

· 临床研究 ·

人乳头瘤病毒 DNA 基因分型和 E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的临床价值

陆璐¹, 成建^{2*}¹江苏卫生健康职业学院生化教研室, 江苏 南京 211800; ²南京医科大学附属妇产医院产前诊断中心, 江苏 南京 210004

[摘要] 目的:探讨人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)DNA 基因分型和 E6/E7 mRNA 检测技术在宫颈癌早期筛查中的临床价值。方法:用 PCR-反向点杂交方法对 29 081 名妇女进行宫颈脱落细胞 HPV DNA 基因分型检测,对高危型阳性率、亚型分布统计分析;用 Aptima mRNA 逆转录扩增法对 22 562 名妇女进行宫颈脱落细胞 HPV E6/E7 mRNA 检测,对高危型感染率统计分析;比较不同检测方法和不同年龄段高危型感染率的差异。结果:在接受 HPV DNA 基因分型检测的 29 081 例标本中, HPV 阳性率为 29.57%(8 602/29 081);高危型 HPV 感染前 5 名依次为 HPV52、HPV16、HPV53、HPV58、HPV51;高危型阳性率最高峰出现在 < 25 岁年龄段。在接受 HPV E6/E7 mRNA 检测的 22 562 例标本中,高危型阳性率为 12.59%(2 840/22 562),高危型阳性率排名前二的分别是 ≥65 岁年龄段、55~64 岁年龄段。除 55~64 岁年龄段、≥65 岁年龄段外,其余年龄段两种检测方法之间 HPV16、HPV18/45 阳性率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:HPV E6/E7 mRNA 检测可有效减少“假阳性”结果,提高筛查效率。应重视 ≥55 岁女性的 HPV 筛查,在该年龄段的女性中,两种 HPV 检测方法的筛查效率相近。

[关键词] 人乳头瘤病毒; HPV DNA; E6/E7 mRNA; 宫颈癌**[中图分类号]** R737.33**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2021)01-122-04**doi:** 10.7655/NYDXBNS20210123

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,发病率在我国女性恶性肿瘤中位居第二。宫颈癌的发生、发展与人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的感染密切相关^[1]。不同的 HPV 亚型具有不同的致病性。目前已分离出 HPV 亚型 120 余种,其中常见高危型有 18 种。临床上常用的 HPV DNA 基因分型检测能反映宫颈上皮细胞的病毒种类和载量,但对病毒的活动程度无法知晓。研究发现,高危型 HPV E6/E7 mRNA 可反映致癌基因 E6/E7 的活动度,其过度表达是宫颈癌及癌前病变发生的关键^[2]。本研究通过比较 HPV DNA 基因分型检测和 HPV E6/E7 mRNA 检测结果,评估两种方法在宫颈癌早期筛查中的诊断价值。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2018 年 1 月 1 日—12 月 31 日在南京医科大学附属妇产医院妇科、宫颈科、妇女保健门诊就

诊,并自愿接受宫颈部位 HPV DNA 基因分型检测及 HPV E6/E7 mRNA 检测的女性,年龄 18~88 岁。其中,接受 HPV DNA 基因分型检测的样本共 29 081 例,接受 E6/E7 mRNA 检测的样本共 22 562 例。本研究经医院伦理委员会批准,所有被检者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

标本使用专用 HPV 采样刷,由门诊医生取宫颈脱落细胞储存于有专用细胞保存液的取样管中,4℃冰箱保存,1 周内检测。

1.2.2 HPV DNA 分型检测

使用亚能生物技术(深圳)有限公司生产的人乳头瘤病毒(HPV)基因分型检测试剂盒及人乳头瘤病毒分型基因芯片检测系统,对 23 种 HPV 基因型进行检测,其中包括 18 种高危型(HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV53、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68、HPV73、HPV83、HPV82)和 5 种低危型(HPV6、HPV11、HPV42、HPV43、HPV81)。检测过程严格按照试剂盒及检测系统说明书进行,包括标

[基金项目] 江苏卫生健康职业学院院级重点项目(JKB 201914)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chengjian_nj@njmu.edu.cn

本DNA提取、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、导流杂交。根据芯片上HPV基因型分布的相应位点进行判读。

1.2.3 HPV E6/E7 mRNA 检测

使用美国豪洛捷公司(Hologic)研发的Aptima HPV(14种高危亚型)试剂盒、Aptima HPV 16、HPV 18/45分型检测试剂盒及Panther一体化检测平台进行HPV E6/E7 mRNA检测。检测过程分为两个步骤,第一步:使用Aptima HPV(14种高危亚型)试剂盒对14种高危型(HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68)E6/E7 mRNA进行检测;第二步:使用Aptima HPV 16、HPV18/45分型检测试剂盒对第一步检测结果阳性的样本进行HPV16、HPV18/45分型检测。检测操作过程严格按照试剂盒及检测系统说明书进行(该检测过程为全自动、一体化过程,仅需将检测试剂、样本放入后机器运行检测程序即可)。检测结果判读:系统自动读出“阴性、HPV 16型阳性、HPV 18/45型阳性、其他阳性”4种结果。

1.3 统计学方法

应用SPSS16.0软件进行统计分析,以百分率作为HPV感染的统计描述。两样本间率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种检测方法检测结果分析

在接受HPV DNA基因分型检测的29 081例样本中,共检出阳性例数8 602例,HPV阳性率为29.57%(8 602/29 081),其中高危型阳性例数7 425例,高危型阳性率为25.53%,占86.32%(7 425/8 602)。检测的23种HPV亚型均有检出,高危型HPV感染前5名依次为HPV52、HPV16、HPV53、HPV58、HPV51,占阳性例数百分比分别为22.13%(1 904/8 602)、14.32%(1 232/8 602)、13.22%(1 137/8 602)、10.63%(914/8 602)、9.13%(785/8 602)。在接受E6/E7 mRNA检测的22 562例样本中,共检出阳性病例2 840例,高危型阳性率为12.59%(2 840/22 562),其中HPV16阳性患者557例,占19.61%(557/2 840),HPV18/45阳性患者198例,占6.97%(198/2 840),其他类型阳性患者2 091例,占73.63%(2 091/2 840)。具体检测结果见表1。

2.2 不同年龄段高危型阳性率比较

采用HPV DNA基因分型和E6/E7 mRNA检测

表1 两种检测方法检测结果一览表

类型	感染例数*	阳性例数构成比(%)
HPV DNA 基因分型		
HPV52	1 904	22.13
HPV16	1 232	14.32
HPV53	1 137	13.22
HPV58	914	10.63
HPV51	785	9.13
HPV68	685	7.96
HPV33	464	5.39
HPV18	422	4.91
HPV56	415	4.83
HPV59	413	4.80
HPV39	409	4.75
HPV31	371	4.31
HPV66	342	3.98
HPV35	272	3.16
HPV45	148	1.72
HPV73	93	1.08
HPV82	85	0.99
HPV83	84	0.98
E6/E7 mRNA 检测		
HPV16	557	19.61
HPV18/45	198	6.97
其他高危型	2 091	73.63

*:统计不同亚型感染时多重感染者重复计数。

结果按不同年龄段分组,各组检测例数和高危型阳性例数详见表2。HPV DNA基因分型检测,高危型阳性率最高峰出现在 < 25 岁年龄段;HPV E6/E7 mRNA检测,高危型阳性率排名前二的分别是 ≥ 65 岁年龄段、55~ < 65 岁年龄段。卡方检验结果显示,两种检测方法中,在不同年龄段间高危型阳性率的差异均有统计学意义($P < 0.05$);但各年龄段间两两比较,两种检测方法中,55~ < 65 岁年龄段与 ≥ 65 岁年龄段间高危型阳性率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 不同年龄段两种检测方法 HPV16、HPV18/45 阳性率比较

不同年龄段,两种检测方法的HPV16、HPV18/45阳性例数见表3。卡方检验结果显示,除55~ < 65 岁年龄段、 ≥ 65 岁年龄段,其余年龄段两种检测方法检测的HPV16、HPV18/45阳性率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

HPV是一组无包膜的小DNA病毒,属乳头瘤病

表2 不同年龄段高危型阳性率比较

年龄组	HPV DNA 基因分型检测		E6/E7 mRNA 检测	
	总例数	高危型*[n(%)]	总例数	高危型*[n(%)]
<25岁	169	85(50.30)	749	130(17.36)
25~<35岁	6 743	1 732(25.69)	10 726	1 035(9.65)
35~<45岁	11 145	2 610(23.42)	6 041	815(13.49)
45~<55岁	8 023	1 972(24.58)	3 893	589(15.13)
55~<65岁	2 480	862(34.76)	978	220(22.49)
≥65岁	521	164(31.48)	175	51(29.14)
χ ² 值	205.32		257.82	
P值	<0.001		<0.001	

*:包括单纯高危型阳性、高危型阳性合并低危型阳性。

表3 不同年龄段中两种检测方法 HPV16、18/45 阳性率比较

[n(%)]

年龄组	HPV DNA 基因分型检测		E6/E7 mRNA 检测		χ ² 值	P值
	HPV16、HPV18/45 阳性	其他*	HPV16、HPV18/45 阳性	其他*		
<25岁	51(30.18)	118(69.82)	36(4.81)	713(95.19)	103.46	<0.001
25~<35岁	460(6.82)	6 283(93.18)	279(2.60)	10 447(97.40)	182.05	<0.001
35~<45岁	506(4.54)	10 639(95.46)	206(3.41)	5 835(96.59)	12.60	<0.001
45~<55岁	422(5.26)	7 601(94.74)	161(4.14)	3 732(95.86)	7.12	0.008
55~<65岁	189(7.62)	2 291(92.38)	56(5.73)	922(94.27)	3.83	0.051
≥65岁	44(8.45)	477(91.55)	11(6.29)	164(93.71)	0.84	0.359

*:包括除 HPV16、HPV18/45 外其他高危型阳性、单纯低危型阳性和阴性。

染亚型^[6]。相较于 HPV16、HPV18,其他高危型 HPV 的致癌风险相对较低。女性一生中感染 HPV 的概率高达 80%,其中 90% 的感染是一过性的,2~3 年可被自身免疫清除。这就导致 HPV DNA 基因分型检测在实际应用中假阳性率偏高,由此可能导致不必要的阴道镜检查,加重患者的心理压力和经济负担。因此,寻找敏感度较好且更特异的 HPV 检测方法是目前研究的热点。

Aptima HPV E6/E7 mRNA 检测作为一种宫颈癌前病变早期筛查的新技术,能有效评估宫颈上皮细胞因 E6/E7 癌基因表达导致的病变程度^[7]。高危型 HPV 持续感染基底细胞后,病毒 E6/E7 癌基因的表达水平会受细胞分化程度和患者免疫水平的影响。HPV E6/E7 mRNA 的表达是宫颈癌发生发展的重要因素^[8]。E6/E7 mRNA 检测相比 DNA 检测,前者能更加精准地发现具有临床重要性的感染^[9]。本研究中妇女宫颈高危型 HPV E6/E7 mRNA 阳性者所占比例为 12.59%(2 840/22 562),低于 HPV DNA 基因分型检测的高危型阳性率 25.53%(7 425/29 081)。

为了更客观地比较两种检测方法阳性率的差异,本研究对这两种检测方法都包含的 3 种型别(HPV16、HPV18/45)阳性率分年龄段比较。卡方检

毒科。持续高危型 HPV 感染是导致宫颈癌的主要原因,其分型检测在宫颈癌筛查中具有举足轻重的作用^[3]。

在本研究中,HPV DNA 分型检测结果显示,阳性构成比排名前五的亚型分别为 HPV52(22.13%)、HPV16(14.32%)、HPV53(13.22%)、HPV58(10.63%)、HPV51(9.12%)。尽管在世界范围内,高危型 HPV 基因型排序是 HPV16、HPV18、HPV31、HPV58、HPV52,但多项研究数据显示,亚洲地区 HPV58、HPV52 的阳性率超过 HPV18^[4-5]。然而,对宫颈癌患者的研究显示,HPV16 和 HPV18 依然是最常见的感

验结果显示,除 55~<65 岁年龄段、≥65 岁年龄段,其余年龄段两种检测方法中 HPV16、HPV18/45 阳性率的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这可能是因为 HPV DNA 分型检测是对宿主细胞内游离状态与整合状态的 HPV DNA 进行检测,特异性相对较低。而 HPV E6/E7 mRNA 仅检测整合状态的病毒 RNA 片段,大大减少“假阳性”出现的概率。但在 55~<65 岁、≥65 岁两个年龄段,这两种检测方法中 HPV16、HPV18/45 阳性率差异无统计学意义,这可能与机体清除率下降、持续性感染率增高有关。同时提示,在这两个年龄段,两种方法的筛查效率相近。

本研究按照年龄对样本进行分段,不同年龄段之间,两种检测方法中高危型阳性率的分布差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明按这种年龄段分组的研究方法有一定的临床意义。

在接受 HPV DNA 基因分型检测的标本中,高危型阳性率最高峰出现在 <25 岁年龄段(50.30%),与浙江、上海的报道相似^[10-11]。这可能与本研究中 25 岁以下年龄段就诊的女性性生活开始早、性伴侣多有关。而 HPV E6/E7 mRNA 检测中 <25 年龄段 HPV16、HPV18/45 阳性率明显低于 HPV DNA 分型检测。这提示该年龄段女性机体有着良好的病毒

清除能力,大部分病例仅为一过性感染。因此,对于<25岁年轻女性,不推荐进行HPV筛查。同时,在经济条件允许的情况下,可考虑尽早接种HPV疫苗。

在接受高危型HPV E6/E7 mRNA检测的标本中,高危型阳性率排名前二的分别是≥65岁年龄段、55~<65岁年龄段。这虽然与HPV DNA分型检测的年龄分布模式不尽相同有关,但两种检测方法的结果提示这两个年龄段妇女HPV感染率高、E6/E7阳性率高。这可能与这两个年龄段妇女体内激素水平低、波动大,易引起免疫功能失调导致病毒的再活动有关^[12]。该年龄人群普遍已绝经,宫颈上皮萎缩后以中层及外底层细胞为主,细胞学检查的假阳性率比较高。因此单独进行HPV筛查在这两个年龄段有着重要的临床意义。

此外,值得一提的是,各年龄段间两两比较,两种检测方法中,55~<65岁年龄段与≥65岁年龄段间高危型阳性率差异均无统计学意义($P>0.05$)。这就提示我们,在后续的研究中可以将这两个年龄段合并研究。

HPV E6/E7蛋白的表达是HPV病毒活跃的信号。与HPV DNA基因分型检测相比,E6/E7 mRNA检测能有效剔除HPV一过性感染造成的假阳性结果,提高筛查效率,减少过度诊断和治疗。但是,目前HPV E6/E7 mRNA检测阳性只是一个定性结果,国内外对其定量检测的最佳诊断临界点尚存在一定争议^[13],其与宫颈病变严重程度的相关性也仍需深入探讨。本次研究只对两种筛查方法进行了简单对比,二者的临床应用价值的比较还有待进一步加强。

[参考文献]

[1] VERHOEF V M, BOSGRAAF R P, KEMENADE F J, et al. Triage by methylation-maker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervico-vaginal specimens (PROHTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(3):315-322

[2] LIU Q, LIN X, LIN L, et al. A comparative study of three different nucleic acid amplification techniques combined with microchip electrophoresis for HPV16 E6/E7 mRNA

detection[J]. *Analyst*, 2015, 140(19):6736-6741

- [3] 左欣,李伟玲,朱红娣,等.高危型HPV分型在宫颈细胞学阴性者中宫颈病变的诊断价值[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*,2016,36(12):1528-1530
- [4] LI L K, DAI M, CLIFFORD G M, et al. Human papillomavirus infection in Shenyang City, People's Republic of China: a population-based study [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(11):1593-1597
- [5] WU R F, DAI M, QIAO Y L, et al. Human papillomavirus infection in women in Shenzhen City, People's Republic of China, a population typical of recent Chinese urbanisation [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(6):1306-1311
- [6] MALISIC E, BROTTO K, KRIVOKUCA A, et al. Overall human papillomavirus and types 16/18 prevalence in women with normal cervical cytology in Serbia: is it time for human papillomavirus testing and/or vaccination? [J]. *J BUON*, 2014, 19(4):937-939
- [7] DURZYNSKA J, LESNIEWICZ K, POREBA E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017, 772(1):36-50
- [8] REN C C, ZHU Y H, YANG L, et al. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA assay for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among women with ASCUS Papanicolaou smears [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 297(2):425-432
- [9] 张丽娜,周蓓蓓,来艺青,等.高危型HPVE6/E7mRNA检测在HPV DNA阳性患者中的临床意义[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*,2018,38(10):1401-1403
- [10] 夏艳,金志军,倪云翔,等.上海市人乳头瘤病毒感染及病毒分型与宫颈病变的探讨[J].*第二军医大学学报*,2017,38(12):1526-1531
- [11] YE J, CHENG X, CHEN X, et al. Prevalence and risk profile of cervical human papillomavirus infection in Zhejiang Province, southeast China: a population-based study [J]. *Virology*, 2010, 7(66):66
- [12] ALTHOFF K N, PAUL P, BURKE A E, et al. Correlates of cervico vaginal human papillomavirus detection in perimenopausal women [J]. *J Womens Health (Larchmt)*, 2009, 18(9):1341-1346
- [13] 顾青,赵艳.子宫颈HPV E6, E7mRNA检测的临床诊断及预后评估价值研究进展[J].*诊断学理论与实践*, 2019, 18(2):228-231

[收稿日期] 2019-12-21