

液基细胞学、HPV 检测及 *hTERT*、*C-myc* 基因检测在宫颈癌筛查中的临床应用

Clinical Application of ThinPrep Cytology Test, Human Papillomavirus DNA and *hTERT* and *C-myc* Gene Detection to Cervical Cancer Screening
DONG You-wei, LOU Ge

董有伟, 娄 阁
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘 要: [目的] 研究液基细胞学(TCT)、人乳头瘤病毒(HPV)检测及人类染色体端粒酶基因(*hTERT*)、*C-myc* 基因检测在宫颈癌筛查中的临床应用价值。[方法] 对 1 000 例患者分别进行 TCT、HPV-DNA 检测、荧光原位杂交(FISH)技术检测 *hTERT*、*C-myc* 基因, 对以上任一结果阳性者进行阴道镜下宫颈活检术, 以病理学结果为金标准, 评价上述方法的敏感度及特异性。[结果] 1 000 例患者中, TCT 异常者 304 例(30.4%); HPV 阳性者 273 例(27.3%); *hTERT* 阳性者 90 例(9.0%); *C-myc* 阳性者 59 例(5.9%)。467 例患者行阴道镜下宫颈活检术, 结果宫颈慢性炎者 244 例, 宫颈病变者 223 例, 其中宫颈上皮内瘤变 CIN I 73 例(15.6%), CIN II 87 例(18.6%), CIN III 53 例(11.3%), 宫颈鳞状细胞癌 10 例(2.1%)。*hTERT* 基因在正常宫颈细胞、CIN I、CIN II、CIN III 和宫颈癌中的阳性表达率分别为 4.1%、16.4%、36.8%、50.9% 和 90%。*C-myc* 在正常宫颈、CIN I、CIN II、CIN III 和宫颈癌中的阳性表达率分别为 1.6%、9.6%、21.8%、37.7% 和 90%。[结论] 联合筛查方法优于单一检测方法, TCT+*hTERT* 联合检测宫颈癌的效果最好, *hTERT*、*C-myc* 基因异常扩增率随宫颈病变程度的加重而增加, 与宫颈癌发生发展密切相关。

关键词: 宫颈癌; 染色体端粒酶; 人乳头瘤病毒; 荧光原位杂交; *C-myc* 基因

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)07-0547-04

doi:10.11735/j.issn1004-0242.2013.07.A007

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 其发病率居女性恶性肿瘤第二位, 仅次于乳腺癌。随着宫颈癌病因学的研究发展, 筛查是预防宫颈癌的主要手段。近年来, 我国广泛开展了宫颈癌的筛查工作, 使宫颈癌死亡率有所下降, 但每年仍有 13.7 万新发病例, 且发病率呈年轻化趋势^[1], 如何提高筛查的敏感度及特异性, 以达到早发现、早诊断、早治疗的目的, 一直是临床医生关注的焦点。我国宫颈癌筛查主要采用薄层液基细胞学检查(TCT)以及 HPV-DNA 检测方法, 并以病理学为最终诊断标准。近年来不少学者开始关注宫颈癌在基因水平的表达, 研究证明宫颈癌的发生及发展常常伴有 3 号染色体的扩增, 在此区域有人染色体端粒酶 RNA 基因 (human telomerase gene, *hTERT*) 异常表达^[2]。*hTERT* 基因位于 3 号染色体长臂 26.3 (3q26.3), 该基因的扩增可阻止

细胞凋亡, 从而导致肿瘤发生。*C-myc* 基因是 *myc* 基因家族的重要成员之一, 位于人类染色体 8q24, 是具有多功能的基因, 属核内原癌基因, 参与细胞分化和恶性增殖^[3], 研究表明 *C-myc* 基因表达异常是多种细胞凋亡的主要诱因。王志芳等^[4]证实 *C-myc* 基因在宫颈癌中高表达, 与宫颈癌的发生发展密切相关。本实验主要探讨 TCT、HPV 检测、荧光原位杂交法(FISH 法)检测 *hTERT*、*C-myc* 基因在宫颈癌筛查中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 9 月至 2012 年 1 月在哈尔滨医科大学附属肿瘤医院妇科门诊就诊的患者 1 000 例, 年龄 21~69 岁, 有性生活史, 无宫颈手术史及子宫切除史, 无妇科肿瘤病史及家族史, 非月经期、妊娠期

收稿日期: 2012-09-12; 修回日期: 2012-12-19

基金项目: 中华医学会分子生物学临床应用研究专项资金(CAMB022010)

通讯作者: 娄阁, E-mail: dr-louge@163.com

及哺乳期,就诊前 24h 内无性生活、无阴道冲洗及阴道上药,入选者均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 取材方法

用无菌棉球擦去宫颈表面分泌物,宫颈毛刷于宫颈鳞—柱上皮交界处顺时针旋转 3~5 周刷取宫颈脱落细胞,然后将细胞冲洗到装有特殊保存液的小瓶中 4℃ 保存,保存时间不超过 10d,同一份样本分别进行 TCT、HPV 检测、FISH 法检测 *hTERT* 及 *C-myc* 基因。

1.2.2 TCT 检测

采用英硕力公司新柏氏膜式液基薄层细胞制片技术,制成直径约 2mm 的薄层细胞涂片,95%乙醇固定,巴氏染色,光学显微镜下读片,细胞学检查结果采用 2001 年国际癌症协会推荐的 TBS^[5](the bestheda system)分类标准报告系统进行诊断。

1.2.3 HPV 分型检测

采用凯普公司生产的 HPV 核酸扩增分型检测系统进行检测,HPV-DNA 分型包括 15 种高危型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68)及 6 种低危型(6、11、42、43、44、CP8304)。

1.2.4 FISH 法检测 *hTERT*、*C-myc* 基因

FISH 所用探针购自北京金菩嘉医疗科技有限公司,应用荧光原位杂交(FISH)技术,将 TCT 剩余标本按照 FISH 操作步骤依次进行,具体步骤如下:①制片:将 TCT 剩余标本液 10ml 装入 15ml 离心管中,离心,去上清,加胶原酶 B 3ml,37℃ 水浴 30min,离心,去上清,加去离子水 5ml,37℃ 水浴 30min,离心,去上清,加固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)5ml,离心,重复固定 2 次,加固定液(甲醇:冰乙酸=1:1)2ml,离心去上清后,将细胞滴于干净玻片上室温过夜,每张玻片上均匀滴上 2 个细胞群;②变性杂交:细胞涂片依次经 2×SSC(pH7.0)5min、0.1M HCl 10min、0.01M HCl 和胃酶混合液中 37℃ 水浴 17min、2×SSC(pH7.0)5min、再依次放入 75%、85%、100%乙醇中各 3min,自然干片后,在避光环境中将探针混合液 10μl(8μl 缓冲液、2μl 探针)滴于玻片杂交区,加盖玻片封片,置于荧光原位杂交仪上过夜杂交;③洗片:次日移去盖玻片,将杂交后玻璃涂片依次经 2×SSC 溶液 5min、2×SSC/NP40 混合液 4min、75%乙醇 3min,玻片干燥后加适量 DAPI 复染,盖玻片封片,

于暗盒中复染 15~20min;④结果观察:荧光显微镜下观察间期细胞荧光杂交信号,利用 FISH 分析软件进行图像分析,选择细胞核形态完整、杂交信号强的细胞计数 100 个。

hTERT 阳性判断标准:细胞核内出现红色信号>2 个,且绿色信号≥2 个为阳性,表示 *hTERT* 有扩增;*C-myc* 阳性判断标准:红色信号>2 个即为阳性。

1.2.5 阴道镜检查

阴道镜检查前 3d 禁止性交及妇科检查,急性宫颈炎及阴道炎先行适当治疗,采用 Olympus 光学阴道镜将窥器暴露于宫颈,用干棉球轻轻拭去宫颈表面的黏液及分泌物,将阴道镜移至距阴道口约 20cm 处,使光源与窥器方向一致,调节焦距至图像最清晰位置,用 3%醋酸棉球浸润宫颈 1min,观察鳞状细胞、柱状细胞及转化区的颜色、形态及血管,然后进行碘实验,阴道镜下可见醋白上皮、点状血管、异型血管及碘实验阴性者为阴道镜检查阳性,在阳性部位取活检。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,分别计算各检查方法单独及联合检测宫颈疾病的敏感度、特异性,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TCT 检测结果

1 000 例患者中,TCT 异常者 304 例,占 30.4%。其中意义不明的非典型鳞状上皮细胞(ASCUS)176 例,占 17.6%;低度鳞状上皮内病变(LSIL)101 例,占 10.1%;高度鳞状上皮内病变(HSIL)27 例,占 2.7%。

2.2 HPV 检测结果

1 000 例患者中,HPV 阳性者 273 例,占 27.3%。其中低危型 HPV 感染 11 例,占 1.1%;高危型 HPV 感染 257 例,占 25.7%;高低危 HPV 混合感染者 5 例,占 0.5%;单一型别感染者 200 例,占 20.0%;两种及以上型别感染者 73 例,占 7.3%。

2.3 FISH 检测结果

1 000 例患者中,*hTERT* 阳性扩增者 90 例,占 9.0%;*C-myc* 阳性扩增者 59 例,占 5.9%。

2.4 阴道镜下宫颈活检病理结果

对以上 3 种方法中任一结果阳性者行阴道镜下

宫颈活检术,共 467 例,其中宫颈慢性炎者 244 例,占 24.4%;有病变者 223 例,占 22.3%,其中宫颈上皮内瘤变 CIN I 73 例,占 7.3%,CIN II 87 例,占 8.7%,CIN III 53 例,占 5.3%,宫颈鳞状细胞癌(SCC) 10 例,占 1.0%。

各筛查方法的评价指标见 Table 1,联合检查方案优于单一检查,以 TCT+hTERTC 联合检测效果最好。随着宫颈病变程度的加重,hTERTC、C-myc 基因表达阳性率呈上升趋势,且 hTERTC、C-myc 基因的表达在正常宫颈细胞、CIN I、CIN II、CIN III 及宫颈癌中各组间比较均有统计学差异($P<0.05$)(Table 2)。

3 讨论

宫颈癌是严重威胁女性健康的妇科恶性肿瘤之一。近年来,宫颈癌发病率呈上升趋势且发病年龄趋于年轻化。据统计,每年约有 50 万的宫颈癌新发病例,其中 80%的病例来自发展中国家^[6],宫颈癌的

发生和发展是一个多基因、多因素、由癌前病变发展为浸润性宫颈癌的持续过程。因此,早期发现宫颈癌及癌前病变成为影响宫颈癌预防及早期治疗的关键环节。

在美国,已将 TCT 联合 HPV-DNA 检测应用于 30 岁以上妇女的宫颈癌筛查,这种联合方案提高了筛查宫颈癌及癌前病变的敏感性,并使阴性预测达到 99.9%~100%。目前,我国的宫颈癌筛查主要采用“三阶梯”筛查方法,即“宫颈细胞学—阴道镜—宫颈活检”,初筛还是以 TCT+HPV 联合检测方案为主。本实验结果显示,联合筛查方案优于单一方法的筛查,联合方案中以 TCT+hTERTC+C-myc 联合筛查效果最好,但从经济学角度考虑,FISH 方法检测费用相当于 TCT+HPV 联合检测费用的 5~6 倍,普及起来可能存在一定困难。因此,综合经济因素考虑,以 TCT+hTERTC 联合方法筛查宫颈癌的效果最佳,这与刚小青等^[7]研究认为的以 HPV+hTERTC 联合筛查宫颈癌效果最好不一致。目前国内采用的 TCT+HPV 联合方案筛查宫颈癌虽然也有较高的敏感度,但特

Table 1 Indicators of all screening tests

Screening test	Sensitivity(%)	Specificity(%)	Rate of missed diagnosis (%)	Rate of mistake diagnosis(%)	Youden index
TCT	80.7(180/223)	49.2(120/244)	19.3(43/223)	50.8(124/244)	0.299
HPV	71.3(159/223)	53.3(130/244)	28.7(64/223)	46.7(114/244)	0.246
hTERTC	35.9(80/223)	95.9(234/244)	64.1(143/223)	4.1(10/244)	0.318
C-myc	24.7(55/223)	98.4(240/244)	75.3(168/223)	1.6(4/244)	0.231
TCT+HPV(positive result in any test)	87.9(196/223)	18.0(44/244)	12.1(27/223)	82.0(200/244)	0.059
TCT+hTERTC(positive result in any test)	93.3(208/223)	45.9(112/244)	6.7(15/223)	54.1(132/244)	0.392
TCT+C-myc(positive result in any test))	87.9(196/223)	47.5(116/244)	12.1(27/223)	52.5(128/244)	0.354
HPV+hTERTC(positive result in any test)	87.9(196/223)	49.2(120/244)	12.1(27/223)	50.8(124/244)	0.371
HPV+C-myc(positive result in any test)	78.9(176/223)	51.6(126/244)	21.1(47/223)	48.4(118/244)	0.305
hTERTC+C-myc(positive result in any test)	41.7(93/223)	94.3(230/244)	58.3(130/223)	5.7(14/244)	0.360
TCT+HPV+hTERTC(positive result in any test)	98.7(220/223)	14.8(36/244)	1.3(3/223)	85.2(208/244)	0.135
TCT+HPV+C-myc(positive result in any test)	91.9(205/223)	16.4(40/244)	8.1(18/223)	83.6(204/244)	0.083
TCT+hTERTC+C-myc(positive result in any test)	96.4(215/223)	44.3(108/244)	3.6(8/223)	55.7(136/244)	0.407
HPV+hTERTC+C-myc(positive result in any test)	89.7(200/223)	47.5(116/244)	10.3(23/223)	52.5(128/244)	0.372
TCT+HPV+hTERTC+C-myc(positive result in any test)	100(223/223)	13.1(32/244)	0(0/223)	86.9(212/244)	0.131

Table 2 Expression of hTERTC, C-myc in cervical cancer and precancerous lesion

Pathological classification	N	Positive hTERTC		Positive C-myc	
		n	%	n	%
CIN I	73	12	16.4	7	9.6
CIN II	87	32	36.8	19	21.8
CIN III	53	27	50.9	20	37.7
SCC	10	9	90.0	9	90.0
Normal	244	10	4.1	4	1.6

Note: positive threshold of hTERTC, C-myc is 5%.

异性较低(18%),分析其原因可能有两个因素:①大多数妇女的 HPV 感染为一过性的,通常在 8~15 个月转为阴性,只有长期持续的高危型 HPV 感染才是宫颈癌发生的必要条件;②由于慢性炎症刺激或 HPV 感染等因素导致 TCT 标本中无明确意义的 ASCUS 检出率较高。

大量研究已证实 FISH 技术能定量检测 *hTERT* 基因,并能快速鉴别细胞癌变,可作为宫颈癌的预测和评估指标^[8],还可预测肿瘤预后,尤其是预测快速进展高危型宫颈癌^[9],可弥补宫颈肿瘤细胞学检查和 HPV 检测的不足^[10]。本实验结果显示,*hTERT* 基因在宫颈正常细胞、CIN I、CIN II、CIN III 以及宫颈癌中阳性表达率分别为 4.1%、16.4%、36.8%、50.9%和 90%。*C-myc* 基因在宫颈正常细胞、CIN I、CIN II、CIN III 以及宫颈癌中阳性表达率分别为 1.6%、9.6%、21.8%、37.7%和 90%。随着宫颈病变程度的加重,此两种基因的阳性表达率逐渐上升($P < 0.05$),提示这两种基因的异常表达可能是宫颈癌及癌前病变的早期事件,与宫颈癌的发生发展密切相关。在 TCT 检测样本中,*hTERT* 基因及 *C-myc* 基因在正常宫颈细胞、ASCUS、LSIL、HSIL 及 SCC 中的阳性表达率也呈逐级递增的趋势,各组间比较除 ASCUS 与 LSIL 组比较无统计学意义外(*hTERT*: $P=0.683$; *C-myc*: $P=0.850$),其他组间差异均有统计学意义,提示这两种基因可能促进宫颈细胞由非典型异常向宫颈癌的转变。王红等^[11]认为,*hTERT* 基因在宫颈癌及不同级别的 CIN 中比 HPV 更具有特异性表达。本实验中,HPV 感染阳性者 273 例,其中 *hTERT* 阳性表达 43 例,*C-myc* 阳性表达 38 例,并且这些患者均为宫颈癌及不同级别的 CIN,而 HPV 阴性患者中,*hTERT* 基因阳性 47 例(37 例有宫颈病变),*C-myc* 基因阳性 21 例(17 例有宫颈病变),更证实了 *hTERT*、*C-myc* 在宫颈癌及癌前病变中的表达均比 HPV 具有更高的特异性,因此,利用 FISH 技术检测 *hTERT* 基因的扩增,可作为宫颈癌诊断和预后的评价指标,但 *C-myc* 基因检测能否用于宫颈癌的筛查,还需更多的实验验证。

综上所述,在宫颈癌的筛查方法中,联合筛查方案优于单一方法筛查,FISH 技术作为新的检测方法,具有独特优势,为宫颈癌的发生机制提供了基因水平的依据,但由于成本较高,普及起来可能存在一

定困难,因此我们必须考虑地区及患者个人的经济水平,选择合适的筛查方案。

参考文献:

- [1] Ju XZ, Yang JM, Zhou XY, et al. EMMPRIN expression as a prognostic factor in radiotherapy of cervical cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (2):494-501.
- [2] Caraway NP, Khanna A, Dawlett M, et al. Gain of the 3q26 region in cervicovaginal liquid-based pap preparations is associated with squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2008, 110 (1):37-42.
- [3] Utikal J, Leiter U, Udart M, et al. Expression of c-myc and bcl-2 in primary and advanced cutaneous melanoma [J]. Cancer Invest, 2002, 20 (7-8):914-921.
- [4] Wang ZF, Xu Y, Wan YZ. Clinical significance of C-myc and PTEN protein expression in cervical carcinoma [J]. Journal of Liaoning Medical University, 2011, 32 (4):296-299. [王志芳, 徐宇, 万义增. C-myc 和 PTEN 蛋白在宫颈癌中的表达 [J]. 辽宁医学院学报, 2011, 32 (4):296-299.]
- [5] Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting result of cervical cytology [J]. JAMA, 2002, 287 (16):2114-2119.
- [6] Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M, et al. European Society for Medical Oncology: clinical practice guidelines for prognosis, treatment and follow-up of uterine cervical neoplasms [J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2011, 38 (1):82-84. [Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M, et al. 欧洲肿瘤内科协会对宫颈癌的诊断、治疗和随访所制定的临床实践指南 [J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38 (1):82-84.]
- [7] Gang XQ, Zhang JX. The application value of thinprep cytology test, human papillomavirus DNA, human telomerase RNA component gene detection in cervical cancer screening [J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2011, 38 (6):588-604. [刚小青, 张菊新. 液基细胞学、HPV 检测及 hTERT 基因检测在宫颈癌筛查中的应用价值 [J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38 (6):588-604.]
- [8] Li XJ, He GL, Cai JH, et al. Detection the human telomerase gene TERC in cervical carcinoma and CIN for FISH [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2009, 24 (20):2845-2848. [李晓娟, 贺国丽, 蔡俊红, 等. FISH 技术检测宫颈癌和宫颈上皮内瘤样病变的 TERC 基因 [J]. 中国妇幼保健, 2009, 24 (20):2845-2848.]
- [9] Ramsaroop R, Oei P, Ng D, et al. Cervical intraepithelial neoplasia and aneusomy of TERC: assessment of liquid-based cytological preparations [J]. Diagn Cytopathol, 2009, 37 (6):411-415.
- [10] Yu L, Wang SY, Jia CW, et al. Clinical significance of the human telomerase Gene abnormal amplification in cytologic specimens of cervix [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2009, 17 (4):28-30. [余兰, 王树玉, 贾婵维, 等. hTERT 基因异常扩增在宫颈病变中的临床意义 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17 (4):28-30.]
- [11] Wang H, Zhang HK, Xie JS, et al. Expression of hTERT gene in cervical cancer and precancerous lesion tissue samples and its clinical significance [J]. China Cancer, 2011, 20 (8):611-614. [王红, 张华坤, 谢建生, 等. 宫颈癌及癌前病变组织 hTERT 基因表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤, 2011, 20 (8):611-614.]