

DNA 定量分析及高危型人乳头瘤病毒检测在宫颈癌诊断中的应用

孙冬梅¹⁾, 李国晖²⁾

(1) 山东省定陶县妇幼保健院妇产科, 山东 定陶 274100; 2) 云南省中医医院放射科, 云南昆明 650021)

[摘要] **目的** 探讨应用 DNA 定量分析和高危型人乳头状瘤病毒 (HPV) 的检测在宫颈癌诊断中的应用价值. **方法** 对 2012 年 5 月至 2013 年 8 月在山东省定陶县妇幼保健院经过宫颈癌检查初步筛查后得到的异常女性者 374 例进行深入检查. 将参与研究的妇女用宫颈刷从子宫颈取材, 分别进行巴氏染色和 DNA 染色. 其中巴氏染色应用常规细胞学进行检查, 记为对照组. 将 DNA 染色片使用全自动扫描得到诊断结果, 记为观察组. 对比 2 组诊断的准确度、灵敏度以及特异性. 并采用 HC2 检测方法对高危型 HPV 进行检测. **结果** 观察组灵敏度、特异性以及准确度为 89.25%、99.64%、97.06%, 均高于对照组的 68.82%、89.84%、91.18%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 且当 DNA 指数越高时, 高危型 HPV 感染的几率越大. **结论** DNA 定量分析诊断能高效降低误诊率, 提高诊断效率.

[关键词] 宫颈癌; DNA 定量分析; 诊断; 高危型人乳头状瘤病毒; 应用价值

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 10-0048-04

Application of DNA Quantitative Analysis And Detection of High-risk Human Papilloma Virus in the Diagnosis of Cervical Carcinoma

SUN Dong-mei¹⁾, LI Guo-hui²⁾

(1) Dept. of Obstetrics and Gynecology, Maternal and Child Health Hospital of Dingtao County, Dingtao Shandong 274100; 2) Dept. of Radiology, Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** To explore the application of quantitative analysis of DNA and high-risk human papillomavirus (HPV) application value of the detection in the diagnosis of cervical carcinoma. **Methods** From May 2012 to August 2013, abnormal female patients in our hospital from 374 cases who received preliminary cervical cancer screening were given further examination. The samples from the involved women with cervical brush were collected and given Papanicolaou staining and DNA staining. The conventional cytology pap staining was performed in the control group. The DNA staining slices using automatic scanning diagnosis results were recorded as the observation group. The diagnostic accuracy, sensitivity and specificity were compared between two groups. HC2 detection method was used to detect high-risk type HPV. **Results** In the observation group, the sensitivity, specificity and accuracy were 89.25%, 99.64%, 97.06%, which were significantly higher than the control group of 68.82%, 89.84%, 91.18%. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). And when the DNA index was higher, the probability of high-risk HPV infection was more. **Conclusion** The quantitative analysis of DNA can effectively reduce the rate of misdiagnosis and improve the diagnostic efficiency.

[Key words] Cervical cancer; DNA quantitative analysis; Diagnosis; High human papilloma virus; Application value

[基金课题] 卫生部卫生科技发展研究中心基金资助项目 (W2013G109)

[作者简介] 孙冬梅 (1974~) 女, 山东定陶县人, 医学学士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤临床医学工作.

[通讯作者] 李国晖. E-mail: Xfeng425@163.com

人的染色体在正常情况下每个细胞核有且只有 23 对, 除细胞增殖时发生加倍外其他时间是相对恒定的^[1]. 但宫颈癌等癌症患者体内含有的癌性因子会干扰细胞早期活动, 导致细胞核内 DNA 结构以及含量出现极大的变化^[2]. 在后期细胞会发展异常, 甚至一直处于恶性增殖状态. 因此, DNA 定量检测细胞是否为癌变细胞能通过观察 DNA 的含量变化得到结果^[3]. 鉴于此, 本文将通过 DNA 定量分析应用于宫颈癌的诊断, 得到一些结论, 现报道如下.

1 资料和方法

1.1 临床资料

选择 2012 年 5 月至 2013 年 8 月在山东省定陶县妇幼保健院接受宫颈癌筛查后发现异常的女性患者 374 例作为研究对象. 病理诊断结果: 基本正常者 281 例, 良性非典型鳞状上皮增生 (atypical squamous cell hyperplasia, ASC) 者 48 例、低级别鳞状上皮内病变 (low grade squamous intraepithelial lesions, LSIL) 者 26 例、高级别鳞状上皮内病变 (high grade squamous intraepithelial lesions, HSIL) 者 19 例. 年龄在 28 岁至 53 岁之间, 平均 (37.3 ± 8.4) 岁. 将参与研究的妇女用宫颈刷从子宫颈取材, 分别进行巴氏染色和 DNA 染色. 其中巴氏染色应用常规细胞学进行检查, 记为对照组. 将 DNA 染色片使用全自动扫描得到诊断结果, 记为观察组. 2 组人员在年龄、性别等基本资料对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性.

1.2 研究方法

(1) 所有参与者均由专业医师用宫颈刷在阴道扩张器的帮助下插入子宫, 在一个方向上旋转 3 圈后取出. 收集刷头的样本, 并一一标签后准备实验. 将 0.1% DTT 消化液加入样本振荡 2 h 后得到细胞悬液, 再去除上清液后加入 50% 乙醇进行清洗、离心 2 次, 得到细胞混悬液. 最后将细胞混悬液放入细胞涂片离心机甩片 5 min, 每例参与者制成 2 张薄层细胞学片. 其中对照组进行巴氏染色, 观察组进行 DNA 染色. 其中观察组染色片使用 AcCell 全自动细胞图像进行扫描分析, 进行细胞核积分光密度值、核面积的测定以及 DNA 指数分析等. 将在同张玻璃片上的 100 个正常上皮细胞作为标准对照细胞, DI 值是被测细胞的 10D 与正常细胞 10D 的比值, 并自动存储后打印图文图片报告. 诊断软件依据 DI 值以及异倍体细胞数

作出一些结果和建议: DI 值 < 2.5 的细胞为正常, 在 1 ~ 2 a 后复查. 存在 < 3 个细胞有 $2.5 \geq \text{DNA}$ 指数 < 4.5 病患, 应该在 5 个月左右进行复查. 当存在 $2.5 \geq \text{DNA}$ 指数 < 4.5 的细胞 ≥ 3 个应用进行阴道镜活检. 当 $\text{DI} \geq 4.5$, 存在异倍体细胞单个或多个, 需要进行阴道镜活检. 检查得到 DNA 指数 ≥ 2.5 的参与者均需要通过细胞技术员在显微镜下对其进行一一核实, 排除垃圾以及重叠细胞核造成癌细胞的误诊; (2) 采用 HC2 检测方法对 HPV 进行检测. 对参与者的宫颈管分泌物进行采集并放置特制保存液中, 应用美国公司的 Hybrid Capture II System 基因杂交信号放大系统.

1.3 诊断标准^[4,5]

(1) 巴氏染色诊断结果分为 5 种, 依次为正常或良性、非典型鳞状上皮增生 (ASC)、低级别鳞状上皮内病变 (LSIL)、高级别鳞状上皮内病变 (HSIL) 以及鳞状上皮癌; (2) HPV 检测标准: 检测若得到 $\text{RLU/CO} \geq 1$ 的记为阳性, < 1 记为阴性.

1.4 统计学方法

采用 SPSS 统计软件分析. 计数资料比较采用 χ^2 检验, 计量资料以均数 ± 标注差 ($\bar{x} \pm s$) 表示. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 2 种方式诊断灵敏度、特异性以及准确度对比

常规细胞学检测结果得到: 正常者 310 例、ASC 患者 39 例、LSIL 患者 17 例以及 HSIL 患者 8 例. 在 ASC 及以上病变为阳性, 则常规细胞学检测阳性病患共 64 例. DNA 定量分析结果发现: DNA 指数 < 2.5 , 但细胞异常病患 291 例. DNA 指数 ≥ 2.5 且 < 4.5 , $n < 3$ 个的病患 36 例. DNA 指数 ≥ 2.5 且 < 4.5 , $n \geq 3$ 个的病患 21 例. 以及 DNA 指数 ≥ 4.5 病患 26 例. 将 DNA 指数 ≥ 2.5 记为阳性, 则 DNA 定量检测结果为阳性病患共计 83 例. 对比 2 组灵敏度、特异性以及准确度发现: 观察组灵敏度、特异性以及准确度为 89.25%、99.64%、97.06%, 均显著高于对照组的 68.82%、89.84%、91.18%. 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1.

2.2 DNA 定量分析结果

当细胞病变程度越高, DNA 指数越大, $P < 0.05$, DNA 定量分析结果越准确, 见表 2.

2.3 DNA 指数与高危型 HPV 感染关系

在 DNA 指数 < 2.5 时出现高危型 HPV 感染病

表 1 2 种方式诊断灵敏度、特异性以及准确度对比 [n (%)]
Tab. 1 Comparison of the diagnostic accuracy, sensitivity and specificity between two groups [n (%)]

| 组别 | 例数 | 灵敏度 | 特异性 | 准确度 |
|-----|-----|--------|--------|--------|
| 观察组 | 374 | 89.25* | 99.64* | 97.06* |
| 对照组 | 374 | 68.82 | 89.84 | 91.18 |

与对照组比较, * $P < 0.05$.

患明显少于未感染者, 随着 DNA 指数的不断升高出现高危型 HPV 感染病患的比例开始加大. 当 DNA 指数达到 ≥ 4.5 时, 出现高危型 HPV 感染病

患比例明显高于对照组. 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3.

3 讨论

在对宫颈癌诊断的早期, 临床上多应用常规细胞学进行判断^[6]. 常规细胞学检测具有一定的特点, 对低度以及低度以上的病变的检出率较高, 能有效提高诊断结果的准确度^[7]. 并且, 较其他涂片手段而言能明显避免因固定不当或者制片干燥造成误诊结果. 常规细胞学还能可能发现癌前病变, 比如机体受到微生物的严重感染等. 因此,

表 2 DNA 定量分析结果 [n (%)]
Tab. 2 DNA quantitative analysis results [n (%)]

| 常规细胞学 | 例数 | DNA 指数 | | | |
|-------|-----|-------------|-------------------------------|----------------------------------|------------|
| | | < 2.5 细胞异常 | ≥ 2.5 且 < 4.5, $n < 3$ 个 | ≥ 2.5 且 < 4.5, $n \geq 3$ 个 | ≥ 4.5 |
| 正常 | 281 | 275 (97.86) | 6 (2.14) | 5 (1.78) | 2 (0.71) |
| ASC | 48 | 15 (31.25) | 20 (41.67) | 8 (16.67)* | 5 (10.42) |
| LSIL | 26 | 7 (26.92) | 9 (34.62) | 6 (23.08)* | 4 (15.38) |
| HSIL | 19 | 1 (5.26) | 1 (5.26) | 2 (10.53)* | 15 (78.95) |
| 总计 | 374 | 291 (77.81) | 36 (9.63) | 21 (5.61) | 26 (6.95) |

与 ≥ 4.5 比较, * $P < 0.05$.

表 3 DNA 指数与高危型 HPV 感染关系 [n (%)]
Tab. 3 The relation between DNA index and high risk HPV infection [n (%)]

| 高危型 HPV | DNA 指数 | | | | 总计 |
|---------|-------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------|--------------|
| | < 2.5TCT 异常 | ≥ 2.5 且 < 4.5, $n < 3$ 个 | ≥ 2.5 且 < 4.5, $n \geq 3$ 个 | ≥ 4.5 | |
| 感染 | 63 (21.65)* | 11 (30.56)* | 9 (42.86) | 24 (92.31)* | 107 (28.61)* |
| 未感染 | 228 (78.35) | 25 (69.44) | 12 (57.14) | 2 (7.69) | 267 (71.39) |
| 总计 | 291 | 36 | 21 | 26 | 374 |

与未感染者相比, * $P < 0.05$

常规细胞学能被较广泛的应用. 在本研究中对照组的灵敏度、特异性以及准确度以此为 68.82%、89.84%、91.18%. 这也反应出常规细胞学检测存在一定的不足之处, 主要是在病灶范围的限制上. 假如在刮取时未能触及病灶, 取得的样本就有可能造成假阴性的漏诊结果^[8]. 因此, 临床上开始应用 DNA 定量分析加以确诊.

本文通过对比常规细胞学检测和应用 DNA 定量分析以及检测高危型 HPV 在宫颈癌的诊断中, 结果发现: 观察组的灵敏度、特异性以及准确度为 89.25%、99.64%、97.06%, 均显著高于对照组. 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$). 并且 DNA 定量分析结果显示当细胞病变程度越高, DNA 指

数越大, DNA 定量分析结果越准确. 与钟萍萍等^[9,10]的报道相似. 以上结果说明应用 DNA 定量检测能显著提高宫颈癌的诊断准确性, 且对于病变程度越高的准确度越大. 在应用 DNA 定量分析诊断时能根据 DNA 含量及时反映出肿瘤恶性程度, 以及相关的生理学行为, 因此 DNA 定量分析能较准确地分类肿瘤级别. 细胞核的面积会随着细胞变异程度的不断加重而逐渐增大, 相对常规细胞学医师根据单纯细胞形态的变化做出判断更具有可信度. 即使在诊断中出现误诊, 但对疑似宫颈癌患者进行活检不会影响其正常生活, 所以可行性较高. 此外, 本研究还进行了高危型 HPV 感染的检测, 发现当 DNA 指数越高感染比例越大. 符合

曹红英等^[11-13]的报道. 在许多研究中已经发现高危型 HPV 与宫颈癌的发生关系密切, 但相关报道较少. 高危型 HPV 感染后造成 DNA 倍体异常主要是因为 HPV 中的致癌基因整合至宿主宫颈上皮细胞的基因组上, 并且控制宿主细胞凋亡过程, 导致细胞周期紊乱, 最后形成 DNA 含量在细胞增殖时发生改变. 因此, 通过高危型 HPV 检测增加 DNA 定量分析的结果, 提高宫颈癌的诊断效率.

综上所述, 在常规细胞学的检测当中增加 DNA 定量分析, 能有效提高诊断宫颈癌的准确度. 不仅对宫颈活检的选择起到决定性作用, 而且极大降低了假阳性的比例. 并且对高危型 HPV 感染能起到重要提示作用, 为宫颈癌的进一步治疗提供指导.

[参考文献]

- [1] 尹格平, 武爱芳, 梁静, 等. 趋化因子 CXCL 12 和肿瘤坏死因子- α 基因多态性与宫颈上皮内瘤变和宫颈癌易感性之间的相关性研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2014, 01(04): 451 - 456.
- [2] 王韵茹, 章强强. 随机扩增多态性 DNA 结合微流芯片鉴定马拉色菌的初步研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2012, 45(08): 545 - 548.
- [3] 忙尼沙汗·阿不都拉, 古丽那尔·阿布都拉江. 维吾尔族妇女宫颈上皮内瘤变和宫颈癌与内质网蛋白 57 基因启动子甲基化的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2013, 35(08): 600 - 603.
- [4] 孙笑非, 顾依群, 王爱春, 等. 高危型人乳头瘤病毒检测结合薄层细胞学检查在宫颈癌筛查中的价值评估[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(04): 273 - 276.
- [5] 徐军, 徐灵, 王立峰, 等. 子宫颈脱落细胞中 PAX1 基因甲基化定量检测在子宫颈癌早期诊断中的应用 [J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(09): 699 - 701.
- [6] LIN CHEN, HUAN JONG-C, WU BIN-HAO, et al. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in 4-aminobiphenyl-treated HepG2 cells [J]. Toxicology, 2014, 01(322): 69 - 77.
- [7] BRUNO, VEIGAS RITA, BRANQUINHO JOANA V, et al. Ion sensing (EIS) real-time quantitative monitoring of isothermal DNA amplification [J]. Biosensors & bioelectronics, 2014, 01(52): 50 - 52.
- [8] 刘辉, 江凌, 商红艳, 等. 分支 DNA 技术定量检测 HBV DNA 的临床意义 [J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(03): 252 - 254.
- [9] 钟萍萍, 顾依群, 王军, 等. DNA 定量分析在宫颈癌筛查中的应用 [J]. 中华病理学杂志, 2013, 42 (07): 469 - 470.
- [10] 宋志琴, 王嵩明. 宫颈细胞 DNA 倍体定量分析联合液基细胞学在宫颈癌早期筛查中的应用价值[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 01(08): 1 437 - 1 440.
- [11] 曹红英, 武卫华, 许振, 等. DNA 定量细胞学配合液基细胞学对宫颈病变筛查的价值 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(09): 704 - 706.
- [12] 范波, 姚紫薇. EphA2 与宫颈癌[J]. 川北医学院学报, 2007, (22)2: 167 - 169
- [13] 胡尚英, 赵方辉, 马俊飞, 等. 轻度宫颈上皮内瘤变预后及其与人乳头状瘤病毒关系的前瞻性队列研究 [J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(05): 361 - 365.

(2015 - 06 - 20 收稿)

版权声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文, 作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意编辑部上述声明.