

· 论著 ·

女性阴道自采样本检测 PAX1/JAM3 双基因甲基化标志物作为子宫颈癌筛查的可行性评估

余芙蓉¹ 马洁稚² 周希³ 李根林¹ 彭嘉琪⁴ 李萍⁴ 曾飞² 谢小兵⁴ 董巍楠¹¹南华大学附属第一医院妇科, 衡阳 421001; ²中南大学湘雅三医院妇科, 长沙 410013;³湖南中医药大学第一附属医院肝胆胰、疝外科, 长沙 410007; ⁴湖南中医药大学第一附属医院医学检验与病理中心, 长沙 410007

通信作者: 董巍楠, Email: 540325366@qq.com; 谢小兵, Email: xxiaobing888@163.com

【摘要】 目的 探讨女性自采样本进行配对盒基因 1(PAX1)/结合连接黏附分子 3(JAM3)双基因甲基化检测在子宫颈癌筛查与绝经前后女性分层管理的应用价值。**方法** 单中心横断面研究。2023 年 1—11 月在阴道镜门诊同时收集女性自采样本及医生采样样本, 分别进行 PAX1/JAM3 双基因甲基化(PAX1^m/JAM3^m)检测, 以组织病理学为标准。总计招募 301 例接受阴道镜检查女性, 并对 272 例有组织病理与检测信息的女性进行统计分析。通过 Spearman 相关性分析和 χ^2 检验比较两种采样方法 PAX1^m/JAM3^m 检测结果的一致性。通过计算受试者操作特征曲线(ROC)和曲线下面积(AUC)比较女性自采样本甲基化检测与现行临床检测及其组合方法在临床研究中用于子宫颈癌筛查的效益。**结果** 在所有招募的受试者中, 正常宫颈组织或慢性宫颈炎 102 例(37.5%)、宫颈上皮内瘤变 1 级(CIN1)72 例(26.4%)、CIN2 43 例(15.8%)、CIN3 29 例(10.7%)、宫颈癌 26 例(9.6%)。按最低检出量公式计算区分成为 81 例一致性研究组和 191 例临床研究组。Spearman 相关性分析表明, 自采样本和医生采样样本进行 PAX1 和 JAM3 双基因甲基化检测结果的卡氏评分呈正相关($r=0.858$ 、 0.828 , P 均 <0.001); 自采样本在临床研究中结果显示 PAX1^m/JAM3^m 检测诊断 CIN2 或更严重病变(CIN2+)的敏感度和特异度分别为 77.6%(95%CI 65.3%~86.4%)和 87.2%(95%CI 80.5%~91.9%), PAX1^m/JAM3^m 联合人乳头瘤病毒 16/18 型(HPV16/18)检测的敏感度与高危人乳头瘤病毒(hrHPV)检测相同为 89.7%(95%CI 79.2%~95.2%); 在 CIN3+ 时为 96.0%(95%CI 80.4%~99.3%), 优于 hrHPV 的 92.0%(95%CI 75.0%~97.8%)、细胞学的 82.6%(95%CI 62.9%~93.0%)及 sPAX1^m/JAM3^m 联合细胞学检测低度及以上鳞状上皮内病变(LBC_{LSIL+})[87.0%(95%CI 67.9%~95.5%)]。**结论** 女性自采样本进行 PAX1 与 JAM3 双基因甲基化检测作为子宫颈癌筛查具有操作与临床可行性。

【关键词】 宫颈肿瘤; 宫颈上皮内瘤样病变; DNA 甲基化; 自采样

基金项目: 湖南省自然科学基金(2020JJ4859)

Feasibility Evaluation of using PAX1/JAM3 methylation markers as cervical cancer screening for female self-collected samples

Yu Furong¹, Ma Jiezhil², Zhou Xi³, Li Genlin¹, Peng Jiaqi⁴, Li Ping⁴, Zeng Fei², Xie Xiaobing⁴, Dong Weilei¹¹Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, University of South China,

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240109-00016

收稿日期 2024-01-09 本文编辑 武昱

引用本文: 余芙蓉, 马洁稚, 周希, 等. 女性阴道自采样本检测 PAX1/JAM3 双基因甲基化标志物作为子宫颈癌筛查的可行性评估[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(4): 419-427. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240109-00016.

中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



Hengyang 421001, China; ² Department of Obstetrics and Gynecology, Xiangya Third Hospital, Central South University, Changsha 410013, China; ³ Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; ⁴ Medical Laboratory and Pathology Center, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Corresponding authors: Dong Weilei, Email: 540325366@qq.com; Xie Xiaobing, Email: xxiaobing888@163.com

【Abstract】 Objective To explore the application value of PAX1/JAM3 methylation detection by cervical self-collected specimen in cervical cancer screening and the management of premenopausal and postmenopausal women. **Method** This study is a single center cross-sectional study. From January 2023 to November 2023, cervical self-collected and physician-collected specimens at the colposcopy clinic were detected the PAX1/JAM3 methylation (PAX1^m/JAM3^m) testing. The consistency between self-collected and physician-collected specimens for PAX1^m/JAM3^m detection were compared based on histopathology. In addition, the clinical efficacy of methylation detection with high-risk human papillomavirus (hrHPV), liquid-based cytology (LBC), and their combination for cervical cancer screening were compared in the study. **Results** A total of 301 women were recruited to undergo referral colposcopy examination, and statistical analysis was conducted on 272 women with pathological and diagnostic information. Among them, 102 cases (37.5%) were diagnosed as normal cervical tissue or chronic cervicitis, 72 cases (26.4%) were cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1), 43 cases (15.8%) were CIN2, 29 cases (10.7%) were CIN3, and 26 cases (9.6%) were cervical cancer. According to the minimum quantity formula, they were divided into a consistency cohort of 81 participants and a validation cohort of 191 participants. The consistency between cervical self-collected and physician-collected specimens for detecting PAX1^m/JAM3^m. Results from spearman correlation analysis showed a positive correlation between the self-collected and physician-collected results of PAX1^m/JAM3^m detection, and the correlation coefficient R values are 0.858 ($P<0.001$) and 0.828 ($P<0.001$). The sensitivity and specificity of PAX1^m/JAM3^m detection for diagnosing CIN2 or more severe lesions (CIN2+) were 77.6% [95% confidence interval (CI) 65.3%–86.4%] and 87.2% (95%CI 80.5%–91.9%), respectively. In clinical performance comparison, the sensitivity of PAX1^m/JAM3^m combined with HPV16/18 detection, 89.7% (95%CI 79.2%–95.2%), was the same as that of hrHPV detection in CIN2+and 96.0% (95%CI 80.4%–99.3%) in CIN3+, which is higher than 92.0% (95%CI 75.0%–97.8%) of hrHPV and 82.6% (95%CI 62.9%–93.0%) of LBC or the combination of sPAX1^m/JAM3^m and LBC low-grade and higher squamous intraepithelial lesion testing [87.0% (95%CI 67.9%–95.5%)]. **Conclusions** Self-collected specimens by women for detection of PAX1 and JAM3 methylation as a promising screening tool for cervical cancer has operational and clinical feasibility. The methylation test can optimize the current cervical cancer screening plan, reduce the number of referral women with false positive diagnosis to colposcopy, and is of great significance for reducing fertility protection and preventing missed diagnosis in women of childbearing age.

【Key words】 Cervical cancer; Cervical intraepithelial neoplasia; DNA methylation; Self-sampling

Fund program: Hunan Provincial Natural Science Foundation (2020JJ4859)

尽管过去十年全球致力于 HPV 筛查和疫苗接种计划并取得了巨大进步,但是各国公共卫生水平差异仍然存在,宫颈癌仍是全球女性主要的健康挑战之一^[1]。以高危型人乳头瘤病毒(high risk HPV, hrHPV)作为宫颈癌初级筛查方法比 hrHPV 联合细胞学或单独细胞学检查更加客观、更长筛查间隔和更佳的获益风险比,并且 hrHPV 检出宫颈癌前病变的敏感度与阴性预测值更佳^[2]。

研究表明,阴道自采样本进行 hrHPV-DNA 检测可获得与医生采样相似的敏感度^[3]。但低特异性容易造成被筛查者的心理负担、过度诊疗等问

题。因此,寻找不同宫颈癌检测方法仍是全球临床医生与公共卫生专家关注的焦点^[4]。

肿瘤异常 DNA 甲基化表达与癌变的关联性已被证实^[5-7],且 WHO、国际癌症研究机构及专家学者均提出, DNA 甲基化检测可以作为 HPV 阳性女性提供分层管理策略^[8-9]。结合连接黏附分子 3(junctional adhesion molecule 3, JAM3 基因)和配对盒基因 1(paired box gene 1, PAX1 基因)被认为是多种癌症的抑癌基因^[10-11],研究表明 JAM3 基因与 PAX1 基因的 DNA 启动子甲基化程度随着宫颈病变恶化程度增加而增加^[12]。



本研究在南华大学附属第一医院妇科阴道镜门诊收集女性自样本和医生采集宫颈脱落细胞样本进行 PAX1 与 JAM3 双基因甲基化(PAX1^m/JAM3^m)检测,以组织病理为标准进行针对于自样本的 PAX1^m/JAM3^m检测对于妇科临床宫颈病变患者的检测效能研究。

对象与方法

一、对象

2023 年 1—11 月在南华大学附属第一医院妇科阴道镜门诊招募受试者,在医院进行本研究。所有受试者均签署知情同意书,该研究获得南华大学附属第一医院伦理委员会批准[医伦审 2021 第(yz2021104)号]。

纳入标准:(1)女性年龄大于 18 岁并有性生活史;(2)均接受细胞学、hrHPV 检查且转诊阴道镜;(3)病历资料完整;(4)完成知情同意书签署。

排除标准:(1)月经期、妊娠期或哺乳期;(2)已知生殖道恶性肿瘤或其他肿瘤史;(3)3 d 内有性生活、阴道冲洗与阴道用药;(4)6 个月内接受宫颈或阴道病变治疗者;(5)有自身免疫性疾病史,或正在服用免疫抑制剂;(6)HPV 疫苗接种史;(7)退出研究与临床资料不完整者。

研究共招募了 301 例患者,其中 29 例患者因无活检病理、无法自行采检或甲基化检测失败等被排除。共计 272 例患者被纳入本研究统计分析,其中未绝经患者占 72.4% (197 例),绝经患者占 27.6% (75 例);87.1% 的患者为 hrHPV 阳性,59.6% 的患者细胞学诊断为未明确诊断意义的不典型鳞状细胞(atypical squamous cell of undetermined significance, ASCUS)。组织病理提示,宫颈良性或慢性子宫颈炎(正常)、CIN1、CIN2、CIN3 和子宫颈癌分别为 102 例(37.4%)、72 例(26.5%)、43 例(15.8%)、29 例(10.7%)和 26 例(9.6%),其中一致性研究组共 81 例,年龄 41.0(34.0~48.0)岁;验证研究组 191 例,年龄 37.0(29.0~47.0)岁。二组受试者实际入组例数均大于有效评估指标例数。

本研究包含:(1)一致性研究:同一受试者阴道自采与医生采样本进行 PAX1^m/JAM3^m检测,探讨自采样本进行双基因甲基化检测结果是否与医生采样检测结果一致;(2)临床研究:以病理为金标准,将自采样本 PAX1^m/JAM3^m检测结果与 HPV 及细胞学检测结果进行比对,进行不同临床检测方法的效

益分析;(3)临床研究:自采样本进行 PAX1^m/JAM3^m检测在绝经前与绝经后女性临床的检测性能分析。

二、方法

1. 试剂与仪器:人高危型(14 型)人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)购自广州凯普生物公司;一次性宫颈脱落细胞采样器购自江苏健友医疗科技有限公司;(宫颈)细胞保存液体购自慈达生物技术有限公司;人 PAX1 和 JAM3 基因甲基化检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购自北京起源聚禾生物科技公司;SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统购自上海宏石医疗科技有限公司。

2. 一致性样本量估算:受试者自采与医生采样本二组数据之间的非劣效性试验样本量估计基于 RMLE 法^[13-14]。

根据经验 CIN2 及以上病变(CIN2+)样本量预估参数设定为:(1)自采和医生采样本检测双基因甲基化在 CIN2+ 中的敏感度为 90%,2 种采样方式结果均为阳性的占 89%,均为阴性的占 9%,则 $P_{01}=0.089$;(2)非劣效性单侧检验水准 $\alpha=0.05$;(3)把握度为 80%,则 $\beta=0.2$;(4)非劣效界值为 $\delta=0.15$ 。按照配对二项数据非劣效性检验基于 RMLE 方法估算,需要纳入 34 例以上 CIN2+ 病例。由医生依据 CIN2+ 与 CIN2- 人数收集研究对象。

3. 临床研究样本量估算:(1)受试者的选择及样本量计算。研究假设:目标受试者自采样本与医生采样本 PAX1^m/JAM3^m检测的有效率一致。

样本量估计 CIN2+ 参数设定为:自采样敏感度=90%;置信水平=0.95, $\alpha=0.05$;(3) $L=0.1$ 。按照式(1)计算,计算公式如下。

$$n = \frac{Z_{1-\alpha}^2 \times P \times (1 - P)}{L^2} \quad (1)$$

其中 L 为 95%CI 宽度的一半。

由公式(1)计算结果得知需要招募 35 例以上 CIN2+ 受试者即可满足本研究最低人数要求。

对于 CIN2- 样本量估计参数设定为:自采样特异度=90%;置信水平=0.95, $\alpha=0.05$; $L=0.05$ 。按照式(1)计算结果得知需要招募 139 例<CIN2 受试者即可满足本研究最低人数要求。由医生依据 CIN2+ 与 CIN2- 人数收集研究对象。

4. 样本采集流程:本研究纳入妇科门诊宫颈细胞学检测 \geq ASCUS 或 hrHPV 检测阳性患者样本。保留拟入组患者宫颈细胞学检测或者 HPV 检测样本(医生采集样本),并嘱患者阴道镜检查前签署知情同意书,后实行患者自采样过程并保留样本。医



生采集样本与患者自采样本分别进行 PAX1/JAM3 基因甲基化检测,并应用于一致性研究和对比不同检测临床性能的研究中。

5. 宫颈细胞学与 HPV 检查:在阴道镜检前,患者暴露宫颈后,医生用无菌大头棉签轻轻擦拭宫颈表面分泌物,用宫颈脱落细胞取材刷于宫颈表面及宫颈管内顺时针旋转 5 周获得宫颈脱落细胞,并将刷头放入细胞保存液瓶后贴好检测条形码,可室温保存 6 个月。样本经处理后将脱落细胞制片、染色。由细胞病理医生依照 2014 年修订的宫颈细胞学结果分级系统(the Bethesda System, TBS) 进行描述并诊断。取 2 ml 样本提取 DNA 后在聚合酶链反应仪对 hrHPV 进行扩增检测。部分受试者的自采与医生采样本作为 PAX1^m/JAM3^m检测一致性比对使用。

6. 自采样本:受试者持一次性宫颈脱落细胞采样器,将采样器伸入阴道并顶到采样器垫片后,以顺时针方向旋转 5~10 周,将采样器刷头依照折线处折断后放入(宫颈)细胞保存液中,可室温保存 6 个月。

7. DNA 甲基化检测:取自采样本细胞保存液瓶(6 个月内)1 ml 样本,进行 DNA 提取纯化,并进行 DNA 浓度和质量测定。取 200~1 000 ng DNA 进行重亚硫酸盐转化。重亚硫酸盐转化后 DNA 在 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统进行扩增检测,每次检测时加入阳性与阴性对照品。反应结束后根据 PAX1 基因、JAM3 基因与内参基因(GAPDH)的 Ct 值,计算 ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ 检测基因 - Ct 内参基因),使用内参基因 $Ct_{GAPDH} < 35$ 作为标本作为检测质量控制。JAM3 基因甲基化结果 $\Delta Ct_{JAM3} \leq 10$ 为阳性, PAX1 基因甲基化结果 $\Delta Ct_{PAX1} \leq 6.6$ 为阳性; PAX1^m/JAM3^m 双基因甲基化阳性标准以 PAX1^m 或 JAM3^m 任意一结果为阳性即判定为阳性。定义 s ΔCt 为自采样本, d ΔCt 为医生采样样本。

8. 阴道镜检查及宫颈活检:患者取截石位放置窥阴镜,充分暴露宫颈,使用生理盐水冲洗宫颈表面黏液,观察宫颈的形态、颜色等自然状态。将涂有 5% 冰醋酸的湿润棉球涂到宫颈上,停留 120 s 以后取掉棉球,肉眼直接观察宫颈颜色变化,宫颈转化区类型、醋白反应、有无镶嵌、有无点状血管和异型血管等病变。鳞柱交界区可见、部分可见、不可见分别对应 I 型、II 型、III 型转化区(TZ1、TZ2、TZ3)。用活检钳在阴道镜下提示可疑病变区域取活检,如 TZ3 者以刮勺进行宫颈管搔刮,取样组织

经 10% 福尔马林固定。宫颈组织固定后立即送至病理科予以制片,采用苏木精伊红染色。由 2 位病理医生分别进行判读,如结果不一致时由主任病理科医生判读并审核最终报告结果。

三、统计学分析

先用 Shapiro-Wilk Test 进行正态性检验。符合正态分布的数据用均数 \pm 标准差描述,使用 t 检验进行统计;不符合正态分布的数据用 $M(Q_1, Q_3)$ 描述,使用 χ^2 检验方法进行统计。在一致性研究中,医生采样和自采样的 PAX1 和 JAM3 双基因甲基化检测结果 ΔCt 间的一致性采用 Spearman 相关性分析检验,并画出 Bland-Altman 图。PAX1^m/JAM3^m、PAX1^m、JAM3^m 医生采样和自采样的一致性用 Kappa 值表示,差异性用配对 χ^2 检验。在验证研究中,计算不同检测方法的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值及 95% Wald Score 可信区间。双侧检验 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

结 果

一、基本信息

一致性研究组自采样的 s ΔCt_{PAX1} ^m 和 s ΔCt_{JAM3} ^m 值与验证研究组比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。2 组基本特征与检测结果见表 1。

二、自采样本与医生采样本进行 PAX1 和 JAM3 双基因甲基化检测结果的一致性分析

Spearman 相关性分析显示,自采和医生采的 PAX1 和 JAM3 双基因甲基化测试的 r 值分别为 0.858 ($P < 0.001$) 与 0.828 ($P < 0.001$), Bland-Altman 图(图 1)显示自采和医生采的一致性较好。以 CIN2 作为病理临界判断值, PAX1^m/JAM3^m 检测在自采和医生采样的敏感度分别为 77.5% 和 82.5%, 特异度分别为 92.7% 和 87.8%, 差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。一致性研究中,全部样本(81 份) PAX1^m/JAM3^m 检测的 Kappa=0.90, $P=0.134$; $<$ CIN2 样本(41 例) PAX1^m/JAM3^m 检测的 Kappa=0.72, $P=0.479$; CIN2+ 样本(40 例) PAX1^m/JAM3^m 检测的 Kappa=0.84, $P=0.065$, 提示了结果的高度一致性(表 2)。

三、PAX1 与 JAM3 双基因甲基化检测结果与其他检测结果的相关性分析

临床研究纳入 191 例受试者,以组织病理学检测结果作为金标准比较自采样本检测双基因甲基



表1 参与研究患者的基本特征

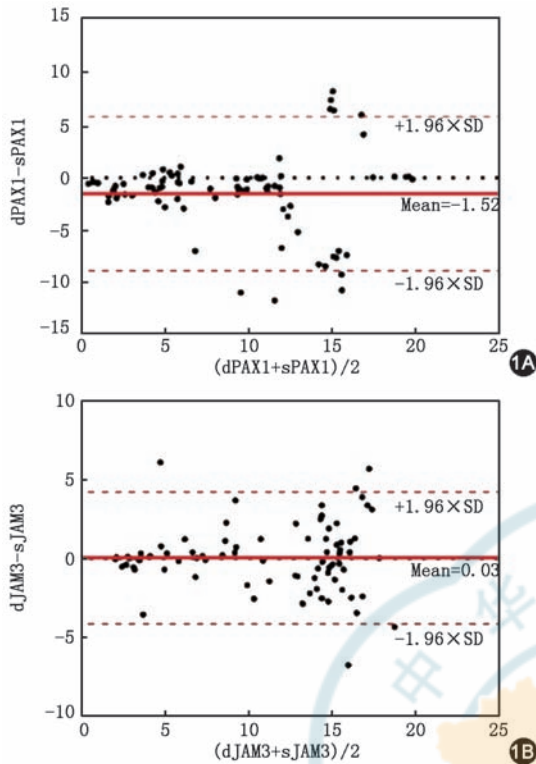
| 项目 | 一致性研究组 (81 例) | 验证研究组 (191 例) | U/χ^2 值 | P 值 |
|--------------------------------|------------------|------------------|--------------|--------|
| 年龄[岁, $M(Q_1, Q_3)$] | 41.0(34.0, 48.0) | 37.0(29.0, 47.0) | 8 656.5 | 0.121 |
| 绝经状态[例(%)] | | | 0.4 | 0.521 |
| 绝经前 | 56(69.1) | 141(73.8) | | |
| 绝经后 | 25(30.9) | 50(26.2) | | |
| 细胞学检查[例(%)] | | | 11.3 | 0.047 |
| 缺失 | — | 15(7.9) | | |
| NILM | 19(23.5) | 76(39.8) | | |
| ASCUS/AGC | 33(40.7) | 54(28.3) | | |
| LSIL | 16(19.8) | 26(13.6) | | |
| ASC-H | 3(3.7) | 6(3.1) | | |
| HSIL | 10(12.3) | 12(6.3) | | |
| SCC | 0(0) | 2(1.0) | | |
| 高危型 HPV 检测[例(%)] | | | 1.7 | 0.426 |
| 缺失 | — | 2(1.0) | | |
| 阴性 | 7(8.6) | 26(13.6) | | |
| hrHPV 其他 12 种型 | 28(34.6) | 68(35.6) | | |
| HPV16/18 | 46(56.8) | 95(49.7) | | |
| DNA 甲基化检测[$M(Q_1, Q_3)$] | | | | |
| d Δ CtPAX1 ^m | 8.6(3.8, 11.1) | — | — | — |
| s Δ CtPAX1 ^m | 10.1(5.0, 13.76) | 10.9(6.5, 17.8) | 6 682.0 | 0.076 |
| d Δ CtJAM3 ^m | 12.6(6.9, 15.4) | — | — | — |
| s Δ CtJAM3 ^m | 13.4(6.9, 15.2) | 13.1(9.1, 14.9) | 7 570.0 | 0.781 |
| 宫颈转化区类型[例(%)] | | | 0.5 | 0.782 |
| 缺失 | — | 1(0.5) | | |
| TZ1 型 | 30(37.0) | 73(38.2) | | |
| TZ2 型 | 9(11.1) | 16(8.4) | | |
| TZ3 型 | 42(51.9) | 101(52.9) | | |
| 组织病理结果[例(%)] | | | 22.3 | <0.001 |
| 良性/炎症 | 20(24.7) | 82(42.9) | | |
| CIN1 | 21(25.9) | 51(26.7) | | |
| CIN2 | 10(12.4) | 33(17.3) | | |
| CIN3 | 15(18.5) | 14(7.3) | | |
| 宫颈癌 | 15(18.5) | 11(5.8) | | |

注: Δ CtPAX1^m ≤ 6.6 定义为阳性; Δ CtJAM3^m ≤ 10.0 定义为阳性。d 为医生采样, s 为自采样; CIN 为宫颈上皮内瘤变, NILM 为无上皮内瘤变和恶性细胞, ASCUS 为不明意义非典型鳞状上皮内病变, AGC 为不典型腺上皮细胞, ASC-H 为不能排除高级鳞状上皮内病变的不典型鳞状上皮细胞, LSIL 为低度鳞状上皮内病变, HSIL 为高度鳞状上皮内病变, AGC 为不典型腺上皮细胞, SCC 为鳞状细胞癌, hrHPV 其他 12 型为非 HPV16 或 18 型的其他高危型 HPV, HPV16/18 为 HPV16 和 18 型, TZ 为宫颈转化区; “—”表示无数值

化与 HPV 及细胞学检测方法的临床检测效能, 结果见表 3。CIN2+ 为阳性结果显示 PAX1^m/JAM3^m 的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 77.6% (95%CI 65.3%~86.4%)、87.2% (95%CI 80.5%~91.9%)、72.6% (95%CI 60.4%~82.1%) 和 89.9% (95%CI 83.5%~94.0%)。使用单变量分析和赤池信息准则来构建逻辑回归模型。模型包括 sPAX1^m、sJAM3^m 和液基细胞学检测 ASCUS (liquid based cytology ASCUS, LBCasc-us) 3 个变量, 我们评

估了每个单独变量、组合, 以及整体模型的预测能力。PAX1^m/JAM3^m 联合 HPV16/18 检测或 hrHPV 检测的敏感度等于 HPV 16/18, 高于其他检测, 为 89.7% (95%CI 79.2%~95.2%); PAX1 基因、JAM3 基因、PAX1/JAM3 双基因甲基化检测的特异度分别为 93.2% (95%CI 87.6%~96.4%)、89.5% (95%CI 83.1%~93.6%) 与 87.2% (95%CI 80.5%~91.9%), 甲基化单独或联合检测的特异度与阳性预测值皆高于 hrHPV、HPV16/18 与细胞学, 差异有统计学意义





注:医生采样定义为d,自采样定义为s;纵轴为医生采样与自采样样本 PAX1 基因甲基化检测的 ΔCt 差值,横轴为医生采样与自采样样本 JAM3 基因甲基化检测的 ΔCt 差值

图1 PAX1 和 JAM3 甲基化测试 Bland-Altman 图

($P<0.005$)。PAX1^m/JAM3^m联合 LBC (LSIL+) 检测时阴性预测值最高,为 91.0% (95%CI 83.8%~95.2%),其次为 PAX1^m/JAM3^m [89.9% (95%CI 83.5%~94.0%)],二者差异无统计学意义($P>0.05$)。

对于 CIN3+ 病变的检测结果显示 PAX1^m/JAM3^m 联合 HPV16/18 检测的敏感度最高为 96.0% (95%CI 80.4%~99.3%),特异度前 3 名为 PAX1^m (80.7%)、LBC (LSIL+) (78.4%) 和 PAX1^m/JAM3^m (75.9%)。不同检测方法比较时,JAM3^m 36.2% (95%CI 25.0%~49.1%) 显示了最高阳性预测值,PAX1^m/JAM3^m [97.7% (95%CI 93.4%~99.2%)] 为最高阴性预测值。

自样本中检测 PAX1 或 JAM3 双基因甲基化 ΔCp 值在不同宫颈病变程度样本中的分布见表 4,

PAX1^m 或 JAM3^m 检测值在病理 CIN2 与正常组间差异有统计学意义 ($P<0.05$),在 CIN1、CIN3、宫颈癌和正常病理间差异无统计学意义 (P 均 >0.05)。

四、绝经与未绝经女性自样本进行 PAX1 与 JAM3 双基因甲基化检测的效应分析 (临床研究)

在临床研究中病理 CIN2+PAX1^m/JAM3^m 的敏感度与特异度分别为 77.6% (95%CI 65.3%~86.4%)、87.2% (95%CI 80.5%~91.9%)。绝经前女性甲基化检测特异度为 PAX1^m 96.1% (95%CI 90.3%~98.5%)、JAM3^m 92.2% (95%CI 85.3%~96.0%) 与 PAX1^m/JAM3^m 92.2% (95%CI 85.3%~96.0%)。PAX1^m/JAM3^m 在绝经后女性检测敏感度与阴性预测值为 94.7% (95%CI 75.4%~99.1%) 和 95.7% (95%CI 79.0%~99.2%),见表 5。

讨 论

宫颈自采样进行分子检测可以将不易参加常规细胞学筛查的女性纳入子宫颈癌筛查计划^[9, 15-17]。世界卫生组织发布《WHO 宫颈癌前病变筛查和治疗指南 (2 版)》^[9] 指出自采样进行 HPV-DNA 检测作为宫颈癌初筛方案并提示甲基化检测在未来宫颈癌筛查中应用具有可行性。在自采样的情况下,有效细胞的刷取效率下降会产生样本质量差异,因此需进行自样本和医生样本检测结果的一致性评估研究。本研究结果说明自样本进行 PAX1 与 JAM3 双基因甲基化检测较医生采样的阳性率 (42.0% 比 46.9%) 与敏感度 (77.5% 比 82.5%) 略低而特异度 (92.7% 比 87.8%) 较高,且阳性率均随病变严重程度而增加,2 种采样方法结果具有一致性,且能够准确地识别子宫颈病理 HSIL 与子宫颈癌,支持了自采样作为 PAX1 与 JAM3 双基因甲基化检测的临床应用的可行性。

高敏感度的 hrHPV-DNA 检测是目前许多国家宫颈癌首选的筛查方案,然而其特异性较低,使其可能无法区分持续性和暂时性感染^[18]。荷兰 HPV 筛查计划研究表明使用 DNA 甲基化作为 HPV 分层

表2 自采与医生样本 PAX1/JAM3 甲基化检测的一致性 (份)

| CIN2+ | | | <CIN2 | | | 全部 | | |
|--------------------------------------|----|------|--------------------------------------|----|------|--------------------------------------|----|------|
| PAX1 ^m /JAM3 ^m | | 医师采样 | PAX1 ^m /JAM3 ^m | | 医师采样 | PAX1 ^m /JAM3 ^m | | 医师采样 |
| 自采 | 阴性 | 阳性 | 自采 | 阴性 | 阳性 | 自采 | 阴性 | 阳性 |
| 阴性 | 7 | 2 | 阴性 | 36 | 2 | 阴性 | 43 | 4 |
| 阳性 | 0 | 31 | 阳性 | 0 | 3 | 阳性 | 0 | 34 |

注:CIN为宫颈上皮内瘤变



表3 自采样甲基化检测及其他检测方法在 CIN2+和 CIN3+的临床性能分析[% (95%CI)]

| 检测 | 敏感度 | 特异度 | 阳性预测值 | 阴性预测值 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CIN2+ | | | | |
| sPAX1 ^m /JAM3 ^m | 77.6(65.3~86.4) | 87.2(80.5~91.9) | 72.6(60.4~82.1) | 89.9(83.5~94.0) |
| sPAX1 ^m | 69.0(56.2~79.4) | 93.2(87.6~96.4) | 81.6(68.6~90.0) | 87.3(80.8~91.8) |
| sJAM3 ^m | 75.9(63.5~85.1) | 89.5(83.1~93.6) | 75.9(63.5~85.1) | 89.5(83.1~93.6) |
| hrHPV | 89.7(79.2~95.2) | 15.3(10.1~22.4) | 31.9(25.2~39.4) | 76.9(57.9~89.0) |
| HPV16/18 | 50.0(37.5~62.5) | 49.6(41.2~58.1) | 30.5(22.2~40.4) | 69.1(59.2~77.6) |
| LBC _{ASCUS+} | 78.2(65.6~87.1) | 52.9(44.0~61.6) | 43.0(33.7~52.8) | 84.2(74.4~90.7) |
| LBC _{LSIL+} | 45.5(33.0~58.5) | 82.6(74.9~88.4) | 54.3(40.2~67.9) | 76.9(69.0~83.3) |
| sPAX1 ^m /JAM3 ^m 联合 HPV16/18 | 89.7(79.2~95.2) | 40.5(32.4~49.0) | 40.0(32.0~48.6) | 89.8(79.5~95.2) |
| sPAX1 ^m /JAM3 ^m 联合 LBC _{LSIL+} | 83.6(71.7~91.1) | 75.2(66.8~82.1) | 60.5(49.3~70.8) | 91.0(83.8~95.2) |
| 模型 1 | 76.4(63.6~85.6) | 90.1(83.5~94.2) | 77.8(65.1~86.8) | 89.3(82.6~93.7) |
| CIN3+ | | | | |
| sPAX1 ^m /JAM3 ^m | 88.0(70.0~95.8) | 75.9(68.8~81.8) | 35.5(24.7~47.9) | 97.7(93.4~99.2) |
| sPAX1 ^m | 68.0(48.4~82.8) | 80.7(74.0~86.0) | 34.7(22.9~48.7) | 94.4(89.3~97.1) |
| sJAM3 ^m | 84.0(85.3~93.6) | 77.7(70.8~83.4) | 36.2(25.0~49.1) | 97.0(92.5~98.8) |
| hrHPV | 92.0(75.0~97.8) | 14.6(10.0~20.9) | 14.1(9.6~20.3) | 92.3(75.8~97.9) |
| HPV16/18 | 56.0(37.1~73.3) | 50.6(43.0~58.2) | 14.7(9.0~23.2) | 88.3(80.2~93.3) |
| LBC _{ASCUS+} | 82.6(62.9~93.0) | 47.1(39.3~54.9) | 19.0(12.5~27.8) | 94.7(87.2~97.9) |
| LBC _{LSIL+} | 56.5(36.8~74.4) | 78.4(71.3~84.2) | 28.3(17.3~42.5) | 92.3(86.4~95.8) |
| sPAX1 ^m /JAM3 ^m 联合 HPV16/18 | 96.0(80.4~99.3) | 35.4(28.4~43.0) | 18.5(12.7~26.0) | 98.3(91.0~99.8) |
| sPAX1 ^m /JAM3 ^m 联合 LBC _{LSIL+} | 87.0(67.9~95.5) | 63.4(55.5~70.6) | 26.3(17.7~37.2) | 97.0(91.5~99.0) |
| 模型 1 | 82.6(62.9~93.0) | 77.1(69.8~83.1) | 35.2(23.8~48.5) | 96.7(91.9~98.7) |

注: Δ CtPAX1^m≤6.6 定义为阳性, Δ CtJAM3^m≤10.0 定义为阳性; PAX1^m/JAM3^m 定义为 PAX1^m 或 JAM3^m 阳性; CIN 为宫颈上皮内瘤变, LBC (ASCUS+) 为宫颈脱落细胞学检查结果为不明意义非典型鳞状上皮内病变或低度鳞状上皮内病变或高度鳞状上皮内病变或宫颈癌, LBC (LSIL+) 为宫颈脱落细胞学检查结果为低度鳞状上皮内病变或高度鳞状上皮内病变或宫颈癌, hrHPV 为 14 型高危型 HPV, HPV16/18 为 HPV16 或 18 型; 模型 1: 纳入 sPAX1^m、sJAM3^m、LBC_{ASCUS+} 进行逻辑回归模型预测, 根据约登指数最大原则取预测概率的临界值=0.402

表4 不同病理结果中自采样本 PAX1 和 JAM3 甲基化检测值[M(Q₁, Q₃)]

| 组别 | 例数 | s Δ CtPAX1 ^m | s Δ CtJAM3 ^m |
|------------|-----|--------------------------------|--------------------------------|
| 正常 | 102 | 12.9(10.3, 18.4) | 14.1(12.7, 15.1) |
| CIN1 | 72 | 12.5(9.6, 17.6) | 14.3(11.6, 15.7) |
| CIN2 | 43 | 5.0(2.6, 9.3) ^a | 7.1(4.0, 12.3) ^a |
| CIN3 | 29 | 5.4(4.8, 7.1) | 7.4(5.7, 9.9) |
| 宫颈癌 | 26 | 2.9(1.9, 6.3) | 4.6(2.9, 6.7) |
| χ^2 值 | | 62.274 | 61.962 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 |

注: CIN 为宫颈上皮内瘤变

管理可提高检测特异度^[19], 从而减少阴道镜检查的转诊次数并降低医疗成本。研究表明, PAX1^m/JAM3^m 是优于 HPV 检查和细胞学检查的宫颈病变检测工具, 其可单独或联合细胞学检查用于 HPV 感染阳性女性高级别/非高级别宫颈病变的分层诊断^[20]。本研究结果显示, PAX1^m 和 JAM3^m 无论单独或联合检测, 对于 CIN2+ 和 CIN3+ 都有较高的检出敏感度和特异度。配合 PAX1^m/JAM3^m 可有效提高

现有 hrHPV 检测和 LBC 对宫颈高级别病变的检测准确度(表 3)。另外, 纳入 sPAX1^m、sJAM3^m、LBC_{ASCUS+} 的逻辑回归模型也显示了对 CIN2+ 病变(敏感度 76.4%, 特异度 90.1%) 和 CIN3+ 病变(敏感度 82.6%, 特异度 77.1%) 的高准确率检出能力, 提示若在自采样异常后医院初诊 LBC 结果为 ASCUS 的患者需要立即转诊阴道镜, 降低漏诊几率。

PAX1 基因甲基化检测在 HPV、E6E7、细胞学阳性分层管理、随访、与治疗效益评估上具有重要临床意义^[21-24]; JAM3 基因甲基化检测在 hrHPV 阳性与细胞学异常分层管理及作为病变进展和预后管理具有良好效果^[26-27]。此外, JAM3 基因在宫颈腺癌的检测中表现出显著的敏感度和特异度, 这对于发现 HPV 检测阴性的宫颈腺癌具有重要价值^[11]。Boers 等^[28]测定 50 份自采样本检测 JAM3 基因甲基化在 CIN2+ 与 CIN3+ 的敏感度分别为 63%、91%, 特异度分别为 72%、78%; 此外, 在自采样本中进行 6 基因甲基化检测在 CIN2+、CIN3+ 的阳性率分别为 26% 和 31.6%。与医生采样的分析相比,

表 5 自采样甲基化检测在女性绝经前与绝经后的临床性能分析[% (95%CI)]

| 检测方法 | 敏感度 | 特异度 | 阳性预测值 | 阴性预测值 |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 绝经前(141例) | | | | |
| PAX1 ^m /JAM3 ^m | 69.2(53.6~81.4) | 92.2(85.3~96.0) | 77.1(61.0~87.9) | 88.7(81.2~93.4) |
| PAX1 ^m | 64.1(48.4~77.3) | 96.1(90.3~98.5) | 86.2(69.4~94.5) | 87.5(80.1~92.4) |
| JAM3 ^m | 66.7(51.0~79.4) | 92.2(85.3~96.0) | 76.5(60.0~87.6) | 87.9(80.3~92.8) |
| 绝经后(50例) | | | | |
| PAX1 ^m /JAM3 ^m | 94.7(75.4~99.1) | 71.0(53.4~83.9) | 66.7(47.8~81.4) | 95.7(79.0~99.2) |
| PAX1 ^m | 78.9(56.7~91.5) | 83.9(67.4~92.9) | 75.0(53.1~88.8) | 86.7(70.3~94.7) |
| JAM3 ^m | 94.7(75.4~99.1) | 80.6(63.7~90.8) | 75.0(55.1~88.0) | 96.2(81.1~99.3) |

注: $\Delta C_t PAX1^m \leq 6.6$ 定义为阳性, $\Delta C_t JAM3^m \leq 10.0$ 定义为阳性, $PAX1^m/JAM3^m$ 定义为 $PAX1^m$ 或 $JAM3^m$ 阳性

自采样进行 6 基因检测在 CIN2+ 和 CIN3+ 时敏感度降低了约 20%^[29]。本研究表明,在绝经前女性中进行 PAX1 基因和 JAM3 基因甲基化检测特异性高达 92%,将有效减轻育龄期女性因 HPV 感染引起的焦虑,并可能降低由过度治疗引发的孕产风险^[30]。

部分 HPV 感染与病变发生的区域隐藏在宫颈管内,多发现于 TZ3,这造成了 20% 的女性阴道镜评估不充分与检测漏诊风险^[18]。而盲目进行诊断性锥切的“以防万一”也会造成一定负面后果,手术切除深度和宫颈狭窄与早产风险具有高度相关性^[31]。一项中国 12 714 例大型回顾性研究显示了接受锥切术的患者中 5.98% (760/12 714) 被诊断为浸润性宫颈癌,它指出阴道镜下活检后仍有部分女性存在宫颈癌漏诊风险^[32]。本研究中, TZ3 女性(143 例)为绝经后女性(75 例)的 1.9 倍,提示 TZ3 并不局限于雌激素不良的老年妇女中,育龄女性更需要留意。绝经后女性自采样检测 JAM3^m 或 PAX1^m/JAM3^m 具有 94.7% 敏感度和 >95% 阴性预测值,可辅助阴道镜医生对于绝经女性的可能的隐匿性病变/癌进行更仔细的检查,降低现行检测漏诊率。PAX1^m/JAM3^m 在绝经后女性检测敏感度与阴性预测值为 94.7% 和 95.7%,高敏感度提示甲基化检测阳性结果预示这部分女性需要进一步详细的阴道镜检查。这种筛查策略有助于降低由于激素水平下降而可能导致的隐匿性病变漏检的风险。通过先进行甲基化检测,可以更有效地识别出需要仔细阴道镜检查的女性,从而提高检查的准确性和及时性。

本研究的不足之处在于自采样样本仅进行了阴道镜指征的女性的甲基化检测,因此尚未能就甲基化诊断的准确性进行全面评估。

总之,基于自采样本进行 PAX1 与 JAM3 双基因甲基化检测作为子宫颈癌筛查具有操作可行性

与临床可行性。对女性自行操作采样器采集阴道与宫颈样本进行甲基化检测可能是优化现行子宫颈癌筛查计划的重要方向,这将消除女性因为时间与地域或个人因素去医院进行检查的限制。此外,由于 PAX1 与 JAM3 的双基因甲基化检测与现行检测方法相比具更高特异度,这将有效减少假阳性女性转诊阴道镜的数量,减少过度治疗。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 余芙蓉:样本与信息收集、文章撰写;马洁雅:数据分析;周希、李根林:样本与信息收集;彭嘉琪、李萍:文章撰写;曾飞:数据分析;谢小兵:实验设计;董巍楠:实验设计、样本与信息收集

参 考 文 献

- [1] Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10167): 169-182. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32470-X.
- [2] Fontham E, Wolf A, Church TR, et al. Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(5):321-346. DOI: 10.3322/caac.21628.
- [3] Arbyn M, Verdoodt F, Snijders PJ, et al. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(2): 172-183. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70570-9.
- [4] Shiraz A, Crawford R, Egawa N, et al. The early detection of cervical cancer: The current and changing landscape of cervical disease detection[J]. Cytopathology, 2020, 31(4): 258-270. DOI: 10.1111/cyt.12835.
- [5] Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA, et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(6):395-405. DOI: 10.1038/nrc3728.
- [6] Kremer WW, Steenbergen R, Heideman D, et al. The use of host cell DNA methylation analysis in the detection and management of women with advanced cervical intraepithelial neoplasia: a review[J]. BJOG, 2021, 128(3): 504-514. DOI: 10.1111/1471-0528.16395.
- [7] Zhang L, Tan W, Yang H, et al. Detection of host cell gene/HPV DNA methylation markers: a promising triage



- approach for cervical cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 831949. DOI: 10.3389/fonc.2022.831949.
- [8] Bouvard V, Wentzensen N, Mackie A, et al. The IARC perspective on cervical cancer screening[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(20):1908-1918. DOI: 10.1056/NEJMs2030640.
- [9] WHO. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition [EB/OL]. [2022-11-22]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030824>.
- [10] Fang C, Wang SY, Liou YL, et al. The promising role of PAX1 (aliases: HUP48, OFC2) gene methylation in cancer screening[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(3): e506. DOI: 10.1002/mgg3.506.
- [11] Kong L, Wang L, Wang Z, et al. Cytological DNA methylation for cervical cancer screening: a validation set [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1181982. DOI: 10.3389/fonc.2023.1181982.
- [12] 李翔, 贺斯黎, 赵行平, 等. 高危型人乳头瘤病毒感染患者宫颈脱落细胞 JAM3/PAX1 高甲基化诊断宫颈高级别病变[J]. *中南大学学报(医学版)*:1-11.
- [13] 刘玉秀, 徐晓莉, 郑均. 配对二项数据等效性/非劣效性评价的样本含量估计和假设检验[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13(3):299-302. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2501.2008.03.011.
- [14] Liu JP, Hsueh HM, Hsieh E, et al. Tests for equivalence or non-inferiority for paired binary data[J]. *Stat Med*, 2002, 21(2):231-245. DOI: 10.1002/sim.1012.
- [15] 中国优生科学协会阴道镜和子宫颈病理学分会, 中华医学会妇科肿瘤学分会, 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会, 等. 中国子宫颈癌筛查指南(一)[J]. *现代妇产科进展*, 2023, 32(7):481-487. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2023.07.001.
- [16] Perkins RB, Guido RS, Castle PE, et al. 2019 ASCCP risk-based management consensus guidelines for abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors[J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2020, 24(2):102-131. DOI: 10.1097/LGT.0000000000000525.
- [17] Kyrgiou M, Arbyn M, Bergeron C, et al. Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynaecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC) [J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(4):510-517. DOI: 10.1038/s41416-020-0920-9.
- [18] Manley K, Patel A, Pawade J, et al. The use of biomarkers and HPV genotyping to improve diagnostic accuracy in women with a transformation zone type 3[J]. *Br J Cancer*, 2022, 126(1):91-99. DOI: 10.1038/s41416-021-01539-y.
- [19] Verhoeve L, Bleeker M, Polman N, et al. Performance of DNA methylation analysis of ASCL1, LHX8, ST6GALNAC5, GHSR, ZIC1 and SST for the triage of HPV-positive women: Results from a Dutch primary HPV-based screening cohort[J]. *Int J Cancer*, 2022, 150(3): 440-449. DOI: 10.1002/ijc.33820.
- [20] Zhao X, Sun D, Xu D. #834 High-risk human papillomavirus-infected patients with high methylation levels of JAM3/PAX1 in cervical exfoliated cells are diagnosed with high-grade cervical lesions[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2023, 33: A98. DOI: 10.1136/ijgc-2023-ESGO.196.
- [21] Bhavya, Rajaram S, Gupta B, et al. PAX1 methylation status in cervical scrapes as novel diagnostic biomarker in CIN 2/3 and invasive squamous cell carcinoma[J]. *J Obstet Gynaecol India*, 2022, 72(6): 522-528. DOI: 10.1007/s13224-022-01680-5.
- [22] Li B, Guo R, Lai T, et al. The application of PAX1 methylation detection and HPV E6/E7 mRNA detection in cervical cancer screening[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2021, 47(8):2720-2728. DOI: 10.1111/jog.14869.
- [23] Li X, Liu H, Zhou X, et al. PAX1 hypomethylation as a prognostic biomarker for radioresistance of cervical cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1): 123. DOI: 10.1186/s13148-023-01538-1.
- [24] El Aliani A, El-Abid H, El Mallali Y, et al. Association between gene promoter methylation and cervical cancer development: global distribution and a meta-analysis[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2021, 30(3):450-459. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-20-0833.
- [25] Yin A, Zhang Q, Kong X, et al. JAM3 methylation status as a biomarker for diagnosis of preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44373-44387. DOI: 10.18632/oncotarget.6250.
- [26] Kong L, Wang L, Wang Z, et al. DNA methylation for cervical cancer screening: a training set in China[J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 91. DOI: 10.1186/s13148-020-00885-7.
- [27] Luttmer R, De Strooper LM, Dijkstra MG, et al. FAM19A4 methylation analysis in self-samples compared with cervical scrapes for detecting cervical (pre)cancer in HPV-positive women[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(5): 579-587. DOI: 10.1038/bjc.2016.200.
- [28] Boers A, Wang R, van Leeuwen RW, et al. Discovery of new methylation markers to improve screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3[J]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8: 29. DOI: 10.1186/s13148-016-0196-3.
- [29] Klischke L, von Ehr J, Kohls F, et al. Performance of a six-methylation-marker assay on self-collected cervical samples-a feasibility study[J]. *J Virol Methods*, 2021, 295: 114219. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114219.
- [30] 刘禹利, 孟元光, 陈捷. 子宫颈高级别鳞状上皮内病变诊疗技术在生育力保护的价值[J]. *实用妇产科杂志*, 2023, 39(7):486-489. DOI: 1003-6946(2023)07-0486-04.
- [31] Suh-Burgmann EJ, Whall-Strojwas D, Chang Y, et al. Risk factors for cervical stenosis after loop electrocautery excision procedure[J]. *Obstet Gynecol*, 2000, 96(5 Pt 1): 657-660.
- [32] Cong Q, Song Y, Wang Q, et al. A large retrospective study of 12714 cases of LEEP conization focusing on cervical cancer that colposcopy-directed biopsy failed to detect[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 5138232. DOI: 10.1155/2018/5138232.

