

· 论著 ·

DNA 甲基化检测在育龄期异常子宫出血女性子宫内膜癌诊断中的应用价值

赵行平¹ 徐大宝¹ 马洁稚¹ 傅英钦¹ 李斌玉¹ 靳希桐² 刘禹利² 刘沛³¹中南大学湘雅三医院妇科,长沙 410000; ²广东药科大学附属第一医院精准医学中心,广州 510000; ³北京起源聚禾生物科技有限公司,北京 102600

通信作者:马洁稚, Email: majiezhi@csu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨应用宫颈脱落细胞 DNA(半胱氨酸双加氧酶 1 型, *CDO1* 和 CUGBP Elav 样家族成员 4, *CELF4*) 甲基化检测育龄期女性子宫内膜癌的应用价值。**方法** 选取 2021 年 11 月至 2022 年 10 月就诊于中南大学湘雅三医院妇科异常子宫出血的育龄期、有宫腔镜检查手术指征的女性 517 例进行前瞻性研究,术前收集宫颈脱落细胞进行细胞学、人类乳头瘤病毒(HPV)和 DNA 甲基化检测。同时收集患者基本临床信息、生物标记物与经阴道超声(TVS)子宫内膜厚度等信息。以宫腔镜下内膜组织病理学诊断为金标准,采用单因素 Logistic 回归分析子宫内膜癌的高危因素,利用受试者工作特征曲线下面积(AUC)分析 DNA 甲基化检测对育龄期女性子宫内膜癌的检测效能。**结果** 年龄、体重指数(BMI) ≥ 25 kg/m²、内膜厚度 ≥ 11 mm、*CDO1*^m $\Delta Ct \leq 8.4$ 、*CELF4*^m $\Delta Ct \leq 8.8$ 、双基因甲基化与年轻女性子宫内膜癌的发生相关,OR 值(95%CI)分别为 1.16(1.08~1.25)、4.33(1.89~10.31)、9.49(3.88~26.69)、69.62(25.70~224.36)、23.64(9.66~63.99)、87.39(24.83~555.05),均 $P < 0.05$ 。在这些检测方案中,*CDO1*^m/*CELF4*^m 甲基化诊断子宫内膜癌的 AUC 最高为 0.90(95%CI 0.83~0.97),其敏感度、特异度分别为 91.7%(95%CI 80.6%~100%)和 88.8%(95%CI 86.0%~91.6%)。TVS 联合 DNA 甲基化检测可进一步提高敏感度至 95.8%(95%CI 87.8%~100%),但特异度为 68.0%(95%CI 63.8%~72.1%)。**结论** 对于育龄期女性中异常子宫出血或阴道异常排液的女性,宫颈细胞学 DNA 甲基检测子宫内膜癌的准确性优于其他无创临床方案。DNA 甲基化联合 TVS 可以改善检测的敏感性。

【关键词】 子宫不规则出血; 子宫内膜肿瘤; 早癌诊断; DNA 甲基化; 超声检查**基金项目:**国家重点研发计划(2018YFC1004804)

Application of DNA methylation in detection of endometrial carcinoma in women with abnormal uterine bleeding at childbearing age

Zhao Xingping¹, Xu Dabao¹, Ma Jiezhil¹, Fu Yingqin¹, Li Binyu¹, Jin Xitong², Liu Yuli², Liu Pei³¹Department of Gynecology, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410000, China; ²Precision Medicine Center, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China; ³Beijing Origin-Poly Bio-Tec Co., Ltd., Beijing 102600, China
Corresponding author: Ma Jiezhil, Email: majiezhi@csu.edu.cn

【Abstract】 Objective This work aims to explore the application value of cervical exfoliated cell DNA (Cysteine dioxygenase type 1, *CDO1* and CUGBP Elav-like family member 4, *CELF4*) methylation in the detection of endometrial cancer in women of childbearing age. **Methods** From November 2021 to October 2022, a prospective study was conducted on a total number of 517 reproductive-age women with abnormal uterine bleeding who had surgical indications for

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20221110-00670

收稿日期 2022-11-10 本文编辑 武昱

引用本文:赵行平,徐大宝,马洁稚,等. DNA 甲基化检测在育龄期异常子宫出血女性子宫内膜癌诊断中的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(4): 367-374. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20221110-00670.

中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



hysteroscopy at the Xiangya Third Hospital of Central South University. The cervical exfoliated cells were collected for cytology, HPV (human papillomavirus) and gene methylation detection before operation. Clinical information of patients, level of tumor-related biomarkers, and endometrial thickness of transvaginal ultrasound (TVS) were also collected. Single factor regression method was used to analyze the high-risk factors of endometrial cancer. Receiver operating characteristic curve analysis was used to obtain the area under the curve(AUC), focusing on the screening efficacy of gene methylation test for endometrial cancer in women of childbearing age. **Results** The age, body mass index (BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, endometrial thickness $\geq 11 \text{ mm}$, $CDO1^m \Delta Ct \leq 8.4$, $CELF4^m \Delta Ct \leq 8.8$, and double gene methylation were associated with endometrial cancer in women of childbearing age, 1.16(1.08–1.25), 4.33(1.89–10.31), 9.49(3.88–26.69), 69.62(25.70–224.36), 23.64(9.66–63.99), 87.39(24.83–555.05), all $P < 0.05$. The AUC was 0.90 (95%CI 0.83–0.97) of $CDO1^m/CELF4^m$ in diagnosing endometrial carcinoma was higher than others factors, with sensitivity and specificity of 91.7% (95%CI 80.6%–100%) and 88.8% (95%CI 86.0%–91.6%). TVS combined with DNA methylation detection further improved the sensitivity to 95.8% (95%CI 87.8%–100%), but could not improve the specificity 68.0% (95%CI 63.8%–72.1%). **Conclusions** For women of childbearing age with abnormal uterine bleeding or abnormal vaginal discharge, the accuracy of cervical cytology DNA methyl detection of endometrial cancer is better than other non-invasive clinical programs. DNA methylation combined with TVS can improve the sensitivity of detection.

【Key words】 Metrorrhagia; Endometrial Neoplasms; Early Detection of Cancer; DNA Methylation; Ultrasonography

Fund program: National Key Research and Development Program of China(2018YFC1004804)

据 2019 年国家癌症中心统计,子宫内膜癌在中国居女性生殖系统恶性肿瘤的第 2 位,发病率为 10.28/10 万,死亡率为 1.9/10 万^[1]。在我国一些经济发达地区,已位居妇科恶性肿瘤第 1 位,子宫内膜癌已成为严重危害女性公共健康的社会问题^[2-4]。

异常子宫出血(abnormal uterine bleeding, AUB)是子宫内膜癌的重要风险因素之一,但 AUB 患者中仅有少数的子宫内膜癌病例,且部分子宫内膜癌患者并没有 AUB 表现^[5]。子宫内膜不典型增生和恶变是 AUB 少见而重要的病因。子宫内膜不典型增生是癌前病变,随访 13.4 年癌变率为 8%~29%^[5]。目前临床上对 AUB 患者主要进行经阴道超声检查,并根据相关检查指标,如育龄期内膜厚度大于 11 mm 患者,进行有创的微量组织病理检查,如诊断性刮宫、宫腔镜检查、宫腔细胞学和病理学微量检测等^[6]。这些方案不仅造成了大量的过度诊疗,也存在着很高比例的漏诊率^[7]。基于这些原因,目前国内和国外都没有可用于临床实践的、无创性筛查方案推荐^[8]。

众多研究表明特殊基因的甲基化和肿瘤发生发展具有非常密切的关系,尤其是抑癌基因表观遗传层面上的甲基化沉默,会造成早期癌症的发生和进展^[9]。目前已有多项关于 DNA 甲基化检测在肺癌、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌等早癌筛查相关的研究^[10-12]。子宫内膜癌发生发展

过程中也同步伴随着多个 DNA 甲基化位点的改变^[13]。但相对于子宫内膜癌的高发病率,基于甲基化技术的子宫内膜癌有效生物标志物的研究一直进展缓慢,迄今也仍然缺少确证、安全、准确的可用于子宫内膜癌筛查的生物标记物^[3]。

本研究为应用宫颈脱落细胞学中 DNA 甲基化检测对异常子宫出血的育龄期非妊娠期女性进行子宫内膜癌检测,可减少对育龄期女性子宫的有创性检测,同时对细胞学甲基化联合经阴道超声(transvaginal ultrasound, TVS)在子宫内膜癌检测中的准确性进行探索评估。

对象与方法

一、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行宫腔镜检查的异常子宫出血育龄期女性作为研究对象进行前瞻性研究。入组标准:年龄大于 18 周岁,基于国内指南^[14],根据临床表现和检查考虑为异常子宫出血,阴道异常排液;根据国内专家建议怀疑内膜病变或由临床医师建议进行宫腔镜检查及活检^[8];既往未因内膜病变接受过任何治疗或手术治疗;愿意接受检测并签署知情同意书;宫腔镜前评估未发现浸润性宫颈癌。接受检测前患者均签署相关知情同意书。根据本研究的入组流程,最



终共有 517 患者满足入组条件并纳入最终的统计分析,根据病理结果将 517 例患者分为子宫内膜癌组(24 例)和对照组(493 例),其中对照组包含良性 484 例和不典型增生 9 例。

宫颈脱落细胞学的样本来自患者术前进行传统细胞学检查和/或高危人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)检测的剩余样本总计 2 ml。患者的宫腔镜检查由中南大学湘雅三医院医院具有资质的术者在静脉麻醉下完成,根据病情对内膜及病变进行活检、切除或诊断性刮宫。患者宫颈细胞学和 HPV 检测以及组织病理评估由研究者完成并进行复核。本研究通过本院伦理委员会审批,批号:中南大学湘雅三医院(批号 22246)。

二、方法

1. 试剂与仪器:HPV 分型检测试剂盒(广东凯普生物科技股份有限公司)用于 HPV DNA 基因分型检测。DNA 甲基化检测按照“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*) 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)产品说明书进行操作^[15]。使用 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统进行 PCR 反应(上海宏石医疗科技有限公司)。

2. 研究方法:患者与子宫内膜癌发病相关的一般情况和临床表现由专门的病例收集表采集。本研究重点关注与子宫内膜癌相关的临床指标与检查结果,包含年龄、既往病史、体重指数(body mass index, BMI)、宫颈脱落细胞学检测,高危 HPV 检测,宫腔镜前 1 个月内经 TVS 评估内膜厚度以及宫腔镜前 1 个月内的糖类抗原 125(carbohydrate antigen 125, CA125),糖类抗原 199(carbohydrate antigen 199, CA199)。在本研究中,定义 BMI ≥ 25 kg/m², TVS 评估的内膜厚度 ≥ 11 mm, CA125 ≥ 35 U/ml, CA199 ≥ 35 U/ml 为异常。根据指南定义异常子宫出血^[5]。

3. 宫颈脱落细胞学检测:液基细胞学(thinprep papanicolaou test and imaging system manual, LBC)用于宫颈细胞学检测。HPV 和新柏液基细胞学检测(thinprep cytologic test, TCT)取样前先用棉签擦去宫颈分泌物,宫颈不进行醋酸及碘液涂抹。将专用的 TCT 细胞采集刷放置于宫颈管内,逆时针或顺时针旋转 5~6 周,将细胞采集刷放入专用的小瓶中保存送检。宫颈细胞学描述性(the Bethesda

system, TBS)诊断报告结果如下:无上皮内病变或恶性改变,包括正常和炎症;鳞状细胞异常,包括不典型鳞状细胞(atypical squamous epithelial cells, ASC),鳞状上皮内病变(squamous intraepithelial lesion, SIL)和鳞状细胞癌;腺细胞异常,包括不典型腺细胞(atypical glandular cells, AGC)和腺癌。不典型鳞状细胞包括不能明确意义的不典型鳞状细胞(atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS)和不能除外高度鳞状上皮内病变的不典型鳞状细胞;SIL 包括低度鳞状上皮内病变和高度鳞状上皮内病变。对于所有细胞学结果,最差结果被定义为每例的最终结果。

4. 高危 HPV DNA 基因分型试验:用专用的 HPV 检测采样棉签置于宫颈口内停留 1 min,将采样棉签放入专用试管中保存送检,于 4℃ 保存,在 24~48 h 内进行检测。这 21 种 HPV 基因分型试验包括 14 种高危 HPV 基因型(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66 和 68)、6 种低风险 HPV 基因(HPV 6、11、42、43、44 和 81)和 1 种疑似高危 HPV 型(HPV 53)。

5. 细胞学甲基化检测及判断:实验样本均为参与者进行宫颈癌筛查后残留的宫颈细胞学样本 2 ml。在获得患者知情同意的情况下,进行样本采集。细胞离心分离后利用细胞 DNA 提取试剂盒进行宫颈脱落细胞 DNA 提取,利用 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒处理提取后的核酸,转化完成的 DNA(Bis-DNA)立即进行 PCR 检测。反应结束后根据 *CDO1* 基因、*CELF4* 基因与内参基因的 Ct 值,计算 ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ 检测基因 - Ct 内参基因),甲基化判断标准阳性采用约登指数计算方案,判定 *CDO1*⁺ $\Delta Ct \leq 8.4$, *CELF4*⁺ $\Delta Ct \leq 8.8$ 为阳性。

6. 统计学分析:采用 SPSS 26.0 统计软件包进行统计分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的差异采用方差分析。非正态分布的计量资料用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,两组间的差异采用 Mann-Whitney U 检验。使用 Fisher 确切概率法或两个率或两个构成比比较的 χ^2 检验比较不同组患者临床表现的构成比差异。单因素 Logistic 回归分析用于分析子宫内膜癌发生的相关因素。利用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)下的曲线下面积(area under curve, AUC)评估各指标诊断子宫内膜癌的效果,并计算敏感度、特异度、阳性预测值(positive predictive value, PPV)、阴性预测值(negative



predictive value, NPV)、比值比(odd ratios, OR)及 95% 可信区间(confidence interval, CI)。双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

一、基本信息

子宫内膜癌组与对照组相比,患者年龄, BMI, 内膜厚度, *CDO1* 与 *CELF4* 的甲基化程度存在显著差异($P<0.05$), 两组的 CA125 与 CA199 水平, 宫颈细胞学检测结果, HPV DNA 分型结果无显著差异($P>0.05$), 2 组患者的临床特征比较见表 1。

二、异常子宫出血育龄期女性子宫内膜癌发病的单因素分析

以子宫内膜癌为因变量, 进行单因素 Logistic 回归分析。结果显示, 育龄期女性的年龄、BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 、内膜厚度 $\geq 11 \text{ mm}$ 、*CDO1* $\Delta\text{Ct}\leq 8.4$ 、*CELF4* $\Delta\text{Ct}\leq 8.8$ 、双基因甲基化与子宫内膜癌发生相关($P<0.05$), OR 值(95%CI)分别为 1.16(1.08~1.25)、4.33(1.89~10.31)、9.49(3.88~26.69)、69.62(25.70~224.36)、23.64(9.66~63.99)、87.39(24.83~555.05), 均 $P<0.05$, 见表 2。

三、各参数单项及联合诊断子宫内膜癌的临床效能

诊断子宫内膜癌的各种指标的临床效能见表 3。*CDO1*^m与*CELF4*^m双基因联合敏感度为 91.7%(95%CI 80.6%~100%), 特异度为 88.8%(95%CI 86.0%~91.6%), PPV 为 28.9%(95%CI 18.8%~39.1%), NPV 为 99.5%(95%CI 98.9%~100%)。以 TVS 子宫内膜厚度联合 DNA 甲基化诊断子宫内膜癌敏感度、特异度、PPV 和 NPV 分别为 95.0%(95%CI 85.4%~100%)、68.0%(95%CI 63.8%~72.1%)、10.7%(95%CI 6.2%~15.3%)、99.7%(95%CI 99.1%~100%)。应用 BMI 指标联合超声检测与甲基化诊断子宫内膜癌敏感度、特异度、PPV 和 NPV 分别为 100%(95%CI 100%~100%)、52.5%(95%CI 48.1%~56.9%)、9.3%(95%CI 5.8%~12.8%)和 100%(95%CI 100%~100%)。

各临床指标筛查子宫内膜癌的 ROC 曲线见图 1。BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 、内膜厚度 $\geq 11 \text{ mm}$ 、*CDO1*^m(+)、*CELF4*^m(+)以及双基因 *CDO1*^m/*CELF4*^m(+)的 AUC(95%CI)分别为 0.67(0.55~0.79)、0.75(0.65~0.86)、0.87(0.78~0.96)、0.81(0.70~0.91)和 0.90(0.83~0.97)。联合超声检查(+)/DNA 甲基化(+)的 AUC 为 0.82(0.76~0.88), 联合 BMI/超声检查/DNA 甲基

表 1 患者临床特征信息

项目	合计(n=517)	对照组(n=493)	子宫内膜癌组(n=24)	Z/ χ^2 值	P 值
年龄[岁, $M(Q_1, Q_3)$]	42.00(35.00, 48.00)	42.00(35.00, 47.00)	48.50(45.50, 53.25)	0.947	<0.001
BMI[kg/m^2 , $M(Q_1, Q_3)$]	22.66(20.94, 25.22)	22.65(20.83, 24.97)	25.84(22.18, 29.03)	0.726	0.001
内膜厚度[mm, $M(Q_1, Q_3)$]	7.00(5.00, 11.00)	7.00(5.00, 10.00)	15.00(10.75, 18.75)	1.081	<0.001
CA125[U/ml, $M(Q_1, Q_3)$]	21.34(11.98, 38.57)	21.08(11.92, 38.83)	23.77(12.76, 34.24)	0.246	0.695
CA199[U/ml, $M(Q_1, Q_3)$]	11.66(6.12, 19.59)	10.38(5.91, 18.80)	16.38(10.71, 67.41)	0.701	0.156
$\Delta\text{CtCDO1}[M(Q_1, Q_3)]$	16.78(12.81, 17.93)	16.88(13.83, 17.95)	6.73(5.02, 8.29)	2.017	<0.001
$\Delta\text{CtCELF4}[M(Q_1, Q_3)]$	16.13(10.90, 17.70)	16.42(11.28, 17.75)	7.61(5.44, 9.82)	1.467	<0.001
宫颈细胞学检测结果[例(%)]				0.383	0.450
NILM	415(93.05)	392(92.89)	23(95.83)		
AGC	7(1.57)	6(1.42)	1(4.17)		
ASCUS	19(4.26)	19(4.50)	0		
LSIL	2(0.45)	2(0.47)	0		
HSIL	3(0.67)	3(0.71)	0		
HPVDNA 分型结果[例(%)]				0.396	0.767
低风险 HPV 型	6(1.32)	6(1.40)	0		
非 16/18 高危 HPV 型	37(8.17)	36(8.39)	1(4.17)		
HPV16/18 型	18(3.97)	18(4.20)	0		
阴性	392(86.53)	369(86.01)	23(95.83)		

注: BMI 为体重指数, CA125 为糖类抗原 125, CA199 为糖类抗原 199, ΔCtCDO1 为 *CDO1* 基因甲基化水平 ΔCt 值, $\Delta\text{CtCELF4}$ 为 *CELF4* 基因甲基化水平 ΔCt 值, NILM 为未见上皮内病变细胞和恶性细胞, AGC 为非典型腺上皮细胞, ASCUS 为非典型鳞状上皮细胞, LSIL 为低级别宫颈上皮内瘤变, HSIL 为高级别鳞状上皮内病变



表 2 与子宫内膜癌相关的临床指标单因素分析

临床因素	对照组(<i>n</i> =493)	子宫内膜癌组(<i>n</i> =24)	<i>Z</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值	OR(95%CI)
年龄[岁, <i>M</i> (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃)]	42.00(35.00, 47.00)	48.50(45.50, 53.25)	0.947	<0.001	1.16(1.08~1.25)
BMI[例(%)]			0.729	0.001	4.33(1.89~10.31)
<25 kg/m ²	362(75.42)	10(41.67)			
≥25 kg/m ²	118(24.58)	14(58.33)			
内膜厚度[例(%)]			1.175	<0.001	9.49(3.87~26.70)
<11 mm	373(75.66)	6(25.00)			
≥11 mm	120(24.34)	18(75.00)			
CA125[例(%)]			0.059	0.983	0.89(0.30~2.27)
<35 U/ml	159(71.30)	17(73.91)			
≥35 U/ml	64(28.70)	6(26.09)			
CA199[例(%)]			0.683	0.065	5.30(0.91~28.05)
<35 U/ml	54(90.00)	5(62.50)			
≥35 U/ml	6(10.00)	3(37.50)			
宫颈细胞学[例(%)]			0.128	1.000	0.64(0.03~3.23)
<ASCUS	392(92.89)	23(95.83)			
≥ASCUS	30(7.11)	1(4.17)			
HPV[例(%)]			0.347	0.228	0.30(0.01~1.48)
阴性	369(86.01)	23(95.83)			
阳性	60(13.99)	1(4.17)			
<i>CDO1</i> ^m [例(%)]			2.262	<0.001	69.62(25.70~224.36)
Δ <i>Ct</i> >8.4	458(94.82)	5(20.83)			
Δ <i>Ct</i> ≤8.4	25(5.18)	19(79.17)			
<i>CELF4</i> ^m [例(%)]			1.612	<0.001	23.64(9.66~63.99)
Δ <i>Ct</i> >8.8	438(90.68)	7(29.17)			
Δ <i>Ct</i> ≤8.8	45(9.32)	17(70.83)			
<i>CDO1</i> ^m / <i>CELF4</i> ^m 双基因甲基化[例(%)]			2.716	<0.001	87.39(24.83~550.05)
阴性	429(88.82)	2(8.33)			
阳性	54(11.18)	22(91.67)			

注: BMI 为体重指数, CA125 为糖类抗原 125, CA199 为糖类抗原 199, ASCUS 为非典型鳞状上皮细胞, *CDO1*^m 为 *CDO1* 基因甲基化, *CELF4*^m 为 *CELF4* 基因甲基化

表 3 相关指标用于子宫内膜癌筛查效能的 ROC 曲线分析

检测指标	敏感度(95%CI)	特异度(95%CI)	阳性预测值(95%CI)	阴性预测值(95%CI)	AUC(95%CI)
BMI≥25 kg/m ²	58.3(38.6~78.1)	75.4(71.6~79.3)	10.6(5.4~15.9)	97.3(95.7~99.0)	0.67(0.55~0.79)
内膜厚度≥11 mm	75.0(57.7~92.3)	75.7(71.9~79.4)	13.0(7.4~18.7)	98.4(97.2~99.7)	0.75(0.65~0.86)
<i>CDO1</i> ^m (+)	79.2(62.9~95.4)	94.8(92.8~96.8)	43.2(28.5~57.8)	98.9(98.0~99.9)	0.87(0.78~0.96)
<i>CELF4</i> ^m (+)	70.8(52.6~89.0)	90.7(88.1~93.3)	27.4(16.3~38.5)	98.4(97.3~99.6)	0.81(0.70~0.91)
<i>CDO1</i> ^m / <i>CELF4</i> ^m (+)	91.7(80.6~100)	88.8(86.0~91.6)	28.9(18.8~39.1)	99.5(98.9~100)	0.90(0.83~0.97)
TVS/ <i>CDO1</i> ^m / <i>CELF4</i> ^m (+)	95.8(87.8~100)	68.0(63.8~72.1)	12.7(7.9~17.6)	99.7(99.1~100)	0.82(0.76~0.88)
BMI/TVS/ <i>CDO1</i> ^m / <i>CELF4</i> ^m (+)	100(100~100)	52.5(48.1~56.9)	9.3(5.8~12.8)	100(100~100)	0.76(0.74~0.79)

注: AUC 为受试者工作特征曲线下面积, BMI 为体重指数; *CDO1*^m(+) 为 *CDO1* Δ*Ct* 值 ≤8.4; *CELF4*^m(+) 为 *CELF4* Δ*Ct* 值 ≤8.8; *CDO1*^m/*CELF4*^m(+) 为 *CDO1* Δ*Ct* 值 ≤8.4 或 *CELF4* Δ*Ct* 值 ≤8.8; TVS/*CDO1*^m/*CELF4*^m(+) 为内膜厚度 ≥11 mm 或 *CDO1*^m/*CELF4*^m(+), 2 种检测任一阳性判为最终阳性。BMI/TVS/*CDO1*^m/*CELF4*^m(+) 为 BMI ≥25 kg/m²、内膜厚度 ≥11 mm、*CDO1*^m/*CELF4*^m(+), 3 种检测任一阳性判为最终阳性

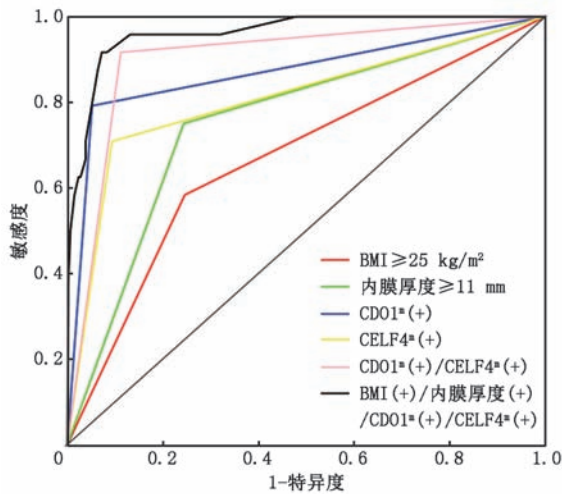
化(+)的 AUC 为 0.76(0.74~0.79)。

四、超声检测初筛甲基化检测分流的筛查效能

BMI ≥25 kg/m², *CDO1*^m(+)、*CELF4*^m(+) 以及双基因 *CDO1*^m/*CELF4*^m(+) 的 ROC 曲线见图 2。在内

膜厚度 <11 mm 组中 BMI ≥25 kg/m²、*CDO1*^m(+)、*CELF4*^m(+)、双基因 *CDO1*^m/*CELF4*^m(+)、联合 BMI/超声检查/DNA 甲基化检测的 AUC(95%CI) 分别为 0.55 (0.04~0.75)、0.89 (0.73~100)、0.79 (0.58~





注: BMI 为体重指数; $CD01^m(+)$ 为 $CD01 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.4 ; $CELF4^m(+)$ 为 $CELF4 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.8 ; $CD01^m/CELF4^m(+)$ 为 $CD01 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.4 或 $CELF4 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.8 ; $BMI(+)$ /内膜厚度 $(+)$ / $CD01^m(+)$ / $CELF4^m(+)$ 为 $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ 、内膜厚度 $\geq 11 \text{ mm}$ 、 $CD01^m/CELF4^m(+)$, 3 种检测任一阳性判为最终阳性。

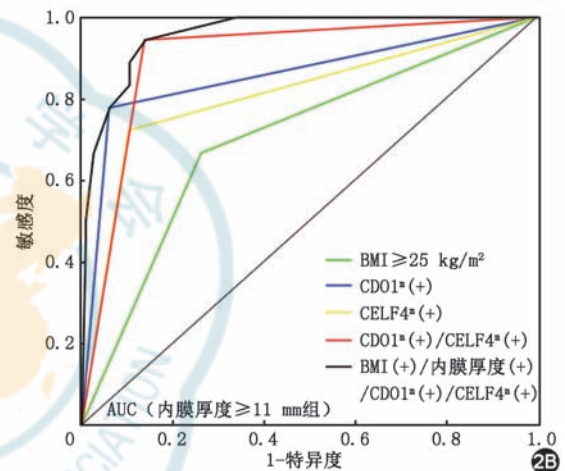
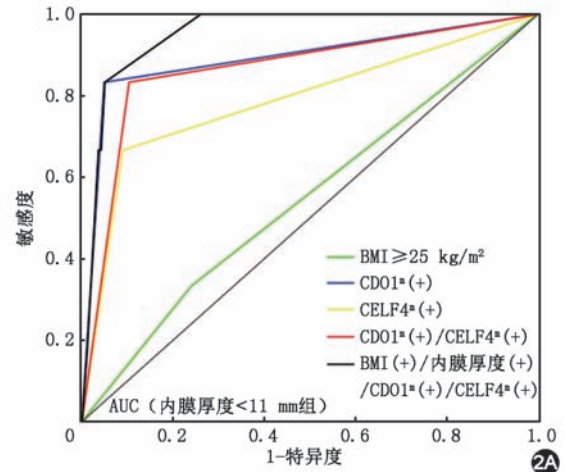
图1 各临床指标筛查子宫内膜癌的受试者工作特征曲线图

1.00)、0.87(0.70~1.00)、0.95(0.91~1.00)。在内膜厚度 $\geq 11 \text{ mm}$ 组中 $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ 、 $CD01^m(+)$ 、 $CELF4^m(+)$ 、双基因 $CD01^m/CELF4^m(+)$ 、联合 BMI /超声检查/DNA 甲基化检测的 AUC(95%CI) 分别为 0.70(0.58~0.82)、0.86(0.76~0.96)、0.81(0.70~0.92)、0.90(0.84~0.97) 和 0.96(0.92~0.99)。

讨论

近年来,随着人口平均寿命延长及生活习惯变化,子宫内膜癌发病率呈逐年上升和年轻化趋势,其发生和发展是多因素、多阶段、多步骤的一系列复杂过程,是癌基因、抑癌基因等多种基因表达的异常改变及协同作用的结果,尤其是抑癌基因表观遗传层面上的甲基化沉默,会造成早期癌症的发生和进展^[9]。本研究以宫颈脱落细胞学的无创液体活检方案通过靶基因检测对育龄期女性进行子宫内膜癌检测,获得了高于其他任何无创检测方案的准确性。细胞学甲基化检测在联合 TVS 后,对子宫内膜癌检测的敏感性获得了进一步改善,证实该方案在临床应用的价值。

子宫内膜癌筛查和早期诊断专家共识指出无排卵型异常子宫出血是子宫内膜癌的高危风险因素^[16]。针对筛查中有阴道流血症状或超声子宫内膜增厚时,可先试用孕激素治疗,治疗无效者,建议行宫腔镜检查。诊断性刮宫后病理检查对异常子



注: BMI 为体重指数; $CD01^m(+)$ 为 $CD01 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.4 ; $CELF4^m(+)$ 为 $CELF4 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.8 ; $CD01^m/CELF4^m(+)$ 为 $CD01 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.4 或 $CELF4 \Delta Ct$ 值 ≤ 8.8 ; $BMI(+)$ /内膜厚度 $(+)$ / $CD01^m(+)$ / $CELF4^m(+)$ 为 $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ 、内膜厚度 $\geq 11 \text{ mm}$ 、 $CD01^m/CELF4^m(+)$, 3 种检测任一阳性判为最终阳性。

图2 超声检测后体重指数和 DNA 甲基化作为分流子宫内膜癌效能的受试者工作特征曲线

宫出血的诊断和指导治疗具有重要意义^[17]。诊断性刮宫时间虽短,但会引起患者疼痛,从而增加医生手术难度,增加患者手术风险。本研究选择了 AUB 女性入组,对比分析了 TVS 与 DNA 甲基化检测在子宫内膜癌筛查和早期诊断中的优势。

选择宫颈脱落细胞 DNA 甲基化检测进行子宫内膜癌的诊断是本研究的重要创新。目前已有研究开展了脱落细胞用于细胞病理分析、靶基因检测和遗传综合征确诊、外泌体分析、MSI 检测以及多组学检测^[18-23]。最新的国外研究表明宫颈脱落细胞 DNA 甲基化检测可以作为一种患者友好的用于筛查和分诊有子宫内膜癌症状或风险的女性,并且由于其适用于自采集的样本,可能是管理 AUB 女性的合适工具,未来考虑在预防性筛查和早期检测

环境来部署这种检测方案的执行^[24]。但国内还未开展脱落细胞学表观遗传学分析的相关研究,更没有应用于临床的可靠筛查方案。宫颈脱落细胞用于子宫内膜癌筛查和诊疗具有很多突出优点,包括完全无创、取材方便、准确性高^[25]、细胞量充分并与组织学结果高度一致等^[15]。本研究选择的靶基因 *CDO1* 和 *CELF4* 表观遗传改变与子宫内膜癌的关系,已经有文献支持^[26-27]。其用于筛查和分诊有子宫内膜癌症状或风险的女性的检测效能在本研究中得到了证实。

传统的子宫内膜癌筛查中,子宫内膜厚度是非常重要的指标。TVS 以无创、经济、易操作的优点成为子宫内膜疾病临床诊断首选的筛查方法^[28]。TVS 对于筛查子宫内膜癌敏感度高,但特异度低,常造成不必要的有创操作。2018 年 10 月国际妇产科联盟发布的《2018 年癌症报告》中关于子宫内膜癌筛查的说明指出 TVS 与子宫内膜刮诊活检组合,具有 96% 的阴性预测值^[29-30],但部分患者不愿接受分段诊刮的有创性操作。本研究中, DNA (*CDO1/CELF4*) 甲基化检测具有较高的敏感度 91.7% (95%CI 80.6%~100.0%), 特异度 88.8% (95%CI 86.0%~91.6%), 在常规的 TVS 基础上,联合细胞学甲基化检测,可以进一步改善对子宫内膜癌检测的敏感度。但由于 TVS 的特异度过低,二者的联合检测未能实现更高水平的特异度。如果结合 TVS,将牺牲部分特异度,增加有创操作的可能。本研究对内膜厚度进行分组后分析发现,与在内膜厚度小于 11 mm 组中用 BMI \geq 25 kg/m² 预测子宫内膜癌发生的低敏感度 33.3% (95%CI: 4.00%~71.1%) 和 AUC 0.55 (95%CI: 0.34~0.77) 不同的是, DNA 甲基化是可预测子宫内膜癌的独立危险因素。

以往的研究表明血清糖类抗原 CA125 与子宫内膜癌的病理分期存在相关性,依照 CA125 的变化趋势,可在一定程度上对子宫内膜癌患者进行有效筛查^[31]。但误诊率、漏诊率也相对较高,需结合其他检测方法提高诊断效能^[32]。本研究发现在对照组和子宫内膜癌组的 CA125 水平为 21.08 (11.92, 38.83) 和 23.77 (12.76, 34.24), 差异无统计学意义 ($Z=0.246$, $P=0.2695$)。其原因可能与子宫内膜良性组中的子宫平滑肌瘤、腺肌瘤(或合并子宫腺肌症)患者中 CA125 水平升高有关。

本研究采用宫颈脱落细胞学 DNA 甲基化检测育龄期妇女子宫内膜癌的发生,可减少对育龄期女

性的子宫有创性检测,起到保护女性生育力的积极推动作用。本研究入组条件为妇科门诊异常流血且未绝经的初诊患者,绝大部分是良性病变,但也容易造成对恶性病变忽略,甲基化检测客观、无创、准确,在病理医生诊断水平有限的医院能准确诊断并进行分级诊疗。该研究也存在一定的局限性,每组患者数据是基于中南大学湘雅三医院妇科 1 年内的门诊筛查患者客观的现实情况进行统计,队列研究所包括的癌症(24 例)样本量小,虽然考虑到癌症样本量小可能与 AUB 患者罹患恶性疾病的临床发病率并不高有关,但本研究仍具有一定的地域局限性,未来亟需在大队列中进行推广等问题。

综上所述,研究通过宫颈脱落细胞学 DNA 甲基化,为异常子宫出血育龄期女性的子宫内膜癌检测提供了一种简便、无创、高敏感性的检测方式,有效减少了子宫内膜癌筛查中的有创性操作,减少了患者的心理负担,提高了患者在检测过程中的依从性。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 赵行平:数据整理、论文撰写;马洁雅:组织病理学分析、论文撰写;靳希桐:数据整理、统计学分析;刘禹利:研究指导、数据收集;李斌玉:细胞病理学分析;傅英钦:组织病理学分析;刘沛:研究指导、经费支持;徐大宝:研究设计与指导、论文修改

参 考 文 献

- [1] Crosbie EJ, Kitson SJ, McAlpine JN, et al. Endometrial cancer[J]. Lancet, 2022, 399(10333): 1412-1428. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00323-3.
- [2] 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(6): 501-512. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.06.08.
- [3] 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. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.11.012.
- [4] 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. DOI: 10.19538/j.fk2021120122.
- [5] 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 最新版)[J]. 中华妇产科杂志, 2022, 57(7): 481-490. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20220421-00258.
- [6] 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, 2017, 26(10): 957-960. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.10.001.
- [7] Crosbie EJ, Kitson SJ, McAlpine JN, et al. Endometrial cancer[J]. Lancet, 2022, 399(10333): 1412-1428. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00323-3.
- [8] 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. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20200201-00070.
- [9] Saavedra KP, Brebi PM, Roa JC. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix[J]. Clin Epigenetics, 2012, 4(1):13. DOI: 10.1186/1868-7083-4-13.
 - [10] 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): eaax7533. DOI: 10.1126/scitranslmed.aax7533.
 - [11] Seijo LM, Peled N, Ajona D, et al. Biomarkers in lung cancer screening: achievements, promises, and challenges [J]. J Thorac Oncol, 2019, 14(3):343-357. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.11.023.
 - [12] 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. DOI: 10.1172/JCI139597.
 - [13] den Helder RV, Wever BM, van Trommel JA, et al. DNA methylation markers for endometrial cancer detection in minimally invasive samples: a systematic review[J]. Epigenomics, 2020, 12(18): 1661-1672. DOI: 10.2217/epi-2020-0164.
 - [14] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 绝经管理与绝经激素治疗中国指南(2018)[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(11): 729-739. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2018.11.001.
 - [15] Kong L, Wang L, Wang Z, et al. DNA methylation for cervical cancer screening: a training set in China[J]. Clin Epigenetics, 2020, 12(1): 91. DOI: 10.1186/s13148-020-00885-7.
 - [16] 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. DOI: 10.19538/j.fk2017100115.
 - [17] 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. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2016.03.16.
 - [18] 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. DOI: 10.1159/000512867.
 - [19] 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. DOI: 10.1186/s12920-020-00753-6.
 - [20] 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): 4282. DOI: 10.3390/ijms23084284.
 - [21] 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. DOI: 10.1208/s12248-018-0220-y.
 - [22] Silveira AB, Bidard FC, Kasperek A, et al. High-accuracy determination of microsatellite instability compatible with liquid biopsies[J]. Clin Chem, 2020, 66(4): 606-613. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa013.
 - [23] 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. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0474.
 - [24] 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. DOI: 10.1200/JCO.22.00266.
 - [25] Verhoef VM, Bosgraaf RP, van Kemenade FJ, et al. Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens (PROTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(3): 315-322. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70019-1.
 - [26] Huang RL, Su PH, Liao YP, 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. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0863.
 - [27] Liew PL, Huang RL, Wu TI, 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. DOI: 10.1186/s13148-019-0765-3.
 - [28] 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. DOI: 10.1097/AOG.0000000000002631.
 - [29] Bhatla N, Denny L. FIGO cancer report 2018[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2018, 143 Suppl 2:2-3. DOI: 10.1002/ijgo.12608.
 - [30] Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, et al. Cancer of the cervix uteri: 2021 update[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2021, 155Suppl 1(Suppl 1):28-44. DOI: 10.1002/ijgo.13865.
 - [31] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.12.003.
 - [32] 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. DOI: 10.1186/s13000-021-01093-4.

