



河北医科大学

Hebei Medical University

授予单位编码	10089
学号或申请号	XS20211460
中国图书分类号	R71
是否保密及密级	否

硕士学位论文

学术学位

PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染宫颈病变患者中的临床研究

**Clinical study on methylation of PAX1 and JAM3 genes
in HR-HPV infected cervical lesions patients**

研 究 生：谢津

导 师：李晓冬教授

专 业：妇产科学

二级学院：河北医科大学第一医院

2024 年 10 月

目 录

英文缩写.....	6
前言.....	7
材料与方法.....	8
结果.....	16
讨论.....	26
结论.....	30
参考文献.....	31
综述 DNA 甲基化在宫颈病变筛查中的研究.....	36
参考文献.....	41

PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染宫颈 病变患者中的临床研究

摘 要

目的: 检测 HR-HPV 感染宫颈病变患者中 PAX1、JAM3 基因甲基化的表达情况。分析 HSIL 患者宫颈锥切术后半年 HPV 转阴与否和 PAX1、JAM3 基因甲基化结果的相关性。

方法:

1.病例资料收集: 收集 2023 年 1 月至 2024 年 6 月期间, 于河北医科大学第一医院行宫颈活检, 且 HPV 高危型感染的患者共 172 例, 根据组织病理结果分为宫颈炎组 40 例、LSIL 组 40 例、HSIL 组 73 例和宫颈癌组 19 例。收集患者剩余的 HPV 检测标本, 采用重亚硫酸盐转化技术和荧光定量 PCR 技术检测宫颈脱落细胞中 PAX1、JAM3 基因甲基化水平, 其中两个基因任何一个阳性定为阳性, 分析 PAX1、JAM3 基因甲基化在各级宫颈病变患者中的阳性率。

2.利用 ROC 曲线评估 PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染患者中诊断 HSIL⁺的效价, 同时与 TCT 检测及 HPV16/18 型检测进行比较。

3.PAX1、JAM3 基因甲基化检测与 TCT 检测对 HR-HPV 感染者阴道镜转诊阳性率的比较。

4.收集 HSIL 患者术后半年 HPV 检测情况, 根据是否转阴分为 HPV 转阴组和 HPV 未转阴组, 分析宫颈锥切术前 PAX1、JAM3 基因甲基化结果与术后 HPV 转阴的关系。

结果:

1.依据病理结果分为宫颈炎组、LSIL 组、HSIL 组及宫颈癌组, 检测各组 PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率分别为 2.5%、15%、30.1%、84.2%。

2.在 HR-HPV 感染者中 PAX1、JAM3 基因甲基化诊断宫颈 HSIL⁺的特异性(91.25%)、PPV(84.44%)及 AUC(0.71)均高于 TCT 检测(66.25%、68.24%、0.65)和 HPV16/18 检测(63.75%、68.82%、0.67)。

3.本研究显示宫颈炎组、LSIL 组、HSIL 组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化进行分流时阴道镜转诊阳性率为 2.5%、15%、30.14%，相比于依据 TCT 检测阴道镜转诊的阳性率，分别下降了 10%、40%、32.87%。而宫颈癌组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化进行分流时阴道镜转诊阳性率为 84.21%，相比于依据 TCT 检测阴道镜转诊的阳性率升高了 21.05%。

4.HSIL 患者 73 例（其中 2 例失访）宫颈锥切术后半年复查 HPV，根据是否转阴分为 HPV 转阴组和 HPV 未转阴组，两组进行单因素关联性分析，发现在年龄、绝经与否、TCT 检测结果、HPV 分型、PAX1、JAM3 基因甲基化上有统计学差异（均 $P<0.05$ ），纳入关联性有统计学意义的自变量构建二分类 Logistic 回归分析，结果发现：HPV16/18 型、PAX1、JAM3 基因甲基化阳性对 HPV 转阴具有统计学意义（OR=5.59, 95%CI 1.37-22.77, $P=0.016$ ）（OR=4.93, 95%CI 1.13-21.56, $P=0.034$ ）。

结论：

- 1.宫颈病变严重程度越高，PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率也越高。
- 2.PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染患者中诊断 HSIL⁺的效能优于 TCT 检测及 HPV16/18 检测。
- 3.在 HR-HPV 感染宫颈病变患者中依据 PAX1、JAM3 基因甲基化转诊至阴道镜检查可能优于 TCT 检测。
- 4.HPV 未转阴组的甲基化阳性率明显高于转阴组，提示 PAX1、JAM3 基因甲基化可能成为预测 HPV 转归的标志物。

关键词：PAX1，JAM3，DNA 甲基化，宫颈病变，HR-HPV

Clinical study on methylation of PAX1 and JAM3 genes in HR-HPV infected cervical lesions patients

ABSTRACT

Objective:

Detect the expression of PAX1 and JAM3 gene methylation in HR-HPV infected cervical lesions patients. Analyze the correlation between HPV seroconversion and PAX1 and JAM3 gene methylation results in HSIL patients six months after cervical conization surgery.

Method:

1. Case data collection: A total of 172 patients with high-risk HPV infection who underwent cervical biopsy at the First Hospital of Hebei Medical University from January 2023 to June 2024 were collected. According to histopathological results, they were divided into cervical inflammation group (40 cases), LSIL group (40 cases), HSIL group (73 cases), and cervical cancer group (19 cases). Collect remaining HPV test samples from patients, and use bisulfite transformation technology and fluorescence quantitative PCR technology to detect the methylation levels of PAX1 and JAM3 genes in cervical exfoliated cells. If either of the two genes is positive, it is considered positive. Analyze the positivity rate of PAX1 and JAM3 gene methylation in patients with various levels of cervical lesions.

2. Evaluate the efficacy of PAX1 and JAM3 gene methylation in diagnosing HSIL+in HR-HPV infected patients using ROC curves, and compare it with TCT detection and HPV16/18 type detection.

3. Comparison of PAX1, JAM3 gene methylation detection and TCT detection for the positive rate of vaginal colposcopy referral in HR-HPV infected individuals.

4. Collect HPV testing results of HSIL patients six months after surgery, and divide them into HPV conversion negative group and HPV non conversion

negative group according to whether they have turned negative. Analyze the relationship between the methylation results of PAX1 and JAM3 genes before cervical conization surgery and postoperative HPV conversion negative group.

Result:

1. According to pathological results, the patients were divided into cervicitis group, LSIL group, HSIL group, and cervical cancer group. The positive rates of PAX1 and JAM3 gene methylation in each group were 2.5%, 15%, 30.1%, and 84.2%, respectively.

2. The specificity (91.25%), PPV (84.44%), and AUC (0.71) of PAX1 and JAM3 gene methylation diagnosis for cervical HSIL⁺ in HR-HPV infected individuals were higher than those of TCT detection (66.25%, 68.24%, 0.65) and HPV16/18 detection (63.75%, 68.82%, 0.67).

3. This study showed that the positive rates of vaginal colposcopy referral based on PAX1 and JAM3 gene methylation were 2.5%, 15%, and 30.14% in the cervicitis group, LSIL group, and HSIL group, respectively. Compared with the positive rates of vaginal colposcopy referral based on TCT detection, they decreased by 10%, 40%, and 32.87%, respectively. The positive rate of vaginal colposcopy referral based on PAX1 and JAM3 gene methylation was 84.21% in the cervical cancer group, which was 21.05% higher than the positive rate of vaginal colposcopy referral based on TCT detection.

4. 73 patients with HSIL (2 of whom were lost to follow-up) underwent cervical conization surgery and underwent HPV re examination six months later. They were divided into HPV conversion negative group and HPV non conversion negative group based on whether they turned negative. Univariate correlation analysis was conducted between the two groups, and statistical differences were found in age, menopause, TCT test results, HPV typing, PAX1, and JAM3 gene methylation (all $P < 0.05$). A binary logistic regression analysis was constructed to include independent variables with statistically significant correlation. The results showed that positive HPV 16/18, PAX1, and JAM3 gene methylation had statistical significance for HPV conversion (OR=5.59, 95% CI 1.37-22.77, $P=0.016$) (OR=4.93, 95% CI 1.13-21.56, $P=0.034$) .

Conclusion:

1.The higher the severity of cervical lesions, the higher the positivity rate of PAX1 and JAM3 gene methylation.

2.The efficacy of PAX1 and JAM3 gene methylation in diagnosing HSIL+in HR-HPV infected patients is superior to TCT detection and HPV16/18 detection.

3.In HR-HPV infected patients with cervical lesions, referral to colposcopy based on PAX1 and JAM3 gene methylation may be superior to TCT testing.

4. The methylation positivity rate of the HPV non negative group was significantly higher than that of the negative group, indicating that methylation of PAX1 and JAM3 genes may become biomarkers for predicting HPV outcome.

Keywords: PAX1, JAM3, DNA methylation, Cervical lesions, HR-HPV

英文缩写

英文缩写	英文全称	中文全称
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance	不能明确诊断意义的不典型鳞状细胞
AUC	Area Under ROC Curve	受试者工作曲线下面积
BMI	Body Mass Index	体重指数
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	子宫颈上皮内瘤变
CpG	Cytosine-phosphate-Guanosine	胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸序列
CC	Cervical cancer	宫颈癌
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	脱氧核糖核酸
HPV	Human papilloma virus	人乳头瘤病毒
HR-HPV	High risk human papilloma virus	高危型人乳头瘤病毒
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion	高级别鳞状上皮内病变
JAM3	Junctional adhesion molecule3	连接粘附分子 3
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion	低级别鳞状上皮内病变
NPV	Negative predictive value	阴性预测值
PAX1	Paired box1	配对盒家族基因 1
PPV	Positive predictive value	阳性预测值
ROC	Receiver operating characteristic curve	受试者工作曲线
TCT	Thinprep cytologic test	薄层液基细胞学检查

PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染宫颈 病变患者中的临床研究

前言

宫颈癌（Cervical cancer, CC）占妇科恶性肿瘤的第四位，根据国际癌症研究机构（IARC）的最新估计，2022 年全球宫颈癌新发病例 66 万，死亡病例 35 万^[1]。在中国，每年新增子宫颈癌病例约 15.1 万，死亡病例约 5.6 万^[2]。宫颈癌的发生与高危型人乳头瘤病毒（High risk human papilloma virus, HR-HPV）的持续感染有关^[3]。宫颈癌的预防及早期筛查至关重要。宫颈癌采用三级防护策略：首先是 HPV 疫苗接种^[4]；其次是宫颈癌筛查；最后是宫颈癌前病变的治疗^[5]。HPV 疫苗的预防作用主要针对未感染者，它无法对已经存在的 HPV 感染及相关的癌前病变进行治疗，这意味着已经感染 HPV 的女性无法从疫苗中直接获益^[5]。对于已经感染 HPV 的女性，宫颈癌的预防和管理主要依赖于定期的宫颈癌筛查。宫颈癌筛查方法主要包括薄层液基细胞学检查（Thinprep cytology test, TCT）、HR-HPV 检测。其中，TCT 检查特异度好，敏感度差，取决于当地医生的判读水平^[6]。与 TCT 检查相比，HR-HPV 检测的敏感度更高，但是感染 HPV 的患者中只有不到 10% 会进展为子宫颈高级别病变或宫颈癌，这直接增加了阴道镜检查的转诊率，降低了 HPV 筛查子宫颈病变的价值^[7,8]。因此探索更精准的早期宫颈癌筛查指标成为研究热点。

近年来 DNA 甲基化检测在肿瘤早筛中得到广泛关注^[9,10]，DNA 甲基化是指 DNA 分子在 DNA 甲基转移酶的作用下将甲基选择性地添加到特定碱基上的过程。DNA 甲基化能够在不改变 DNA 序列的前提下，改变遗传表现，是最重要的表观遗传调控方式之一。DNA 甲基化是从宿主基因层面进行分析检测，从而更早的预测宫颈癌的风险。

配对盒家族基因 1（Paired Box1, PAX1）是一种重要的转录因子，在胚胎发育和组织分化过程中发挥关键作用^[11]。近年来发现 PAX1 在多种

肿瘤中的异常表达与肿瘤发生发展相关,例如,在口腔鳞癌^[12,13]、卵巢癌^[14]、子宫内膜癌^[15]、头颈部鳞状细胞癌^[16]。有研究表明,PAX1 基因甲基化水平在宫颈癌及其癌前病变患者中显著升高^[17],其灵敏度和特异性优于传统的 TCT 和 HPV 检测^[18],因而被认为是一种潜在的宫颈癌早期筛查标志物。

连接粘附分子 3 (Junctional Adhesion Molecule3, JAM3) 基因编码一种跨膜蛋白,主要参与细胞间的粘附和屏障功能^[19]。在多种恶性肿瘤中发现 JAM3 具有调控细胞迁移和侵袭能力的功能,其异常表达与肿瘤的进展和转移密切相关^[20]。例如,JAM3 在乳腺癌、前列腺癌和胃癌中的研究表明,其过度表达与肿瘤的侵袭性和转移潜能增强有关。在宫颈癌研究中,JAM3 基因的甲基化状态也逐渐引起重视。有研究发现,JAM3 甲基化水平在宫颈癌和癌前病变患者中异常升高^[21],提示其在宫颈癌早期发生过程中可能发挥重要作用^[22],具有作为宫颈癌早期筛查标志物的潜力。

本研究进一步探讨 PAX1 和 JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染宫颈病变患者中的表达情况,分析高级别鳞状上皮内病变 (High-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) 患者宫颈锥切术后半年 HPV 转阴与否和 PAX1、JAM3 基因甲基化结果的相关关系,期望为宫颈癌的早期筛查提供新的生物标志物,并为临床应用奠定基础。

材料与方法

1.研究对象

本研究为回顾性研究,经河北医科大学第一医院伦理委员会审核批准 (伦理编号【2024】研审第 (030) 号),收集 2023 年 1 月至 2024 年 6 月所有于河北医科大学第一医院行宫颈活检,且 HPV 高危型感染的患者,共 172 例,调取相关病例资料,获取患者基本信息包括年龄、体重指数 (Body Mass Index, BMI)、避孕方式、是否绝经、有无异常出血、性伴侣人数、HPV 疫苗接种情况、HPV 分型检测结果、TCT 检测结果,根据组织病理结果分为宫颈炎组 40 例、低级别鳞状上皮内病变 (Low-grade

squamous intraepithelial lesion, LSIL) 组 40 例、HSIL 组 73 例、宫颈癌组 19 例。收集患者剩余的 HPV 检测标本,检测宫颈脱落细胞中 PAX1、JAM3 基因甲基化水平,其中两个基因任何一个阳性定为阳性,分析 PAX1、JAM3 基因甲基化在各级宫颈病变患者中的阳性率。利用受试者工作曲线 (Receiver operating characteristic curve, ROC) 评估 PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染患者中诊断 HSIL⁺的效能,比较依据 PAX1、JAM3 基因甲基化检测、TCT 检测对 HR-HPV 感染者转诊至阴道镜检查的阳性率。

HSIL 患者 73 例 (其中 2 例失访) 宫颈锥切术后半年复查 HPV, 根据是否转阴分为 HPV 转阴组和 HPV 未转阴组,分析宫颈锥切术前 PAX1、JAM3 基因甲基化结果与术后 HPV 转阴的关系。

1.1 纳入标准:

- (1) 年龄从 18 岁到 65 岁;
- (2) 有性生活史;
- (3) 经过宫颈组织活检确诊宫颈病变;
- (4) 至少有一项高危型 HPV 感染 (HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型)。

1.2 排除标准:

- (1) 妊娠或哺乳期者;
- (2) 患者检测 HPV 阴性或非高危型感染者;
- (3) 无病理结果者;
- (4) 锥切术后组织病理报告提示切缘阳性者;
- (5) 既往有宫颈病变手术史;
- (6) 合并其他恶性肿瘤, 或放化疗治疗。

2. 实验材料

2.1 实验仪器与设备 (见表 1):

表 1 实验仪器与设备

Table 1 Experimental Instruments and Equipment

仪器名称	公司
-80℃冰箱	海尔集团公司

生物安全柜	济南鑫贝西生物技术有限公司
高速冷冻离心机	德国艾本德公司
旋涡振荡器	美国 SI 仪器公司
迷你离心机	杭州申花科技有限公司
Mini Dry Bath	杭州佑宁仪器有限公司
荧光定量 PCR 仪	杭州佑宁仪器有限公司
移液器及吸头	德国 Eppendorf 公司
200ul 荧光定量 PCR8 联管	上海都友生物科技有限公司
定时定量 PCR 扩增仪	美国伯乐公司

2.2 实验试剂（见表 2）：

表 2 实验试剂

Table 2 Experimental reagents

试剂或耗材名称	公司
无水乙醇	利安隆博华医药化学有限公司
核酸提取或纯化试剂	北京起源聚禾生物科技有限公司
甲基化检测样本前处理试剂盒	北京起源聚禾生物科技有限公司
人 PAX1 和 JAM3 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）	北京起源聚禾生物科技有限公司

3.实验原理

将提取的宫颈脱落细胞 DNA 利用重亚硫酸盐转化，使未发生甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶，而发生甲基化的胞嘧啶则不会发生转变。利用特异性引物结合荧光探针技术，检测 DNA 样本中是否存在发生甲基化的位点。特异性引物能够选择性地扩增发生甲基化的基因，荧光探针在 Taq 酶的作用下水解释放荧光，在实时荧光定量 PCR 仪上进行 DNA 样本的甲基化检测。

4.实验方法与步骤

采用重亚硫酸盐转化技术和荧光定量 PCR 技术检测宫颈脱落细胞中 PAX1 和 JAM3 基因甲基化水平，根据试剂盒说明书操作，具体步骤如下：

4.1 宫颈脱落细胞中提取 DNA

试剂盒：核酸提取或纯化试剂，按照试剂盒指示逐步提取宫颈脱落细胞中的 DNA。

4.1.1 试剂准备

配置结合液 CB 和漂洗液 RW：结合液 CB 4.2 ml/瓶，加入 4.9 ml 无水乙醇；漂洗液 RW 3.36 ml/瓶，加入 15.68 ml 无水乙醇。

4.1.2 宫颈脱落细胞中 DNA 的提取：

- 1) 从-80℃冰箱内取出所需标本，置室内常温解冻。准备多个离心管，将宫颈脱落细胞保存液充分摇匀吸取 2 ml 移入离心管中，将离心机设置为 12000 rpm，将离心管放入离心机内离心 5 min，观察离心管底部可见沉淀的细胞，使用移液器吸出上清液并弃掉。
- 2) 将 300 μ L 裂解液 PL 加入离心管内，振荡至彻底悬浮，再加入 5 μ L Proteinase K 振荡混匀。
- 3) 将恒温箱设置为 65℃、时间为 15 min，将离心管放入其中进行孵育，期间取出颠倒混匀 3 回，每回 3~5 次。
- 4) 再将恒温箱设置为 90℃、时间为 10 min，将离心管放入其中进行孵育，期间取出颠倒混匀 3 回，每回 3~5 次。简短离心以去除管盖内壁的水珠。室温静置 5 min。
- 5) 向每个离心管中加入 350 μ L 无水乙醇，将离心管放在涡旋器上充分振荡混匀 10 s。
- 6) 先将磁珠悬浮液 M 振荡混匀，再向每个离心管内加入 50 μ L 磁珠悬浮液 M，振荡混匀 1 min，静置 9 min。期间每 3 min 振荡混匀 1 min。
- 7) 将离心管放置于磁力架上静置 30 s，磁珠完全吸附后，使用移液器吸出液体并弃掉。
- 8) 将离心管从磁力架上取下，加入 700 μ L 结合液 CB（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），振荡混匀 5min。
- 9) 将离心管放置于磁力架上静置 30 s，磁珠完全吸附后，使用移液器吸出液体并弃掉。
- 10) 将离心管从磁力架上取下，加入 700 μ L 漂洗液 RW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），振荡混匀 2 min。

11) 将离心管放置于磁力架上静置 30 s, 磁珠完全吸附后, 使用移液器吸出液体并弃掉。

12) 重复步骤 10 和 11 一次。

13) 将离心管放置于磁力架上, 室温晾干 10-15 min。(注意: 乙醇残留会抑制后续的酶反应, 所以晾干时要确保乙醇挥发干净, 但也不要干燥太长时间, 以免难以洗脱 DNA。)

14) 将离心管从磁力架上取下, 加入 50-100 μL 洗脱缓冲液 ELB, 振荡混匀, 将恒温箱设置为 56°C、时间为 10 min, 将离心管放入其中进行孵育, 期间每隔 3 s 混匀 1 次。

15) 将离心管放置于磁力架上静置 2 min, 磁珠完全吸附后, 使用移液器小心将 DNA 溶液转移至一个新离心管中。

16) 洗脱后的 DNA: 可以直接用于后续转化或者储存在 -20 \pm 5°C 以备用。长时间保存, 放置于 -80 \pm 5°C。

4.2 重亚硫酸盐转化

1) 使用荧光定量 PCR 仪测定已提取出 DNA 的纯度及浓度, 计算样品 DNA 体积, 体积小于 20 μL 的, 用蒸馏水补充至 20 μL 。在 PCR 管中加入 20 μL 样品, 再加入 130 μL 亚硫酸氢盐转化液 CR, 吹打混匀。具体配制如表 3 所示:

表 3 亚硫酸氢盐反应体系

Table 3 Hydrogen sulfite reaction system

组分	用量
DNA 样品	X μL (最佳 DNA 处理量为 200-1000 ng)
ddH ₂ O	20-X μL (DNA 与 ddH ₂ O 的最大体积为 20 μL)
亚硫酸氢盐转化液 CR	130 μL
Total	150 μL

2) 反应体系配制好以后, 将 PCR 管放置到温度循环变温器中, 进行以下转化程序:

98°C—8 min

54°C—60 min

4°C—最长不要超过 20 h

- 3) 亚硫酸氢盐处理程序结束后, 经过简短离心将管中反应体系转移至干净的 1.5 mL 离心管中。
- 4) 准备多个新的 1.5 mL 离心管, 向其中加入 600 μ L 的 M-binding Buffer 和 10 μ L 的 Mag BindingBeads (加前混匀) (注意磁珠下沉地非常块, 确保在加入时磁珠一直保持悬浮状态)。
- 5) 将样本从 1.5 mL 离心管转移到加入了 M-binding Buffer 和 MagBindingBeads 的新的 1.5 mL 离心管中, 吹打 3-6 次。
- 6) 室温静置 5 min, 然后置于磁力架上吸附 5 min, 直至液体澄清, 使用移液器吸出液体并弃掉。
- 7) 将离心管从磁力架上取下, 加入 400 μ L 的 M-wash Buffer, 吹打混匀使磁珠再次悬浮, 再放回磁力架上 3 min 直至液体澄清, 使用移液器吸出液体并弃掉。
- 8) 将离心管从磁力架上取下, 加入 200 μ L 的 L-Desulphonation Buffer, 吹打混匀使磁珠悬浮, 在室温下 (20-30 $^{\circ}$ C) 静置 15-20 min, 每隔 5 min 颠倒混匀。孵育后, 放回磁力架上 3 min 直至液体澄清, 吸弃废液。(吹打混匀的时间包含在整个孵育过程中, 整个孵育过程不能超过 20-25 min)。
- 9) 将离心管从磁力架上取下, 加入 400 μ L M-wash Buffer, 吹打混匀使磁珠再次悬浮。放回磁力架上 3 min 直至液体澄清, 吸弃废液。重复该步骤一次。
- 10) 将离心管放置于 55 $^{\circ}$ C 金属浴中 20-30 min (开盖) 使磁珠干燥同时去掉 M-washing Buffer。
- 11) 在干燥的磁珠中加入 45 μ L 的 M-Elution Buffer, 吹打混匀至悬浮。在 55 $^{\circ}$ C 下加热 4 min, 然后将离心管放置在磁力架上静止 1 min 直至溶液澄清。将澄清溶液转移至干净的离心管中备用。(注意: 如有磁珠悬浮在溶液里, 轻轻地吹打 1-2 次使之再次吸附在磁力架上。)
- 12) 洗脱后的 DNA: 可以直接使用或者储存在 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C 以备用。长时间保存, 放置于 -80 \pm 5 $^{\circ}$ C。

4.3 PAX1 和 JAM3 基因甲基化检测

4.3.1 PCR 上机试剂配制

4.3.1.1 提前将试剂盒各组分取出，室温融化，漩涡震荡 10 s，2000 rpm 离心 10 s 去除管壁上的液体。

4.3.1.2 待检测数为 n ，所需要配制的反应数 $N = \text{待检测数}(n) + \text{阴性控制}(1) + \text{阳性控制}(1)$ 。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算如下(见表 4)。

表 4 试剂配置体系

Table 4 Reagent Configuration System

试剂	人 PAX1 和 JAM3 甲基化反应液	人 PAX1 和 JAM3 甲基化引探混合液
体积(μL)	$15 \times N$	$5 \times N$

4.3.2 取 1.5 mL 离心管加入人 PAX1 和 JAM3 甲基化反应液 ($15 \times N$) μL ，和人 PAX1 和 JAM3 甲基化引探混合液 ($5 \times N$) μL ，试剂全部加入后漩涡震荡 10 s，2000 rpm 离心 10 s 去除管壁上的液体。

4.3.3 将上述反应液按 20 μL 每管分装到 PCR 反应管中。

4.3.4 加样：将转化完成的 Bis-DNA、阴性质控品和阳性质控品分别加样 5 μL ，然后小心盖上 PCR 反应管的管盖(避免气泡产生)，2000 rpm 离心 10s，然后立即进行 PCR 扩增反应。

4.3.5 PCR 扩增程序设置

按以下表 5 设置仪器扩增相关参数并开始扩增。

表 5 PCR 扩增程序

Table 5 PCR amplification program

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	预变性	96°C	10 min	1
2	变性	94°C	15 s	45
	退火	64°C	5 s	
	延伸、荧光采集	60°C	30 s	
3	仪器冷却	25°C	1 min	1

Target gene P1: FAM channel; Target gene J3: ROS channel; Internal standard: VIC channel (or HEX channel)

4.3.6 质量控制

4.3.6.1 阳性质控品:内标通道与靶基因通道检测均有 S 型扩增曲线且 $25 \leq Ct \text{ 值} \leq 31$ 。

4.3.6.2 阴性质控品:内标通道与靶基因通道检测均无 S 型扩增曲线或检测 Ct 值 >40 。

以上两个条件必须在同一次实验中全部满足, 否则本次实验结果无效。

注:扩增曲线不成标准 S 型曲线, 如无明显对数增长期或者是线性曲线导致扩增曲线与阈值线的交叉, 被认为是阴性结果。

4.4 结果判读

阈值设定:对 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统, 推荐内标通道的阈值为 80, 靶基因 PAX1 的阈值为 110, 靶基因 JAM3 的阈值为 180。由于不同仪器间的差异, 也可根据各基因扩增曲线升起的拐点处为阈值线, 得到各反应管的 Ct 值。

各个反应管 FAM 通道(PAX1)的 Ct 值为 CtP, ROX 通道(JAM3)的 Ct 值为 CtJ, VIC 通道(GAPDH)的 Ct 值为 CtG。ΔCtP 和 ΔCtJ 为相应的靶基因与 CtG 的差值 ($\Delta CtP = CtP - CtG$; $\Delta CtJ = CtJ - CtG$) (见表 6)。

表 6 反应结果的判定

Table 6 Determination of Reaction Results

GAPDH		P1 和 J3 基因可能情况	
阳性	CtG<35	情况 1	P1 基因: $\Delta CtP \leq 6.6$ J3 基因: $\Delta CtJ > 10$
		情况 2	P1 基因: $\Delta CtP > 6.6$ J3 基因: $\Delta CtJ \leq 10$
		情况 3	P1 基因: $\Delta CtP \leq 6.6$ J3 基因: $\Delta CtJ \leq 10$
阴性	CtG<35	情况 1	P1 基因: $\Delta CtP > 6.6$ J3 基因: $\Delta CtJ > 10$
无效	CtG ≥ 35	不予判读	

扩增曲线不成标准 S 型曲线, 如无明显对数增长期或者线性曲线导致扩增曲线与阈值线的交叉, 被认为是无判读; 无判读的 Ct 值默认为 45。

5.统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件对数据结果进行统计学分析,定量资料用 Shapiro—Wilk 检验数据的正态性,定量资料为正态分布的用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)表示,进行独立样本 t 检验或多样本方差分析,偏态分布的用多样本秩和检验,用 M(IQR) 表示,进行 H 检验,定性变量资料采用百分数表示(n%),两组间比较采用卡方检验 (χ^2 检验、校正 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法),诊断效能采用 ROC 曲线进行分析,影响 HPV 转归的相关因素运用二分类 Logistic 回归分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染宫颈病变患者中的表达

1.1 患者的一般临床资料分析

参与研究的患者共 172 例,根据组织病理结果分为宫颈炎组 40 例、LSIL 组 40 例、HSIL 组 73 例、宫颈癌组 19 例。四组患者在年龄、BMI、避孕方式、是否绝经、性伴侣人数无统计学差异(均 $P>0.05$)。

四组患者在异常出血、HPV 疫苗接种、HPV 分型、TCT 检测、PAX1、JAM3 基因甲基化检测存在统计学差异(均 $P<0.05$) (见表 1)。

表 1 患者的一般临床资料分析

Table 1 General Clinical Data Analysis of Patients

	宫颈炎组 (n=40)	LSIL 组 (n=40)	HSIL 组 (n=73)	宫颈癌组 (n=19)	F/H/ χ^2	P
年龄 ($\bar{x}\pm s$) /岁	(38.92 \pm 9.29)	(41.9 \pm 9.85)	(42.38 \pm 9.54)	(48.16 \pm 9.49)	1.47	0.141
BMI (IQR)	22.05 (4.74)	21.47(3.93)	22.31(3.94)	23.71(6.39)	3.33	0.344
避孕方式 n(%)						
避孕套	17 (42.5)	20 (50)	31 (42.5)	3 (15.8)	6.42	0.093
非避孕套	23 (57.5)	20 (50)	42 (57.5)	16 (84.2)		

绝经 n (%)						
是	11 (27.5)	6 (15)	14 (19.2)	8 (42.1)	6.48	0.091
否	29 (72.5)	34(85)	59(80.8)	11 (57.9)		
异常出血 n (%)						
有	6(15)	7 (17.5)	14 (19.2)	9(47.4)	9.30	0.026
无	34 (85)	33 (82.5)	59 (80.8)	10 (52.6)		
性伴侣人数 n (%)						
1 人	26 (65)	23 (57.5)	47 (64.4)	17 (89.5)	6.02	0.11
≥2 人	14 (35)	17 (42.5)	26 (35.6)	2 (10.5)		
HPV 疫苗接种 n (%)						
是	11 (27.5)	17 (42.5)	15 (20.5)	1 (5.3)	11.18	0.011
否	29 (72.5)	23 (57.5)	58 (79.5)	18 (94.7)		
HPV 分型 n (%)						
HPV16/18	15 (37.5)	14 (35)	48 (65.8)	16 (84.2)	21.24	<0.001
非	25 (62.5)	26 (65)	25 (34.2)	3 (15.8)		
HPV16/18						
TCT 检测 n (%)						
阴性	35 (87.5)	18(45)	27(37)	7 (36.8)	29.14	<0.001
≥ASC-US	5 (12.5)	22(55)	46(63)	12 (63.2)		
PAX1、JAM3 基因甲基化 n (%)						
阳性	1 (2.5)	6(15)	22(30.1)	16(84.2)	47.91	<0.001
阴性	39 (97.5)	34(85)	51(69.9)	3 (15.8)		

1.2 PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率与宫颈病变的关系

宫颈炎组 PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率 2.5% (1/40)，LSIL 组 PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率 15.0% (6/40)，HSIL 组 PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率 30.1% (22/73)，宫颈癌组 PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率 84.2% (16/19)，四组患者甲基化阳性率存在着统计差异 ($P<0.001$)。宫颈炎组与 HSIL 组、与宫颈癌组均存在着统计学差异 ($P<0.05$)，与 LSIL 组无统计学差异 ($P>0.05$)；宫颈癌组与宫颈炎组、LSIL 组、HSIL 组均

存在着统计学差异($P < 0.05$); LSIL 组与 HSIL 组无统计学差异($P > 0.05$) (见表 2)。PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率随着宫颈病变程度的加重而递增。

表 2 不同宫颈病变组 PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率的比较

Table 2 Comparison of PAX1 and JAM3 gene methylation positivity rates in different cervical lesion groups

分组	合计 (例)	阳性例 (%)	阴性例 (%)	卡方检验	
				χ^2 值	P 值
宫颈炎组	40	1 (2.5%) #	39 (97.5%)	47.9	<0.001
LSIL 组	40	6 (15.0%) #	34 (85.0%)		
HSIL 组	73	22 (30.1%) *#	51 (69.9%)		
宫颈癌组	19	16 (84.2%) *	3 (15.8%)		

注: *与宫颈炎组相比, 具有统计学差异; #与宫颈癌组相比, 具有统计学差异。

Note: * There is a statistically significant difference compared to the cervicitis group# Compared with the cervical cancer group, there is a statistically significant difference.

1.3 TCT \geq ASC-US 阳性率与宫颈病变的关系

宫颈炎组 TCT \geq ASC-US 阳性率 12.5% (5/40), LSIL 组 TCT \geq ASC-US 阳性率 55.0% (22/40), HSIL 组 TCT \geq ASC-US 阳性率 63.0% (46/73), 宫颈癌组 TCT \geq ASC-US 阳性率 63.2% (12/19), 四组 TCT \geq ASC-US 阳性率存在着统计差异 ($P < 0.001$)。宫颈炎组与 LSIL 组、与 HSIL 组、与宫颈癌组均存在着统计学差异 ($P < 0.05$), LSIL 组、HSIL 组、宫颈癌之间无统计学差异 ($P > 0.05$) (见表 3)。

表 3 不同宫颈病变组 TCT \geq ASC-US 阳性率的比较

Table 3 Comparison of TCT \geq ASC-US positivity rates in different cervical lesion groups

分组	合计 (例)	阳性例 (%)	阴性例 (%)	卡方检验	
				χ^2 值	P 值

宫颈炎组	40	5 (12.5%)	35 (87.5%)		
LSIL 组	40	22 (55.0%) *	18 (45.0%)	29.1	<0.001
HSIL 组	73	46 (63.0%) *	27 (37.0%)		
宫颈癌组	19	12 (63.2%) *	7 (36.8%)		

注：*与宫颈炎组相比，具有统计学差异。

Note: * There is a statistically significant difference compared to the cervicitis group.

1.4 HPV16/18 型阳性率与宫颈病变的关系

宫颈炎组 HPV16/18 型阳性率 37.5% (15/40)，LSIL 组 HPV16/18 型阳性率 35.0% (14/40)，HSIL 组 HPV16/18 型阳性率 65.8% (48/73)，宫颈癌组 HPV16/18 型阳性率 84.2% (16/19)，四组 HPV16/18 型阳性率存在着统计差异 ($P<0.001$)。宫颈炎组与 HSIL 组、与宫颈癌组均存在着统计学差异 ($P<0.05$)；LSIL 组与 HSIL 组、与宫颈癌组均存在着统计学差异 ($P<0.05$)；宫颈炎组与 LSIL 组无统计学差异 ($P>0.05$)；HSIL 组与宫颈癌组无统计学差异 ($P>0.05$) (见表 4)。

表 4 不同宫颈病变组 HPV16/18 型阳性率的比较

Table 4 Comparison of HPV16/18 positivity rates among different cervical lesion groups

分组	合计 (例)	阳性例 (%)	阴性例 (%)	卡方检验	
				χ^2 值	P 值
宫颈炎组	40	15 (37.5%)	25 (62.5%)		
LSIL 组	40	14 (35.0%)	26 (65.0%)	21.2	<0.001
HSIL 组	73	48 (65.8%) *#	25 (34.2%)		
宫颈癌组	19	16 (84.2%) *#	3 (15.8%)		

注：*与宫颈炎组相比，具有统计学差异；#与 LSIL 组相比，具有统计学差异。

Note: * There is a statistically significant difference compared to the cervicitis group# Compared with the LSIL group, there is a statistically significant difference.

1.5 PAX1、JAM3 基因甲基化、TCT 检测在 HR-HPV 感染患者中诊断宫颈 HSIL⁺的效能分析

在 HR-HPV 感染患者中 PAX1、JAM3 基因甲基化诊断宫颈 HSIL⁺的敏感度为 41.30%，特异性为 91.25%，阳性预测值(Positive predictive value, PPV)为 84.44%，阴性预测值(Negative predictive value, NPV)为 57.48%，受试者工作曲线下面积 (Area Under ROC Curve, AUC) 0.71 (见图 1)。

在 HR-HPV 感染患者中 TCT 检测诊断宫颈 HSIL⁺的敏感度为 63.04%，特异性为 66.25%，PPV 为 68.24%，NPV 为 60.92%，AUC 面积 0.65(见图 2)。

PAX1、JAM3 基因甲基化与 TCT 联合检测敏感度为 70.65%，特异性为 60.00%，PPV 为 67.01%，NPV 为 86.67%，AUC 面积 0.66(见图 3)。

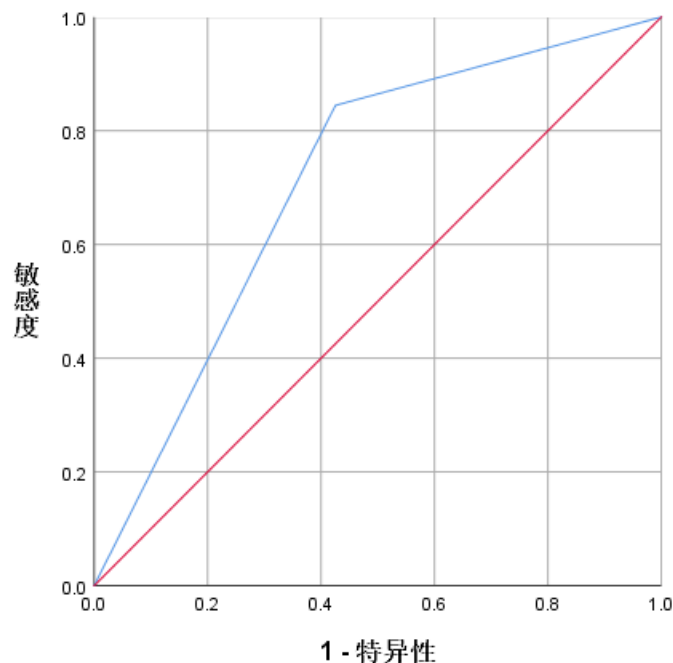


图 1. 基因甲基化检测 ROC 曲线

Fig.1 Figure 1. ROC curve of gene methylation detection

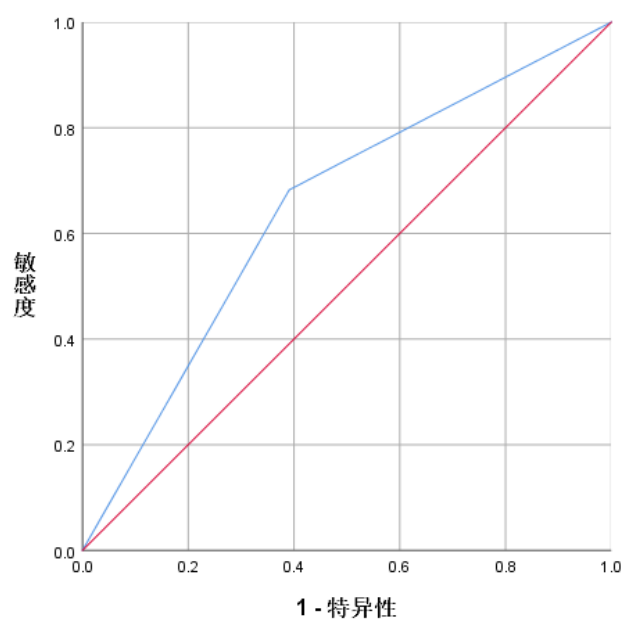


图 2. TCT 检测 ROC 曲线
Fig.2 ROC curve of TCT detect

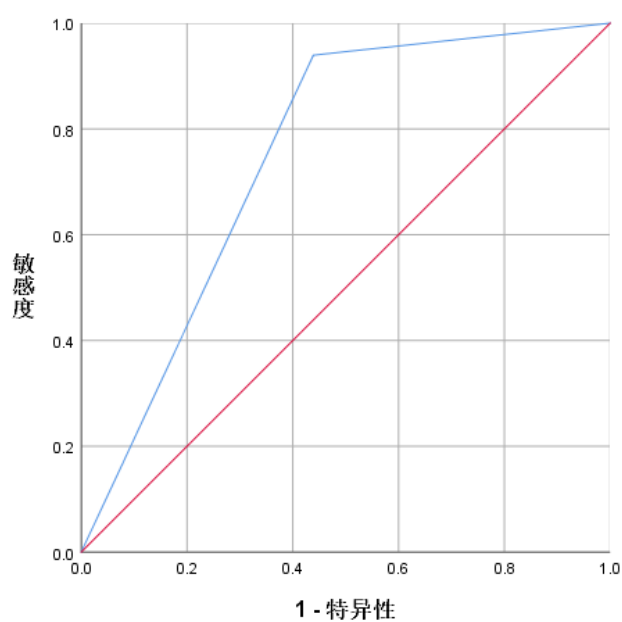


图 3. 基因甲基化联合 TCT 检测 ROC 曲线
Fig.3 ROC curve of gene methylation combined with TCT detection

1.6 PAX1、JAM3 基因甲基化、宫颈 HPV16/18 型检测在 HR-HPV 感染患者中诊断宫颈 HSIL⁺的效能分析

在 HR-HPV 感染患者中 PAX1、JAM3 基因甲基化检测诊断宫颈 HSIL⁺ 的敏感度为 41.30%，特异性为 91.25%，PPV 为 84.44%，NPV 为 57.48%，AUC 面积为 0.71 (见图 1)。

HPV16/18 型检测诊断宫颈 HSIL⁺的敏感度为 69.57%，特异性为 63.75%，PPV 为 68.82%，NPV 为 64.56%，AUC 面积为 0.67。(见图 4)。

PAX1、JAM3 基因甲基化与 HPV16/18 型联合检测敏感度为 80.43%，特异性为 57.50%，PPV 为 67.52%，NPV 为 71.88%，AUC 面积 0.70(见图 5)。

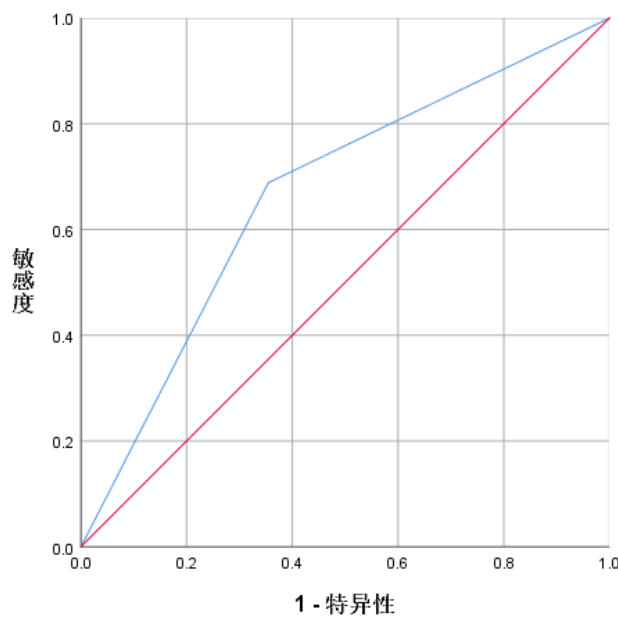


图4. HPV16/18型检测ROC曲线

Fig.4 ROC curve for HPV16/18 type detection

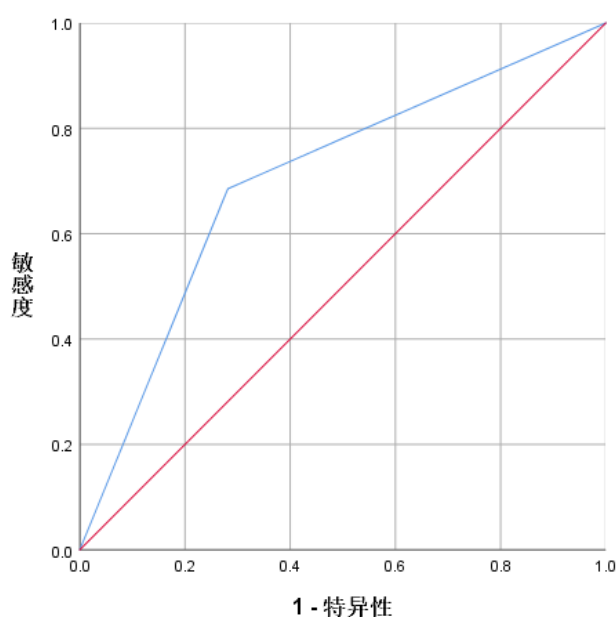


图5. 基因甲基化联合HPV16/18检测ROC曲线

Fig.5 Gene methylation combined with HPV16/18 detection ROC curve

1.7 PAX1、JAM3 基因甲基化检测及 TCT 检测在各级宫颈病变中阴道镜转诊阳性率的影响

宫颈炎组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化检测进行分流时阴道镜转诊阳性率为 2.5% (1/40)，比依据 TCT 检测阴道镜转诊阳性率 (12.5%) 减少 10%；

LSIL 组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化检测进行分流时阴道镜转诊阳性率为 15% (6/40)，比依据 TCT 检测阴道镜转诊阳性率 (55%) 减少 40%；

HSIL 组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化检测进行分流时阴道镜转诊阳性率为 30.14% (22/73)，比依据 TCT 检测阴道镜转诊阳性率 (63.01%) 减少 32.87%；

宫颈癌组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化检测进行分流时阴道镜转诊阳性率为 84.21% (16/19)，比依据 TCT 检测阴道镜转诊阳性率 (63.16%) 提高了 21.05% (见表 5)。

表 5 不同检测方法阴道镜转诊阳性率的比较

Table 5 Comparison of positive rates of vaginal colposcopy referral using different detection met

阴道镜转诊阳性率	PAX1、JAM3 基因甲基化阳性 (%)	TCT \geq ASC-US
宫颈炎组	2.5% (1/40)	12.5% (5/40)
LSIL 组	15% (6/40)	55% (22/40)
HSIL 组	30.14% (22/73)	63.01 (46/73)
宫颈癌组	84.21 (16/19)	63.16 (12/19)

2. HSIL 患者宫颈宫颈锥切术后半年 HPV 转阴情况分析

2.1 一般临床资料分析

HSIL 患者 73 例（其中 2 例失访）均行宫颈锥切术，术后半年检测 HPV，根据是否转阴分为 HPV 转阴组和 HPV 未转阴组，宫颈 HPV 转阴率 57.7% (41/71)，未转阴率 42.3% (30/71)。两组患者在 BMI、避孕方式、异常出血、性伴侣人数、HPV 疫苗接种无统计学差异（均 $P>0.05$ ）。两组患者在年龄、绝经与否、TCT 检测、HPV 分型、PAX1、JAM3 基因甲基化有统计学差异（均 $P<0.05$ ）（见表 6）。

表 6 HSIL 患者一般资料分析

Table 6 General information analysis of HSIL patients

	转阴组 (n=41)	未转阴组 (n=30)	t/z/ χ^2	P
年龄 ($\bar{x}\pm s$) /岁	(37.1 \pm 9.74)	(42.13 \pm 10.85)	2.05	0.044
BMI M (IQR)	22.76 (3.91)	22.01 (4.0)	0.02	0.981
避孕方式 n(%)				
避孕套	18(43.9)	14 (46.7)		
非避孕套	23 (56.1)	16 (53.3)	0.05	0.817
绝经 n(%)				
是	4 (9.8)	9 (30.0)		
否	37 (90.2)	21 (70)	4.75	0.029
异常出血 n(%)				
有	7(17.1)	7(23.3)		

无	34 (82.9)	23 (76.7)	0.43	0.513
性伴侣人数 n(%)				
1 人	25 (61.0)	20 (66.7)		
≥2 人	16 (39.0)	10 (33.3)	0.24	0.623
HPV 疫苗接种 n(%)				
是	10(24.4)	5 (16.7)		
否	31 (75.6)	25 (83.3)	0.62	0.431
HPV 分型 n (%)				
HPV16/18	21 (51.2)	25 (83.3)		
非 HPV16/18	20 (48.8)	5 (16.7)	7.83	0.005
TCT 检测 n (%)				
阴性	21 (51.2)	5 (16.7)		
≥ASC-US	20 (48.8)	25 (83.3)	8.91	0.003
PAX1、JAM3 基因甲基化 n(%)				
阳性	7 (17.1)	15 (50.0)		
阴性	34 (82.9)	15 (50.0)	8.78	0.003

2.2 HSIL 患者术后 HPV 转阴的二分类 Logistic 回归分析

纳入年龄、绝经与否、HPV 分型、TCT 检测、PAX1、JAM3 基因甲基化构建二分类 Logistic 回归。结果发现：HPV16/18 型对 HPV 转阴具有统计学意义 (OR=5.59, 95%CI 1.37-22.77, $P=0.016$)；HPV16/18 阳性较非 HPV16/18 阳性者 HPV 未转阴发生的风险将近提升 4.59 倍，HPV16/18 阳性是 HPV 未转阴的高危因素（见表 7）。

PAX1、JAM3 基因甲基化阳性对 HPV 转阴具有统计学意义 (OR=4.93, 95%CI 1.13-21.56, $P=0.034$)；PAX1、JAM3 基因甲基化阳性较甲基化阴性者 HPV 未转阴发生的风险将近提升 3.93 倍，PAX1、JAM3 基因甲基化阳性是 HPV 未转阴的高危因素（见表 7）。

年龄、绝经与否、TCT 检测结果对 HPV 转阴无统计学意义 ($P>0.05$)。（见表 7）。

表 7 HSIL 患者术后 HPV 转阴的二分类 Logistic 回归分析

Table 7 Binary logistic regression analysis of HPV seroconversion in HSIL patients after surgery

变量	b 值	b 值标准误差	Wald 卡方值	P 值	OR 值	OR 值的 95%CI	
						下限	上限
年龄	0.01	0.05	0.05	0.831	0.99	0.90	1.09
绝经情况							
是							
否*	0.98	1.20	0.67	0.414	2.66	0.25	27.79
HPV 分型							
HPV16/18							
非 HPV16/18*	1.72	0.72	5.77	0.016	5.59	1.37	22.77
TCT 检测结果							
阴性*							
≥ASC-US	1.15	0.67	2.99	0.084	3.16	0.86	11.62
PAX1、JAM3 基因甲基化							
阳性							
阴性*	1.60	0.75	4.49	0.034	4.93	1.13	21.56

*对照组

*Control group

讨 论

1. 宫颈病变筛查现状与挑战

宫颈癌是全球第四大最常见的妇科癌症，发病率和死亡率极高^[1]。尽管全球近 90% 的宫颈癌发生在发展中国家，但据报道，这些国家女性的筛查率通常明显低于发达国家^[23]。传统的宫颈癌筛查方法，如宫颈细胞学检查（如巴氏涂片和薄层液基细胞学检查, TCT）和 HR-HPV 检测^[24]，TCT 展现出明显的优势，它能够显著降低不满意制片的比例，特异性较高，但敏感度相对较低，可能存在一定的漏检风险^[25]。HR-HPV 的持续感染是导

致宫颈病变的主要原因。HPV 检测敏感度高,能够更早发现潜在病变,但其特异性较差。大多数 HPV 感染是暂时的,只有少部分感染会持续存在,进而引发致癌过程。HPV 检测的高敏感度导致阴道镜的转诊率增加^[26];对于有生育要求的 HSIL 患者行宫颈环形电切术或宫颈锥切术对宫颈机能的影响,增加早产、流产的风险。因此,寻找更加准确、高效的筛查标志物和方法,对于提高宫颈癌的早期诊断率和降低死亡率具有重要意义。宫颈癌的发生还受到遗传和表观遗传修饰的影响^[26]。DNA 甲基化是宫颈癌常见的表观遗传改变^[27],通常与基因的表达沉默有关^[28],且随疾病的严重程度而增加。在宫颈癌的进程中,甲基化的积累与癌前病变向浸润性癌的发展密切相关,分析 DNA 甲基化有望为宫颈癌的筛查和风险评估提供更准确、更有效的手段,对监测高危人群具有重要的临床价值^[29,30]。

2. PAX1 和 JAM3 基因甲基化与宫颈病变的关系

PAX1 和 JAM3 基因在宫颈癌的发生和发展中扮演着重要角色^[31]。PAX1 基因属于配对盒家族,其甲基化水平与子宫颈上皮内瘤变(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌的病变级别高度相关^[32]。JAM3 基因则是一种紧密连接蛋白,与肿瘤细胞的迁移和侵袭能力密切相关^[33]。本研究将所有受检者依据病理结果分为宫颈炎组、LSIL 组、HSIL 组及宫颈癌组,利用重亚硫酸盐转化技术和荧光定量 PCR 技术检测宫颈脱落细胞中 PAX1 和 JAM3 基因甲基化水平,结果显示宫颈炎组、LSIL 组、HSIL 组、宫颈癌组中 PAX1 和 JAM3 基因甲基化阳性率分别为 2.5%、15%、30.1%、84.2%。结果表明宫颈病变严重程度越高, PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率越高。通过 ROC 曲线分析和效能评价,发现 PAX1、JAM3 基因甲基化诊断宫颈 HSIL⁺的特异性(91.25%)、PPV (84.44%)及 AUC (0.71)均高于 TCT 检测(66.25%、68.24%、0.65)和 HPV16/18 检测(63.75%、68.82%、0.67),当甲基化与 TCT 联合检测时,诊断宫颈 HSIL⁺的敏感度为 70.65%,甲基化与 HPV16/18 型联合检测时,诊断宫颈 HSIL⁺的敏感度为 80.43%,具有一定临床指导意义。PAX1、JAM3 基因甲基化检测较 TCT、HPV16/18 检测具有更高的特异性。多项研究对此进行了验证,程媛等^[34]研究表明, PAX1 在宫颈癌组织中的甲基化频率非常高,且随病情的演变呈现明显的上升趋势。PAX1 甲基化检测与 HPV 检测相比

具有更高的敏感度和特异性。Xu J,^[35]等在 121 例患者的宫颈脱落细胞中检测了 PAX1 的甲基化水平, PAX1 甲基化检测宫颈癌的灵敏度和特异性分别是 80% 和 93%, 优于 HPV DNA 检测。Gu Y, 等^[36]的研究表明 JAM3 和 EPB41L3 甲基化检测在 ASCUS、LSIL 和 HSIL 中的灵敏度分别为 8.3%、15.6% 和 85.7%。JAM3 和 EPB41L3 甲基化检测联合的特异性为 100%。在宫颈鳞状细胞癌中检测到高甲基化下调 JAM3 和 EPB41L3。本研究 PAX1、JAM3 基因甲基化检测在诊断宫颈 HSIL⁺方面具有较高的特异性和 PPV, 但敏感度相对较低。这可能与本研究纳入的样本量有限以及不同宫颈病变阶段甲基化水平的差异有关。

本研究显示宫颈炎组、LSIL 组、HSIL 组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化进行分流时阴道镜转诊阳性率为 2.5%、15%、30.14%, 较依据 TCT 检测阴道镜转诊阳性率 12.5%、55%、63.1% 下降了 10%、40%、32.87%。而宫颈癌组依据 PAX1、JAM3 基因甲基化进行分流时阴道镜转诊阳性率为 84.21%, 较依据 TCT 检测阴道镜转诊阳性率 63.16% 升高了 21.05%。在 HR-HPV 感染宫颈病变患者中依据 PAX1、JAM3 基因甲基化转诊至阴道镜检查可能优于 TCT 检测。多项研究对此进行了验证, Chen X 等^[33]研究表明, 在非 16/18 HR-HPV (+) 女性中, PAX1/JAM3 在检测 CIN3⁺方面优于细胞学检查, 具有良好的诊断敏感度和特异性, 并显著减少了阴道镜检查的转诊。Chan KKL 等^[37]研究表明, 细胞学和 PAX1 之间阴道镜检查检测到一个病灶的转诊次数相似 (2.1 vs. 2.0), 但 HPV16/18 更高 (每个病灶 3.2 次阴道镜检查)。梁婷婷等^[38]的研究表明 PAX1 甲基化程度与宫颈高级别上皮内病变及感染的 HPV 型别有关联, PAX1 甲基化检测有助于早期识别 CIN3⁺及 ASC-US 中的宫颈高级别病变, 帮助 ASC-US 的分流、减少阴道镜的转诊率。本研究表明依据 PAX1、JAM3 基因甲基化转诊阴道镜检查, 宫颈癌检出率明显高于 TCT 检测, 宫颈炎组、LSIL 组可明显减少阴道镜转诊率, 但 HSIL 检出率低于 TCT 检测, 不排除宫颈病变漏诊可能。

HR-HPV 感染的持续存在与宫颈病变的复发及癌症的发生有着密切的联系。研究发现, 锥切术前 HPV 阳性的患者锥切术后复发率要高于术前 HPV 阴性患者 (21.4% vs 1.3%, $P < 0.05$)^[39]。PAX1 和 JAM3 基因甲基

化检测还可以用于宫颈癌的预后评估和治疗监测。研究表明,这些基因的甲基化状态与宫颈病变的进展和复发密切相关^[40]。本研究选取 HSIL 患者 73 例(其中 2 例失访)均行宫颈锥切术,术后半年检测 HPV,根据是否转阴分为 HPV 转阴组和 HPV 未转阴组,两组进行单因素关联性分析,发现在年龄、绝经与否、TCT \geq ASC-US、HPV 分型、PAX1、JAM3 基因甲基化有统计学差异(均 $P<0.05$),纳入关联性有统计学意义的自变量构建二分类 Logistic 回归分析,HPV16/18 型、PAX1、JAM3 基因甲基化阳性对 HPV 转阴具有统计学意义。研究发现 HPV 未转阴组的甲基化阳性率明显高于转阴组,提示 PAX1、JAM3 基因甲基化可能成为预测 HPV 转归的标志物。PAX1、JAM3 基因甲基化阳性、HPV16/18 阳性是 HPV 未转阴的高危因素。探讨并找寻出影响术后 HPV 转归的相关高危因素可能对于治疗的指导及预后的判断更加重要。

3. 研究的局限性和未来展望

尽管本研究在 PAX1、JAM3 基因甲基化与宫颈病变的关系方面取得了一些初步成果,但仍存在一定的局限性。首先,本研究纳入的样本量有限,可能导致结果的偏倚和不确定性。未来需要进一步扩大样本量并进行多中心研究以验证本研究的结论。其次,本研究主要关注了 PAX1、JAM3 两个基因的甲基化状态与宫颈病变的关系,而宫颈癌的发生和发展是一个多因素、多步骤的复杂过程,涉及多个基因的异常表达和相互作用。因此,未来需要更加全面地研究宫颈癌相关基因的甲基化状态及其与疾病的关系,以构建更加准确、全面的宫颈癌筛查和预后评估体系。最后,本研究尚未对 PAX1、JAM3 基因甲基化检测的具体方法和操作规范进行深入探讨和优化。未来需要进一步完善这些检测技术的标准化和规范化流程,以确保其在临床应用中的准确性和可靠性。

综上所述,PAX1、JAM3 基因甲基化作为宫颈病变筛查的生物标志物具有广阔的应用前景。本研究通过对比不同宫颈病变患者的 PAX1、JAM3 基因甲基化水平,初步验证了这些基因在宫颈癌筛查中的价值。然而,未来仍需要进一步深入研究这些基因的甲基化状态与宫颈病变的具体关系及其在临床应用中的优势。

结 论

1. 宫颈病变严重程度越高，PAX1、JAM3 基因甲基化阳性率也越高。
2. PAX1、JAM3 基因甲基化在 HR-HPV 感染患者中诊断 HSIL⁺ 的效能优于 TCT 检测及 HPV16/18 检测。
3. 在 HR-HPV 感染宫颈病变患者中依据 PAX1、JAM3 基因甲基化转诊至阴道镜检查可能优于 TCT 检测。
4. 宫颈锥切术后 HPV 未转阴组的甲基化阳性率明显高于转阴组，提示 PAX1、JAM3 基因甲基化可能成为预测 HPV 转归的标志物；PAX1、JAM3 基因甲基化阳性、HPV16/18 阳性是 HPV 未转阴的高危因素。

参考文献

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J] . CA Cancer J Clin, 2024,74(3): 229-263.
2. 姚一菲, 孙可欣, 郑荣寿, 等. 《2022 全球癌症统计报告》解读: 中国与全球对比[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2024, 31(7): 769-780.
3. 卢雪荣, 王甜甜, 刘玉珍, 等. 预测宫颈病变进展风险的相关性因素分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(5): 461-463.
4. Rahangdale L, Mungo C, O'Connor S, et al. Human papillomavirus vaccination and cervical cancer risk [J] . BMJ, 2022 ,12(15): 2901-2913.
5. Allanson ER, Schmeler KM. Preventing Cervical Cancer Globally: Are We Making Progress? [J] . Cancer Prev Res (Phila), 2021,14(12): 1055-1060.
6. 杨磊, 刘德佩, 王芳芳, 等. 高危型人乳头瘤病毒分型和液基薄层细胞学检查在宫颈癌前病变和宫颈癌筛查中的应用价值[J]. 临床与病理杂志, 2023, 43 (6): 1150-1156.
7. Narkcham S, Mody DR, Jones A, et al. Rescreening of high-risk HPV positive Papanicolaou tests initially screened as negative is a low yield procedure in the era of HPV genotyping [J] . J Am Soc Cytopathol, 2021, 10 (6) : 558-564.
8. Koliopoulos G, Nyaga V N, Santesso N, et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 8(8): Cd008587.
9. Chang CL, Ho SC, Su YF, et al. DNA methylation marker for the triage of hrHPV positive women in cervical cancer screening: Real-world evidence in Taiwan [J] . Gynecol Oncol, 2021, 161(2): 429-435.
10. Vink FJ, Lissenberg-Witte BI, Meijer CJLM, et al. FAM19A4/miR124-2 methylation analysis as a triage test for HPV-positive women: cross-sectional and longitudinal data from a Dutch screening cohort [J] . Clin Microbiol Infect, 2021, 27(1): 125.e1-125.e6.

11. 王秀, 王蔚, 王义权, 等. Pax 基因功能及其选择性剪接的研究进展[J]. 生命科学, 2008, (1): 125-130.
12. Cheng SJ, Chang CF, Ko HH, et al. Hypermethylated ZNF582 and PAX1 genes in mouth rinse samples as biomarkers for oral dysplasia and oral cancer detection[J]. Head Neck, 2018, 40(2): 355-368.
13. Huang YK, Peng BY, Wu CY, et al. DNA methylation of PAX1 as a biomarker for oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Oral Investig, 2014, 18(3): 801-808.
14. Hassan ZK, Hafez MM, Kamel MM, et al. Human Papillomavirus Genotypes and Methylation of CADM1, PAX1, MAL and ADCYAP1 Genes in Epithelial Ovarian Cancer Patients[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(1): 169-176.
15. Liu LC, Lai HC, Chou YC, et al. Paired boxed gene 1 expression: A single potential biomarker for differentiating endometrial lesions associated with favorable outcomes in patients with endometrial carcinoma[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2016, 42(9):1159-1167.
16. Guerrero-Preston R, Michailidi C, Marchionni L, et al. Key tumor suppressor genes inactivated by "greater promoter" methylation and somatic mutations in head and neck cancer[J]. Epigenetics, 2014, 9(7): 1031-1046.
17. Kan YY, Liou YL, Wang HJ, et al. PAX1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening[J]. Int J Gynecol Cancer, 2014, 24(5):928-934.
18. 李碧军, 郭瑞霞, 刘媛媛, 等. PAX1 甲基化检测对细胞学异常(ASCUS、LSIL 和 ASC-H)患者的分流作用[J]. 现代妇产科进展, 2021, 30(3): 184-188.
19. Lauko A, Mu Z, Gutmann DH, et al. Junctional Adhesion Molecules in Cancer: A Paradigm for the Diverse Functions of Cell-Cell Interactions in Tumor Progression[J]. Cancer Res, 2020, 80(22):4878-4885.

20. Peng J, Chen Y, Yin A. JAM3 promotes cervical cancer metastasis by activating the HIF-1 α /VEGFA pathway[J]. BMC Womens Health, 2024, 24(1):293.
21. van Leeuwen RW, Oštrbenk A, Poljak M, et al. DNA methylation markers as a triage test for identification of cervical lesions in a high risk human papillomavirus positive screening cohort[J]. Int J Cancer, 2019, 144(4):746-754.
22. Li N, Hu Y, Zhang X, et al. DNA methylation markers as triage test for the early identification of cervical lesions in a Chinese population[J]. Int J Cancer, 2021, 148(7):1768-1777.
23. Denny L, de Sanjose S, Mutebi M, et al. Interventions to close the divide for women with breast and cervical cancer between low-income and middle-income countries and high-income countries[J]. Lancet, 2017, 389(10071): 861-870.
24. MacLaughlin KL, Jacobson RM, Radecki Breitkopf C, et al. Trends Over Time in Pap and Pap-HPV Cotesting for Cervical Cancer Screening[J]. J Womens Health (Larchmt), 2019, 28(2): 244-249.
25. Nkwabong E, Laure Bessi Badjan I, Sando Z. Pap smear accuracy for the diagnosis of cervical precancerous lesions[J]. Trop Doct, 2019, 49(1): 34-39.
26. Steenbergen R D, Snijders P J, Heideman D A, et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(6):395-405.
27. Feng C, Dong J, Chang W, et al. The Progress of Methylation Regulation in Gene Expression of Cervical Cancer[J]. Int J Genomics. 2018, 52(6):60-82.
28. 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.

29. de Waard J, Bhattacharya A, de Boer MT, et al. Identification of a methylation panel as an alternative triage to detect CIN3⁺ in hrHPV-positive self-samples from the population-based cervical cancer screening programme[J]. Clin Epigenetics, 2023, 15(1):103.
30. Kelly H, Benavente Y, Pavon MA, et al. Performance of DNA methylation assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2⁺): a systematic review and meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2019, 121(11): 954-965.
31. Li X, He S, Zhao X, et al. High-grade cervical lesions diagnosed by JAM3/PAX1 methylation in high-risk human papillomavirus-infected patients[J]. Zhong nan da xue xue bao, Yi xue ban Journal of Central South University. Medical Sciences, 2023, 48(12): 1820-1829.
32. Shang X, Kong L H, Xiao X P, et al. A multicenter study on the accuracy of PAX1/JAM3 dual genes methylation testing for screening cervical cancer[J]. Zhonghua yi xue za zhi, 2024, 104(20): 1852-1859.
33. Chen X, Jin X, Kong L, et al. Triage performance of PAX1 m/JAM3 m in opportunistic cervical cancer screening of non-16/18 human papillomavirus-positive women: a multicenter prospective study in China[J]. Clinical Epigenetics, 2024, 16(1): 108.
34. 程媛, 魏丽惠, 王建六, 等. PAX1 基因及其甲基化在宫颈癌作用的分子机制研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(11): 823-825.
35. Xu J, Xu L, Yang B, et al. Assessing methylation status of PAX1 in cervical scrapings, as a novel diagnostic and predictive biomarker, was closely related to screen cervical cancer [J] . Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1674—1681.
36. Gu Y, Chu C, Yuan B, et al. Expression and hypermethylation of JAM and EPB41L3 in cervical squamous cell carcinoma: Clinical significance and applications[J]. Histol Histopathol, 2024, 39(8):1043-1051.
37. Chan KKL, Liu SS, Lau LSK, et al. PAX1/SOX1 DNA Methylation Versus Cytology and HPV16/18 Genotyping for the Triage of High-Risk HPV-

- Positive Women in Cervical Cancer Screening: Retrospective Analysis of Archival Samples[J]. BJOG, 2024,2(6) : 606-671.
38. 梁婷婷, 杨勇霞, 侯丛哲, 等. PAX1 基因甲基化与宫颈高级别上皮内病变及高危型 HPV 分型的关联性[J]. 山东大学学报(医学版), 2021, 59(11): 48-52.
39. Kamio M, Yanazume S, Togami S, et al. Association Between Positive Human Papillomavirus Status After Conization and Disease Recurrence in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 [J]. J Obstet Gynaecol India, 2021, 71(1): 66-71.
40. 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]. Journal of Central South University Medical Sciences, 2023, 48(12): 182-187.

综述

DNA 甲基化在宫颈病变筛查中的研究

宫颈癌是女性生殖系统中常见的恶性肿瘤之一,对全球女性健康造成重大威胁,其发病率和死亡率在女性恶性肿瘤中居高不下,尤其在一些发展中国家,由于医疗资源有限和筛查普及率不高,宫颈癌的发病率更是居高不下^[1-2]。宫颈癌的发展通常与 HR-HPV 的持续感染密切相关,这一病毒通过性行为传播,广泛存在于人群中。长期持续的 HR-HPV 感染可导致宫颈上皮内瘤变,进而可能发展为浸润性宫颈癌,严重威胁女性的生命健康。

宫颈病变筛查在宫颈癌的防治中占据关键位置,通过早期发现并及时干预,可以显著减少宫颈癌的发病率和死亡率。然而,传统的筛查方法,如 TCT 和高危型 HPV 检测,虽然在一定程度上有效,但仍存在局限性^[3-4]。TCT 检查通过显微镜观察宫颈脱落细胞的形态变化,以发现异常细胞,其特异性较高,但敏感度相对较低。导致 TCT 检查遗漏一些早期病变,导致漏诊。此外, TCT 检查的结果还可能受到操作条件、技术水平和判断差异等人为因素的影响,进一步降低了其准确性。相比之下,高危型 HPV 检测具有较高的敏感度,能够有效地识别出 HPV 感染者。然而, HPV 感染在人群中普遍存在,而只有少数感染者会发展成宫颈高级别病变或浸润性癌症。这导致阴道镜检查的转诊率增加。此外, HPV 检测的特异性不足和较高的假阳性率也是其局限性之一,可能导致患者产生不必要的恐慌和焦虑。

鉴于传统筛查方法的局限性,研究人员一直在探索更为准确、有效的筛查方法。近年来, DNA 甲基化作为新型筛查方法的研究背景逐渐受到关注。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学现象,通过改变基因的表达水平而不影响其序列,参与调节细胞的增殖、分化及凋亡等生命过程^[5]。在肿瘤的发生和发展过程中, DNA 甲基化扮演着重要角色。研究发现,启动子区域 CpG 岛的异常高度甲基化可导致肿瘤抑制基因的表达沉默,

进而引发细胞异常增殖，最终可能导致宫颈癌的发生。这一发现为宫颈癌的早期筛查提供了新的视角^[6-7]。与 TCT 检测和 HPV 检测相比，DNA 甲基化检测能够提高检测结果的准确性，并增强组织病理学诊断的可靠性。通过检测特定基因的甲基化状态，可以更准确地识别不同级别的宫颈病变，为临床医生制定合理的治疗方案提供有力支持。此外，DNA 甲基化检测还具有操作简便、重复性好、结果稳定等优点。这使得其在宫颈癌的筛查、异常结果的管理以及术后监测中具有广阔的应用前景。通过结合多种检测方法形成综合性筛查策略，可能进一步提高宫颈癌的早期检出率，并为患者提供精准治疗方案。随着分子生物学技术的不断发展，DNA 甲基化及其他分子标志物的研究降低宫颈癌发病率和死亡率。

一、DNA 甲基化研究背景

宫颈癌作为女性健康的重大威胁，其发展与 HR-HPV 的持续感染密切相关，且疾病的演变通常需要很长时间。因此，早期的识别和干预对于降低宫颈癌的发病率极其关键。为了应对这一挑战，科研人员不断探索新的筛查和诊断方法，其中 DNA 甲基化作为一种新型的生物标志物，近年来在宫颈病变筛查中展现出了显著潜力。

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学现象，它通过在 DNA 分子上添加甲基基团来调控基因的表达^[8]。具体而言，DNA 甲基化是指 DNA 甲基转移酶以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体，将甲基转移到胞嘧啶碱基的 5' 碳原子上，形成 5'-甲基胞嘧啶^[9]。这一过程通常发生在胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤（CpG）二核苷酸序列富集的 CpG 岛上，对基因的表达产生深远影响。在肿瘤的发生和发展过程中，DNA 甲基化扮演着重要角色。研究发现，启动子区域 CpG 岛的异常高度甲基化会导致肿瘤抑制基因的表达沉默，进而引发细胞的异常增殖和癌变^[10]。这种甲基化改变不仅影响了基因的正常功能，还为肿瘤细胞的生长和转移提供了有利条件。因此，DNA 甲基化是肿瘤发生、发展的一个重要标志。在宫颈病变中，DNA 甲基化同样展现出了其作为生物标志物的巨大潜力。与传统的宫颈筛查方法比较，DNA 甲基化检测显示出更高的准确性和特异性。它能够识别出那些传统方法难以检测的早期病变，为患者提供更加及时和有效的治疗。此外，

DNA 甲基化检测还有助于减少不必要的阴道镜转诊和过度治疗，从而减轻患者的经济和心理负担。

近年来，随着对 DNA 甲基化研究的不断深入，越来越多的甲基化标志物被发现与宫颈病变密切相关。例如^[11-14]，性别决定区域 Y 盒 1(SOX1)、细胞黏附分子 1(CADM1)、锌指蛋白 582(ZNF582)以及具有序列相似性的 19 家族成员 A4(FAM19A4)等基因，在宫颈病变中的甲基化状态均发生了显著变化。这些变化不仅与病变的严重程度密切相关，还为临床诊断和治疗提供了新的视角和依据。SOX1 作为一种重要的转录调控因子，在宫颈癌的研究中展现出了显著的肿瘤抑制功能。其甲基化状态与宫颈细胞学检查结合使用时，能够显著提高检测的特异性。CADM1 则主要参与上皮细胞之间的黏附，并具有促进细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的功能。随着宫颈病变严重程度的增加，CADM1 的甲基化水平也逐渐上升。ZNF582 和 FAM19A4 同样在宫颈病变中展现出了异常的甲基化状态，且这些变化与病变的进展和癌变风险密切相关。

二、用于宫颈筛查的甲基化指标

甲基化指标在宫颈病变筛查中扮演着重要角色。这些指标不仅为我们提供了评估宫颈病变风险的新视角，还为提高宫颈癌的早期检出率带来了新的希望。目前已知可以预测宫颈病变的宿主细胞甲基化相关基因包括 SOX1、CADM1、ZNF582 以及 FAM19A4 等。

性别决定区域 Y 盒 1(SOX1)是一种重要的转录调控因子，在胚胎发育和细胞存亡中发挥着关键作用，并具有肿瘤抑制的功能。近年来，研究发现 SOX1 基因的甲基化状态与宫颈病变的发生、发展密切相关。在宫颈癌的研究中，SOX1 的甲基化检测展现出了显著的临床价值^[15, 16]。具体而言，SOX1 基因的甲基化水平随着宫颈病变严重程度的增加而逐渐升高，高甲基化状态被认为是宫颈高级别病变的独立预测因子。此外，SOX1 基因的甲基化检测与宫颈细胞学检查结合使用时，其特异性显著高于传统的 HPV 检测。这一发现使得 SOX1 基因的甲基化状态成为一种具有潜力的生物标志物，尤其适用于宫颈鳞癌和 CIN3⁺患者的筛查^[17]。

细胞黏附分子 1(CADM1)是一种重要的跨膜蛋白，主要参与上皮细胞之间的黏附，并具有促进细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的功能。CADM1

的基因表达缺失与多种肿瘤的发生和转移密切相关,而这种表达缺失主要是由于其过甲基化现象所致。随着宫颈病变严重程度的增加,CADM1的甲基化水平也逐渐上升,提示CADM1可能在宫颈病变的发生和发展过程中发挥了重要作用^[18]。此外,CADM1的甲基化状态在区分高级别鳞状上皮内病变(HSIL)与低度病变(\leq LSIL)时显示出较高的诊断效能^[19]。因此,CADM1基因的甲基化状态有望成为宫颈病变筛查和诊断的潜在生物标志物。

锌指蛋白582(ZNF582)在细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物过程中扮演着重要角色,这些功能使得ZNF582在肿瘤的发生与发展中具有显著的影响。研究表明,ZNF582的甲基化水平在正常宫颈组织、低级别鳞状上皮内病变、高级别鳞状上皮内病变以及宫颈癌组织中存在显著差异^[20]。随着病变级别的提高,ZNF582的甲基化程度逐渐增加,这一发现提示ZNF582的甲基化状态可能与宫颈病变的严重程度密切相关^[21]。ZNF582甲基化检测在宫颈癌的筛查中具有重要应用价值,尤其是在HR-HPV阳性和细胞学检查异常的患者中,能够提供有效的分流策略。此外,ZNF582甲基化检测与HR-HPV检测联合使用时,可进一步提高宫颈癌筛查的准确性。

具有序列相似性的19家族成员A4(FAM19A4)是一个编码小分泌蛋白的基因,具有趋化因子和免疫调节功能。研究表明,FAM19A4基因的甲基化状态与宫颈病变的进展及癌变风险密切相关^[22]。在低级别鳞状上皮内病变(LSIL)和高级别鳞状上皮内病变(HSIL)患者中,FAM19A4的甲基化比例逐渐升高,而在宫颈癌患者中,这一比例高达100%。FAM19A4的甲基化检测在临床上具有重要的价值,其阳性检出率在宫颈癌患者中显著高于正常宫颈组织。此外,FAM19A4的甲基化水平随着宫颈病变的进展而增加,可能在子宫颈癌的发展中起到促进作用。ROC曲线分析显示,FAM19A4在鉴别HSIL及宫颈癌时显示出较高的诊断价值。

尽管这些甲基化指标在宫颈病变筛查中展现出了巨大的潜力,但它们的研究现状仍面临一些挑战。例如,不同研究之间的结果存在一定的异质性,这可能是由于样本量、研究方法或检测技术的差异所致。此外,甲基化指标的临床应用还需要进一步的验证和优化,以确保其准确性和可靠性。

未来,随着分子生物学技术的不断发展,我们有理由相信这些甲基化指标将在宫颈癌筛查与治疗领域发挥更加重要的作用。

三、PAX1、JAM3 基因甲基化研究现状

PAX1 基因甲基化研究在近年来取得了显著进展。作为表观遗传学的重要组成部分,DNA 甲基化通过影响基因表达模式而不改变 DNA 序列本身,在肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用。PAX1 基因作为一种重要的转录调控因子,在胚胎发育和细胞存亡中发挥着关键作用,并且具有肿瘤抑制的功能。研究发现,PAX1 基因的甲基化状态与宫颈病变之间存在密切关系^[23]。在宫颈上皮内瘤变和宫颈癌中,PAX1 基因的甲基化水平显著升高,这种甲基化改变可能导致肿瘤抑制基因的表达沉默,进而引发细胞的异常增殖。在临床应用方面,PAX1 基因甲基化检测展现出了一定的价值。研究表明^[24],PAX1 基因的甲基化状态可以作为一种生物标志物,用于宫颈病变的筛查和风险评估。与传统的细胞学检测和 HPV 感染检测相比,PAX1 基因甲基化检测具有更高的特异性和准确性,能够更有效地识别出高风险患者。此外,PAX1 基因甲基化检测还可以为临床医生制定合理的治疗方案提供重要依据。然而,尽管 PAX1 基因甲基化研究取得了显著进展,但仍存在一些问题和挑战。例如,目前对于 PAX1 基因甲基化的具体作用机制尚不完全清楚,需要进一步深入研究。此外,不同研究中 PAX1 基因甲基化的检测方法和标准也存在差异,这可能会影响结果的准确性和可比性。因此,未来需要建立统一的检测标准和规范,以推动 PAX1 基因甲基化检测在临床中的广泛应用。至于 JAM3 基因甲基化研究现状,尽管 JAM3 基因在细胞黏附和免疫调节等方面发挥着重要作用,但目前关于 JAM3 基因甲基化与宫颈病变之间关系的研究还相对较少。初步研究发现,JAM3 基因的甲基化状态可能与宫颈病变的进展和转移有关,但具体作用机制仍需进一步探讨。此外,目前关于 JAM3 基因甲基化检测的临床应用价值也尚未得到充分验证。因此,未来需要加强对 JAM3 基因甲基化的研究力度,以揭示其在宫颈病变中的具体作用机制,并评估其作为生物标志物的临床应用价值。

作为新型分子标志物,DNA 甲基化在提高宫颈癌检出率方面具有显著优势,能够更准确地识别不同级别的宫颈病变,为临床诊断和治疗提供

有力支持。尽管 DNA 甲基化在宫颈病变筛查中的应用已取得一定进展，但现有研究仍存在不足。例如，缺乏统一标准和前瞻性研究，以及不同甲基化指标之间的比较和验证等。因此，未来的研究方向应更加注重标准化和前瞻性研究，以发现最佳的生物标志物，并结合多种检测方法形成综合性筛查策略。

DNA 甲基化研究在宫颈癌防控方面具有潜在影响与贡献。通过更精准的筛查手段，我们可以实现对宫颈癌的更有效防控，降低发病率和死亡率。此外，随着分子生物学技术的不断发展，DNA 甲基化及其他分子标志物的研究将为宫颈癌筛查与治疗开辟新方向，为患者提供更加精准和个性化的治疗方案。

参考文献

1. Reza S, Anjum R, Khandoker R Z, et al. Public health concern-driven insights and response of low-and middle-income nations to the World health Organization call for cervical cancer risk eradication[J]. Gynecologic Oncology Reports, 2024, 54: 101460.
2. Derby A, Mekonnen D, Nibret E, et al. Cervical cancer in Ethiopia: a review of the literature[J]. Cancer Causes & Control, 2023, 34(1): 1-11.
3. Wang L, Song Q, Liu Y, et al. ThinPrep cytologic test combined with HPV typing to evaluate the degree of cervical diseases and the relationship between HPV typing and the pathological results of patients with atypical squamous cells of undetermined significance: a diagnostic test[J]. Translational Cancer Research, 2022, 11(9): 3277.
4. Yang Y, Xu L, Yuan S, et al. Optimal Screening and Detection Strategies for Cervical Lesions: A Retrospective Study[J]. Journal of Cancer, 2024, 15(11): 3612.
5. Zhang J, Sheng H, Hu C, et al. Effects of DNA methylation on gene expression and phenotypic traits in cattle: A review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(15): 11882.

6. Yadav C, Yadav R, Chhabra R, et al. Overview of genetic and epigenetic regulation of human papillomavirus and apoptosis in cervical cancer[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(5): 683-701.
7. Bisht D, Bhadra M, Sharma N, et al. Aberrant DNA methylation signatures in gynecological malignancies: Implications for early diagnosis, prognosis, and therapy *Epigenetics in Human Disease*[J]. Academic Press, 2024: 931-957.
8. Nasrullah, Hussain A, Ahmed S, et al. DNA methylation across the tree of life, from micro to macro-organism[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1666-1685.
9. Nasrullah, Hussain A, Ahmed S, et al. DNA methylation across the tree of life, from micro to macro-organism[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1666-1685.
10. Del Castillo Falconi V M, Torres-Arciga K, Matus-Ortega G, et al. DNA methyltransferases: from evolution to clinical applications[J]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(16): 8994.
11. Kelly H, Benavente Y, Pavon M A, et al. Performance of DNA methylation assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): a systematic review and meta-analysis[J]. *British journal of cancer*, 2019, 121(11): 954-965.
12. Laengsri V, Kerdpin U, Plabplueng C, et al. Cervical cancer markers: epigenetics and microRNAs[J]. *Laboratory medicine*, 2018, 49(2): 97-111.
13. Schmitz M, Eichelkraut K, Schmidt D, et al. Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages[J]. *BMC cancer*, 2018, 18: 1-8.
14. Albulescu A, Plesa A, Fudulu A, et al. Epigenetic approaches for cervical neoplasia screening[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2021, 22(6): 1-14.

15. Fan C, Hu J, Luo T, et al. Analysis of the diagnostic performance of PAX1/SOX1 gene methylation in cervical precancerous lesions and its role in triage diagnosis[J]. Journal of Medical Virology, 2024, 96(5): e29521.
16. Fan C, Ma Q, Wu X, et al. Detection of DNA methylation in gene loci ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, and ZNF671 for diagnosis of cervical cancer[J]. Cancer Management and Research, 2023: 635-644.
17. Yuan L, Hu Y, Zhou Z, et al. Quantitative methylation analysis to detect cervical (pre)-cancerous lesions in high-risk HPV-positive women[J]. Int J Clin Exp Med, 2017, 10(7): 10577-10586.
18. Li X, Tao L, Tan Q, et al. CpG island methylation of the CADM1 gene correlates with cervical carcinogenesis in the Uighur and Han populations of Xinjiang, China[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2016, 9(7): 6977-6987.
19. Sundaram M K, Silas S, Hussain A. Epigenetic aberrations in cervical cancer[J]. Epigenetics and Reproductive Health, 2021: 343-370.
20. Lin H, Chen T C, Chang T C, et al. Methylated ZNF582 gene as a marker for triage of women with Pap smear reporting low-grade squamous intraepithelial lesions—a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study[J]. Gynecologic oncology, 2014, 135(1): 64-68.
21. Liang H, Li G L, Liu J, et al. The application value of PAX1 and ZNF582 gene methylation in high grade intraepithelial lesion and cervical cancer[J]. Clinical and Translational Oncology, 2021, 23: 283-288.
22. Bu Q, Wang S, Ma J, et al. The clinical significance of FAM19A4 methylation in high-risk HPV-positive cervical samples for the detection of cervical (pre) cancer in Chinese women[J]. BMC Cancer, 2018, 18: 1-10.
23. Li M, Zhao C, Zhang X, et al. PAX1/JAM3 Methylation and HPV Viral Load in Women with Persistent HPV Infection[J]. Cancers, 2024, 16(7): 1430.
24. Guo Z, Hu Y, Yuan L, et al. A prospective study on the predictive value of DNA methylation in cervical intraepithelial neoplasia prognosis[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2018, 298: 589-596.