

鳞状上皮细胞癌抗原联合人乳头瘤病毒 DNA 检测 对非典型鳞状上皮细胞的诊断意义

杨飞翔¹, 江俊青², 罗克锴², 赵铮¹

作者单位:¹湖北医药学院附属东风医院检验科,湖北 十堰 442000;²湖北医药学院药护学院,湖北 十堰 442000

通信作者:赵铮,男,副主任技师,研究方向为妇科肿瘤的早期诊治,E-mail:zhaozheng425@163.com

基金项目:湖北省教育厅指导性项目(B2017481);十堰市科技局引导性项目(17Y44);湖北省教育厅大学生创新创业训练计划项目(201713249008)

摘要:目的 探讨检测人乳头瘤病毒(HPV)、血清肿瘤标志物鳞状上皮细胞癌抗原(SCC)在非典型鳞状上皮细胞(ASCUS)病人分流管理中的意义。方法 对病人宫颈液基细胞学(TCT)检查诊断为ASCUS,并同时进行HPV DNA、血清SCC检测和阴道镜检下定位活检的175例病人,以病理学结果为确诊标准,进行回顾性分析。同时,选取同期体检健康女性50例为对照组,HPV和SCC均阴性。结果 175例ASCUS病人,病理活检炎症或正常133例,宫颈上皮细胞瘤变(CIN) I 28例,CIN II/III 12例,宫颈鳞状细胞癌2例。HPV DNA阳性对于CIN II及以上的检出率为16.00% (12/75),显著高于HPV DNA阴性病例检出率2.00% (2/100),差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着宫颈上皮细胞瘤变(CIN)级别的增加,HPV阳性率越高。而血清SCC含量大于 >1.5 ng/mL组与血清SCC ≤ 1.5 ng/mL组对于CIN II及以上的检出率分别为37.50% (6/16)、5.03% (8/159),两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。HPV DNA检测对于预测CIN II及以上病理结果的敏感度、特异度、阴性预测值及阳性预测值分别为85.71%、60.87%、98.00%、16.00%;血清SCC检测对于预测CIN II及以上病理结果的敏感度、特异度、阴性预测值及阳性预测值分别为42.86%、93.79%、94.97%、37.50%;二者联合检测应用预测宫颈癌高级别病变的敏感度、特异度、阴性预测值及阳性预测值分别为92.86%、57.76%、98.94%、16.05%。结论 单独HPV DNA或血清SCC检测对于ASCUS病人分流具有一定意义,两者联合检测可有效提高宫颈癌高级别病变的敏感性,减少宫颈癌高级别病变的漏诊和不必要的活检,能在早期有效分流管理ASCUS人群。

关键词: DNA探针, HPV; 鳞状上皮细胞癌抗原; 宫颈非典型增生; 宫颈上皮内瘤样变; 乳头状瘤病毒感染

SCC detection and HPV DNA testing in ASCUSS patient

YANG Feixiang¹, JIANG Junqing², LUO Kekai², ZHAO Zheng¹

Author Affiliations: ¹Department of Clinical Laboratory, Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; ²Institute of Medicine and Nursing, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China

Abstract: **Objective** To investigate the significance of human papilloma virus (HPV) testing and serum squamous cell carcinoma antigen (SCC) in the patients with atypical squamous cell of undermined significance (ASCUS). **Methods** Retrospectively analysis of 175 patients diagnosed as ASCUS by ThinPrep cytology test (TCT), HPV DNA test and pathology examination were analyzed at the same time. 50 cases of healthy women were included in control group, HPV and SCC were negative. **Results** 175 patients with ASCUS, 133 cases of pathological biopsy inflammation or normal, 28 cases of CIN I, 12 cases of CIN II/III and 2 cases of cervical squamous cell carcinoma. The positive rate of HPV DNA for detecting CIN II and above was 16.00% (12/75), which was significantly higher than that of HPV DNA negative cases 2.00% (2/100), statistically significant ($P < 0.05$). And as the level of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) increased, the positive rate of HPV. The detection rates of CIN II and above in serum SCC > 1.5 ng/mL group and serum SCC ≤ 1.5 ng/mL group were 37.50% (6/16) and 5.03% (8/159) respectively, statistically significant ($P < 0.05$). The sensitivity, specificity, negative predictive value and positive predictive value of HPV DNA test and serum SCC for predicting CIN II and above were 85.71% and 42.86%, 60.87% and 93.79%, 98.00% and 94.97%, 16.00% and 37.50%, respectively. The sensitivity, specificity, negative predictive value and positive predictive value of combined detection of the two in the detection of high-grade cervical cancer were 92.86%, 57.76%, 98.94% and 16.05% respectively. **Conclusion** The detection of single HPV DNA or serum SCC has some significance for the shunting of ASCUS patients. The combination detection of HPV DNA and serum SCC can effectively improve the sensitivity of high-grade cervical lesions and reduce the missed diagnosis of high-grade cervical lesions and reduce unnecessary pathological diagnosis, which can be effective in early stage Shunt management ASCUS crowd.

Key words: DNA probes, HPV; Squamous cell carcinoma antigen; Uterine cervical dysplasia; Cervical intraepithelial neoplasia; Papillomavirus infections

宫颈癌(Cervical Cancer)是临床最常见的妇科恶性肿瘤之一,严重威胁着女性的生命健康^[1-2]。目前,宫颈细胞学检查(TCT)可较好的诊断出高级别宫颈细胞瘤变,但对于宫颈细胞学检查为无法明确诊断意义的非典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cell of undermined significance, ASCUS)的病人,由于其病理结果具有多样性,包括宫颈上皮细胞良性病变和不同程度宫颈上皮细胞瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN),因此,临床上对ASCUS的处理一直是宫颈疾病诊治中的难点及争论的焦点^[3-4]。卫生部关于子宫颈癌诊断指南中指出宫颈癌中70%~80%癌症组织学分类属于鳞状细胞癌,血清中SCC水平是检测腺癌的一种重要肿瘤标志物,在宫颈癌发生和发展进程中,由宫颈癌细胞所分泌或产生并释放至血液,能反映宫颈癌发生发展过程,其对于宫颈癌的辅助诊断和预后效果评价具有较高的特异性,但敏感性较差,而HPV DNA对于宫颈癌早期诊断具有较高敏感性,但特异性较差,因此,本研究旨在探讨二者的联合筛查,提高其对宫颈癌早期诊断的敏感性或特异性,减少漏诊率或降低误诊率,研究HPV DNA、血清SCC单一或联合在ASCUS病人分流管理中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集湖北医药学院附属东风医院2014年1月至2017年1月宫颈液基细胞学显示为ASCUS,并同时检测SCC、HPV DNA及宫颈组织病理学分析的病人175例,同时,选取同期体检健康女性50例为对照组,HPV和SCC均阴性。所有入选人员均无子宫切除术和宫颈手术史,年龄范围为21~70岁,目前未怀孕,无骨盆放射治疗史,无宫颈癌诊断史的已婚妇女。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂 美国雅培 Abbott I2000全自动化学发光仪、液基细胞学制片分析系统、潮州凯普 HPV 基因分型检测试剂盒、美国 Applied Biosystems 公司 PCR 仪、北京白洋台式血清离心机等。

1.3 研究方法

1.3.1 血清学检测 采用促凝采血管,空腹采取肘静脉血3~5 mL,4 000 r/min离心5 min分离血清。SCC含量测定采用电化学发光法,采用美国雅培 Abbott I2000全自动化学发光仪进行检测。SCC参考范围:0~1.5 ng/mL,SCC>1.5 ng/mL即为阳性。

1.3.2 液基细胞学检测 病人均处于非月经期,采

集前1 d无性生活,且检测前3 d无阴道用药,标本采集由专业妇科医生进行,采用专用取样刷于宫颈管鳞柱交界可疑病变处,将宫颈移行带区脱落细胞洗入试剂配套的专用保存液中及时常温送检。同时采集两份,一份做细胞学检测,一份做HPV DNA检测。液基细胞学检测采用2001版国际癌症协会推荐的TBS系统分级标准进行分级,由两名病理医师对结果进行判读。

1.3.3 HPV DNA 分析 采用潮州凯普公司的PCR+膜杂交法检测HPV DNA,其中高危HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68共15种,低危HPV6、11、42、43、44、81共6种,共21种。操作步骤按照试剂说明书进行。PCR反应条件:95℃预变性10 min,95℃变性20 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环,最后72℃延伸5 min。杂交检测结果阳性点为清晰可见的蓝紫色原点,根据膜条HPV分布图,判断阳性点的HPV分型。

1.3.4 宫颈病理组织活检 在妇科医生的指导下进行阴道镜检查,对可疑部位进行多点取材,如无异常则取3、6、9、12点处,组织标本用甲醛固定后及时送病理科检测。组织病理诊断由高年资病理医师做出最后诊断,组织病理学结果:正常或慢性炎症、CIN I~III级,宫颈癌(浸润性鳞状细胞癌、腺癌、其他宫颈细胞癌)。组织学阳性:高级别宫颈上皮细胞瘤变,即≥宫颈上皮内瘤变CIN II者为阳性,组织学阴性:正常、慢性炎症、尖锐湿疣、低级别宫颈上皮细胞瘤变(CIN I)。

1.4 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$,各组之间比较,采用方差分析或非参数检验,计数资料采用 χ^2 进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年龄段 ASCUS 病人病理检查结果分析

以宫颈组织病理学为标准,175例ASCUS病人中,共检出炎症或正常133例,CIN I 28例,CIN II/III 12例,宫颈鳞状细胞癌2例,21~30岁占总例数的20.57%(36/175),其中13.89%检出CIN II及以上病变;>30~40岁占22.29%(39/175),其中12.82%检出CIN II及以上病变;>40~50岁占34.85%(61/175),其中6.56%检出CIN II及以上病变。CIN II及以上病理结果检出主要集中在21~50岁之间,年龄>50岁,未检出CIN II及以上病变;21~50岁之间,不同年龄段之间CIN II及以上检出率均差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 ASCUSS 病人的年龄分布及组织病理结果/例(%)

年龄/岁	例数	炎症或正常	CIN I	CIN II/III	宫颈癌
21~30	36	23(63.89)	8(22.22)	5(13.89)	0(0.00)
>30~40	39	27(69.23)	7(17.95)	4(10.26)	1(2.56)
>40~50	61	45(73.77)	12(19.67)	3(4.92)	1(1.64)
>50~60	27	26(96.29)	1(3.70)	0(0.00)	0(0.00)
>60~70	12	12(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
合计	175	133	28	12	2

2.2 ASCUS 病人 HPV、SCC 与病理结果分析 宫颈癌组病人血清 SCC 水平明显其他各组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); CIN II/III 组病人血清 SCC 水平明显高于健康组、正常或炎症组、CIN I 组(均 $P < 0.05$),差异有统计学意义。见表 2。

表2 ASCUSS 不同病理结果中血清 SCC 含量分析/(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

项目	例数	SCC
健康人	50	0.47 ± 0.21
正常或炎症	133	0.49 ± 0.32
CIN I	28	0.60 ± 0.47
CIN II/III	12	1.24 ± 0.49 ^{ab}
宫颈癌	2	13.30 ± 2.50 ^{abc}

注:^a 为与健康组、正常或炎症组比较, $P < 0.05$; ^b 为与 CIN I 比较, $P < 0.05$; ^c 为与 CIN II/III 组比较, $P < 0.05$

2.3 ASCUS 病人 HPV 检测、SCC 含量与组织病理活检结果 175 例 ASCUS 病人中, HPV 阳性 75 例, 占 42.86% (75/175), HPV 阳性组与 HPV 阴性组对于 CIN II 及以上的检出率分别为 16.0% (12/75) 和 2.0% (2/100), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.590, P = 0.002$)。HPV 在正常或炎症组、CIN I 组、CIN II/III 组、宫颈癌组中组织学阳性检出率分别为 33.83% (45/133)、64.29% (18/28)、83.33% (10/12)、100.0%, 随着宫颈细胞瘤变程度的加重, HPV 阳性率逐渐增加。而 ASCUS 病人中, 血清 SCC 水平大于 1.5 ng/mL 有 16 例, 占 9.14%, SCC > 1.5 ng/mL 在 ASCUS 病人中对于 CIN II 及以上的检出率为 37.5% (6/16), 显著高于 SCC ≤ 1.5 ng/mL 病理检出率 5.03% (8/159), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 16.644, P = 0.000$); SCC 阳性在正常或炎症组、CIN I 组、CIN II/III 组、宫颈癌组中检出率分别为 4.51% (6/133)、14.29% (4/28)、33.33% (4/12)、100.00%, 随着宫颈细胞瘤变程度增加, SCC 阳性率逐渐增加。

以宫颈病理组织活检为标准, 高级别宫颈上皮细胞瘤变即 ≥ 宫颈上皮内瘤变 CIN II 者为阳性, HPV DNA 和血清 SCC 水平测定对于预测 CIN II 及

以上病理结果的灵敏度、特异度、阴性预测值及阳性预测值分别为 85.71% 和 42.86%、60.87% 和 93.79%、98.00% 和 94.97%、16.00% 和 37.50%。为提高其灵敏性, 降低漏诊率, 采取并联试验, 即 SCC 和 HPV 中任一为阳性即判定为阳性, 二者联合检测应用于预测高级别宫颈癌病变的灵敏度、特异度、阴性预测值及阳性预测值分别为 92.86%、57.76%、98.94%、16.05%。见表 3。

表3 175 例 ASCUS 病人 HPV 检测、血清 SCC 含量与组织病理活检结果分析比较/例

病理诊断	例数	HPV DNA 检测		血清 SCC 含量检测/(ng/mL)		HPV + SCC 联合检测	
		HPV +	HPV -	>1.5	≤1.5	阳性	阴性
正常或炎症	133	45	88	6	127	49	84
CIN I	28	18	10	4	24	19	9
CIN II/III	12	10	2	4	8	11	1
宫颈癌	2	2	0	2	0	2	0
合计	175	75	100	16	159	81	94

2.4 ASCUS 病人主要 HPV 感染亚型及病理检查结果分析 HPV 感染阳性组中, 主要 HPV 感染亚型有 16、18、52、58、33, 其分别对应 CIN II 及以上患病率为 24.14% (7/29)、10.00% (1/10)、10.00% (1/10)、10.00% (1/10)、28.57% (2/7)。正常或炎症组、CIN I 组、CIN II 组中分别有 3 例、1 例、1 例多重 HPV 亚型感染, CIN II 中一例混合感染 HPV33 和 53 型。CIN II 及以上病人 14 例, HPV 阳性检出率为 85.71% (12/14), 其中, HPV16、18、33、52、58 在高级别宫颈组织瘤变病人中分别占 50.00% (7/14)、7.14% (1/14)、14.29% (2/14)、7.14% (1/14)、7.14% (1/14)。在正常或低级别瘤变组中, 有低危型 HPV 感染, 而在高级别宫颈细胞瘤变中未见低危 HPV 亚型感染的发生。见表 4。

表4 ASCUS 病人主要 HPV 感染分型及病理检查结果比较/例

项目	正常或炎症	CIN I	CIN II/III	宫颈癌	合计
高危 HPV					
HPV16 +	16	6	6	1	29
HPV18 +	6	3	1	0	10
HPV33 +	4	1	1	1	7
HPV39 +	3	1	0	0	4
HPV52 +	7	2	1	0	10
HPV58 +	5	4	1	0	10
其他	5	1	1	0	5
低危 HPV					
HPV6 +	1	0	0	0	1
HPV81 +	1	1	0	0	2
其他	0	0	0	0	0
合计	48	19	11	2	81

3 讨论

宫颈癌是威胁发展中国家女性健康的主要卫生问题之一,我国每年约有 15 万宫颈癌新发病例^[5]。宫颈癌的发生起源于宫颈组织细胞异常增生,而早期宫颈癌无明显临床指征,因此容易造成漏诊或误诊。临床常用的宫颈细胞学检查在宫颈癌早期筛查中可有效筛查出大部分高级别 CIN,但是其对于低级别 CIN 灵敏性较差,特别是宫颈细胞学 ASCUS 状态,因为该状态可能是潜在恶性改变或是增生活跃的良性改变,因此,对于 ASCUS 分流管理对于宫颈癌的漏诊误诊具有很重要的意义。本调查资料显示,175 例 ASCUS 病人中,共检出高级别宫颈上皮细胞瘤变病例 14 例,其中检出宫颈癌病人 2 例,因此,如果对 ASCUS 病人简单地进行随访处理,无疑会漏诊一部分癌前病变甚至是宫颈癌病人。

女性生殖道 HPV 持续感染是高级别 CIN 及宫颈癌发生的必然条件^[6-7],CIN 病人中 80%~90% 伴有 HPV 感染,通常认为年轻妇女(<30 岁)的 HPV 感染是一过性的,大部分 HPV 感染会自然消退,仅 5%~10% 发展为持续感染^[8]。HPV 的检出率随着宫颈病变的严重程度增加而增加,在本研究中 175 例 ASCUS 病人中,HPV 检出率为 42.86%,HPV DNA 阳性对于 CIN II 及以上的检出率显著高于 HPV DNA 阴性病例检出率,且随着 CIN 级别的增加,HPV 阳性率越高,因此,对于 ASCUS 病人,行 HPV DNA 筛查可有效的分流 ASCUS 病人。但在高级别宫颈上皮细胞瘤变病例中,也有 HPV 阴性者,这可能与我院检测试剂盒检测范围的局限性,也可能与病人取材有关。研究发现,HPV 感染率与感染亚型分布存在一定地域差异,魏英等研究湖北十堰地区^[9],徐万洲等^[10]研究湖北省地区女性宫颈人乳头状瘤病毒感染与亚型分布,发现湖北地区 HPV 感染亚型主要为 16、18、52、58 型,而本研究中 HPV 感染主要亚型是 16、18、52、58、33,说明我省 HPV 感染亚型主要是 16、18、52、58 型。

在宫颈癌早期筛查中,HPV DNA 检测具有较高的灵敏度,但也存在一定局限性,如特异性较差^[11],假阳性、假阴性等问题,在本研究中,若以宫颈病理组织活检为标准,高级别宫颈上皮细胞瘤变,即 $\geq$ 宫颈上皮内瘤变 CIN II 者为阳性,HPV DNA 单一检测对于预测 CIN II 及以上病理结果的灵敏度达到 85.7%,但特异性仅 60.9%。血清肿瘤标志物 SCC 水平可反映腺癌发生发展的状态,在恶性肿瘤的辅助诊断中起着重要作用,特别是反映晚期宫颈癌状

态及宫颈癌预后效果评价^[12],其无创、简单、易于病人接受。然而,单一标志检查虽有较高特异性但也有局限性,因此,临床上很少使用血清 SCC 水平来诊断早期宫颈癌。在本研究中,血清 SCC 水平测定对于预测 CIN II 及以上病理结果的灵敏度仅有 42.86%,特异度超过 90%,而二者联合检测应用于预测高级别宫颈癌病变的灵敏性、特异度、阴性预测值及阳性预测值分别为 92.86%、57.76%、98.94%、16.05%。二者联合检测,可以有效提高对于高级别宫颈细胞瘤变检出的灵敏性和阴性预测值,提高 ASCUS 病人对于高级别 CIN 筛查的灵敏性和准确性,减少 ASCUS 病人中高级别瘤变的漏诊,也可以减少不必要的阴道镜检查或宫颈活检等有创操作。

在本研究中虽然发现 HPV DNA 检测联合 SCC 测定,可以有效提高对于高级别宫颈细胞瘤变检出的灵敏性和阴性预测值,提高 ASCUS 病人对于高级别 CIN 筛查的灵敏性和准确性,但联合检测相对于 HPV DNA 在灵敏性方面仅提高 7%,提高幅度较小,同时在研究 ASCUS 不同病理状态 SCC 水平含量时,CIN I 组数据不成正态分布,造成这些问题的原因可能是我院为职工医院,收集标本多年龄主要集中在 21~50 岁之间,可能造成数据的偏态分布,同时对于 ASCUS 状态的诊治临床学界尚处于争议阶段,病人对于宫颈细胞学检出 ASCUS 状态,大多采取保守治疗,如定期复查宫颈细胞学检查或 HPV DNA 检测,而取同时行 HPV DNA、血清 SCC 含量检测、宫颈组织活检的病人少之又少,因此,造成收集病例数量偏少,而没有充分发挥二者联合检测提高灵敏性的效果。虽然二者联合检测可提高灵敏度,但特异度仍较低,因此,研究灵敏性、特异性更高的宫颈细胞分子标志物如 HPV E6/E7 mRNA,HPV 蛋白, p16, Ki67, TOP2A/MCM2 等细胞因子以及 DNA 甲基化对于宫颈癌早起诊治具有重要的意义。

总之,单独 HPV DNA 或血清 SCC 检测对于宫颈癌早期病变诊断和分流具有重要作用,但各自都有其局限性,两者联合检测可有效提高宫颈癌高级别病变的灵敏性,减少宫颈癌高级别病变的漏诊和不必要的活检,能在早期有效分流管理 ASCUS 人群。

参考文献

- [1] JEMAL A, SIMARD EP, DORELL C, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975—2009, featuring the burden