

硕士学位论文

**DNA 甲基化在 AUB 妇女 EC 筛查中的应用
价值研究**

**Application value of DNA methylation detection in
EC screening of AUB women**

专业学位类别

临床医学

专 业 领 域

妇产科学

作 者 姓 名

傅英钦

指 导 教 师

徐大宝教授

2023 年 6 月

中图分类号 R711.74
UDC 618

学校代码 10533
学位类别 专业学位

硕士学位论文

DNA 甲基化在 AUB 妇女 EC 筛查中的应用 价值研究

Application value of DNA methylation detection in
EC screening of AUB women

作者姓名	傅英钦
专业学位类别	临床医学
专业领域	妇产科学
研究方向	宫内膜病变
二级培养单位	湘雅三医院
指导教师	徐大宝 教授

论文答辩日期 2023.6.25

答辩委员会主席 _____

中 南 大 学
2023 年 6 月

DNA 甲基化在 AUB 妇女 EC 筛查中的应用价值研究

摘要:

目的: 探讨从宫颈部收集的脱落细胞(以下简称宫颈脱落细胞)DNA(CDO1^m/CELF4^m)甲基化检测在异常子宫出血(AUB)妇女子宫内膜癌(EC)筛查中的应用价值。

方法: 选取纳入2021年11月至2022年10月期间于中南大学湘雅三医院妇科门诊就诊的AUB妇女296例, 且有宫腔镜检指征。在宫腔镜检查术前收集患者的基本信息、血清肿瘤标志物(CA125)与经阴道超声测量的子宫内膜厚度等数据, 并收集宫颈脱落细胞标本, 进行DNA(CDO1^m/CELF4^m)甲基化检测。宫腔镜下采集子宫内膜组织进行病理学诊断为金标准, 采用单因素logistic回归模型分析EC的相关高危因素, 绘制受试者工作特征(ROC)曲线并计算曲线下面积(AUC), 重点分析从宫颈部收集的脱落细胞DNA甲基化检测在AUB妇女EC筛查中的诊断效能。

结果: 单因素logistic回归分析结果表明, 年龄、BMI ≥ 25 kg/m²、TVS测量内膜厚度 ≥ 11 mm、宫颈脱落细胞CDO1甲基化(CDO1^m Δ Ct ≤ 8.4)、CELF4甲基化(CELF4^m Δ Ct ≤ 8.8)、双基因甲基化(CDO1^m Δ Ct ≤ 8.4 /CELF4^m Δ Ct ≤ 8.8) AUB妇女发生EC的独立高危因素。OR值(95%CI)分别为1.15 (1.06-1.26)、4.76 (1.89-11.96)、8.41 (3.13-22.59)、64.49 (20.46-203.33)、12.79 (4.91-33.30)、42.53 (11.90-152.03), 均P<0.05。在这些指标中, 双基因甲基化(CDO1^m Δ Ct ≤ 8.4 /CELF4^m Δ Ct ≤ 8.8)应用于诊断EC的敏感性(95%CI)最高, 且特异性(95%CI)较好, 分别为85.7% (70.7%-100.0%) 和87.6%(83.7%-91.5%)。双基因甲基化联合BMI、TVS可进一步提升敏感性(95%CI)至95.2% (86.1%-100%), 但特异性(95%CI)无改善, 为82.5%(78.1%-87.0%)。

结论: 对于AUB妇女, 宫颈脱落细胞DNA(CDO1^m/CELF4^m)甲基检测应用于EC筛查的临床效能优于其他无创临床指标, 且在DNA甲基化检测的基础上, 联合BMI、TVS可以进一步改善EC筛查的敏感性, 但不能改善特异性。

图3幅, 表9个, 参考文献59篇

关键词：异常子宫出血；子宫内膜癌；筛查；DNA甲基化；经阴道超声；体质指数

分类号：R711.74

Application value of DNA methylation detection in EC screening of AUB women

Abstract:

Objective:To explore the value of DNA (CDO1m/CELF4m) methylation detection of cervical exfoliated cells collected from cervix in screening of endometrial carcinoma (EC) in women with abnormal uterine bleeding (AUB).

Methods:A total of 296 AUB women attending the gynecology clinic of the Third Xiangya Hospital of Central South University from November 2021 to October 2022 were selected. Basic patient information, serum tumor markers (CA125) and endometrial thickness measured by transvaginal ultrasonography were collected before hysteroscopy, and cervical detached cell samples were collected for DNA (CDO1m/CELF4m) methylation testing. Endometrial tissue was collected under hysteroscopy for pathological diagnosis as the gold standard. Univariate logistic regression model was used to analyze risk factors of EC, the working characteristics (ROC) curve and the area under the curve (AUC) was calculated, focusing on the diagnostic efficacy of DNA methylation detection of cervical exfoliated cells in EC screening of AUB women.

Results:The results of univariate logistic regression analysis indicated independent high risk factors for EC in age, $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, TVS thickness $\geq 11 \text{ mm}$, cervical CDO1 methylation ($\text{CDO1}^{\text{m}} \Delta \text{Ct} \leq 8.4$), CELF4 methylation ($\text{CELF4}^{\text{m}} \Delta \text{Ct} \leq 8.8$), and two-gene methylation ($\text{CDO1}^{\text{m}} \Delta \text{Ct} \leq 8.4 / \text{CELF4}^{\text{m}} \Delta \text{Ct} \leq 8.8$) AUB women. OR values (95%CI) were 1.15 (1.06-1.26), 4.76 (1.89-11.96), 8.41 (3.13-22.59), 64.49 (20.46-203.33), 12.79 (4.91-33.30), 42.53 (11.90-152.03), respectively, all $P < 0.05$. Among these indicators, dual gene methylation ($\text{CDO1}^{\text{m}} \Delta \text{Ct} \leq 8.4 / \text{CELF4}^{\text{m}} \Delta \text{Ct} \leq 8.8$) had the highest sensitivity (95%CI) to diagnose EC with good specificity (95%CI), with 85.7% (70.7%-100.0%) and 87.6% (83.7%-91.5%), respectively. Dual-gene methylation

combined with BMI and TVS further increased sensitivity (95%CI) to 95.2% (86.1%-100%), but no improvement in specificity (95%CI) to 82.5% (78.1%-87.0%).

Conclusions:For AUB women, the clinical efficacy of cervical detached cell DNA (CDO1m/CELF4m) methyl test for EC screening is better than other micro-noninvasive clinical indicators, and on the basis of DNA methylation detection, combining BMI and TVS can further improve the sensitivity of EC screening, but not the specificity.

Keywords: Abnormal uterine bleeding; endometrial cancer; screening; DNA methylation; transvaginal ultrasound; body mass index

Classification: R711.74

目 录

第 1 章 前言.....	1
第 2 章 材料与方法	5
2.1 研究对象.....	5
2.2 标本取样.....	5
2.2.1 宫颈脱落细胞 DNA 甲基化检测.....	5
2.2.2 宫腔镜检联合组织病理学检查.....	6
2.3 实验方法.....	6
2.3.1 主要仪器与试剂.....	6
2.3.2 宫颈脱落细胞 DNA 的提取.....	6
2.3.3 重亚硫酸氢盐转化.....	7
2.3.4 PCR 扩增	8
2.3.5 数据处理.....	9
2.4 评价指标.....	9
2.4.1 一般信息.....	10
2.4.2 DNA 甲基化(ΔCt).....	10
2.4.3 组织病理学诊断.....	10
2.5 统计学方法.....	10
第 3 章 研究结果	11
3.1 一般资料及 DNA 甲基化特征.....	11
3.2 单因素分析.....	12
3.3 各指标应用于 EC 筛查的临床效能	13
3.4 BMI 初筛分流后各指标应用于 EC 筛查的临床效能.....	15
3.5 TVS 初筛分流后各指标应用于 EC 筛查的临床效能.....	16
第 4 章 讨论.....	18
第 5 章 结论.....	22
第 6 章 不足与展望	23
参考文献.....	24
综述 子宫内膜癌的筛查现状及研究进展	29
参考文献.....	39

英文缩略词说明

英文缩写	英文全称	中文全称
<i>AGC</i>	Atypical Glandular Cells	非典型腺上皮细胞
<i>AIS</i>	Adenocarcinoma in situ	原位腺癌
<i>ASC-H</i>	atypical squamous cells: cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion	非典型鳞状上皮细胞不排除高度鳞状上皮内病变
<i>ASC-US</i>	Atypical squamous cells of undetermined significance	无明确诊断意义的非典型鳞状细胞
<i>AUB</i>	Abnormal uterine bleeding	异常子宫出血
<i>AUC</i>	Area under curve	曲线下面积
<i>BHLHE22</i>	Basic helix-loop-helix family member e22	碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族成员 e22
<i>BMI</i>	Body mass index	体质指数
<i>CA125</i>	Cancer antigen 125	糖类抗原 125
<i>CDO1</i>	Cysteine dioxygenase type 1	人半胱氨酸双加氧酶 1 型
<i>CDO1m</i>	CDO1 methylation	CDO1 甲基化
<i>CELF4</i>	CUGBP Elav-like family member 4	CUGBP Elav 样家族成员 4
<i>CELF4m</i>	CELF4 methylation	CELF4 甲基化
<i>CI</i>	Confidence interval	置信区间
<i>CMT</i>	Controlled membrane transfer	可控过滤膜采集技术
<i>Ct</i>	Cycle threshold	循环阈值
<i>DNA</i>	Deoxyribo nucleic acid	脱氧核糖核酸
<i>DNMTs</i>	DNA methyltransferases	DNA 甲基化转移酶
<i>EC</i>	Endometrial cancer	子宫内膜癌
<i>EIN</i>	Endometrial intraepithelial neoplasia	子宫内膜上皮内瘤变
<i>HPV</i>	Human papilloma virus	人乳头瘤病毒
<i>HSIL</i>	High-grade squamous intraepithelial lesion	高级别鳞状上皮内病变
<i>IDI</i>	Integrated discrimination improvement	综合判别改善指数
<i>LSIL</i>	Low-grade squamous intraepithelial lesion	低级别鳞状上皮内病变
<i>M</i>	Median	中位数
<i>NILM</i>	Negative for intraepithelial lesion or malignancy	未见上皮内病变或恶性改变
<i>NPV</i>	Negative predictive value	阴性预测值
<i>NRI</i>	Net reclassification improvement	净重新分类指数

英文缩写	英文全称	中文全称
<i>TVS</i>	Transvaginal ultrasonography	经阴道超声
<i>OR</i>	Odd ratios	比值比
<i>PCR</i>	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
<i>PPV</i>	Positive predictive value	阳性预测值
<i>ROC</i>	Receiver operating characteristic	受试者工作特征曲线
<i>ROS</i>	Reactive oxygen species	活性氧
<i>SCC</i>	Squamous cell carcinoma	鳞状上皮细胞癌
<i>TCT</i>	Thinprep cytologic test	新柏氏宫颈液基薄层细胞学检测技术

第 1 章 前言

子宫内膜癌（endometrial cancer, EC）是最常见的妇科恶性肿瘤之一，是发生在子宫内膜的一类上皮性恶性肿瘤，以来源于子宫内膜腺体的腺癌最常见。在发达国家，它是最常见的妇科恶性肿瘤，在全球范围内，它的发病率呈逐渐攀升，发病年龄亦逐渐年轻化^[1-3]。美国癌症协会 2021 年报道，2020 年 EC 新发病例 65620 人，死亡 12590 人^[4]；2021 年 EC 新发病例 66570 人，死亡病例 12940 人^[5]。英国妇科肿瘤协会 2017 年报道，1990-2011 年 EC 新发病人数上升了 50%^[6]。2019 年国家癌症中心统计，EC 在中国居妇科恶性肿瘤的第二位，发病率为 10.28/10 万，死亡率为 1.9/10 万，且随着生活水平的提高、生活习惯的改变、人类寿命的延长，肥胖、高血压、糖尿病、人口老龄化等 EC 高危因素日益凸显，特别是肥胖和人口老龄化^[7]，在育龄期女性中，肥胖人群日益剧增，成为了主要高危因素，尤其是在我国某些经济发达地区，EC 有逐渐超过宫颈癌成为妇科第一大恶性肿瘤的趋势，比如北京市，据肿瘤登记办公室数据显示，2008 年后 EC 已成为发病率最高的女性生殖道恶性肿瘤，在 2015 年发病率达到 18.67/10 万^[8-10]，现已成为严重的备受关注的女性健康问题与社会问题。

异常子宫出血(abnormal uterine bleeding, AUB)（各国定义存在混淆，根据我国指南，AUB 概念限定于育龄期、非妊娠期女性）是 EC 的重要临床表现，但是不具备典型性，AUB 妇女中仅有极少数为 EC 患者，且部分 EC 患者并没有 AUB 的临床表现^[11]，因此往往难以早期发现、早期干预，从而耽误治疗时机，影响预后。

EC 一般分为两种类型：I 型，即雌激素依赖型：它的发生发展与机体雌激素的增高有关（内源或外源性），占 EC 中的大多数，病理类型为子宫内膜样腺癌，常分化较好，雌激素受体阳性率高，预后较好；II 型，即非雌激素依赖型：少见，组织学表现为浆液性癌、透明细胞癌和未分化癌等，分化差，恶性程度高，雌激素受体多为阴性，预后差。EC 患者的分期越晚，5 年生存率越低。EC I 期女性中约 80% 的患者，其 5 年生存率可达 95% 以上^[12]，而晚期患者的 5 年生存率仅不到 20%^[1, 4, 5, 13]。而子宫内膜上皮内瘤样病变(endometrial intraepithelial neoplasia, EIN) 是 EC 的癌前病变阶段，随访 13.4 年癌变率为 8%~29%，亦需干预，避免进展^[11]。因此，早发现早干预，是改善预后的关键。然而，由于目标人群的特殊性，追求防与治的同时，还要兼顾生育力的保护，但目前还没有令人满意的无创 EC 筛查方法。

目前，临床工作中最常用的 EC 筛查手段有经阴道超声（transvaginal ultrasonography, TVS）、子宫内膜活组织检查、肿瘤标志物等。TVS 是女性子

宫腔内疾患的初步检查手段,尤其是对于 AUB 患者意义较大,可以初步了解宫腔内情况,测量某些相关指标,如子宫内膜厚度、血流信号等,然而内膜厚度受性激素周期性变化影响,且内膜厚度阈值存在争议,因此特异性并不高^[14]。一般来说,育龄期妇女子宫内膜受雌激素与孕激素作用而呈周期性增生、分泌、剥脱,最厚约可达 10mm,若内膜厚度达 11mm 甚至以上,则需警惕子宫内膜病变的可能。采集微量子宫内膜组织进行病理学检查,即所谓的“金标准”,诊断性刮宫和宫腔镜检联合子宫内膜活组织检查是诊断 EC 的最可靠手段,亦可联合基因检测辅助诊断^[15],然而,以上均为侵入性操作,会给患者带来极大的疼痛与不适,患者的接受度差^[16],且多数接受上述宫腔操作的妇女实际上并非 EC 患者,其中相当一部分患者不具有绝对的宫腔镜检指征,其实很大程度上应当避免,这造成了一定程度的过度医疗操作,造成了不必要的创伤,不利于女性生育力的保护。同时,通过这类侵入性方法进行取材,也存在着一定的漏诊率^[7]。有研究报道,约 36%的子宫内膜活检组织不足以进行诊断^[17],尽管约 11%的取材失败率是由于取样不足及宫颈狭窄造成的^[18]。血清糖类抗原 125(cancer antigen 125, CA125)是一种经典的血清肿瘤标志物,在临床上应用甚广,其血清学检测的手段是一种几乎无创的非侵入性方法,但因其很容易受到子宫腺肌症、子宫内膜异位症、盆腔炎性疾病等良性疾病的干扰,准确性并不高,因此往往只是作为诊断的参考依据,其更高的价值在于动态评估恶性肿瘤的治疗效果、监测病情转归等方面。目前临床上常用的方案存在有创、侵入性、易造成过度医疗、漏诊率高等问题,也正是因其侵入性,患者痛苦大,接受度也低。基于这些原因,现阶段国内和国外都没有形成统一规范的、可用于临床实践的、无创性筛查方案^[19]。因此,能否有一种创伤小、非侵入性、准确性高、操作便捷、易于推广的检查方法,可以作为 EC 的筛查手段,有待进一步研究。

近些年来,表观遗传学领域的相关研究火热,这一概念首次提出于 1942 年,是指基因的碱基序列保持不变的前提下,表型发生了可遗传变化。其主要的机制包括脱氧核糖核酸(deoxyribo nucleic acid, DNA)甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 和染色质重塑等,它在基因和环境共同作用下,通过基因修饰,调控 DNA、蛋白质以及其他分子之间的相互作用,从而调控基因的表达,参与机体各个生理与病理过程。其中 DNA 甲基化是发现最早、研究最透彻的表观遗传学机制。DNA 甲基化是指 CpG 二核苷酸的胞嘧啶环 5 号位碳原子上的氢被一个甲基所取代,使之变成 5-甲基胞嘧啶的化学反应,可在不改变碱基序列情况下调控基因的表达,且可遗传^[20],它与肿瘤的发生和发展及其生物学行为密切相关^[21],是目前的热点研究方向之一。已有大量的研究表明,肿瘤组织中 DNA 甲基化模式的改变可以使抑癌基因失活,或者使原癌基因激活^[22],从而导致肿瘤的发生与发展,尤其

是抑癌基因的沉默在这个过程中发挥重要作用。早期肿瘤中 DNA 甲基化改变的特点表现为全基因组处于低甲基化状态,而抑癌基因启动子区域 CpG 岛处于高度甲基化状态^[23,24],因此 DNA 甲基化检测作为一种新型的癌症早期筛查手段,具有宽广的前景。

DNA 甲基化检测方法,依据其预处理的方式不同,主要分为亲和富集预处理法、限制性酶切预处理法、亚硫酸氢盐处理法 3 类^[25]。其中,基于 PCR 扩增的亚硫酸氢盐预处理法,因其价格低廉、操作简便,已成为目前主流的、应用最广泛 DNA 甲基化检测方法。

到目前为止,已有多项研究在肺癌、结直肠癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌、宫颈癌等多种类型的癌症中发现了大量以 DNA 甲基化为基础的生物标志物,并且应用于诊断具有较高的准确性^[26-31],具有良好的应用前景,为肿瘤的早期筛查提供了新思路。在 EC 发生与发展过程中也存在着多个基因甲基化模式的改变^[32]。但随着经济发展与人民生活水平的提高,相较于 EC 逐年升高的发病率以及年轻化趋势,基于 DNA 甲基化检测技术的 EC 有效生物标志物的发掘与研究显得相对进展缓慢,迄今为止,仍然缺少确证、安全、准确的可用于 EC 筛查的 DNA 甲基化检测生物标志物^[9]。有文献报道,恶性子宫内膜细胞可脱落至宫颈,并且可在细胞学检查中被发现,敏感甲基化标志物的使用大大增加了从宫颈部收集的脱落细胞(以下简称宫颈脱落细胞)的使用范围^[33]。一项研究发掘了利用宫颈脱落细胞(目的是收集从宫腔内膜脱落至宫颈处,特别是位于颈管下段处的脱落内膜细胞)DNA 甲基化检测 EC 的潜在用途,该研究中分析了 EC 的两个 DNA 甲基化组学数据库,对 DNA 甲基化模式进行聚类并减少候选基因,得到 14 个在 EC 中高度甲基化的基因,其中碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族成员 e22(basic helix-loop-helix family member e22, BHLHE22)、人半胱氨酸双加氧酶 1 型(cysteine dioxygenase type 1, CDO1)和 CUGBP Elav 样家族成员 4(CUGBP Elav-like family member 4, CELF4)三个基因表现最好,利用单个基因检测 EC 的敏感性为 83.7%-96.0%,特异性为 78.7%-96.0%,利用 3 个基因中任意 2 个基因组合检测 EC 达到了 91.8%的敏感性和 95.5%的特异性^[34],CDO1 和 CELF4 这两个基因已被开发成甲基化检测试剂盒,但尚未在临床上加以验证。

随着 EC 发病率的上升及其年轻化趋势,EC 的好发人群逐渐由绝经后女性逐渐向育龄期女性迁移,但由于育龄期女性 EC 患者的临床表现主要为 AUB,不典型、难区分、易混淆,大大增加了筛查难度,因此对于育龄期女性 EC 的筛查方法的探索,其重要性和紧迫性显而易见。本研究基于 CDO1 和 CELF4 这 2 个 DNA 甲基化标志物,首次针对 AUB 妇女,利用宫颈脱落细胞 DNA 甲基化检测进行 EC 筛查,并对其检验效能进行分析评估,同时探索其联合体质指数(body

mass index, BMI)、TVS 等其他手段在 EC 筛查中的准确性, 为一项临床应用价值验证性研究。

第2章 材料与方法

2.1 研究对象

选取2021年11月至2022年10月就诊于中南大学湘雅三医院妇产科、有宫腔镜检查手术指征的AUB妇女作为研究对象。纳入标准：18周岁 \leq 年龄 \leq 55周岁；未绝经；基于国内相关指南^[11,35]、根据临床表现和检查考虑为AUB的患者；根据国内专家共识与建议^[15,19]，怀疑子宫内膜病变或由经临床医师评估后建议进行宫腔镜检查及子宫内膜活组织检查；既往未因子宫内膜病变接受过任何保守治疗及手术治疗；无子宫颈癌、卵巢癌、肺癌等其他癌种及其癌前病变；愿意接受检测并签署知情同意书。排除标准：年龄 \leq 17周岁或年龄 \geq 56周岁；已绝经；妊娠期；无宫腔镜检指征患者；术前即明确子宫粘膜下肌瘤、子宫内膜息肉等良性疾病有宫腔镜检指征患者；既往因子宫内膜病变接受过任何治疗或手术治疗；合并有宫颈癌、卵巢癌、肺癌等其他癌种及其癌前病变；不愿意接受检测并签署知情同意书。接受检测前患者均签署相关知情同意书。

2.2 标本取样

本研究中涉及到取样与处理操作的检查有：宫颈脱落细胞DNA甲基化检测、宫腔镜检等。

2.2.1 宫颈脱落细胞DNA甲基化检测

本研究中，所有AUB患者就诊时由于不明确异常阴道流血来源，均不排除宫颈来源出血可能，因此均进行了人乳头瘤病毒（human papilloma virus, HPV）分型检测和新柏氏宫颈液基薄层细胞学检测（thinprep cytologic test, TCT），将HPV、TCT结果异常者排除，减少潜在干扰。而用于DNA甲基化检测的宫颈脱落细胞样本均来自患者宫腔镜术前所进行的TCT检测所刷取的宫颈脱落细胞转移至细胞保存液后制成的细胞混悬液，该样本用于TCT检测会有富余，在患者知情、征得其同意的情况下，取剩余样本总计2-3ml进行DNA甲基化检测。为了能收集到脱落至宫颈的内膜细胞，需严格按照要求取样，具体标本取样步骤如下：患者取膀胱截石位，首先用窥阴器扩张阴道壁，充分暴露宫颈，用干净的医用棉拭子拭去宫颈口过多的分泌物，在宫颈不进行醋酸及碘液涂抹等任何操作的前提下，采用TCT专用的宫颈一次性使用宫颈采样拭子进行宫颈处脱落细胞的收集取样，将其置于宫颈口，深入宫颈管，顺时针旋转刷取5周，采集该处的宫颈脱落细胞，将已经刷取下宫颈脱落细胞的宫颈刷慢慢取出，放置入装有TCT专用细胞保存液的小瓶中进行振荡漂洗，使宫颈脱落细胞从宫颈刷转移到细胞保存液中，标记

送检。

2.2.2 宫腔镜检联合组织病理学检查

本研究中患者宫腔镜检查均由中南大学湘雅三医院妇产科具有资质的高年资术者完成操作。手术细节如下：患者手术体位采用膀胱截石位，麻醉方式选择经静脉全身麻醉，膨宫液采用生理盐水，膨宫压维持在 110-120mmHg。宫腔镜经宫颈进入宫腔，大体初步评估颈管形态、宫腔形态、子宫内膜厚薄、有无异常血管、有无病损等。术中根据病情需要进行活检、病损切除、诊断性刮宫等操作。组织取样后送病理学检查。

2.3 实验方法

DNA 甲基化检测过程严格按产品说明书进行操作，流程如下：完成取样后将宫颈脱落细胞进行离心分离；使用 DNA 提取试剂盒对其进行 DNA 的提取；使用重亚硫酸氢盐转化试剂盒对提取后的 DNA 进行转化修饰，然后将转化完成的 DNA 脱盐回收；转化修饰完成的 DNA (Bis-DNA) 进行 PCR 扩增。反应结束后，PCR 分析系统可自动分析数据，通过调整基线和阈值得到循环阈值 (cycle threshold, Ct)，分别计算 CDO1、CELF4 与内参基因 (GAPDH) 的 Ct 值的差值，即 $\Delta Ct = Ct_{\text{检测基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ，分别记录为：CDO1^m ΔCt 、CELF4^m ΔCt 。按说明书对结果进行判读。

2.3.1 主要仪器与试剂

-80℃冰箱：美国 Thermo Scientific 公司

SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统：上海宏石医疗科技有限公司

磁力架：美国 Thermo Fisher 公司

台式离心机：杭州奥盛有限公司

涡旋振荡器：美国 MET 公司

紫外分光光度计：美国 Molecular Decices 公司

DNA 提取试剂盒（离心柱型）：上海研谨生物科技有限公司

96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）：艾维缔科技怀来有限公司

人 CDO1 和 CELF4 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

2.3.2 宫颈脱落细胞 DNA 的提取

(1) 准备 DNA 提取试剂盒（上海研谨生物科技有限公司），各组分：缓冲液 GA（用于悬浮细胞），缓冲液 GB（调节溶液的 PH，维持一定的离子浓度），

缓冲液 GD（去残留的蛋白质），漂洗液 PW（洗脱脂类、蛋白及盐类等杂质），洗脱缓冲液 TE（溶解核酸，稳定储存 DNA），蛋白酶 K（Proteinase K）溶液（酶解与核酸结合的组蛋白，使 DNA 游离在溶液中），吸附柱 CB3，收集管。使用前确保试剂盒包装完好，组分完整无缺失；各组分标识清楚明确，各管溶液无浑浊、无漏液。

（2）先将宫颈脱落细胞上下颠倒混匀，处理为细胞悬液。共取 2-3ml 宫颈脱落细胞，分次加入 1.5ml 离心管中，12000rpm 离心 5min，并弃去上清。

（3）加入缓冲液 GA 200 μ l，充分振荡使其彻底悬浮。

（4）加入蛋白酶 K（Proteinase K）溶液 20 μ l，充分混匀，放置条件及时间：56 $^{\circ}$ C 10min，90 $^{\circ}$ C 30min，溶液应变清亮。

（5）加入缓冲液 GB 200 μ l，充分颠倒混匀，简短离心（将管盖内壁上的水珠去除）。

（6）加入无水乙醇 200 μ l，充分振荡混匀 15sec，这一步有可能出现絮状沉淀物，简短离心（将管盖内壁上的水珠去除）。

（7）将步骤（6）所得的产物（包括溶液和絮状沉淀）一并加入到一个吸附柱 CB3 中（将吸附柱放置于收集管中），12000rpm 离心 30sec，废液倒弃后将吸附柱 CB3 放回到收集管中。

（8）向吸附柱 CB3 中加入缓冲液 GD 500 μ l，12000rpm 离心 30sec，废液倒弃后把吸附柱 CB3 放入到收集管中。

（9）向吸附柱 CB3 中加入 600 μ l 漂洗液 PW，12000rpm 离心 30sec，废液倒弃后把吸附柱 CB3 放入收集管中。

（10）再次重复第（9）步操作。

（11）将吸附柱 CB3 放回到收集管中，12000rpm 离心 2min，废液倒弃后将吸附柱 CB3 置于室温环境下 10min，将吸附材料中的残余漂洗液彻底晾干。

（12）把吸附柱 CB3 转入到一个干净的离心管中，悬空向吸附膜的中间部滴加洗脱缓冲液 TE 50-200 μ l，室温环境放置 2-5min，12000rpm 离心 2min，收集溶液，置于离心管中。

（13）洗脱后的 DNA：可以直接用于后续转化或者储存在-20 $^{\circ}$ C 以备用。长时间保存，放置于-70 $^{\circ}$ C。

2.3.3 重亚硫酸氢盐转化

（1）准备重亚硫酸氢盐转化试剂盒，本研究采用“96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）”（艾维缔科技怀来有限公司），各组分：Lightning Conversion Reagent, M-Binding Buffer, M-Wash Buffer, L-Desulphonation Buffer, M-Elution

Buffer, MagBinding Beads, Conversion Plates w/Pierceable Cover Film, Collection Plates, Elution Plates。使用前确保试剂盒包装完好,组分完整无缺失;各组分标识清楚明确,各管溶液无浑浊、无漏液。

(2) 在 200ul 8 联 PCR 反应管中加入 20ulDNA 样品,再加入 130ul Lightning Conversion Reagent 溶液,吹打混匀。

(3) 将 PCR 管放置到温度循环变温器中,进行以下转化程序:

①98°C, 8min;

②54°C, 60min;

③4°C, 储存最长不要超过 20h。

(4) 将金属浴提前预热到 55°C,为第 10) 步做准备。

(5)在新的 1.5ml 离心管中加入 600ul 的 M-Binding Buffer 和 10ul 的 MagBinding Beads (加前混匀)。

(6) 将样本从 200ul 8 联 PCR 反应管转移到加入了 M-Binding Buffer 和 MagBinding Beads 的新的 1.5ml 离心管中。吹打 3-6 次,或者 1300-1500rpm 混匀 30sec。

(7) 室温 (20-30°C) 静置 5min,然后置于磁力架上吸附 5min,直至液体澄清,吸弃废液。

(8) 加入 400ul 的 M-Wash Buffer,吹打混匀或者涡旋混匀 1300-1500rpm, 30sec 使 MagBinding Beads 再次悬浮。再放回磁力架上 3min 至液体澄清,吸弃废液。

(9) 加入 200ul 的 L-Desulphonation Buffer,吹打混匀或者涡旋混匀 30sec 使 MagBinding Beads 悬浮。在室温下 (20-30°C) 静置 15min (此步骤由于 MagBinding Beads 沉降,需每隔 5min 颠倒混匀)。孵育后,放回磁力架上 3min 直至液体澄清,吸弃废液。

(10) 加入 400ul M-Wash Buffer,吹打混匀或者涡旋混匀 30sec 使 MagBinding Beads 悬浮。放回磁力架上 3min 直至液体澄清,吸弃废液。重复该步骤一次。

(11) 将 1.5ml 离心管放置于 55°C 金属浴中 20min (开盖) 使 MagBinding Beads 干燥同时去掉 M-Washing Buffer。

(12) 在干燥的 MagBinding Beads 中加入 25ul 的 M-Elution Buffer (可根据实验调整),吹打混匀或者混涡旋匀 30sec 至悬浮。在 55°C 下加热 4min,然后将离心管放置在磁力架上静止 1min 直至溶液澄清。可直接进行下游实验或者将转移至干净的离心管中备用。洗脱后的 DNA 可以直接使用或者储存在 -20°C 以备用。长时间保存,需放置于 -70°C。

2.3.4 PCR 扩增

(1) 准备“人 CDO1 和 CELF4 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), 各组分: 8 联 PCR 管反应条 (冻干粉): Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物、探针等; 人 CDO1 和 CELF4 阳性质控品 (冻干粉): 含相关检测基因甲基化序列的质粒; 人 CDO1 和 CELF4 阴性质控品: 纯化水; MANTACC® Disposable Sampling Kit。使用前确保试剂盒包装完好, 组分完整无缺失; 各组分标识清楚明确。

(2) 取离心之后的 8 联 PCR 管反应条, 轻轻揭开 8 联 PCR 管反应条盖, 每个反应孔加入 20 μ L 纯化水将冻干粉进行溶解, 然后小心盖上 8 联 PCR 管反应条盖。漩涡震荡 10sec, 2000rpm, 离心 10sec, 去除管壁上的液体。取离心之后的人 CDO1 和 CELF4 甲基化阳性质控品 (冻干粉), 加入 130 μ L 纯化水将冻干粉进行溶解。漩涡震荡 10sec, 2000rpm, 离心 10sec, 去除管壁上的液体。待检测数为 n, 所需要配制的反应数 $N = \text{待检测数}(n) + 1$ 。计算加到反应混合物中的各个试剂的量: 人 CDO1 和 CELF4 甲基化反应液体积 (μ L) = $15 \times N$; 人 CDO1 和 CELF4 甲基化引物探针混合液体积 (μ L) = $5 \times N$ 。

(3) 取 1.5mL 离心管配制反应体系, 试剂全部加入后漩涡震荡 10sec, 2000rpm 离心 10sec, 去除管壁上的液体。

(4) 将上述反应液按 20 μ L/管分装到 PCR 反应管中。

(5) 将转化完成的 Bis-DNA、阴性质控品和阳性质控品分别加样 5 μ L, 然后小心盖上 PCR 反应管的管盖(避免气泡产生), 2000rpm 离心 10sec, 然后立即进行 PCR 扩增反应, CDO1 取 FAM 通道, CELF4 取 ROX 通道, GAPDH 取 VIC 通道(或 HEX 通道)。反应程序如下:

①预变性 96°C 10min;

②变性 94°C 15sec; 退火 64°C 5sec; 延伸、荧光采集 60°C 30sec, 45 个循环

③仪器冷却 25°C 1min。

(6) 实验完毕后使用 10%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面, 然后紫外灯照射 25-30min。

2.3.5 数据处理

反应结束后, PCR 分析系统可自动分析数据, 得到 CDO1、CELF4 与内参基因 (GAPDH) 的 Ct 值, 计算检测基因与内参基因 Ct 值的差值, 即 $\Delta Ct = Ct_{\text{检测基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, 分别记录为: $CDO1^m \Delta Ct$ 、 $CELF4^m \Delta Ct$ 。

2.4 评价指标

本研究中纳入评价的指标包括患者的一般信息、DNA 甲基化 ΔCt 值、组织

病理学诊断等。

2.4.1 一般信息

收集患者的一般临床信息，包括年龄、既往史、BMI、宫腔镜术前一个月内TVS测量的内膜厚度以及血清CA125等。定义以下结果为阳性：BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$ 、TVS测量内膜厚度 $\geq 11\text{mm}$ 、血清CA125 $\geq 35\text{U/ml}$ 。

2.4.2 DNA 甲基化(ΔCt)

计算CDO1^m ΔCt 、CELF4^m ΔCt ，严格按照产品说明书判读DNA甲基化检测的结果，“CDO1^m $\Delta\text{Ct} \leq 8.4$ ”定义为CDO1甲基化阳性(+)，“CELF4^m $\Delta\text{Ct} \leq 8.8$ ”定义为CELF4甲基化阳性(+)。“CDO1^m $\Delta\text{Ct} \leq 8.4/\text{CELF4}^{\text{m}}\Delta\text{Ct} \leq 8.8$ ”定义为双基因甲基化阳性(+)。

2.4.3 组织病理学诊断

完成宫腔镜检查及子宫内膜组织取样后，将标本及时送检，由湘雅三医院病理科两名经验丰富的病理科医师各自完成诊断后核对，报告最终病理学检查结果。

2.5 统计学方法

本研究采用SPSS 26.0和R 4.0.2统计软件包进行统计分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述，组间的差异采用方差分析进行比较。呈非正态分布的计量资料，则用M(Q1, Q3)描述，组间的差异采用Kruskal-Wallis检验进行比较，采用LSD法进行组间两两比较。计数资料采用例数与百分比描述，采用 χ^2 检验进行组间比较。单因素Logistic回归模型分析EC的相关危险因素。绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)评估各指标用于诊断EC的价值，并计算曲线下面积(area under curve, AUC)、敏感性(sensitivity)和特异性(specificity)、阳性预测值(positive predictive value, PPV)和阴性预测值(negative predictive value, NPV)、比值比(odd ratios, OR)及95%可信区间(confidence interval, CI)。利用净重新分类指数(net reclassification improvement, NRI)和综合判别改善指数(integrated discrimination improvement, IDI)比较双基因甲基化联合不同指标用于EC诊断的提升价值。所有检验均为双侧检验，以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

第 3 章 研究结果

3.1 一般资料及 DNA 甲基化特征

本研究最终有 296 例患者满足入组条件并纳入最终的统计分析，包括 EC 21 例，EIN 10 例，非病变子宫内膜 265 例（包括正常内膜、单纯性增生、复杂性增生）。三组患者的年龄、BMI、TVS 测量的内膜厚度、CDO1^m Δ Ct、CELF4^m Δ Ct，存在显著统计学差异（P<0.05），三组患者的 CA125 无显著统计学差异（P>0.05），详见表 1。

表 1 各组患者的一般资料及 DNA 甲基化特征

变量	合计 (n=296)	非病变组 (n=265)	EIN 组 (n=10)	EC 组 (n=21)	χ^2	P
年龄 [岁, M (Q1, Q3)]	43.0 (36.5,48.0)	43.0 (35.0,48.0)	46.0 (38.0,48.0)	49.0 (44.0,52.0)	13.52	0.001
BMI [kg/m ² , M (Q1, Q3)]	22.9 (21.3,25.6)	22.8 (21.1,25.0)	24.3 (22.6,27.7)	26.3 (22.4,29.0)	13.39	0.001
内膜厚度 [mm, M (Q1, Q3)]	7.0 (5.0,11.0)	7.0 (5.0,10.0)	6.8 (4.0,9.0)	14.0 (10.0,17.0)	11.91	0.003
CA125 [U/ml, M (Q1, Q3)]	17.6 (11.3,26.3)	17.3 (11.4,25.9)	10.6 (8.3,18.4)	21.5 (13.1,30.9)	5.00	0.082
CDO1 ^m Δ Ct [M (Q1, Q3)]	16.7 (12.8,17.9)	17.0 (14.3,18)	15.2 (12.7,17.6)	7.4 (6.4,8.3)	38.92	<0.001
CELF4 ^m Δ Ct [M (Q1, Q3)]	15.9 (10.8,17.7)	16.4 (11.5,17.8)	14.1 (8.8,17.2)	8.6 (5.7,13.8)	24.40	<0.001

各组之间的 DNA 甲基化特征进一步进行组间两两比较，EC 组患者的 CDO1^mΔCt 与 CELF4^mΔCt 显著低于 EIN 及非病变组患者，差异有统计学意义（P<0.05），EIN 组的 CDO1^mΔCt、CELF4^mΔCt 与非病变组无显著统计学差异（P>0.05）。详见表 2 和表 3。

表 2 各组患者 CDO1 甲基化特征的组间比较

变量	CDO1 ^m Δ Ct[M (Q1, Q3)]	P
非病变组 VS EIN 组	非病变组 (n=265) 17.0 (14.3,18) EIN 组 (n=10) 15.2 (12.7,17.6)	0.304
非病变组 VS EC 组	非病变组 (n=265) 17.0 (14.3,18) EC 组 (n=21) 7.4 (6.4,8.3)	<0.001
EIN 组 VS EC 组	EIN 组 (n=10) 15.2 (12.7,17.6) EC 组 (n=21) 7.4 (6.4,8.3)	<0.001

表3 各组患者 CELF4 甲基化特征的组间比较

变量	CEL F4 ^m Δ Ct[M (Q1, Q3)]	P
非病变组 非病变组 (n=265)	16.4 (11.5,17.8)	0.281
VS EIN 组 EIN 组 (n=10)	14.1 (8.8,17.2)	
非病变组 非病变组 (n=265)	16.4 (11.5,17.8)	<0.001
VS EC 组 EC 组 (n=21)	8.6 (5.7,13.8)	
EIN 组 EIN 组 (n=10)	14.1 (8.8,17.2)	0.013
VS EC 组 EC 组 (n=21)	8.6 (5.7,13.8)	

根据以上不同组别患者 DNA 甲基化特征的比较结果,可进一步将 EIN 和非病变组合并为一组,设为对照组,EC 组为研究组,进一步分析比较,研究组患者的年龄、BMI、TVS 测量的内膜厚度显著高于对照组患者,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。研究组的 CDO1^m Δ Ct、CEL F4^m Δ Ct 显著低于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。两组组患者的 CA125 无显著统计学差异 ($P>0.05$), 详见表 4。

表4 两组患者的一般资料及 DNA 甲基化特征

变量	合计 (n=296)	对照组 (n=275)	研究组 (n=21)	Z	P
年龄 [岁, M (Q1, Q3)]	43.0 (36.5,48.0)	43.0 (35.0,48.0)	49.0 (44.0,52.0)	3.61	0.003
BMI [kg/m ² , M (Q1, Q3)]	22.9 (21.3,25.6)	22.9 (21.2,25.0)	26.3 (22.4,29.0)	3.25	0.001
内膜厚度 [mm, M (Q1, Q3)]	7.0 (5.0,11.0)	7.0 (5.0,10.0)	14.0 (10.0,17.0)	3.42	<0.001
CA125 [U/ml, M (Q1, Q3)]	17.6 (11.3,26.3)	17.3 (11.2,25.5)	21.5 (13.1,30.9)	1.60	0.110
CDO1 ^m Δ Ct [M (Q1, Q3)]	16.7 (12.8,17.9)	16.9 (14.3,18.0)	7.4 (6.4,8.3)	6.11	<0.001
CEL F4 ^m Δ Ct [M (Q1, Q3)]	15.9 (10.8,17.7)	16.4 (11.5,17.8)	8.6 (5.7,13.8)	4.77	<0.001

3.2 单因素分析

以 EC 为因变量,进行单因素 Logistic 回归分析,结果显示:年龄、BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$ 、TVS 测量的内膜厚度 $\geq 11\text{mm}$ 、CDO1^m Δ Ct ≤ 8.4 、CEL F4^m Δ Ct ≤ 8.8 、双基因甲基化(+)是 EC 的独立相关危险因素,OR 值 (95%CI) 分别为 1.15 (1.06-1.26)、4.76 (1.89-11.96)、8.41 (3.13-22.59)、64.49 (20.46-203.33)、12.79 (4.91-33.30)、42.53 (11.90-152.03), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 详见表 5。

表5 与EC相关指标的单因素分析

变量	对照组 (n=275)	研究组 (n=21)	Z/ χ^2	P	OR (95%CI)
年龄	43.0 (35.0,48.0)	49.0 (44.0,52.0)	3.61	0.003	1.15 (1.06-1.26)
BMI			12.85	<0.001	4.76 (1.89-11.96)
<25 kg/m ²	205 (74.55)	8 (38.1)			
≥25 kg/m ²	70 (25.45)	13 (61.9)			
内膜厚度			23.67	<0.001	8.41 (3.13-22.59)
<11 mm	212 (77.09)	6 (28.57)			
≥11 mm	63 (22.91)	15 (71.43)			
CA125			0.01	0.918	1.27 (0.41-3.96)
<35 U/ml	232 (84.36)	17 (80.95)			
≥35 U/ml	43 (15.64)	4 (19.05)			
CDO1 ^m Δ Ct			104.80	<0.001	64.49 (20.46-203.33)
Δ Ct>8.4	262 (95.27)	5 (23.81)			
Δ Ct≤8.4	13 (4.73)	16 (76.19)			
CELF4 ^m Δ Ct			35.62	<0.001	12.79 (4.91-33.30)
Δ Ct>8.8	244 (88.73)	8 (38.1)			
Δ Ct≤8.8	31 (11.27)	13 (61.9)			
双基因甲基化			67.51	<0.001	42.53 (11.90-152.03)
阴性	241 (87.64)	3 (14.29)			
阳性	34 (12.36)	18 (85.71)			

3.3 各指标应用于EC筛查的临床效能

各指标应用于AUB妇女EC诊断的临床效能如下：BMI≥25 kg/m²的敏感性(95%CI)为61.9%(41.1%-82.7%)，特异性(95%CI)为74.5%(69.4%-79.7%)，PPV(95%CI)为15.7%(7.8%-23.5%)，NPV(95%CI)为96.2%(93.7%-98.8%)。TVS测量内膜厚度≥11 mm的敏感性(95%CI)为71.4%(52.1%-90.8%)，特异性(95%CI)为77.1%(72.1%-82.1%)，PPV(95%CI)为19.2%(10.5%-28.0%)，NPV(95%CI)为97.2%(95.1%-99.4%)。CDO1甲基化的敏感性(95%CI)为76.2%(58.0%-94.4%)，特异性(95%CI)为95.3%(92.8%-97.8%)，PPV(95%CI)为55.2%(37.1%-73.3%)，NPV(95%CI)为98.1%(96.5%-99.8%)。CELF4甲基化的敏感性(95%CI)为61.9%(41.1%-82.7%)，特异性(95%CI)为88.7%(85.0%-92.5%)，PPV(95%CI)为29.5%(16.1%-43.0%)，NPV(95%CI)为96.8%(94.7%-99.0%)。双基因甲基化的敏感性(95%CI)为85.7%(70.7%-100.0%)，特异性(95%CI)为87.6%(83.7%-91.5%)，PPV(95%CI)为34.6%(21.7%-47.5%)，NPV(95%CI)为98.8%(97.4%-100.2%)。可见双基因甲基化相较于其他指标，敏感性最高，且特异性较好。详见表6。

表6 各指标应用于EC筛查的效能

指标	敏感性 (95%CI)	特异性 (95%CI)	阳性预测值 (95%CI)	阴性预测值 (95%CI)	AUC (95%CI)
BMI ≥ 25 kg/m ²	0.619 (0.411-0.827)	0.745 (0.694-0.797)	0.157 (0.078-0.235)	0.962 (0.937-0.988)	0.682 (0.573-0.792)
内膜厚度 ≥ 11 mm	0.714 (0.521-0.908)	0.771 (0.721-0.821)	0.192 (0.105-0.280)	0.972 (0.951-0.994)	0.743 (0.641-0.845)
CDO1 ^m (+)	0.762 (0.580-0.944)	0.953 (0.928-0.978)	0.552 (0.371-0.733)	0.981 (0.965-0.998)	0.857 (0.763-0.951)
CELF4 ^m (+)	0.619 (0.411-0.827)	0.887 (0.850-0.925)	0.295 (0.161-0.430)	0.968 (0.947-0.990)	0.753 (0.645-0.861)
双基因甲 基化	0.857 (0.707-1.000)	0.876 (0.837-0.915)	0.346 (0.217-0.475)	0.988 (0.974-1.002)	0.867 (0.788-0.946)

将各指标单项及联合应用于AUB妇女EC诊断的ROC曲线绘制于同一张图进行比较,各指标的AUC如下: BMI ≥ 25 kg/m²、TVS测量内膜厚度 ≥ 11 mm、CDO1甲基化、CELF4甲基化以及双基因甲基化的AUC(95%CI)分别为0.682(0.573-0.792)、0.743(0.641-0.845)、0.857(0.763-0.951)、0.753(0.645-0.861)。在双基因甲基化基础上,联合BMI的AUC(95%CI)为0.929(0.892-0.966);联合TVS测量内膜厚度的AUC(95%CI)为0.920(0.855-0.985)。联合BMI、TVS测量内膜厚度的AUC(95%CI)为0.942(0.900-0.985)。详见图1。可见在双基因甲基化的基础上,联合BMI、TVS测量内膜厚度、BMI+TVS测量内膜厚度等其他指标后AUC有所增加,综合检验效能有所提升。其中,双基因甲基化的基础上同时联合BMI、TVS测量内膜厚度对综合检验效能的提升最大,计算敏感性(95%CI)为95.2%(86.1%-100%),特异性(95%CI)为82.5%(78.1%-87.0%)。

在双基因甲基化的基础上,联合BMI、TVS测量内膜厚度、BMI+TVS测量内膜厚度对于EC诊断效能的提升增量如下:以双基因甲基化为参考,联合BMI的AUC差值(95%CI)、NRI(95%CI)分别为0.062(0.012-0.112)、0.444(0.229-0.658),差异有统计学意义($P < 0.05$);IDI(95%CI)为0.068(-0.008-0.144),差异无统计学意义($P > 0.05$)。联合TVS测量内膜厚度的AUC差值(95%CI)、NRI(95%CI)、IDI(95%CI)分别为0.053(0.008-0.098)、0.590(0.381-0.799)、0.134(0.050-0.218),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。同时联合BMI、TVS测量内膜厚度的AUC差值(95%CI)、NRI(95%CI)、IDI(95%CI)分别为0.075(0.024-0.128)、0.590(0.381-0.799)、0.174(0.061-0.287),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见表7。

以上结果表明在双基因甲基化基础上,联合BMI、TVS测量内膜厚度、BMI+TVS测量内膜厚度等指标可以进一步提升诊断效能,增量有意义。

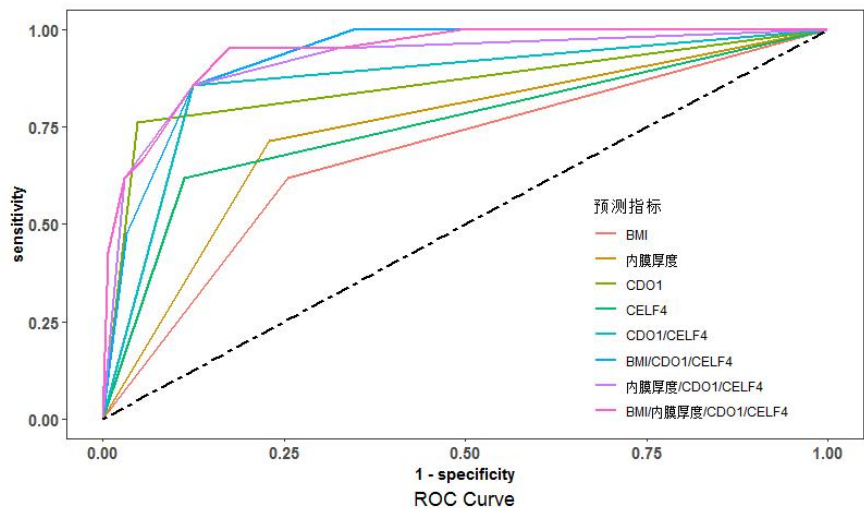


图 1 各临床指标筛查 EC 的 ROC 曲线图

表 7 双基因甲基化联合 BMI、TVS 测量内膜厚度对 EC 筛查的诊断效能增量

组别	AUC 差值 (95%CI)	P	NRI (95%CI)	P	IDI (95%CI)	P
BMI/双基因甲基化 VS 双基因甲基化	0.062 (0.012-0.112)	0.015	0.444 (0.229-0.658)	<0.001	0.068 (-0.008-0.144)	0.078
内膜厚度/双基因甲基化 VS 双基因甲基化	0.053 (0.008-0.098)	0.021	0.590 (0.381-0.799)	<0.001	0.134 (0.050-0.218)	0.002
BMI/内膜厚度/双基因甲基化 VS 双基因甲基化	0.075 (0.024-0.128)	0.004	0.590 (0.381-0.799)	<0.001	0.174 (0.061-0.287)	0.003

3.4 BMI 初筛分流后各指标应用于 EC 筛查的临床效能

将患者按 BMI≥25kg/m²、BMI<25kg/m² 分成 2 个亚组,TVS 测量内膜厚度、CDO1 甲基化、CELF4 甲基化、双基因甲基化、TVS 测量内膜厚度联合双基因甲基化诊断 EC 的 ROC 曲线分别绘制于同一张图,详见图 2。两个亚组中各指标的 AUC 如下:在 BMI≥25kg/m² 组(83 例)中,TVS 测量内膜厚度、CDO1 甲基化、CELF4 甲基化、双基因甲基化、TVS 测量内膜厚度联合双基因甲基化的 AUC(95%CI)分别为 0.809(0.695-0.922)、0.832(0.700-0.964)、0.789(0.653-0.925)、0.820(0.695-0.946)、0.898(0.792-1.000)。在 BMI<25kg/m² 组(213 例)中,TVS 测量内膜厚度、CDO1 甲基化、CELF4 甲基化、双基因甲基化、TVS 测量内膜厚度联合双基因甲基化的 AUC(95%CI)分别为 0.635(0.448-0.823)、0.911(0.787-1.000)、0.694(0.507-0.880)、0.939(0.917-0.961)、0.955(0.925-0.985)。两组之间各指标的 AUC 均无显著统计学差异(P>0.05),详见表 8。但 TVS 测量内膜厚度的 AUC 波动大,表明 TVS 测量内膜厚度不适合单独作为 EC 的筛查的指标;双基因甲基化的 AUC 较稳定,在两个亚组中表现均较好,表明其可以独立作为 EC 的筛查指标。

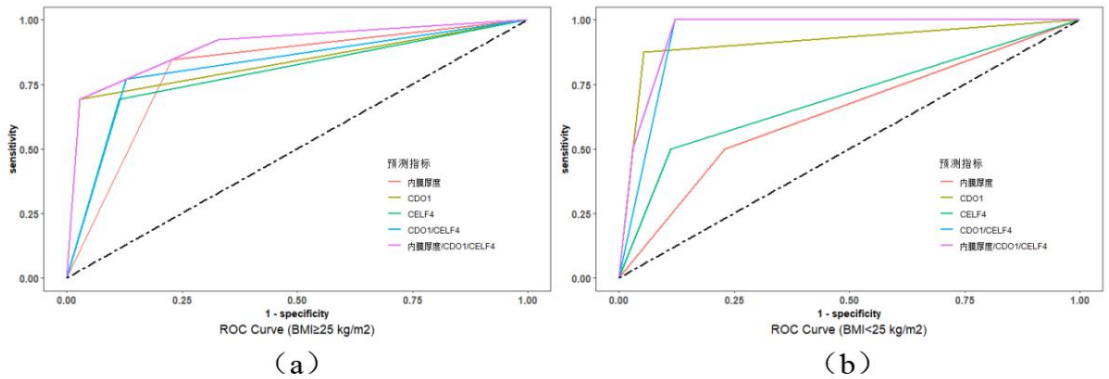


图 2 BMI 初筛分流后各指标诊断 EC 的 ROC 曲线

表 8 BMI 分流后各指标应用于 EC 筛查的效能

指标	BMI≥25 kg/m ²	BMI<25 kg/m ²	P
	AUC(95%CI)	AUC(95%CI)	
内膜厚度	0.809 (0.695-0.922)	0.635 (0.448-0.823)	0.122
CDO1 甲基化	0.832 (0.700-0.964)	0.911 (0.787-1.000)	0.394
CELF4 甲基化	0.789 (0.653-0.925)	0.694 (0.507-0.880)	0.420
双基因甲基化	0.820 (0.695-0.946)	0.939 (0.917-0.961)	0.072
内膜厚度/双基因甲基化	0.898 (0.792-1.000)	0.955 (0.925-0.985)	0.310

3.5 TVS 初筛分流后各指标应用于 EC 筛查的临床效能

将患者按 TVS 测量内膜厚度≥11mm、<11mm 分成 2 个亚组，BMI、CDO1 甲基化、CELF4 甲基化、双基因甲基化、BMI 联合双基因甲基化诊断 EC 的 ROC 曲线分别绘制于同一张图，详见图 3。两个亚组中各指标的 AUC 如下：在 TVS 测量内膜厚度≥11mm 组（78 例）中，BMI、CDO1 甲基化、CELF4 甲基化、双基因甲基化、BMI 联合双基因甲基化的 AUC(95%CI)分别为 0.740(0.612-0.868)、0.843(0.724-0.962)、0.778(0.648-0.907)、0.870(0.772-0.968)、0.938(0.886-0.990)。在 TVS 测量内膜厚度<11mm 组（218 例）中，BMI、CDO1 甲基化、CELF4 甲基化以及双基因甲基化、BMI 联合双基因甲基化的 AUC(95%CI)分别为 0.539(0.331-0.748)、0.893(0.729-1.000)、0.693(0.473-0.914)、0.855(0.691-1.000)、0.906(0.842-0.971)。两组之间各指标的 AUC 均无显著统计学差异（P>0.05），详见表 9。但 BMI 的 AUC 波动大，表明 BMI 不适合单独作为 EC 的筛查的指标；双基因甲基化的 AUC 较稳定，在两个亚组中表现均较好，亦表明其可以独立作为 EC 的筛查指标。

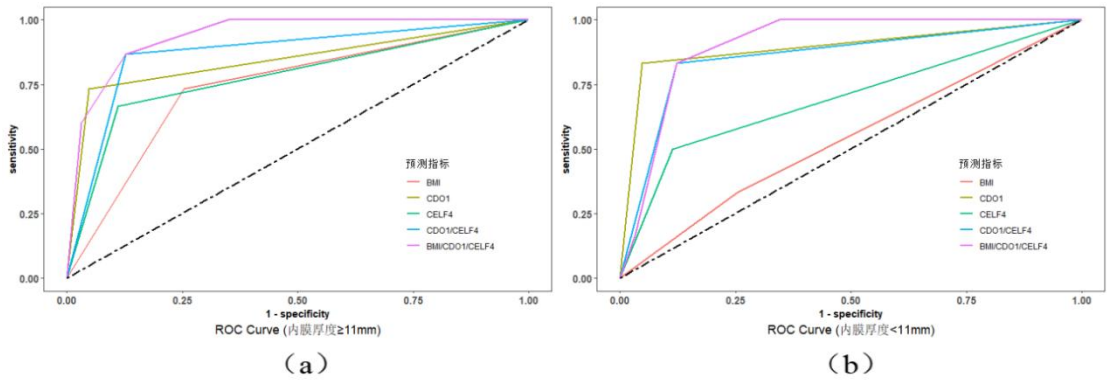


图 3 TVS 测量内膜厚度初筛分流后各指标诊断 EC 的 ROC 曲线

表 9 TVS 测量内膜厚度分流后各指标应用于 EC 筛查的效能

指标	内膜厚度 $\geq 11\text{ mm}$	内膜厚度 $< 11\text{ mm}$	P
	AUC(95%CI)	AUC(95%CI)	
BMI	0.740 (0.612-0.868)	0.539 (0.331-0.748)	0.110
CDO1 甲基化	0.843 (0.724-0.962)	0.893 (0.729-1.000)	0.627
CELF4 甲基化	0.778 (0.648-0.907)	0.693 (0.473-0.914)	0.518
双基因甲基化	0.870 (0.772-0.968)	0.855 (0.691-1.000)	0.882
BMI/双基因甲基化	0.938 (0.886-0.990)	0.906 (0.842-0.971)	0.463

第4章 讨论

子宫内膜癌（endometrial cancer, EC）是最常见的妇科恶性肿瘤之一，是发生在子宫内膜的一类上皮性恶性肿瘤。在发达国家，它是最为常见的妇科恶性肿瘤^[1]。近些年来，随着人类平均寿命的延长、生活水平的提高以及生活习惯的变化，肥胖、高血压、糖尿病、人口老龄化等高危因素日益凸显，在育龄期女性中，尤其是肥胖人群与日俱增^[7, 36, 37]，在这些高危因素的影响下，EC的发病率呈逐渐上升趋势，发病年龄也逐渐趋于年轻化^[2, 3]。

EC的发生和发展是一个多因素影响、多阶段发展的过程，是多种基因表达异常，尤其是抑癌基因、原癌基因表达异常的结果，多存在表观遗传学层面的基因甲基化改变，这与早期肿瘤的发生和发展有着密切联系^[21]。DNA甲基化可在不改变碱基序列的前提下调控基因的表达，主要发生在CpG岛，是指其胞嘧啶环5号位碳原子上有一个氢被一个甲基所取代，使之变成5-甲基胞嘧啶的化学反应^[20]。CpG岛存在于启动子区域，在约60%以上的哺乳动物基因中均有发现，该区域甲基化可导致基因功能的异常甚至丧失。尤其是全基因组处于低甲基化状态，而抑癌基因启动子区域CpG岛处于高度甲基化状态，是人类癌症早期中最常见的两种DNA甲基化改变^[23, 24]，这也是近些年来人们致力于利用DNA甲基化开发新型表观生物标志物的原因，对于其的研究具有重要的价值和意义。

无排卵性AUB是EC的高危因素之一^[38]，因为子宫内膜长期处于雌激素影响下导致其增生，严重时可发展成为EIN甚至EC，而行诊断性刮宫并取子宫内膜组织送病理学检查对于AUB的诊断和治疗具有重要的指导意义^[39, 40]。尽管诊断性刮宫的操作简便又快捷，但因其有创性及疼痛感明显等，患者接受度差、配合度差，从而在一定程度上增加了术者的操作难度，亦增加患者的手术风险，同时也不利于推广。但无论如何，金标准依旧是组织病理学检查。

本研究首次以AUB妇女为研究对象，并采用宫颈脱落细胞这种无创方式即可采集的标本（从宫颈部收集的脱落细胞，目的是为了收集从宫腔脱落至宫颈处特别是位于颈管下段处的脱落内膜细胞）进行DNA（CDO1^m/CELF4^m）甲基化检测，对比分析了其与“BMI”、“TVS测量内膜厚度”以及上述诊断方法相联合的诊断方式在EC筛查中的诊断效能，其中宫颈脱落细胞DNA甲基化检测获得了相较于其他无创筛查方案更高的准确性。且在DNA甲基化检测的基础上，联合BMI、TVS测量所得的内膜厚度，对EC筛查的敏感性获得了进一步提升，证实了这种新型无创EC筛查方案的临床应用价值。

目前已有相关研究利用宫颈脱落细胞进行细胞病理学分析、靶基因检测、外泌体分析、林奇综合征（lynch syndrome）的确诊以及多组学检测等^[41-46]。国外

已有研究报道, 宫颈脱落细胞 DNA 甲基化检测作为一种对患者来说更友好、更无创、痛苦小、易接受的方法, 可用于筛查 EC 患者或 EC 高危人群, 并且由于其检测方法学对于患者自采集的样本亦适用, 因此可以提高早期诊断并减少对住院就诊的依赖, 这使其有可能成为管理 AUB 妇女的合适工具^[47]。但目前在国内关于 EC 宫颈脱落细胞学表观遗传学分析的相关研究甚少, 国内也尚未建立可广泛应用于临床的可靠的、统一的、规范的 EC 筛查方案。而以宫颈脱落细胞为样本用于 EC 的筛查具有很大的优势, 无创、取材便捷、准确性高、样本细胞量充足、细胞病理学结果与组织病理学结果高度一致等^[48]。已有相关研究报道, BHLHE22、CDO1 和 CELF4 的基因甲基化改变, 与 EC 的发生与发展密切关联, 可作为 EC 筛查的潜在生物学标志物^[34, 49]。其中, CDO1 基因编码一种非血红素结构的含铁金属酶蛋白酶, 即人半胱氨酸双加氧酶, 可将半胱氨酸生物降解为半胱氨酸亚磺酸, 从而降低其引起的细胞毒性, 亦可降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的细胞损伤作用^[50, 51]。CELF4 基因编码一种具有三个结构域的蛋白质, 用于结合 RNA 识别基序, 该基序可能参与特定细胞发育过程中的 RNA 选择性剪接^[52-54]。虽然有文献报道, 在宫颈脱落细胞学检查中可以检测到恶性子宫内膜细胞^[33], 但 TCT 检测的细胞混悬液中, 含有大量宫颈细胞, 为确保其用于 EC 筛查的准确性, 需排除宫颈病变对 CDO1 和 CELF4 两个基因甲基化的影响, 在“Pubmed”中未检索到 CDO1 及 CELF4 与宫颈病变相关的文献。故本研究选定 CDO1 和 CELF4 两个检测基因, 取宫颈脱落细胞样本进行 DNA 甲基化检测, 分析其用于诊断 AUB 妇女中 EC 患者的检验效能及临床应用价值, 并在本研究中得到了证实。那么对于非 EC 所致的 AUB 患者或无 EC 高危因素者, 临床医生将有更大的把握、更足的底气予以保守治疗, 尽可能避免不必要的宫腔操作, 加强了对女性生育力的保护。

对于 EC 的筛查, 往往是针对于患者及高危人群, 而随着生活水平的提高、生活习惯的改变、人类寿命的延长, 肥胖、高血压、糖尿病、人口老龄化等 EC 高危因素日益凸显, 在育龄期女性中, 肥胖人群的增长速度远超其他因素, 因此 BMI 成为了需格外关注的指标^[7, 36, 37]。2015 年美国妇产科医师学会(American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)EC 实践指南指出, BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$ 的人群罹患 EC 的风险可增加 2-4 倍^[55]。2021 年我国 EC 筛查规范建议指出, BMI $25\text{-}29\text{kg/m}^2$, I 型、II 型 EC 的相对危险度分别为 1.5、1.2; BMI $30\text{-}34\text{kg/m}^2$, I 型、II 型 EC 的相对危险度分别为 2.5、1.7; BMI $35\text{-}39\text{kg/m}^2$, I 型、II 型 EC 的相对危险度分别为 4.5、2.2; BMI $\geq 40\text{kg/m}^2$, I 型、II 型 EC 的相对危险度分别为 7.1、3.1^[19]。2022 年欧洲肿瘤内科学会 EC 临床实践指南指出, BMI $22\text{-}27.2\text{kg/m}^2$, 使 EC 风险增加 21%, BMI $27.5\text{-}29.5\text{kg/m}^2$, EC 风险增加 43%, BMI $> 30\text{kg/m}^2$,

EC 风险增加 273%^[56]。可见各个国家对于 BMI 作为高危因素的界值的判定不一,综合以上各指南信息,本研究中将 BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$ 定义为阳性结果。

以往传统的 EC 筛查手段中,TVS 具有重要的地位,可测量内膜厚度、血流指数等指标,在初步鉴别子宫内膜良恶性病变方面具有重要价值,尤其经 TVS 测量的内膜厚度是非常重要的指标。TVS 具有价格低廉、快速便捷、无创、安全可重复、易操作等优点,具有很高的泛用性,使其成为了妇产科子宫内膜疾病初筛首选方法^[57]。2020 年我国 EC 筛查规范建议推荐对绝经前增殖期子宫内膜厚度 11mm 以上的妇女进行 EC 的筛查^[19],故本研究将 TVS 测量子宫内膜厚度 $\geq 11\text{mm}$ 定义为阳性结果。虽然 TVS 用于 EC 的筛查具有较高的敏感性,但特异性并不高,且超声科医师的经验及技术也会让检查结果存在一定的差异,即使仅仅是 1mm 的差距,也会对 EC 的诊断产生重大影响,直接影响后续的治疗和决策。

本研究中,宫颈脱落细胞 DNA 甲基化检测(CDO1/CELF4)用于 EC 筛查的敏感性(95%CI)为 85.7%(70.7%-100.0%),特异性(95%CI)为 87.6%(83.7%-91.5%);在此基础上联合 BMI、TVS 测内膜厚度,可进一步提升敏感性(95%CI)至 95.2%(86.1%-100%),特异性(95%CI)为 82.5%(78.1%-87.0%),且其对诊断价值的提升增量有统计学意义。但由于 BMI、TVS 测量内膜厚度的特异性过低,三者联合非但不能改善特异性,反而使之降低。这使得在临床应用中,若牺牲部分特异性,将会增加过多有创操作的可能,但这种情况是否符合实际,能否重复和改善,仍需进一步大队列研究加以验证。本研究根据 BMI、TVS 测内膜厚度进行亚组分析发现,在 BMI $< 25\text{kg/m}^2$ 时,TVS 测量内膜厚度筛查 EC 的 AUC(95%CI)为 0.635(0.448-0.823);在 TVS 测内膜厚度 $< 11\text{mm}$ 时,BMI 筛查 EC 的 AUC(95%CI)为 0.539(0.331-0.748)。但不同的是,宫颈脱落细胞 DNA 甲基化在两个亚组的 AUC(95%CI)分别为 0.939(0.917-0.961)、0.855(0.691-1.000),尚让人满意,因此 DNA 甲基化是区别于 BMI、TVS 测内膜厚度,可作为诊断 EC 的独立筛查指标且较为稳定。

既往的研究表明 CA125 与 EC 的病理分期的相关,依据 CA125 的变化趋势,可在一定程度上对 EC 患者进行筛查^[58],但误诊率、漏诊率也相对较高,需结合其他检测方法以提高检验效能^[59]。但本研究发现,各组间 CA125 水平均不存在统计学差异,考虑可能是子宫腺肌症、子宫腺肌瘤、子宫内膜异位症、盆腔炎症性疾病等良性疾病的影响,使得患者血清中 CA125 水平升高所致。但这并没有影响 DNA 甲基化(CDO1/CELF4)的检验效能。

本研究采用宫颈脱落细胞 DNA 甲基化检测对 AUB 妇女进行 EC 筛查,可减少育龄期女性宫腔的有创性操作,对于女性生育力的保护具有积极意义。但本研究也存在一定的局限性:首先,研究所纳入的 EC(21 例)及 EIN(10 例)样本

量小,代表性不强可能,考虑到 EC 与 EIN 样本量小可能与所面对的研究对象群体有关,一方面,育龄期本就并非 EC 的好发年龄,只是近些年来有年轻化的趋势;另一方面,AUB 原因众多,仅有极少数由 EC 引起,且考虑到地区经济水平对肥胖等高危因素的影响,本研究亦存在一定的地域限制性。其次,从疾病的临床意义上,EIN 的筛查同 EC 一样均很重要,理论上也应当视作研究组对待,但本研究中,经统计学分析,将之与非病变组合并成对照组,可能是由于其病例数过少,整体甲基化特征不明显,组间差异不明显所致。未来仍需在多中心、大队列、大样本中进一步开展研究。另外,标本取样阶段,本研究中所有 AUB 患者就诊时由于不明确异常阴道流血来源,均不排除宫颈来源出血可能,均进行了 HPV 和 TCT 检测,并将 HPV、TCT 结果异常者排除,可以减少潜在干扰,虽然确保了所有宫颈病变可能的患者均被排除,但也存在缺点,若 TCT 结果为非典型腺细胞,则不排除宫颈病变或宫内膜病变,直接剔除有可能造成 EC 病例的丢失,而 AUB 妇女中仅有极少数 EC,后续进一步扩大研究时需注意,TCT 结果为非典型腺细胞的患者,需先行阴道镜检、宫颈活检、颈管搔刮,若病检回报未提示宫颈病变,则需进一步宫腔镜检、诊刮,待病检回报后决定排除或是保留,以免丢失宫内膜病变病例。最后,本研究排除了其他癌种及癌前病变的干扰,设立了“阴性对照”,证明了宫颈脱落细胞 DNA 甲基化(CDO1/CELF4)筛查 EC 的准确性,未来大样本、大队列研究中需设立其他癌种及癌前病变的“阳性对照”,进一步分析比较,以验证其对于 EC 的独有诊断效能。

综上所述,本研究采取的宫颈脱落细胞学 DNA 甲基化检测,为 AUB 女性 EC 的筛查提供了新的选择,具有无创、操作便捷、高敏感等特点,但仍需进一步扩大研究加以验证,有望成为新型可推广的 EC 筛查手段,可以减少 EC 筛查中的有创性操作,减少了患者的痛苦,提高了患者就医体验与依从性,在疾病筛查的同时兼顾了女性生育力的保护。

第 5 章 结论

对于 AUB 妇女,采集宫颈脱落细胞行 DNA 甲基化检测应用于 EC 筛查的临床效能优于其他无创临床指标。在 DNA 甲基化检测的基础上,联合 BMI、TVS 可以进一步改善 EC 筛查的敏感性,但不能改善特异性。

第6章 不足与展望

本研究也存在一定的局限性：首先，研究所纳入的 EC（21 例）及 EIN（10 例）样本量小，代表性不强可能，考虑到 EC 与 EIN 样本量小可能与所面对的研究对象群体有关，一方面，育龄期本就并非 EC 的好发年龄，只是近些年来有年轻化的趋势；另一方面，AUB 原因众多，仅有极少数由 EC 引起，且考虑到地区经济水平对肥胖等高危因素的影响，本研究亦存在一定的地域限制性。其次，从疾病的临床意义上，EIN 的筛查同 EC 一样均很重要，理论上也应当视作研究组对待，但本研究中，经统计学分析，将之与非病变组合并成对照组，可能是由于其病例数过少，整体甲基化特征不明显，组间差异不明显所致。未来仍需在多中心、大队列、大样本中进一步开展研究。另外，标本取样阶段，本研究中所有 AUB 患者就诊时由于不明确异常阴道流血来源，均不排除宫颈来源出血可能，均进行了 HPV 和 TCT 检测，并将 HPV、TCT 结果异常者排除，可以减少潜在干扰，虽然确保了所有宫颈病变可能的患者均被排除，但也存在缺点，若 TCT 结果为非典型腺细胞，则不排除宫颈病变或子宫内膜病变，直接剔除有可能造成 EC 病例的丢失，而 AUB 妇女中仅有极少数 EC，后续进一步扩大研究时需注意，TCT 结果为非典型腺细胞的患者，需先行阴道镜检、宫颈活检、颈管搔刮，若病检回报未提示宫颈病变，则需进一步宫腔镜检、诊刮，待病检回报后决定排除或是保留，以免丢失子宫内膜病变病例。最后，本研究排除了其他癌种及癌前病变的干扰，设立了“阴性对照”，证明了宫颈脱落细胞 DNA 甲基化（CDO1/CELF4）筛查 EC 的准确性，未来大样本、大队列研究中需设立其他癌种及癌前病变的“阳性对照”，进一步分析比较，以验证其对于 EC 的独有诊断效能。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2019,69(1): 7-34.
- [2] FELIX A S, BRINTON L A. Cancer Progress and Priorities: Uterine Cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2018,27(9): 985-994.
- [3] CHLEBOWSKI R T, ANDERSON G L, SARTO G E, et al. Continuous Combined Estrogen Plus Progestin and Endometrial Cancer: The Women's Health Initiative Randomized Trial[J]. J Natl Cancer Inst, 2016,108(3).
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020,70(1): 7-30.
- [5] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021,71(1): 7-33.
- [6] SUNDAR S, BALEGA J, CROSBIE E, et al. BGCS uterine cancer guidelines: Recommendations for practice[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017,213: 71-97.
- [7] CROSBIE E J, KITSON S J, MCALPINE J N, et al. Endometrial cancer[J]. The Lancet, 2022,399(10333): 1412-1428.
- [8] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 子宫内膜癌诊断与治疗指南（2021 年版）[J]. 中国癌症杂志, 2021,31(06): 501-512.
- [9] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会, 中华医学会病理学分会, 国家病理质控中心. 子宫内膜癌分子检测中国专家共识（2021 年版）[J]. 中国癌症杂志, 2021,31(11): 1126-1144.
- [10] 杨曦, 廖秦平. 子宫内膜癌筛查的现状与研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021,37(12): 1269-1272.
- [11] 中华医学会妇产科学分会妇科内分泌学组. 异常子宫出血诊断与治疗指南（2022 更新版）[J]. 中华妇产科杂志, 2022,57(7): 481-490.
- [12] HAN L, DU J, ZHAO L, et al. An Efficacious Endometrial Sampler for Screening Endometrial Cancer[J]. Front Oncol, 2019,9: 67.
- [13] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016,66(1): 7-30.
- [14] TIMMERMANS A, OPMEER B C, KHAN K S, et al. Endometrial thickness

- measurement for detecting endometrial cancer in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis[J]. *Obstet Gynecol*, 2010,116(1): 160-167.
- [15] 全国卫生产业企业管理协会妇幼健康产业分会生殖内分泌学组. 中国子宫内膜增生诊疗共识[J]. *生殖医学杂志 JF Journal of Reproductive Medicine*, 2017,26(10).
- [16] STOVALL T G, LING F W, MORGAN P L. A prospective, randomized comparison of the Pipelle endometrial sampling device with the Novak curette[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1991,165(5 Pt 1): 1287-1290.
- [17] DUFFY S, JACKSON T L, LANSDOWN M, et al. The ATAC adjuvant breast cancer trial in postmenopausal women: baseline endometrial subprotocol data[J]. *BJOG*, 2003,110(12): 1099-1106.
- [18] VAN HANEGEM N, PRINS M M, BONGERS M Y, et al. The accuracy of endometrial sampling in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016,197: 147-155.
- [19] 俞梅, 向阳, 马晓欣, 等. 子宫内膜癌筛查规范建议[J]. *中华妇产科杂志*, 2020,55(5): 307-311.
- [20] CHEN Z, ZHANG Y. Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development[J]. *Annu Rev Biochem*, 2020,89: 135-158.
- [21] SAAVEDRA K P, BREBI P M, ROA J C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix[J]. *Clin Epigenetics*, 2012,4(1): 13.
- [22] DOR Y, CEDAR H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine[J]. *Lancet*, 2018,392(10149): 777-786.
- [23] XIANG R, FU T. Gastrointestinal adenocarcinoma analysis identifies promoter methylation-based cancer subtypes and signatures[J]. *Sci Rep*, 2020,10(1): 21234.
- [24] ZHAN W, LI Y, LIU X, et al. ZNF671 Inhibits the Proliferation and Metastasis of NSCLC via the Wnt/ β -Catenin Pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2020,12: 599-610.
- [25] WEBER M, DAVIES J J, WITTIG D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells[J]. *Nat Genet*, 2005,37(8): 853-862.

- [26] WALTER K, HOLCOMB T, JANUARIO T, et al. Discovery and development of DNA methylation-based biomarkers for lung cancer[J]. Epigenomics, 2014,6(1): 59-72.
- [27] COPPEDÈ F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation[J]. Cancer Lett, 2014,342(2): 238-247.
- [28] ASHOUR N, ANGULO J C, ANDRÉS G, et al. A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis[J]. Prostate, 2014,74(12): 1171-1182.
- [29] LUO H, ZHAO Q, WEI W, et al. Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer[J]. Sci Transl Med, 2020,12(524).
- [30] SEIJO L M, PELED N, AJONA D, et al. Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements, Promises, and Challenges[J]. J Thorac Oncol, 2019,14(3): 343-357.
- [31] CHEN X, ZHANG J, RUAN W, et al. Urine DNA methylation assay enables early detection and recurrence monitoring for bladder cancer[J]. J Clin Invest, 2020,130(12): 6278-6289.
- [32] DEN HELDER R V, WEVER B M, van TROMMEL J A, et al. DNA methylation markers for endometrial cancer detection in minimally invasive samples: a systematic review[J]. Epigenomics, 2020,12(18): 1661-1672.
- [33] COSTAS L, FRIAS-GOMEZ J, GUARDIOLA M, et al. New perspectives on screening and early detection of endometrial cancer[J]. Int J Cancer, 2019,145(12): 3194-3206.
- [34] HUANG R L, SU P H, LIAO Y P, et al. Integrated Epigenomics Analysis Reveals a DNA Methylation Panel for Endometrial Cancer Detection Using Cervical Scrapings[J]. Clin Cancer Res, 2017,23(1): 263-272.
- [35] 中华医学会妇产科学分会妇科内分泌学组. 异常子宫出血诊断与治疗指南[J]. 中华妇产科杂志, 2014,49(11): 801-806.
- [36] PEARSON-STUTTARD J, ZHOU B, KONTIS V, et al. Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018,6(2): 95-104.
- [37] 张心, 王建东. 子宫内膜癌相关流行病学高危因素的研究进展[J]. 医学综述, 2021,27(15): 2995-2999.
- [38] 子宫内膜癌筛查专家委员会. 子宫内膜癌筛查和早期诊断专家共识(草

- 案)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017,33(10): 1050-1052.
- [39] 吕淑霞. 育龄妇女异常子宫出血的原因及病理分析[J]. 中国妇幼保健, 2016,31(3): 489-490.
- [40] 肖洁. 育龄妇女异常子宫出血的原因及病理基础[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017,17(40): 98-99.
- [41] ODASHIMA H, YOSHIOKA H, OTA K, et al. Morphological Differences between Liquid-Based Cytology and Conventional Preparation in Endometrial Endometrioid Carcinoma Grade 1 and Grade 3, and the Differentiation of Grades in Each Method[J]. Acta Cytol, 2021,65(3): 227-234.
- [42] AKAHANE T, KITAZONO I, YANAZUME S, et al. Next-generation sequencing analysis of endometrial screening liquid-based cytology specimens: a comparative study to tissue specimens[J]. BMC Med Genomics, 2020,13(1): 101.
- [43] BUGLYÓ G, STYK J, PÖS O, et al. Liquid Biopsy as a Source of Nucleic Acid Biomarkers in the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2022,23(8).
- [44] SRIVASTAVA A, MOXLEY K, RUSKIN R, et al. A Non-invasive Liquid Biopsy Screening of Urine-Derived Exosomes for miRNAs as Biomarkers in Endometrial Cancer Patients[J]. AAPS J, 2018,20(5): 82.
- [45] SILVEIRA A B, BIDARD F C, KASPEREK A, et al. High-Accuracy Determination of Microsatellite Instability Compatible with Liquid Biopsies[J]. Clin Chem, 2020,66(4): 606-613.
- [46] MARTINEZ-GARCIA E, LESUR A, DEVIS L, et al. Targeted Proteomics Identifies Proteomic Signatures in Liquid Biopsies of the Endometrium to Diagnose Endometrial Cancer and Assist in the Prediction of the Optimal Surgical Treatment[J]. Clin Cancer Res, 2017,23(21): 6458-6467.
- [47] HERZOG C, MARÍN F, JONES A, et al. A Simple Cervicovaginal Epigenetic Test for Screening and Rapid Triage of Women With Suspected Endometrial Cancer: Validation in Several Cohort and Case/Control Sets[J]. J Clin Oncol, 2022,40(33): 3828-3838.
- [48] VERHOEF V M, BOSGRAAF R P, VAN KEMENADE F J, et al. Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens (PROHTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial[J]. Lancet Oncol, 2014,15(3): 315-322.

- [49] LIEW P L, HUANG R L, WU T I, et al. Combined genetic mutations and DNA-methylated genes as biomarkers for endometrial cancer detection from cervical scrapings[J]. Clin Epigenetics, 2019,11(1): 170.
- [50] JESCHKE J, O'HAGAN H M, ZHANG W, et al. Frequent inactivation of cysteine dioxygenase type 1 contributes to survival of breast cancer cells and resistance to anthracyclines[J]. Clin Cancer Res, 2013,19(12): 3201-3211.
- [51] DOMINY J J, HWANG J, STIPANUK M H. Overexpression of cysteine dioxygenase reduces intracellular cysteine and glutathione pools in HepG2/C3A cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007,293(1): E62-E69.
- [52] SINGH G, CHARLET-B N, HAN J, et al. ETR-3 and CELF4 protein domains required for RNA binding and splicing activity in vivo[J]. Nucleic Acids Res, 2004,32(3): 1232-1241.
- [53] HAN J, COOPER T A. Identification of CELF splicing activation and repression domains in vivo[J]. Nucleic Acids Res, 2005,33(9): 2769-2780.
- [54] LADD A N, CHARLET N, COOPER T A. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing[J]. Mol Cell Biol, 2001,21(4): 1285-1296.
- [55] Practice Bulletin No. 149: Endometrial cancer[J]. Obstet Gynecol, 2015,125(4): 1006-1026.
- [56] 王晶, 袁江静, 王玉东. 2022 欧洲肿瘤内科学会《子宫内膜癌临床实践指南》解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022,38(08): 827-829.
- [57] ACOG Committee Opinion No. 734: The Role of Transvaginal Ultrasonography in Evaluating the Endometrium of Women With Postmenopausal Bleeding[J]. Obstet Gynecol, 2018,131(5): e124-e129.
- [58] 李柯. 糖类抗原 125 与血管内皮生长因子检测在子宫内膜癌中的价值[J]. 检验医学与临床, 2022,19(12): 1593-1595, 1598.
- [59] KAKIMOTO S, MIYAMOTO M, EINAMA T, et al. Significance of mesothelin and CA125 expression in endometrial carcinoma: a retrospective analysis[J]. Diagn Pathol, 2021,16(1): 28.

综述

子宫内膜癌的筛查现状及研究进展

傅英钦综述 徐大宝审校

摘要：子宫内膜癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一，其发病率逐年上升，且随着人们生活水平的提高有年轻化趋势。目前在子宫内膜癌筛查方面尚没有系统、有效的方法。现阶段取子宫内膜行组织病理学检查是诊断子宫内膜癌的金标准，但由于其侵入性，使得推广受限，这就为子宫内膜癌筛查带来一定难度。本文围绕子宫内膜癌现阶段的筛查方法及其相关进展展开综述。

关键词：子宫内膜癌；筛查；研究进展

Abstract: Endometrial cancer is one of the most common malignant tumors in gynecology, its incidence is increasing year by year, and with the improvement of people's living standard has a trend of younger age. At present, there is no systematic and effective method for endometrial cancer screening. At present, histopathological examination of the endometrium is the gold standard for the diagnosis of endometrial cancer, but due to its invasive nature, the promotion is limited, which brings some difficulty for endometrial cancer screening. This review summarizes the current status and progress of early screening methods for endometrial cancer.

Key words: Endometrial cancer; screening; research progress

子宫内膜癌（endometrial cancer, EC）是最常见的妇科恶性肿瘤之一，是发生在子宫内膜的一类上皮性恶性肿瘤，以来源于子宫内膜腺体的腺癌（子宫内膜样腺癌）最为常见，在发达国家位列妇科恶性肿瘤之首，也是全球第六大常见恶性肿瘤^[1]，其发病率在全球范围内呈上升趋势^[2]，患者发病年龄也逐渐趋于年轻化^[3]。美国癌症协会 2021 年报道，2020 年子宫内膜癌新发病例 65620 人，死亡 12590 人^[4]；2021 年子宫内膜癌新发病例 66570 例，死亡病例 12940 例^[5]。英国妇科肿瘤协会 2017 年报道，1990-2011 年子宫内膜癌发病人数上升了 50%^[6]。我国 2019 年报道，2004 年子宫内膜癌发病率为 6.51/10 万，2008 年上升为 9.52/10 万，2015 年上升至 10.3/10 万^[7]。且以上病例有向年轻化发展的趋势。

子宫内膜癌的相关高危因素包括有绝经、高血压、糖尿病、异常阴道流血、肥胖、不孕、长期他莫昔芬用药、长期雌激素用药、多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome, PCOS）、初潮年龄早、基因改变等^[8]。在这些危险因的持续作用下，子宫内膜可发生病变，其中，部分为非生理性增生，具有可逆性^[9]，而部分异常增生为癌前病变，随着时间的推移，可发展成为子宫内膜癌^[10]。1项研究对子宫内膜增生大样本女性群体进行随访，期限为20年，该研究结果^[11]表明，子宫内膜上皮内非瘤样病变（即子宫内膜不典型增生）的患者发展成为子宫内膜癌的20年累积病变风险约28%，而其余类型子宫内膜增生患者发展成为子宫内膜癌的20年累积病变风险约为5%。子宫内膜癌一般分为两种类型：I型，即雌激素依赖型：它的发生发展与机体雌激素的增高有关（内源或外源性），占EC中的大多数，病理类型为子宫内膜样腺癌，雌激素受体阳性率高，常分化较好，往往预后较好；II型，即非雌激素依赖型：少见，组织学表现为浆液性癌、透明细胞癌和未分化癌等，分化差，恶性程度高，雌激素受体多为阴性，预后差。治疗上，目前的标准化治疗方法为手术联合放疗和/或化疗^[12]，但患者预后大相径庭，子宫内膜癌患者的分期越晚，5年生存率越低。子宫内膜癌I期女性中约80%的患者，其5年生存率可达95%以上^[13]，而晚期患者的5年生存率仅不到20%^[14]。因此，早发现早干预，是改善子宫内膜癌患者预后和远期生存率的关键。子宫内膜癌早期筛查就变得尤为至关重要。然而，目前还没有可靠的子宫内膜癌早期筛查方法，探索并确立一种创伤小、非侵入性、准确性高、操作便捷、易于推广的检查方法，作为子宫内膜癌的筛查手段，成为目前研究的重点。现围绕子宫内膜癌目前的筛查方法及其相关进展予以综述。

1 子宫内膜癌的现有筛查与诊断方法

子宫内膜癌主要发生于绝经后妇女，发病年龄逐渐呈年轻化趋势，异常阴道流血是子宫内膜癌最常见的症状，但临床表现不具备典型性，缺乏特异性，且受到多种良性疾病的影响，因此明确诊断仍需要借助进一步的辅助检查。现阶段，已有的子宫内膜癌的筛查及诊断方法较多，包括超声等影像学检查、血清肿瘤标志物的检测、组织细胞学检查、组织病理学检查、基因检测等。相较于影像学、血清学等手段，直接获取宫腔内组织或细胞进行病理学检查虽然相对有创，却依旧是诊断子宫内膜癌的金标准。

1.1 影像学检查

1.1.1 经阴道超声检查

影像学手段以超声检查为主要代表，经阴道超声检查（transvaginal ultrasonography, TVS）常作为妇科疾病的初步检查方法，具有价格低廉、快速

便捷、安全可重复等优点。经阴道超声检查可以了解宫腔内情况,测量某些相关指标,如子宫内膜厚度、血流信号等指标,在初步鉴别子宫内膜良恶性病变方面具有重要的价值^[15]。但由于多因素的影响,经阴道超声检查的特异性并不高,有研究以 TVS 测量子宫内膜厚度对无症状的绝经后妇女进行子宫内膜癌及其癌前病变的筛查,发现 TVS 测量子宫内膜厚度并不能达到让人满意的评估效果^[16]。不同研究报道对于绝经后妇女子宫内膜厚度阈值的制定存在不同的标准,例如有研究表明 TVS 测量内膜厚度 3mm 及以上时,TVS 诊断子宫内膜癌具有最高的敏感性^[17],而美国妇产科医师协会则认为 TVS 测量内膜厚度超过 4mm 已适用于子宫内膜癌的初筛^[18],加拿大妇产科医师协会联合妇科肿瘤学会则提出 TVS 测量子宫内膜厚度在 5mm 及以上,其诊断效能更高^[19]。除此之外,检查结果的准确性也会受到超声科医师的经验水平及技术水准的影响,哪怕是 1mm 的差距,也会对子宫内膜癌的诊断产生重大影响,直接影响后续的治疗和决策方案的制定。因此,TVS 测量子宫内膜厚度对于无症状绝经后妇女群体,作为子宫内膜癌筛查方法,特异性并不好,不适合作为单独筛查手段。

1.1.2 电子计算机断层扫描与核磁共振成像

此外,电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)与核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)也可以作为子宫内膜癌的诊断方法,目前在日常临床工作中已被大量应用。CT 的主要优势在于不易受体内置入物的干扰(如宫内节育器等金属置入物),可以对子宫内膜癌的浸润深度和转移范围做出有效、准确评估,因此更大的意义在于子宫内膜癌术前的影像学评估,对其肿瘤分期有一定的初步判别作用,有较好地临床指导意义。MRI 亦可以作为子宫内膜癌的诊断方法,可较好地评估肿瘤的直径、范围,初步判定肿瘤的性质,在某些场景下亦可较好地评估子宫内膜癌肌层浸润深度及盆腹腔淋巴结转移情况。因此其更大意义也在于子宫内膜癌的术前影像学评估。有研究将 MRI 用于子宫内膜癌术前对其肌层浸润进行评估,术后在大体标本上进行对比验证,结果显示 MRI 的准确率可达 93.1%,这是 TVS 所达不到的^[20]。可见 MRI 对于子宫内膜癌术前的影像学分期具有较高的准确性,与术后病理学分期有较好地符合度,有极大的临床指导意义。但由于 CT、MRI 成本高、价格昂贵、可重复性差等缺点,一般不用作子宫内膜癌的初步筛查手段,其适用场景往往在于子宫内膜癌已确诊或拟诊,需要进行术前分期的情况。但是近些年来超声造影技术(dynamic contrast enhanced ultrasound, DCE-US)迅猛发展,有研究表明期对于早期子宫内膜癌术前分型诊断与评估具有较高价值,其准确性甚至超过 MRI,但是临床应用尚未普及,有待进一步验证^[21]。

1.2 组织病理学检查

采集微量子宫内膜,进行组织病理学检查,是诊断子宫内膜癌的“金标准”,是最终诊断依据,临床上常用的采样方式有诊断性刮宫、宫腔镜检联合子宫内膜活组织检查。

1.2.1 诊断性刮宫术

诊断性刮宫术于 1843 年逐渐开始在临床工作中应用,是治疗异常子宫出血、发现子宫内膜病变的经典术式,既是检查,又是治疗。既往有研究以 204 例子宫内膜病变患者为研究对象,将患者的术前诊刮组织病理学结果与术后大体标本组织病理学结果进行比较,在组织学类型上获得了高达 83.75% 的符合度,其中子宫内膜样腺癌最高,为 85.81%^[22]。尽管诊断性刮宫的操作简便又快捷,广泛应用于临床,但其操作具有非可视性,因此取材存在局限性,有一定比例的漏诊风险,可能耽误病情,造成严重的后果。此外,其为有创性检查,患者疼痛负荷大,费用高,也正是因为疼痛明显,患者接受度差,且可引起感染、损伤、出血等,甚至可出现子宫穿孔、宫腔粘连,进而影响女性的生育力,导致不孕、流产等并发症,因此将其作为常规的筛查方法是不适宜,但可作为高危人群的子宫内膜癌筛查手段之一。

1.2.2 子宫内膜活检术

子宫内膜活检术是指使用子宫内膜采集器收集标本进行组织病理学检查,常用的采集器有 Pipelle 采集器、Vabra 抽吸器等。以 Pipelle 为例,它是一种利用与负压吸引装置相连的导管,将子宫内膜组织从宫腔缓慢、温和吸出,进行组织病理学检查以明确诊断的筛查方式。一项对 140 例异常子宫出血患者同时行 Pipelle 及诊断性刮宫术的病例对照研究显示:将其用于子宫内膜癌、子宫内膜增生以及正常子宫内膜的各个生理周期阶段(增殖期、分泌期)诊断的敏感性 & 准确性均可达 100%,而将其用于子宫内膜息肉诊断的敏感性为 60%,准确性为 98.6%^[23]。既往有研究报道,利用 Pipelle 进行子宫内膜活检,相较于传统的诊断性刮宫术,所获取的标本更具充分性,组织病理学结果高度吻合,具有更高的结果一致性。与此同时,因其疼痛感更低、持续时间更短,更容易为患者所接受,配合度好。但对于子宫内膜萎缩的患者,其诊断敏感性可降低至 50% 以下^[24]。因此, Pipelle 依旧存在漏可能性。对于采样不全、取材失败的高危人群,仍需进行全面的分段诊刮^[25]。

1.2.3 宫腔镜下子宫内膜活检术

宫腔镜下子宫内膜活检术实是一种“检查+手术”联合一体的模式,目前在临床上应用甚广,在较为大型的医院甚至为常备手段。在宫腔镜下,可以直接观察到颈管形态、宫腔形态、子宫内膜厚薄、有无异常血管、有无病损等情况,术者可以根据病情需要,对可疑病灶进行定位取样,对病损进行切除等,进而

送组织病理学检查,明确有无病变,指导后续治疗与临床决策。相较于传统的诊断性刮宫更具有优势,特别是局部病变。有研究通过宫腔镜下子宫内膜活检诊断子宫内膜癌,获得了90.4%的敏感性^[26]。相当一部分专家认为,行宫腔镜检查的患者,脱落的癌细胞有可能通过膨宫液顺着输卵管进入腹腔,增加癌细胞扩散的风险,但对于此,不同的研究者之间意见未达成统一,众说纷纭,尚没有定论^[27]。因此,宫腔镜下子宫内膜活检仍是目前筛查子宫内膜病变较准确和经济的方法。

1.3 细胞病理学检查

1.3.1 子宫内膜细胞学检查

子宫内膜细胞学检查(endometrial cytology test, ECT)是指避开经期,无异常阴道流血时(以减少感染概率),利用专门的子宫内膜细胞采集器采集足够的样本,进行液基薄层细胞学检测,以达到诊断目的。目前常用的子宫内膜细胞采集器有“Tao brush”、SAP-1采集器。国外有研究报道,采用“Tao brush”细胞学检测进行子宫内膜癌筛查的敏感性为91.67%,特异性为96.04%^[28],与诊断性刮宫术无显著统计学差异。国内有研究报道,采用SAP-1采集器收集样本进行细胞学检查,利用其进行子宫内膜癌筛查的敏感性为92.9%,特异性为100.00%,准确率可达99.1%^[29],与诊断性刮宫术相比,无显著统计学差异。亦有相关研究表明,在子宫内膜细胞学检查的基础上,联合TVS可提高诊断效果^[30,31]。这类筛查方法相较于传统的诊断性刮宫术,患者承受的痛苦更小,无须麻醉和住院观察,因此患者的接受度与配合度更好。但其取材容易受到多因素的干扰,诸如宫腔的大小形态、有无畸形、有无解剖结构异常、病灶的位置、病损的大小,以及绝经前女性患者的子宫内膜受到体内激素变化而产生周期性变化等影响,因此并没有在临床上得到广泛的应用。

1.3.2 子宫内膜细胞块检查

子宫内膜细胞块检查是指,利用子宫内膜细胞学检查剩余的细胞学标本进行离心、固定、免疫组织化学染色等步骤而成的细胞团块进行子宫内膜癌的筛查。一项回顾性研究表明,以绝经后女性为研究对象,评估子宫内膜细胞团块的诊断效能,其对于子宫内膜增生的阳性预测值为100%,对于II型子宫内膜癌的阳性预测值为85.7%^[32]。有研究对198例子宫内膜癌高危女性同时进行子宫内膜细胞学检查取样并制取子宫内膜细胞块,然后行宫腔镜下采集少量子宫内膜进行组织病理学检查,以最终的病理学诊断报告作为参考依据,该研究中有22.2%的子宫内膜细胞块标本不合格,不足以进行诊断,而子宫内膜细胞标本的不合格率仅有7.1%,明显低于子宫内膜细胞块标本。但在两种类型的标本均合格的144例患者中,对于子宫内膜上皮内瘤样病变以及子宫内膜癌患者,子

宫内膜细胞块检查的诊断符合率为 95.1%，子宫内膜细胞学检查的诊断符合率为 93.8%，将这两种类型的标本联用，可将诊断符合率提高至 95.8%^[33]。因此，子宫内膜细胞块检查作为补充手段，在一定程度上可以进一步提高诊断的准确性，但目前尚缺乏详尽的研究。

1.4 血清肿瘤标志物检测

目前，糖类抗原 125(CA125)和附睾蛋白 4(HE4)是最经典的子宫内膜癌血清肿瘤标志物，在临床工作中最为常用。其中 CA125 与子宫内膜癌的分期相关，往往在子宫内膜癌进展、存在宫外侵犯时升高，亦可见于子宫腺肌症、子宫腺肌瘤、卵巢巧克力囊肿以及盆腔炎等良性疾病，对于子宫内膜癌早期诊断与筛查的意义有限^[34]。有研究表明，血清 HE4 对子宫内膜癌的早期诊断的具有重要意义，但是国内外尚未确定最佳参考值范围，还有待进一步研究^[35]。一项 Meta 分析显示：单独检测血清 CA125、HE4 筛查子宫内膜癌的敏感性分别为 26%、53%，特异性分别为 81%、91%，而同时检测 CA125、HE4 的敏感性和特异性分别为 58%、92%^[36]，另有研究报道联合检测 CA125、HE4 可提高阳性预测值^[37]。尽管 CA125、HE4 在临床上应用已久，但往往是作为诊断的参考依据，并非诊断依据，更多用于疗效的观察及随访。

1.5 基因检测

近些年来，现代分子生物学领域的研究突飞猛进，越来越多的基因检测方法问世并逐渐投入到应用当中。其中自然也包括子宫内膜癌的诊断，多种基因检测方法的应用对其诊断起到了很好的助力作用，诸如免疫组织化学技术、免疫细胞化学技术等。现阶段主要的检测指标包括有：第 10 号染色体缺失的磷酸酶与张力蛋白同源基因(PTEN)、TP53、Ki-67、微卫星不稳定(MSI)等。

1.5.1 PTEN

与子宫内膜癌相关的遗传学改变中，最为常见的是 PTEN 突变，相较于 II 型子宫内膜癌更多见于 I 型子宫内膜癌，主要发生于 I 型子宫内膜癌的早期阶段^[38]。有研究报道，子宫内膜增生患者 PTEN 表达的克隆缺失率为 19%，子宫内膜癌患者 PTEN 表达的克隆缺失率为 55%^[39]。可见，PTEN 表达在子宫内膜癌患者的丢失程度明显增高。因此，PTEN 突变的相关因素有待进一步研究，进一步探索，并且需要加强对于 PTEN 突变患者的随访，这对于子宫内膜癌的早期变化的理解可能会有较大意义。

1.5.2 TP53

相较于 I 型子宫内膜癌，TP53 突变更多见 II 型子宫内膜癌，是其特征性的改变，主要见于浆液性癌患者。既往有研究表明，TP53 只在子宫内膜癌组织中表达，在增生子宫内膜组织与正常子宫内膜组织中不表达，且其表达程度与子

宫内膜癌的发生发展及其预后密切相关,因此可用于对子宫内膜癌的高危人群进行区分及危险分层,具有一定筛查和预防意义^[40]。

1.5.3 Ki-67

Ki-67 是子宫内膜癌的重要指标,它对子宫内膜癌的病情发展、临床分期、病理类型、有无转移和疾病预后等密切相关。它在分泌状态子宫内膜、萎缩状态子宫内膜中表达程度低,在子宫内膜癌组织及增殖状态子宫内膜中表达程度较高^[41],因此,Ki-67 与子宫内膜癌组织中肿瘤细胞的复制活跃程度有关,间接反映了其预后。

1.5.4 MSI

有文献报道,林奇综合征患者中约有 1/3-2/3 可发展成为子宫内膜癌^[42]。研究发现,MSI 主要发生于林奇综合征相关性子宫内膜癌(可从 90%以上的患者中发现),其有助于子宫内膜癌的早期筛查与诊治。

2 子宫内膜癌筛查方法的研究进展

近些年来,在全球范围内,它的发病率呈逐渐攀升,发病年龄亦逐渐年轻化,子宫内膜癌的早期筛查方式的探索热度高居不下,是近期的研究热点,包括基因甲基化检测、新型肿瘤标志物、血清光谱检测、子宫内膜微生态等。

2.1 DNA 甲基化检测

“表观遗传学”最初由 Conrad Waddington 于 1942 年首次提出,用于描述细胞表型中独立于 DNA 序列改变的可遗传变化。尽管经历了数十年的争论和研究,但表观遗传学的定义仍然存在着争议,缺乏共识^[43]。目前表观遗传学最常用的定义是指不改变基因碱基序列的情况下,相应的表型发生了可遗传变化的现象。其中 DNA 甲基化是发现最早、研究最彻底的表观遗传学机制,可以使抑癌基因失活,或者使原癌基因激活,与肿瘤的发生发展密切相关,尤其是抑癌基因的沉默在这个过程中发挥重要作用。

2.1.1 DNA 甲基化与肿瘤的关系

DNA 甲基化是指 CpG 二核苷酸的胞嘧啶环 5 号位碳原子上的氢被一个甲基所取代,使之变成 5-甲基胞嘧啶的化学反应^[44]。它除了在维持机体生长发育、新陈代谢方面发挥重要功能外,还与肿瘤的发生和发展密切相关,近些年来研究火热,是研究的热点之一。

大量的研究表明,肿瘤组织中 DNA 甲基化模式的改变可以使抑癌基因沉默,或者使原癌基因激活^[45],从而导致肿瘤的发生与发展,尤其是抑癌基因的沉默在这个过程中发挥重要作用。早期肿瘤中 DNA 甲基化改变的特点表现为全基因组处于低甲基化状态,而抑癌基因启动子区域 CpG 岛处于高度甲基化状

态, 因此 DNA 甲基化检测可以作为一种有前途的癌症早筛查手段^[46, 47], 亦属于基因检测的范畴。到目前为止, 已经在肺癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌等多种类型的癌症中发现了大量以 DNA 甲基化为基础的生物标志物, 并且应用于诊断具有较高的准确性^[48-50], 具有良好的应用前景, 为肿瘤的早期筛查提供了新思路。

2.1.2 DNA 甲基化的检测方法

DNA 甲基化检测方法主要分为两类, 检测整体基因组与检测特定的基因位点^[51]。依据其预处理的方式不同, 亦可分为亲和富集预处理法、限制性酶切预处理法、亚硫酸氢盐处理法 3 类^[52]。目前应用最广的 DNA 甲基化检测与分析方法是亚硫酸氢盐预处理法, 其中较为常用的有甲基化特异性数字 PCR、甲基化芯片、核酸质谱、甲基化荧光法等。其中, 基于 PCR 扩增的亚硫酸氢盐预处理法成本相对较低, 操作方法简便易行, 是目前的主流 DNA 甲基化检测方法。

2.1.3 DNA 甲基化检测在泛癌种筛查中的应用

基于基因生物学技术筛查恶性肿瘤的检测公司, 目前比较知名的有国外的 Grail, 国内的燃石、鹧远等, 均采用了甲基化的技术路线, 且目前应用最广泛的是外周血的血浆游离 DNA (plasma cell-free DNA, cfDNA) 的甲基化检测。因其非侵入性、可在多个时间点重复采样检测, 有利于对疾病过程的整体监测, 故其在肿瘤的早期诊断、微小残留病变检测、肿瘤实时监测、耐药突变鉴定等领域有着非常广阔的应用前景。以早筛的龙头企业 Grail 为例, 其泛癌早筛项目 CCGA (the circulating cell-free genome atlas) 包含三个子研究。CCGA-1 (N=2402) 是对早筛技术路线的探索, 使用了兼顾信号丰度和强度的靶向测序、全基因组测序和全基因组甲基化测序三种技术路线, 最后确定了信号出现早、强度大并可组织溯源的甲基化技术路线作为后期研究的方向^[53]。CCGA-2 (N=4316) 在前期工作的基础上确定靶向甲基化捕获区域并构建机器学习分类器, 使用靶向 DNA 甲基化检测确定是否为肿瘤患者并建立组织溯源模型, 结果显示对 96% 的肿瘤样本进行组织溯源, 其准确率能达到 93%^[54]。CCGA-3 (N=4077) 是进行产品的临床验证, 推出产品 Galleri, 大样本研究表明, 其组织溯源准确率可达 88.7%, 特异性为 99.4%, 敏感性为 51.5%, 其中早期患者检测敏感性较低, 但随着临床分期的升级而升高, I 期患者为 16.8%, II 期为 40.4%, III 期为 77.0%, IV 期为 90.1%^[55], 但目前尚未批准上市。

2.1.4 DNA 甲基化检测在单癌种筛查中的应用

DNA 甲基化的组织特异性, 使得其能应用于肿瘤筛查, 并助力肿瘤的精准诊断。结直肠癌患者 Spetin9、FIT-DNA 基因呈高甲基化, 乳腺癌患者 RASSF1A、

SOX17、CDH1、p16、RAR β 2、CyclinD2 等基因呈高甲基化状态,肺癌患者 SHOX2、RASSF1A 基因呈高甲基化,胰腺癌早期 p16 基因启动子区域即可呈现高甲基化^[56]。以上特定癌种相应的基因甲基化检测,正在被逐步开发并投入临床,且颇见成效,有望在肿瘤的精准诊断和个体化治疗中发挥越来越重要的作用。

2.1.5 DNA 甲基化检测在妇科肿瘤筛查中的应用

宫颈癌是 DNA 甲基化研究热度最高的妇科肿瘤,因其所需取材的直接性、可获得性、便捷性,该癌种领域的 DNA 甲基化检测技术已相当成熟,目前最常用的 DNA 甲基化检测有:1.单基因甲基化检测:PAX1、SOX17、SOX1、ZNF671、PCDHA13 等;2.多种基因组合的甲基化检测:FAM19A4/miR124-2 等。另外,人乳头瘤状病毒(human papilloma virus, HPV)的感染是宫颈癌的高危因素,且 HPV 感染的类型与宫颈癌的病理类型、预后等密切相关,已广泛应用于宫颈癌的筛查,那么除了以上单纯以单种或多种基因甲基化检测的方式,亦可联合 HPV 检测,如 EPB41L3 的基础上联合 HPV DNA 分型检测等。有研究报道,采集宫颈脱落细胞样本进行以上多种方式的 DNA 甲基化检测进行宫颈癌的筛查,准确性均可达到 80%以上^[57, 58]。宫颈癌的普查往往严格遵守经典的“三阶梯”的程序,但是由于各地区经济水平、人群的依从性等差异以及阴道镜检以及取明显病灶送活检的不适感与疼痛感强烈等,某些地区阴道镜检查的开展受到了比较大限制,因而不可轻易获得,有研究报道,以“PAX1/ZNF582 联合 HPV16/18 检测”的方式进行宫颈癌的筛查,可以减少约 1/3 的阴道镜检查,提供宫颈癌筛查的新思路^[59, 60]。

子宫内膜癌的发病率逐渐上升并呈年轻化趋势,在某些发达地区,子宫内膜癌逐渐超越宫颈癌成为了妇科最常见的恶性肿瘤,而子宫内膜癌 DNA 甲基化检测也有了一定程度的进展。已有研究证实了子宫内膜癌细胞可脱落至宫颈,且可在宫颈脱落细胞学检查中被发现,可以利用其进行 DNA 甲基化检测,以达到子宫内膜癌筛查的目的^[61]。目前已有研究发现了一些高特异性的 DNA 甲基化标志物,如 BHLHE22、CDO1、CELF4、HAND2、RASSF1 等,特异性均可以达到 85%以上,ROC 曲线下面积(AUC)从 0.80 到 0.96 不等。但是目前单个 DNA 甲基化检测的敏感性不高,多中基因甲基化的组合检测,能有效提高子宫内膜癌筛查的敏感性和特异性,较为常见的基因组合有:CDO1/CELF4 双基因、BHLHE22/CDO1/CELF4 三基因等。在 DNA 甲基化检测的基础上联合其他方法学亦可以提高敏感性和特异性,如 BHLHE22、CDO1、TBX5 和 HAND2 甲基化检测联合 PTEN 和 TP53 的突变检测。以上不同组合的敏感性为 60.0%-91.8%,特异性为 70%-100%^[62-64]。

卵巢癌居于妇科恶性肿瘤第三位,但其恶性度和死亡率最高,且预后差。目前卵巢癌 DNA 甲基化相关研究甚少,但仍有少数研究表明其具有较为不错应用前景。有研究发现,利用宫颈脱落细胞进行 DNA 甲基化组合检测(AMPD3、NRN1 和 TBX15)的敏感性为 61%-76%,特异性 70%-88%。^[65-68]。有基于血液样本 DNA 甲基化检测的两项研究表明,采集 ctDNA 进行甲基化检测用于诊断卵巢癌的敏感性均>85%,特异性为 60%-90%不等。^[69,70]。

2.2 新型肿瘤标志物

近些年来,研究发现了一些新型的肿瘤标志物,如精子相关抗原 9(SPAG9)、人软骨糖蛋白(YKL-40)等。有研究报道,SPAG9 可用于区分子宫内膜癌和子宫良性疾病,并且与子宫内膜癌的病理类型、分级一定程度上相关^[71]。亦有研究报道,早期子宫内膜癌高表达 YKL-40,虽然 YKL-40 在区分子宫内膜癌早晚期方面不如 HE4,但将 YKL-40 与 HE4 联合,对早期子宫内膜癌的筛查具有重要意义^[72,73]。

2.3 血液光谱检测

血液标本蕴含的信息丰富,包括蛋白质、脂类和核酸等各种分子信息,且易获取,将血液光谱学技术应用到疾病的筛查中,具有成本低、便捷、高效、准确的特点。血液中存在各种分子均可以被检测,有研究报道,以血液振动光谱技术进行子宫内膜癌筛查的敏感性为 87%,特异性为 78%,其中,检测子宫内膜增生的敏感性 100%,特异性为 88%;检测 I 型子宫内膜癌的敏感性为 91%,特异性为 81%,对以上两者的检测具有最高的准确性^[74]。但其亦存在一定的局限,因为光谱区域是由大量不同的生物实体形成的,衍生的峰只能暂时归属到各种生物分子,这也限制了它在揭示肿瘤发生和演变的分子途径方面的应用。

2.4 子宫内膜微生态

子宫内膜微生物群的各种组成部分可以产生各种生物活性分子,可以参与机体的新陈代谢、病理生理过程以及免疫环节,适当比例的微生物群可以构建并维持一个稳定且健康的子宫内膜环境。在多种高危因素,诸如绝经、异常阴道流血、肥胖、糖尿病、高血压、多囊卵巢综合征等的影响下,子宫内膜的微生态可发生一定的演变,出现异常的微生物生态系统改变,如比例失衡、优势微生物群演变。例如,有相关研究报道,绝经是子宫内膜癌发生高危因素之一,可引起在子宫内膜癌相关微生物群的演变,可以此为接入点来筛查无症状的高危患者^[75]。然而,与子宫内膜微生态相关领域研究道阻且长,存在很多挑战,由于女性月经周期的存在,子宫内膜周期性剥脱出血,获得无污染标本比较困难,往往混入下生殖道的微生物群,易造成干扰,除此之外,在标本储存、运输、处理及检测的过程中也存在被污染的可能。

3 总结

综上所述,子宫内膜癌的筛查需要遵循“早期发现、早期治疗”的原则,在癌前病变和早期子宫内膜癌的阶段施加干预,以改善预后、提高生存率。但随着子宫内膜癌的发病率逐渐升高及其年轻化趋势,建立起一套规范、统一、可普及、简便、准确、无创、大众接受度高的子宫内膜癌筛查方案流程。目前公认的应用最广泛的仍是采集子宫内膜标本行组织病理学检查,但依旧不能真正意义上地达到子宫内膜癌早期筛查的目的。随着影像学、分子生物学等的飞速发展,越来越多的新型手段开始加入到子宫内膜癌的早期筛查尝试中,甚至逐渐开始加入临床应用中,其中不乏有高敏感性和特异性的手段,如DNA甲基化检测、血液光谱检测、新型肿瘤标志物等,以及将以上新型筛查方式与现有筛查方式相结合,可进一步提高内膜癌的早期筛查的准确性,且随着其进一步发展,有望在子宫内膜癌的诊断上形成类似于宫颈癌“三阶梯”式精准筛查模式,建立精准的风险预测模型,对子宫内膜癌真正地做到早发现、早治疗、改善预后、提高生存率。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2019,69(1): 7-34.
- [2] FELIX A S, BRINTON L A. Cancer Progress and Priorities: Uterine Cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2018,27(9): 985-994.
- [3] CHLEBOWSKI R T, ANDERSON G L, SARTO G E, et al. Continuous Combined Estrogen Plus Progestin and Endometrial Cancer: The Women's Health Initiative Randomized Trial[J]. J Natl Cancer Inst, 2016,108(3).
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020,70(1): 7-30.
- [5] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021,71(1): 7-33.
- [6] SUNDAR S, BALEGA J, CROSBIE E, et al. BGCS uterine cancer guidelines: Recommendations for practice[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017,213: 71-97.
- [7] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019,41(1): 19-28.
- [8] KURAMOTO H, IWAMI Y, SUGIMOTO N, et al. Cytological Characteristics

- of Endometrial Phasing Using the Specimens Prepared with the Liquid-Based Procedure: Comparison with the Conventional Procedure[J]. *Acta Cytol*, 2016,60(5): 429-437.
- [9] ZHANG C, WANG E Y, LIU F, et al. Routine histologic features in complex atypical hyperplasia can predict the presence of endometrial carcinoma: a clinicopathological study of 222 cases[J]. *Hum Pathol*, 2018,80: 40-46.
- [10] CHAPEL D B, PATIL S A, PLAGOV A, et al. Quantitative next-generation sequencing-based analysis indicates progressive accumulation of microsatellite instability between atypical hyperplasia/endometrial intraepithelial neoplasia and paired endometrioid endometrial carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2019,32(10): 1508-1520.
- [11] LACEY J J, SHERMAN M E, RUSH B B, et al. Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia[J]. *J Clin Oncol*, 2010,28(5): 788-792.
- [12] LACHANCE J A, DARUS C J, RICE L W. Surgical management and postoperative treatment of endometrial carcinoma[J]. *Rev Obstet Gynecol*, 2008,1(3): 97-105.
- [13] HAN L, DU J, ZHAO L, et al. An Efficacious Endometrial Sampler for Screening Endometrial Cancer[J]. *Front Oncol*, 2019,9: 67.
- [14] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2016,66(1): 7-30.
- [15] LIU M J, LIU Z F, YIN W H, et al. Application of transvaginal three-dimensional power Doppler ultrasound in benign and malignant endometrial diseases[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019,98(46): e17965.
- [16] 师赞, 薛雪, 石盼盼, 等. 绝经后无症状子宫内膜增厚女性的临床评估[J]. *国际妇产科学杂志*, 2020,47(04): 413-416.
- [17] WONG A S, LAO T T, CHEUNG C W, et al. Reappraisal of endometrial thickness for the detection of endometrial cancer in postmenopausal bleeding: a retrospective cohort study[J]. *BJOG*, 2016,123(3): 439-446.
- [18] ACOG Committee Opinion No. 734: The Role of Transvaginal Ultrasonography in Evaluating the Endometrium of Women With Postmenopausal Bleeding[J]. *Obstet Gynecol*, 2018,131(5): e124-e129.
- [19] RENAUD M C, LE T. Epidemiology and investigations for suspected endometrial cancer[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2013,35(4): 380-381.

- [20] RAUCH G M, KAUR H, CHOI H, et al. Optimization of MR Imaging for Pretreatment Evaluation of Patients with Endometrial and Cervical Cancer[J]. RadioGraphics, 2014,34(4): 1082-1098.
- [21] TIAN Z, YAO H M, WANG Y Q, et al. Use of contrast-enhanced ultrasound during preoperative evaluation of endometrial carcinoma[J]. Gynecology and Obstetrics Clinical Medicine, 2021,1(3): 148-152.
- [22] KISIELEWSKI F, GAJEWSKA M E, MARCZEWSKA M J, et al. Comparison of endometrial biopsy and postoperative hysterectomy specimen findings in patients with atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer[J]. Ginekol Pol, 2016,87(7): 488-492.
- [23] ABDELAZIM I A, ABOELEZZ A, ABDULKAREEM A F. Pipelle endometrial sampling versus conventional dilatation & curettage in patients with abnormal uterine bleeding[J]. J Turk Ger Gynecol Assoc, 2013,14(1): 1-5.
- [24] SANAM M, MAJID M M. Comparison the Diagnostic Value of Dilatation and Curettage Versus Endometrial Biopsy by Pipelle--a Clinical Trial[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015,16(12): 4971-4975.
- [25] 徐丕丽, 文佳, 张慧, 等. 宫腔取样与子宫内膜癌筛查研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2016,32(09): 911-914.
- [26] DE FRANCISCIS P, RIEMMA G, SCHIATTARELLA A, et al. Concordance between the Hysteroscopic Diagnosis of Endometrial Hyperplasia and Histopathological Examination[J]. Diagnostics (Basel), 2019,9(4).
- [27] 吴汝芳. 宫腔镜检查在诊断异常子宫出血中的临床价值[J]. 中国妇幼保健, 2012,27(07): 1088-1090.
- [28] LV S, WANG Q, LI Y, et al. A Clinical Comparative Study of Two Different Endometrial Cell Samplers for Evaluation of Endometrial Lesions by Cytopathological Diagnosis[J]. Cancer Manag Res, 2020,12: 10551-10557.
- [29] 周蓉, 沈丹华, 唐志坚, 等. 子宫内膜采集器在子宫内膜癌及癌前病变筛查中的应用[J]. 中国妇产科临床杂志, 2013,14(03): 242-244.
- [30] REMONDI C, SESTI F, BONANNO E, et al. Diagnostic accuracy of liquid-based endometrial cytology in the evaluation of endometrial pathology in postmenopausal women[J]. Cytopathology, 2013,24(6): 365-371.
- [31] 杨曦, 廖秦平, 吴成, 等. 子宫内膜细胞学检查在子宫内膜癌筛查中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2013,48(12): 884-890.
- [32] NISHIDA N, MURAKAMI F, KURODA A, et al. Clinical Utility of

- Endometrial Cell Block Cytology in Postmenopausal Women[J]. *Acta Cytol*, 2017,61(6): 441-446.
- [33] ZHANG H, WEN J, XU P L, et al. Role of Liquid-based Cytology and Cell Block in the Diagnosis of Endometrial Lesions[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016,129(12): 1459-1463.
- [34] PETERS-ENGL C, BUXBAUM P, OGRIS E, et al. TATI (tumor associated trypsin inhibitor) and cancer antigen 125 (CA 125) in patients with early-stage endometrial cancer[J]. *Anticancer Res*, 1998,18(6B): 4635-4639.
- [35] 杨淑丽, 苗劲蔚, 何玥, 等. 人附睾蛋白 4 在早期子宫内膜癌中的诊断价值[J]. *中国医药导报*, 2018,15(09): 70-73.
- [36] CHEN Y, REN Y L, LI N, et al. Serum human epididymis protein 4 vs. carbohydrate antigen 125 and their combination for endometrial cancer diagnosis: a meta-analysis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016,20(10): 1974-1985.
- [37] SAARELAINEN S K, PELTONEN N, LEHTIMÄKI T, et al. Predictive value of serum human epididymis protein 4 and cancer antigen 125 concentrations in endometrial carcinoma[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2013,209(2): 141-142.
- [38] MCCONECHY M K, DING J, SENZ J, et al. Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles[J]. *Mod Pathol*, 2014,27(1): 128-134.
- [39] YANG H P, MEEKER A, GUIDO R, et al. PTEN expression in benign human endometrial tissue and cancer in relation to endometrial cancer risk factors[J]. *Cancer Causes Control*, 2015,26(12): 1729-1736.
- [40] MIRAKHOR S S, EZAZI B T, ZARGHAMPOUR M, et al. Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2018,38(7): 999-1004.
- [41] KOSMAS K, STAMOULAS M, MAROUGA A, et al. Expression of Ki-67 as proliferation biomarker in imprint smears of endometrial carcinoma[J]. *Diagn Cytopathol*, 2013,41(3): 212-217.
- [42] 张晔, 胡元晶. Lynch 综合征相关子宫内膜癌诊断的思考和化学治疗的进展[J]. *现代妇产科进展*, 2019,28(01): 58-61.
- [43] BERGER S L, KOUZARIDES T, SHIEKHATTAR R, et al. An operational definition of epigenetics[J]. *Genes Dev*, 2009,23(7): 781-783.

- [44] CHEN Z, ZHANG Y. Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development[J]. Annu Rev Biochem, 2020,89: 135-158.
- [45] DOR Y, CEDAR H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine[J]. Lancet, 2018,392(10149): 777-786.
- [46] XIANG R, FU T. Gastrointestinal adenocarcinoma analysis identifies promoter methylation-based cancer subtypes and signatures[J]. Sci Rep, 2020,10(1): 21234.
- [47] ZHAN W, LI Y, LIU X, et al. ZNF671 Inhibits the Proliferation and Metastasis of NSCLC via the Wnt/ β -Catenin Pathway[J]. Cancer Manag Res, 2020,12: 599-610.
- [48] WALTER K, HOLCOMB T, JANUARIO T, et al. Discovery and development of DNA methylation-based biomarkers for lung cancer[J]. Epigenomics, 2014,6(1): 59-72.
- [49] COPPEDE F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation[J]. Cancer Lett, 2014,342(2): 238-247.
- [50] ASHOUR N, ANGULO J C, ANDRÉS G, et al. A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis[J]. Prostate, 2014,74(12): 1171-1182.
- [51] LI S, TOLLEFSBOL T O. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses[J]. Methods, 2021,187: 28-43.
- [52] WEBER M, DAVIES J J, WITTIG D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells[J]. Nat Genet, 2005,37(8): 853-862.
- [53] LIU M C, KLEIN E, HUBBELL E, et al. Plasma cell-free DNA (cfDNA) assays for early multi-cancer detection: The circulating cell-free genome atlas (CCGA) study[J]. ANNALS OF ONCOLOGY, 2018,29: 14.
- [54] LIU M C, OXNARD G R, KLEIN E A, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA[J]. Ann Oncol, 2020,31(6): 745-759.
- [55] KLEIN E A, RICHARDS D, COHN A, et al. Clinical validation of a targeted methylation-based multi-cancer early detection test using an independent validation set[J]. Ann Oncol, 2021,32(9): 1167-1177.
- [56] 曹雷, 郭利娟, 郭晓锦, 等. 癌症液体活检新思路: 数字 PCR 检测 DNA 甲基化[J]. 生物化学与生物物理进展, 2019,46(11): 1085-1100.

- [57] HOLUBEKOVA V, MERSAKOVA S, GRENDAR M, et al. The Role of CADM1 and MAL Promoter Methylation in Inflammation and Cervical Intraepithelial Neoplasia[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2020,24(5): 256-263.
- [58] ORANRATANAPHAN S, KOBWITAYA K, TERMRUNGRUANGLERT W, et al. Value of CCNA1 promoter methylation in triaging ASC-US cytology[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2020,21(2): 473-477.
- [59] TIAN Y, YUAN W N, LIOU Y L, et al. Utility of gene methylation analysis, cytological examination, and HPV-16/18 genotyping in triage of high-risk human papilloma virus-positive women[J]. Oncotarget, 2017,8(37): 62274-62285.
- [60] LIOU Y L, ZHANG T L, YAN T, et al. Combined clinical and genetic testing algorithm for cervical cancer diagnosis[J]. Clin Epigenetics, 2016,8: 66.
- [61] HUANG R L, SU P H, LIAO Y P, et al. Integrated Epigenomics Analysis Reveals a DNA Methylation Panel for Endometrial Cancer Detection Using Cervical Scrapings[J]. Clin Cancer Res, 2017,23(1): 263-272.
- [62] KAHN R M, GORDHANDAS S, MADDY B P, et al. Universal endometrial cancer tumor typing: How much has immunohistochemistry, microsatellite instability, and MLH1 methylation improved the diagnosis of Lynch syndrome across the population?[J]. Cancer, 2019,125(18): 3172-3183.
- [63] HUTT S, TAILOR A, ELLIS P, et al. The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review[J]. Acta Oncol, 2019,58(3): 342-352.
- [64] YANG C, WANG K, LIANG Q, et al. Role of NSD1 as potential therapeutic target in tumor[J]. Pharmacol Res, 2021,173: 105888.
- [65] HENTZE J L, HØGDALL C K, HØGDALL E V. Methylation and ovarian cancer: Can DNA methylation be of diagnostic use?[J]. Mol Clin Oncol, 2019,10(3): 323-330.
- [66] MOSCHETTA M, GEORGE A, KAYE S B, et al. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer[J]. Ann Oncol, 2016,27(8): 1449-1455.
- [67] ASANTE D B, CALAPRE L, ZIMAN M, et al. Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time?[J]. Cancer Lett, 2020,468: 59-71.
- [68] NEBGEN D R, LU K H, BAST R J. Novel Approaches to Ovarian Cancer

- Screening[J]. *Curr Oncol Rep*, 2019,21(8): 75.
- [69] MELNIKOV A, SCHOLTENS D, GODWIN A, et al. Differential methylation profile of ovarian cancer in tissues and plasma[J]. *J Mol Diagn*, 2009,11(1): 60-65.
- [70] ZHANG Q, HU G, YANG Q, et al. A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA[J]. *Gynecol Oncol*, 2013,130(1): 132-139.
- [71] YU P, YAN L, ZHANG H, et al. Expression and clinical significance of sperm-associated antigen 9 in patients with endometrial carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012,22(1): 87-93.
- [72] KEMIK P, SAATLI B, YILDIRIM N, et al. Diagnostic and prognostic values of preoperative serum levels of YKL-40, HE-4 and DKK-3 in endometrial cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2016,140(1): 64-69.
- [73] 王美巍, 李佩玲. 新肿瘤标志物及联合检测诊断子宫内膜癌的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2016,24(05): 834-837.
- [74] PARASKEVAIDI M, MORAIS C, ASHTON K M, et al. Detecting Endometrial Cancer by Blood Spectroscopy: A Diagnostic Cross-Sectional Study[J]. *Cancers (Basel)*, 2020,12(5).
- [75] WALSH D M, HOKENSTAD A N, CHEN J, et al. Postmenopause as a key factor in the composition of the Endometrial Cancer Microbiome (ECbiome)[J]. *Sci Rep*, 2019,9(1): 19213.