CI:67.2%~84.4%)。结论:HPV-E6/E7 mRNA 与宫颈细胞学类型相关,其对 LSIL⁺的诊断具有较高的效率,可能更为适用于宫颈癌的发病风险评估。

[关键词] 人乳头瘤病毒;非典型鳞状上皮细胞;低度鳞状上皮内病变;高度鳞状上皮内病变;E6/E7 信使 RNA;E6/E7 DNA; bDNA 技术

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1261-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130917

Preliminary evaluation of detection of human papilloma virus E6/E7 mRNA in screening of cervical cancer

Jiang Jun^{1*}, Chen Yigang¹, Wang Hua², Ye Jun², Feng Lei¹

(¹Department of Medical Science, School of Laboratory Medicine, Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; ²Department of Gynaecology and Obstetrics, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical value of human papilloma virus E6/E7 mRNA by branch-DNA technology. **Methods:** In the exfoliated cervical cells from 167 women of cervical cancer screening by liquid based thinprep cytology test (TCT), branch-DNA (bDNA) technology was performed to examine the HPV-E6/E7 mRNA. The HPV-E6/E7 DNA was also examined in 43 cases at the same time. **Results:** ①The copies of HPV-E6/E7 mRNA are positively related with HPV-E6/E7 DNA ($r = 0.465, P = 0.002$); ②The HPV-E6/E7 mRNA positive rate was 43.1% in all groups. The HPV-E6/E7 mRNA positive rate and copies were increased along with the increase of the grade of cervical lesions ($\chi^2 = 41.396, P < 0.001$; $H = 39.350, P < 0.001$); ③The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value, negative predictive value of HPV-E6/E7 mRNA for LSIL⁺ were 67.1% (95%CI, 56.1% to 78.1%), 74.2% (95%CI, 65.5% to 82.9%), 71.3% (95%CI, 64.4% to 78.1%), 65.3% (95%CI, 54.3% to 76.3%) and 75.8% (95%CI, 67.2% to 84.4%), respectively. **Conclusion:** The HPV-E6/E7 mRNA was related with the type of cervix cytology, and had high efficiency diagnose for LSIL⁺. The HPV-E6/E7 mRNA can be applied for risk assessment of cervical cancer.

[Key words] human papilloma virus; atypical squamous cells of undetermined sign; low grade squamous intraepithelial lesion; high grade squamous intraepithelial lesion; E6/E7 mRNA; E6/E7 DNA; branch-DNA

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1261-1264]

[基金项目] 泰州市社会发展计划(指导性)项目(2012123)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 2625370017@QQ.com

宫颈癌是全球发病率居第二位的妇女恶性肿瘤,人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的感染与宫颈癌的发病有密切的关系^[1]。因此 HPV 的

检测已成为筛查宫颈疾病,预防宫颈癌发生的重要项目。目前实验室常用的 HPV 检测方法有核酸杂交、聚合酶链反应技术(PCR)、第二代杂交捕获技术(hybrid capture 2,HC2)试验等方法。它们大多是针对高危 HPV 型的 DNA 进行检测。其实在 HPV 高危型别中真正致癌的基因是其中的 E6/E7 基因片段^[2],而 HPV-E6/E7 mRNA 含量能较好地反映 HPV 致癌基因 E6/E7 的活动度,可以更为直观地评估宫颈癌的发病风险和预后^[3]。本文采用支链 DNA 技术(bDNA)对 HPV-E6/E7 mRNA 进行检测,并与 HPV-E6/E7 DNA 比较,分析其在宫颈疾病检查项目中的价值。

1 对象和方法

1.1 对象

以 2012 年 10 月~2013 年 3 月来泰州市人民医院妇产科门诊和住院患者 167 例为研究对象。年龄 27~63 岁,平均年龄(40.9 ± 8.3)岁。其中液基细胞薄层涂片技术(TCT)行宫颈细胞学检查正常 52 例、非典型鳞状上皮细胞(ASCUS)45 例、低度鳞状上皮内病变(LSIL)30 例、高度鳞状上皮内病变(HSIL)40 例。由妇科医生取宫颈脱落细胞贮存于 Digene 专用采样瓶中待检。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集及保存

由妇科医生使用液基细胞学 Autocyteprep 系统专用刷插入患者子宫颈口旋转 3 周,收集宫颈口及颈管的脱落上皮细胞,然后将刷头部放入装有 CyttoRich 保存液的小瓶内供 TCT 检测,TCT 检测剩余标本用于 HPV E6/E7 mRNA 的检测。

1.2.2 细胞学诊断

采集受检对象子宫颈分泌物标本的同时进行阴道镜检查,对可疑子宫颈癌前病变者直接取子宫颈活组织检查;对于 TCT ≥ 未明确诊断意义的 ASCUS 或 HPV 阴性但 TCT ≥ LSIL 的病例均行阴道镜下多点活检或颈管诊刮。在完全不知道 TCT 和 HPV 结果的情况下盲法阅片做出诊断。所有异常的病理切片和 TCT 异常的细胞涂片及 10%正常的病理切片和细胞涂片均经本院病理技术人员按照 Richart 标准^[4]复查审核。

1.2.3 HPV E6/E7 DNA 的检测

采用 TCT 制片过程中剩余的离心细胞用于高危 HPV 检测^[5]。基本操作步骤参见试剂盒说明。结果判定:HPV 阳性判断标准为检测样本的相对光单

位(relative light unit,RLU)/标准阳性对照的 RLU> 0.8~1.0。采用 96 孔平板法,可 1 次检测国际癌症研究机构(IARC)公布已被世界公认的 13 种高危型 HPV^[6],分别为 HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68 型 HPV,并可同时检测样本中 HPV 的负荷量。

1.2.4 HPV E6/E7 mRNA 的检测

标本处理:将液基细胞学检测后剩余标本,以 3 000 r/min 离心 5 min,去上清液,用 2 ml 蒸馏水清洗后再次离心,去上清液,加入裂解剂(lysis mixture 与 proteinase K 按 1:800 混合,Diacarta 公司,美国),65℃水浴 30min,得到裂解液,待测。检测步骤:按照文献^[7]进行操作,可检测 HPV 的 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、66、26、55、61、73、83 亚型的 E6/E7mRNA 的基因片段。

1.3 统计学方法

采用 sigmastat3.1 软件进行统计分析,不同程度宫颈病变中 HPV 阳性率比较采用 χ^2 检验,不同程度宫颈病变中 HPV 的 copies 数采用 One Way ANOVA 的 Ranks 检验。以病理检测结果为参照计算 HPV-E6/E7 mRNA 诊断的敏感度、特异性、准确性、阳性预测值、阴性预测值,不同程度病变诊断的效率的比较采用 χ^2 检验。采用 Pearson 直线相关分析 HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV-E6/E7 DNA copies 量的相关性。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV-E6/E7 DNA 检出结果相关性分析

随机选择 11 例 ASCUS、17 例 LSIL、15 例 HSIL 患者标本,HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV DNA 相关性分析显示:HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV-E6/E7 DNA 检测结果呈现显著正相关($r = 0.465, P = 0.002$,图 1)。

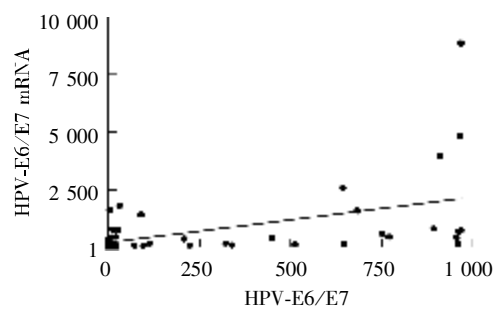


图 1 HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV-E6/E7 DNA 检出结果相关性分析图

Figure 1 Correlation analysis results of HPV-E6/E7 mRNA and HPV-E6/E7 DNA detection

2.2 HPV-E6/E7 mRNA 对不同人群检测结果比较
随着病理级别的升高,HPV-E6/E7 mRNA 阳性率($\chi^2 = 41.396, P < 0.001$)和 copy 量($H = 39.350, P < 0.001$)呈现上升趋势。与正常对照组比较,ASCUS、LSIL、HSIL 的 HPV-E6/E7 mRNA 的 copy 量均有显著性差异($Q = 3.055, P < 0.05; Q = 3.271, P < 0.05; Q = 55.134, P < 0.05$),ASCUS、LSIL 的 HPV-E6/E7mRNA 的 copy 量无显著性差异($T = 1\ 234.000, P = 0.312$),ASCUS 与 HSIL 有显著性差异($Q = 2.493, P < 0.05$); 而 LSIL 与 HSIL 比较亦无显著性差异 ($T = 953.000, P = 0.186$,表 1)。

表 1 HPV-E6/E7 mRNA 对不同人群检出结果比较

Table 1 Comparison of HPV-E6/E7 mRNA detection results for different people

	例数	阳性例数	百分率(%)	中位数	25%~75%
正常	52	5	9.6	0.000	0.000~0.000
ASCUS	45	20	44.4	0.000	0.000~446.033
LSIL	30	18	60.0	86.189	0.000~942.165
HSIL	40	29	72.5	361.384	0.000~1\ 733.903
总计	167	72	43.1	0.000	0.000~575.096

表 2 HPV-E6/E7mRNA 对 ASCUS⁺、LSIL⁺和 HSIL 的诊断效率比较

Table 2 Comparison of the diagnostic efficiency of ASCUS⁺, LSIL⁺ and HSIL by HPV-E6/E7 mRNA

(n/n, %, 95%CI)

	ASCUS ⁺	LSIL ⁺	HSIL
灵敏度	67/115, 58.3, 49.2~67.3	47/70, 67.1, 56.1~78.1	29/40, 72.5, 58.7~86.3
特异性	47/52, 90.4, 82.4~98.4	72/97, 74.2, 65.5~82.9*	84/127, 66.1, 57.9~74.4
准确性	114/167, 68.3, 61.2~75.3	119/167, 71.3, 64.4~78.1	113/167, 67.7, 60.6~74.8
PPV	67/72, 93.1, 87.2~98.9	47/72, 65.3, 54.3~76.3**	29/72, 40.3, 28.9~56.1***
NPV	47/95, 49.5, 39.4~59.5	72/95, 75.8, 67.2~84.4**	84/95, 88.4, 82.0~94.9***

与 ASCUS⁺组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$;与 LSIL⁺组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

高危型 HPV 感染的妇女中有相当一部分可发展成宫颈癌前病变,对 HPV 感染进行准确的检测可提高宫颈癌前病变筛查的敏感性。目前 HPV 的检测方法主要有测定 DNA 和 E6/E7 mRNA, 目前欧、美国家用于筛查检测 HPV-DNA 的方法主要是第二代杂交捕获技术 (hybrid capture 2, HC2)。这种方法主要针对高危亚型 HPV-16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 的 HPV-DNA 进行检测。

HPV E6/E7 致癌蛋白是细胞恶性转化的主要原因。mRNA 是病毒癌基因转录产物,它们的表达会导致宿主细胞向恶性方向转化^[8]。如癌基因没有表达,则细胞本身不会发生癌变。HPV E6/E7 mRNA 在宫颈组织中表现癌基因活性。同时 E6/E7 可显著

2.3 HPV-E6/E7mRNA 检测方法对不同宫颈疾病的诊断效率比较

分别以 ASCUS⁺(包括 ASCUS、LSIL 和 HSIL)、LSIL⁺(包括 LSIL 和 HSIL) 和 HSIL 作为研究对象,分析 HPV-E6/E7 mRNA 对上述病理类型的诊断效率。结果显示:HPV-E6/E7 mRNA 对上述 3 种病理类型诊断的灵敏度($\chi^2 = 3.162, P = 0.206$)和准确性($\chi^2 = 0.579, P = 0.749$)均无显著性差异。HPV-E6/E7 mRNA 对 ASCUS⁺和 LSIL⁺诊断的特异性有显著性差异($\chi^2 = 4.537, P = 0.033$),而对 LSIL⁺和 HSIL 诊断的特异性无显著性差异($\chi^2 = 1.34, P = 0.247$)。与对 ASCUS⁺诊断的阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)相比,HPV-E6/E7 mRNA 对 LSIL⁺诊断的阳性预测值显著升高($\chi^2 = 15.2, P < 0.001$)、阴性预测值显著降低($\chi^2 = 12.953, P < 0.001$)。与对 LSIL⁺诊断的阳性预测值、阴性预测值相比,HPV-E6/E7 mRNA 对 HSIL 诊断的阳性预测值显著升高 ($\chi^2 = 8.053, P = 0.005$)、阴性预测值显著降低 ($\chi^2 = 4.334, P < 0.037$,表 2)。

抑制 p53 和 Rb 这两种肿瘤抑制蛋白,从而干扰细胞周期调节,促进细胞无规则生长^[9]。已证实,测定 E6/E7 有助于区分一过性感染(低表达)和发展为癌(高表达)的人群,可作为妇女筛查的重要靶点^[10]。许多学者报道 HPV-E6/E7 mRNA 水平与病变的严重程度相关,在高级别宫颈病变中对高危 HPV mRNA 检测相比,HPV DNA 检测有更好的特异性^[11-12]。因此对宫颈细胞中 HPV E6/E7 mRNA 的检测有利于对感染高危 HPV 病毒的妇女进行风险评估。本文对 ASCUS、LSIL 和 HSIL 分析显示:随着病理级别的升高,HPV-E6/E7 mRNA 阳性率 ($\chi^2 = 41.396, P < 0.001$)和 copy 量($H = 39.350, P < 0.001$)呈现上升趋势,与 Ratnam^[13]报道的结果一致,提示 HPV-E6/E7 mRNA 在宫颈疾病发病和病理级别升高中起重要作用。本研究分析 HPV-E6/E7 mRNA 对不同宫

颈疾病的诊断效率显示:HPV-E6/E7 mRNA 对 ASCUS⁺、LSIL⁺和 HSIL 诊断的灵敏度和准确性均无显著性差异,而对 LSIL⁺诊断的特异性显著高于 ASCUS⁺,但与 HSIL 无显著性差异。提示 HPV-E6/E7 mRNA 对 LSIL⁺具有较高的诊断效率(灵敏度 67.1%、特异性 74.2%)。

本研究采用支链 DNA 技术 (bDNA) 对 HPV E6/E7 mRNA 进行检测,该方法采用 bDNA 分子放大捕获的目标 DNA 或 RNA 信号,是一种三明治结构的核酸杂交方法。传统的 PCR 检测方法是先进行大量扩增后检测,因非特异性扩增、污染等因素的存在,使技术上存在一些不确定因素。bDNA 只要将样本用特定裂解液裂解后,不经过扩增的过程,直接经探针杂交后,通过特定的信号放大,可得到精确的实验结果。该技术具有放大倍数确定、重复性、稳定性高等特点。可以对 DNA/RNA 做精确的定量检测及动态水平研究。本文用 bDNA 技术对 HPV E6/E7 mRNA 进行检测,并与 HC2 法进行比较。结果显示,HPV-E6/E7 mRNA 与 HPV-E6/E7 DNA 检测结果呈现显著正相关 ($r = 0.465, P = 0.002$)。提示该 bDNA 技术检测 HPV-E6/E7 mRNA 准确可靠。HPV E6/E7 mRNA 是宫颈细胞癌变的罪魁祸首,故检测 HPV E6/E7 片段的表达较其他检测病毒本身的存在更精准,更直接。因此 bDNA 技术对 HPV-E6/E7 mRNA 的检测可以有利于宫颈癌的早期诊断、控制发展及预后监测。

[参考文献]

- [1] Mtmoz N, Bosch FX, Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(6): 518-527
- [2] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(8): 550-560
- [3] Hovland S, Muller S, Skomedal H, et al. E6/E7 mRNA expression analysis: a test for the objective assessment of cervical adenocarcinoma in clinical prognostic procedure [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(6): 1533-1539
- [4] Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Obstet Gynecol*, 1990, 75(1): 131-133
- [5] 刘彬, 陈汶, 任生达, 等. 液基细胞学剩余标本筛查子宫颈病变中人乳头瘤病毒 DNA 的应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(5): 495-497
- [6] Cogliano V, Baan R, Straif K, et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses [J]. *Lancet Oncology*, 2005, 6(4): 204
- [7] 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/E7 mRNA 在宫颈疾病筛查中的价值 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(15): 36-39
- [8] 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
- [9] McCloskey R, Menges C, Friedman A, et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation [J]. *J Virol*, 2010, 84(10): 5131-5139
- [10] Wis-Draper F, Wells S. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 1003-1017
- [11] Perez Castro S, Iñarrea Fernández A, et al. 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
- [12] 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
- [13] 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

[收稿日期] 2013-04-04