

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.018

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.018>

宫颈液基细胞学联合高危型 HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变筛查中的应用

林茂华¹, 谢芳², 毛瑛玉¹, 吴秋珍¹, 翁秀清¹, 陈灼英²

(福建医科大学附属闽东医院 1. 病理科; 2. 妇产科, 福建 福安 355000)

[摘要] 目的: 探讨宫颈液基细胞学(thinprep cytologic test, TCT)联合高危型HPV E6/E7 mRNA检测在宫颈病变筛查中的应用价值。方法: 选择2016年8月至2018年10月福建医科大学附属闽东医院及分院妇科同时行TCT及高危型HPV E6/E7 mRNA检测的12 679例患者, 结合组织病理学活检诊断为上皮内病变或癌的病例进行数据分析。结果: 12 679例患者中, HPV E6/E7 mRNA阳性者1 808例, 阳性率14.26%, TCT异常者1 054例。在组织病理学活检异常病例中, HPV检出率92.7%, TCT及HPV两者任意阳性占98.2%, 16型HPV阳性占高危型HPV阳性18.18%。在腺上皮异常病例中, 18/45型HPV阳性占48.28%。联合检测的敏感性98.2%, 特异性91.5%。结论: 高危型HPV E6/E7 mRNA检测在宫颈上皮内病变及癌中具有较高的敏感性, 联合TCT检测可提高宫颈病变的检出率。

[关键词] 宫颈TCT; 高危型HPV E6/E7 mRNA; 宫颈上皮内病变

Application of cervical thinprep cytologic test combined with high-risk HPV E6/E7 mRNA detection in the screening of cervical lesions

LIN Maohua¹, XIE Fang², MAO Yingyu¹, WU Qiuqun¹, WENG Xiuqing¹, CHEN Zhuoying²

(1. Department of Pathology; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Mindong Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fu'an Fujian 355000, China)

Abstract **Objective:** To study the clinical value of thinprep cytologic test (TCT) combined with high-risk HPV E6/E7 mRNA detection in the screening of cervical lesions. **Methods:** From August 2016 to October 2018, a total of 12 679 cases who had received TCT and high-risk HPV E6/E7 mRNA test at Mindong Hospital Affiliated to Fujian Medical University and the branch hospital were selected. Statistical analysis of cases which were diagnosed as cervical intraepithelial lesions or cancer by histopathological biopsy. **Results:** Among 12 679 patients, 1 808 cases were found HPV E6/E7 mRNA positive. The positive rate was 14.26%. A total of 1 054 cases got abnormal TCT results. In cases diagnosed with cervical intraepithelial lesions or cancer by histological pathology, the detection rate of HPV was 92.7%; 98.2% were positive for either TCT or HPV; HPV16 accounted for 18.18% of high-risk

收稿日期 (Date of reception): 2019-02-14

通信作者 (Corresponding author): 林茂华, Email: lmh5180@163.com

基金项目 (Foundation item): 宁德市科技项目 (20140047)。This work was supported by Ningde Science Foundation, China (20140047).

HPV. In abnormal cases of glandular epithelium, 48.28% were positive for 18/45 HPV. Sensitivity and specificity of combined testing were 98.2% and 91.5%. **Conclusion:** The sensitivity of high-risk HPV E6/E7 mRNA test was higher in cervical lesions and cancer. Combined high-risk HPV E6/E7 mRNA test with TCT test could enhance the detection rate of cervical lesions.

Keywords cervical thinprep cytologic test; high-risk HPV E6/E7 mRNA; cervical intraepithelial lesion

宫颈癌及癌前病变筛查是目前整个妇科肿瘤领域的热点。根据2014年WHO^[1]发布的数字, 2012年全球新发现宫颈癌病例52万, 中国占13.5万~13.8万, 占全球的1/4; 死亡病例26万, 90%来自中低收入国家。目前宫颈癌的筛查有宫颈液基细胞学(thinprep cytologic test, TCT), HPV DNA, HPV E6/E7 mRNA等多种检测方法, 这些方法各有优缺点。TCT的特异性较强, 敏感性较差; HPV检测是过去十年中出现新技术最多, 种类最多, 临床争议也最多的检测方法。Aptima HPV E6/E7 mRNA检测于2011年得到美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准, 2012年底获得批准用于检测HPV 16, 18和/或45型。本研究旨在分析联合宫颈TCT和HPV E6/E7 mRNA检测对宫颈癌及癌前病变筛查的意义。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2016至2018年宁德市闽东医院、周宁县医院、寿宁县医院和柘荣县医院妇科门诊及住院行宫颈TCT及HPV E6/E7 mRNA检测的12 679例患者, 年龄17~93(中位41)岁。根据2012年美国阴道镜检查学和宫颈病理学会(American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, ASCCP)指南^[2], 阴道镜检查病理活检标准为: HPV16型或HPV18/45型结果阳性, 不论当时细胞学结果如何, 行阴道镜检查; 细胞学异常结果高于或等于无明确意义非典型鳞状细胞(atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS), 并且HPV结果阳性(但非16和18型)时, 行阴道镜检查。

1.2 样本采集与标本制备

1.2.1 TCT 标本

在阴道镜下暴露宫颈, 拭去表面黏液, 用宫颈刷伸入宫颈, 在鳞柱状交界处顺时针旋转3~5圈, 然后将刷子置于装有保存液的固定瓶中涮洗, 常温保存。TCT刷检应注意: 一般在月经结束3~7 d检查, 检查前2 d夫妻不同房, 标本采集前3 d禁止

阴道冲洗或阴道用药, 如有妇科炎症要在治愈后行TCT检查, 以免影响检测结果。采用美国英硕力Thinprep 2000制片系统制成液基薄层涂片, 95%乙醇固定, 巴氏染色。由3位高年资病理医师阅片, 按国际癌症协会推荐TBS(2014)分类标准诊断。

1.2.2 HPV E6/E7 mRNA 检测

使用Aptima HPV E6/E7 mRNA PANTHER系统自动检测平台。共有两种检测试剂盒, 主要针对14种高危型HPV亚型(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)。检测样本为TCT剩下样本, 取样前混匀Thinprep细胞保存液瓶, 开盖取出1 mL到相应的试样转移管(STU管)中, 按说明书操作。根据分析物信号与阈值比(S/CO)判读进行结果分析, 分为hr-HPV(+)及hr-HPV(-), 当检测结果无效时, 需重新检测, 检测结果阳性时行HPV16, 18/45分型, 分型只区分16, 18/45, 不区分18与45及其他具体型别。

1.2.3 宫颈病理学活检

行阴道镜下3, 6, 9, 12点活检, 如细胞学为AGC则加宫颈搔刮。以宫颈活检结果为金标准。活检结果分为: 正常或炎症, 鳞状上皮低级别上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL), 鳞状上皮高级别上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL), 鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC), 腺上皮高级别上皮内病变[原位腺癌(adenocarcinoma in situ, AIS)], 腺癌等。

1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析, 组间比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCT 检查结果

12 679例中35例(0.28%)诊断为AGC, 61例(0.48%)诊断为非典型鳞状细胞(atypical squamous cells, ASC), 59例(0.47%)诊断为无法排除HSIL ASC (ASC-H), 57例(0.45%)诊断为无法排除LSIL ASC (ACS-L), 493例(3.89%)诊断为ASCUS,

164例(1.29%)诊断为LSIL, 176例(1.39%)诊断为HSIL, 9例诊断为SCC或疑癌。阳性病例总计1054例, 占总数的8.31%。

2.2 HPV E6/E7 mRNA 检测结果

12 679例中, 15例由于标本出血或黏液及炎细胞多而上皮细胞量极少, 检测结果不理想或无效, 于1个月后重新取样行Aptima检测。1 808例(14.26%)高危型HPV阳性。HPV分型检测结果: 16型阳性272例, 占高危型HPV阳性数15.04%; 18/45型阳性数145例, 占8.02%; 16型及18/45型均阳性数6例, 占0.33%; 16型及18/45型均阴性数1 385例, 占76.60%(表1)。

2.3 组织病理学结果

共922例病理活检诊断为宫颈上皮内病变及癌, 其中LSIL 441例, HSIL 414例, AIS 24例, 腺癌7例, SCC 36例。宫颈慢性炎症、糜烂、息肉542例。

2.4 宫颈上皮内病变 HPV E6/E7 mRNA 结果

将以上宫颈病变的病例进行HPV E6/E7 mRNA检测结果分析见表2。LSIL中16型HPV阳性占高危型HPV阳性18.18%; HSIL占比45.59%; SCC占比57.57%; 随着宫颈病变级别的提高, HPV16感染率也相应提高。对LSIL, HSIL和SCC分组进行两两比较, LSIL和HSIL差异具有统计学意义($\chi^2=70.06, P<0.05$), 而HSIL与SCC差异无统计学

意义($\chi^2=2.52, P>0.05$)。提示HPV16持续感染与宫颈HSIL及SCC的进展风险密切相关。在宫颈腺上皮病变中, HPV18/45感染最为常见, 占比达48.28%, HPV16感染次之占27.59%, 其余高危型HPV感染占24.14%。

2.5 TCT 和 HPV E6/E7 mRNA 单独和联合筛查结果比较

表3示所有诊断为鳞状上皮癌前病变之前的TCT和HPV E6/E7 mRNA联合筛查结果, 包括LSIL和HSIL。根据组织学特征对其总体和分布情况进行分析。在LSIL组441例中HPV检测阳性396例, 检出率89.80%; TCT阳性405例, 检出率91.84%; HPV检测及TCT检测两者任意一个阳性的病例数为432例, 占比97.96%。高级别上皮内病变414例中HPV检测阳性398例, 检出率96.14%; TCT阳性388例, 检出率93.72%。HPV阳性率随病变严重程度增加而增加, 在上皮内病变的总检出率达92.7%, 具有极高的敏感性。在宫颈活检炎性病变或正常的542例中, TCT探测未见恶性细胞或上皮内病变细胞388例, TCT阳性154例, TCT特异性71.6%; HPV阴性302例, HPV阳性240例, HPV特异性55.7%; 活检所有病例中HPV及TCT均阴性177例, 活检诊断上皮内病变15例, 联合检测特异性达91.5%。TCT或HPV任意一个阳性在宫颈上皮内病变中总计达98.2%, 高于单一HPV检测的92.9%及单一TCT检测的92.7%。

表1 Aplitima HPV项目检测跟踪表

Table 1 Aplitima HPV detection tracking table

检测项目	n	阳性/[例(%)]	16型阳性/[例(%)]	18/45阳性/[例(%)]	16, 18/45均阳性/[例(%)]	16, 18/45均阴性/[例(%)]
高危型HPV检测	12 679	1 808 (14.26)	—	—	—	—
16, 18/45型HPV分型检测	1 808	—	272 (15.04)	145 (8.02)	6 (0.33)	1 385 (76.60)

表2 Aplitima HPV检测宫颈病变分析表

Table 2 Analysis table of Aplitima HPV detection of cervical lesion

分类	高危型HPV检测		16, 18/45型HPV分型检测/[例(%)]		
	阳性例数	16型阳性	18/45阳性	16, 18/45均阳性	16, 18/45均阴性
CIN1	396	72 (18.18)	38 (9.60)	1 (0.25)	285 (71.97)
CIN2/3	398	181 (45.48)	10 (2.51)	3 (0.75)	204 (51.26)
AIS/腺癌	29	8 (27.59)	14 (48.28)	0 (0)	7 (24.14)
鳞癌	33	19 (57.58)	4 (12.12)	1 (3.03)	9 (27.27)
总计	856	280 (32.71)	66 (7.71)	5 (0.58)	505 (59.00)

表3 诊断为宫颈上皮内病变HPV E6/E7 mRNA和细胞学联合筛查结果

Table 3 Results of combined HPV E6/E7 mRNA and cervical liquid-based cytology

组织病理学	n	HPV E6/E7 mRNA 检测(+)/[例(%)]	TCT(+)/ [例(%)]	任意(+)/ [例(%)]	HPV(+), TCT(+)/[例(%)]	HPV(+), TCT(-)/ [例(%)]	HPV(-), TCT(+)/ [例(%)]	HPV(-), TCT(-)/ [例(%)]
LSIL	441	396 (89.8)	405 (91.8)	432 (98.0)	369 (83.7)	27 (6.1)	36 (8.2)	9 (2.0)
HSIL	414	398 (96.1)	388 (93.7)	408 (98.6)	378 (91.3)	20 (4.8)	10 (2.4)	6 (1.4)
总计	855	794 (92.9)	793 (92.7)	840 (98.2)	747 (87.4)	47 (5.5)	46 (5.4)	15 (1.8)

3 讨论

HPV是一个大家族, 有100多种亚型, 现已证实有30多种亚型可导致人体患病, WHO确认的与子宫颈癌相关的高危型HPV有14种: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68。HPV基因组的结构中早期编码区E6, E7基因是病毒癌基因, 与宫颈上皮细胞基因整合后, 可编码使肿瘤抑制基因p53和视网膜母细胞瘤基因(RB)封闭和失活的蛋白, 并可活化细胞周期蛋白E (cyclin E)导致上皮细胞失控性增生, 这些是高危型HPV导致宫颈上皮内瘤变及宫颈癌主要原因^[3]。HPV初始感染E6/E7 mRNA不表达或低表达, 高达90%的感染不用任何干预可被机体免疫力清除, 不会导致细胞高级别上皮内病变, 还有5%~10%机体清除不掉, 持续1年以上, 成为所谓的持续感染状态, 这当中不到1%会发展成宫颈癌^[4]。Aptima HPV是基于E6/E7 mRNA的新一代HPV检测技术, 其检测平台是panther系统, 样本类型是Thinprep细胞保存液, 只要一次取样进行TCT分析, 剩下样本行HPV mRNA分析, 检测方法是转录介导等温扩增技术(transcription mediated amplification, TMA), 包括两种检测试剂盒: Aptima HPV(14种高危亚型)和HPV16, 18/45分型检测。

本研究结果显示: 在宫颈上皮内病变中HPV E6/E7 mRNA的检出率为92.9%, 与Nolte等^[5]报道的细胞学Aptima试验无上皮内病变或恶性病变(negative for intraepithelial lesion or malignancy, NILM)阳性率(14.5%), ASCUS阳性率(52.6%)及上皮内病变阳性率(86.7%)相比较, 本研究在上皮内病变组的检出率更高。因为本研究是以病理活检为最终标准, 相比细胞学结果为参照更为精确。

2012年美国癌症学会统计资料^[2]显示: HPV16型(HPV16)是最具致癌性的HPV基因型,

占所有宫颈癌的55%~60%。HPV18是第2个最具致癌性的HPV基因型, 占宫颈癌的10%~15%, 特别在腺癌当中。其他约10种HPV基因型导致剩余的25%~35%的宫颈癌。HPV16持续感染强烈预测(20%~30%风险)在以后几年内发展为CIN3或更严重病变^[6]。国内数据显示: HPV分布具有地域性。吕秀芳等^[7]的结果显示: 在SCC中, 最常见的HPV型依次为HPV16 (62.50%)、HPV58 (27.50%)及HPV33 (12.50%), 但仅HPV16感染与病变的严重程度具有相关性, 且在HSIL, SCC中感染率最高。因此, HPV16致癌能力最强, 是导致SCC的最主要类型。本研究中HPV16在LSIL, HSIL和SCC中的表达逐步升高, 提示HPV16持续感染与宫颈鳞状上皮内病变(squamous intraepithelial lesion, SIL)的进展风险密切相关。在宫颈腺上皮病变中HPV18/45占比达48.28%, 说明HPV18/45与腺上皮病变密切相关。本组腺癌病例中有1例高危型HPV阴性, 病理活检结果为宫颈透明细胞腺癌。在包括胃型、透明细胞、中肾管及子宫内膜样腺癌在内的宫颈HPV阴性的腺癌中, 这几型是与HPV无关的常见亚型^[8]。本研究中收集腺癌合并HPV E6/E7 mRNA检测的病例数有限, 这方面的研究有待继续深入。在宫颈浸润性癌中, 高危型HPV感染与预后关系密切。有研究^[9]指出: 高危型HPV阳性患者预后明显好于HPV阴性患者。高危型HPV是独立于年龄、国际妇产科联合会(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期及病理组织类型的预后因素, 是一个预后良好的生物学标记。但肿瘤中高危型HPV阴性与预后差之间的机制要进一步研究。

现已有多种HPV检测技术供临床医师选择。诸多文献^[10-12]已经证实: HPV E6/E7 mRNA检测在SIL及宫颈癌中的特异性较HPV DNA检测高, 敏感性相似。本研究数据显示: HPV E6/E7 mRNA检测在上皮内病变敏感性达92.7%, 具有极高的

敏感性,说明Aptima HPV检测可以改善患者的管理,保证临床足够的敏感性,同时减少了假阳性的病例以及不必要的阴道镜转诊和患者心理压力。但是,HPV E6/E7 mRNA并不能完全代替细胞学检测。本研究在宫颈上皮内病变及浸润癌的病例中有7.3%是阴性的,说明确实有一些病例未感染HPV或者只是感染低危型HPV,而且还有一些特殊类型癌与HPV不相关。TCT检测有较高的特异性,而敏感性相对较低,其原因是多方面的,如细胞学医师诊断水平有限、诊断保守、临床医师刷检不到位、细胞量少、出血等。联合TCT及HPV E6/E7 mRNA对宫颈病变的敏感性及特异性均大大高于单一的TCT或HPV检测,特别是TCT诊断为意义未明的ASC的这部分随访人群,联合高危型HPV E6/E7 mRNA可以早期及时、准确地诊断宫颈癌前病变,从而提醒临床医师及时治疗,减少宫颈癌的发病。

参考文献

1. WHO. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice[M]. 2nd ed. World Health Organization, 2014: 1436.
2. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(3): 147-172.
3. Fontecha N, Basaras M, Hernandez S, et al. Assessment of human papillomavirus E6/E7 oncogene expression as cervical disease biomarker[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 852.
4. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO, et al. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis[J]. BMJ, 2018, 360: k499.
5. Nolte FS, Ribeiro-Nesbitt DG. Comparison of the Aptima and Cervista tests for detection of high-risk human papillomavirus in cervical cytology specimens[J]. Am J Clin Pathol, 2014, 142(4): 561-566.
6. 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.
7. 吕秀芳, 宋晓霞, 贺慧, 等. 常见HR-HPV各型在子宫颈组织中致癌能力的评估[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(3): 272-277.
LÜ Xiufang, SONG Xiaoxia, HE Hui, et al. Evaluating the carcinogenic ability of the common high-risk human papillomavirus genotype in cervical tissues[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2016, 32(3): 272-277.
8. Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, et al. International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): a new pathogenetic classification for invasive adenocarcinomas of the endocervix[J]. Am J Surg Pathol, 2018, 42(2): 214-226.
9. Lei J, Ploner A, Lagheden C, et al. High-risk human papillomavirus status and prognosis in invasive cervical cancer: a nationwide cohort study[J]. PLoS Med, 2018, 15(10): e1002666.
10. Basu P, Banerjee D, Mittal S, et al. Sensitivity of APTIMA HPV E6/E7 mRNA test in comparison with hybrid capture 2 HPV DNA test for detection of high risk oncogenic human papillomavirus in 396 biopsy confirmed cervical cancers[J]. J Med Virol, 2016, 88(7): 1271-1278.
11. Nakayama Y, Yamada M, Kurata A, et al. Evaluation of the human papillomavirus mRNA test for the detection of cervical lesions in Japan[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2015, 36(2): 192-196.
12. 梁馨元, 谢杏美, 肖小敏. HPV E6/E7 mRNA在宫颈癌筛查中应用价值的Meta分析[J]. 实用妇产科杂志, 2018, 34(6): 454-458.
LIANG Xinyuan, XIE Xingmei, XIAO Xiaomin. Meta-analysis on the clinical application value of human papillomavirus messenger RNA assay for cervical cancer screening[J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2018, 34(6): 454-458.

本文引用: 林茂华, 谢芳, 毛瑛玉, 吴秋珍, 翁秀清, 陈灼英. 宫颈液基细胞学联合高危型HPV E6/E7 mRNA检测在宫颈病变筛查中的应用[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(11): 2457-2461. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.018

Cite this article as: IN Maohua, XIE Fang, MAO Yingyu, WU Qiuzhen, WENG Xiuqing, CHEN Zhuoying. Application of cervical thinprep cytologic test combined with high-risk HPV E6/E7 mRNA detection in the screening of cervical lesions[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(11): 2457-2461. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.018