

组在初始 Lac 值及 6 h-LCR 上存在差异,有统计学意义($P < 0.05$)。无创通气组与改有创通气组在 APACHE II 评分上存在差异,有统计学意义($P < 0.05$)。无创通气组与改有创通气组在初始 BE 值及 6 h Δ BE 上未存在明显差异,无统计学意义($P > 0.05$) (见表 2)。

2.3 6 h-LCR 在两组中的比较 乳酸清除率 $> 40\%$ 者死亡组占 22.9%,而乳酸清除率 $\leq 40\%$ 者死亡组占 60%,存在差异,有统计学意义($P < 0.05$)。乳酸清除率 $> 40\%$ 者改有创通气者占 8.6%,而乳酸清除率 $\leq 40\%$ 者改有创通气的占 50%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 6 h-LCR 分组情况 [$n(\%)$]

乳酸清除率 $> 40\%$		乳酸清除率 $\leq 40\%$		χ^2 值	P 值
生存组	死亡组	生存组	死亡组		
54(77.1)	16(22.9)	8(40)	12(60)	5.007	0.025
无创通气组	改有创通气组	无创通气组	改有创通气组	6.518	0.011
64(91.4)	6(8.6)	10(50)	10(50)		

3 讨论

心力衰竭是心血管疾病的主要死因,急性心源性肺水肿 (ACPE) 是急性心力衰竭 (AHF) 的一种表现形式,其发病急、死亡率高。因此,寻找对 ACPE 预后的评估指标对于临床有重大意义。无创通气治疗心源性肺水肿的过程中,寻找一些评估指标,来评估近期预后、评估是否改有创机械通气具有

重要临床意义。早期乳酸水平、6 h 乳酸清除率和 APACHE II 评分是评估无创正压通气治疗心源性肺水肿患者近期临床预后的良好指标,亦可有效评估无创正压通气改有创机械通气的可能性。6 h 乳酸清除率是否 $> 40\%$ 是评估近期临床预后和无创通气改有创机械通气的临界点。初始碱剩余和 6 h 碱剩余差值在无创正压通气治疗心源性肺水肿患者中,对评估近期临床预后和无创正压通气改有创机械通气的可能性方面,无统计学意义,未显示临床价值。本研究不足之处在于病例相对较少,未针对急性心源性肺水肿的原发病因进行分析,需大规模临床研究资料予以佐证。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2):98-120.
- [2] 朱蕾,戎卫海. 心源性肺水肿机械通气治疗[J]. 中华老年医学杂志, 2002, 21(4):314-315.
- [3] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 中国心血管病报告 2014 概要[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(7):617-622.
- [4] 孙同文,万有栋,阚全程,等. 无创通气对急性心源性肺水肿患者院内病死率影响的荟萃分析[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2):161-163.

论著与经验

PAX1 基因甲基化定量检测在宫颈癌筛查中的临床意义

刘海凤, 王静依, 刘述江, 孟 侠, 李 薇, 张文鹏

作者单位:610051 四川 成都,核工业 416 医院妇产科

[摘要] 目的 在已有的宫颈癌一线筛查体系中,探讨 PAX1 基因甲基化检测的临床价值。方法 随机收集 54 例宫颈癌筛查的患者为研究对象,收集其宫颈脱落细胞样本,分别采用 RT-PCR 法检测各样本中的 PAX1 基因甲基化水平,HC2 DNA 法检测各样本中的 HPV 感染状况以及 TCT 检测各样本中的细胞病变程度,最终进行组织病理学检查,并以组织病理学诊断为标准,绘制受试者工作特性 (ROC) 曲线,确定 PAX1 基因甲基化对高级别癌前病变的 cut-off 值,在此基础上对三种检测方法进行统计学比较分析,以期找到临床上更合适的筛查方案。结果 以高级别病变作为检测终点,PAX1 基因甲基化检测的 cut-off 值为 13.29,灵敏度 92.00%,特异度 75.86%,阳性预测值 80%,阴性预测值 91.67%,曲线下面积 0.88,并且 PAX1 高度甲基化现象随着病变级别增加而大幅上升,具有较高的诊断价值。HC2 HPV DNA 检测具有较高的灵敏度 84.62%,TCT 检测在以大于 ASCUS 作为检测终点时,具有极高的特异度 92.86%,两种检测方法的曲线下面积分别为 0.66、0.62,诊断价值具有一定的局限性。结论 在宫颈脱落细胞中,PAX1 基因甲基化检测相对于 TCT 检测、HC2 HPV DNA 检测具有更高的诊断价值,有望作为一个新型的无创的分子学技术应用于宫颈癌筛查。

[关键词] 宫颈癌; PAX1 基因; DNA 甲基化; RT-PCR; Cut-off

宫颈癌是威胁女性健康的第二大恶性肿瘤,致死率居女性恶性肿瘤第四位^[1]。本研究通过 RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) 方法,定量分析正常宫颈、低级别病变宫颈、高级别病变宫颈和宫颈癌组织细胞 PAX1 基因甲基化水平,通过与现阶段临床上的一线筛查工具的比较分析,以期找到更合适的筛查方案,为临床工作带来帮助。

1 资料和方法

1.1 一般材料 排除妇科良/恶性肿瘤病史患者,排除妊娠、免疫及造血系统疾病相关病史患者,排除已接受宫颈癌疫苗者,不排除就诊时有临床症状 (阴道接触性出血、宫颈糜烂、反复生殖道感染等) 者,不排除曾有细胞学检测异常或者 HPV 病毒学检测阳性者。符合条件的受试者共 54 例,平均年龄为 (48.94 ± 11.05) 岁,并均已签署知情同意书。受试者一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 TCT 采用 专用宫颈细胞刷,将头部深入宫颈管内约 1 cm 处,顺时针转动 5 圈,取出后将脱落细胞转入液体细胞保存液中,按标准进行处理、制片和阅读。

1.2.2 HPV 检查 HPV 检测采用 HC2 HPV DNA 检测系统,采用专用宫颈脱落细胞取样器刷取一定数量的宫颈脱落

细胞,放入 4℃ 的标本保存液中保存待检。

1.2.3 宫颈标本采集与保存 取少量宫颈病变部位的细胞制成宫颈刮片,阴道镜下钳取少量宫颈组织进行病理活检,并收集宫颈刮片进行 PAX1 基因的甲基化检测。上述各组检测结果均以病理学检查结果为参照。

1.2.4 RT-PCR 方法 采用实时聚合酶链反应技术 (Real-time polymerase chain reaction,简称 Real-time PCR) 定性检测宫颈脱落细胞中的 PAX1 基因甲基化状态,所用仪器为罗氏 480。PAX1 基因甲基化检测流程包含三大步骤:①宫颈脱落细胞的核酸萃取 (DNA Extraction);②以重亚硫酸盐转化 (Bisulfite Conversion) 处理样本基因组核酸分子 (genomic DNA),DNA 经重亚硫酸盐处理后,胞嘧啶 (cytosine) 会被转变为尿嘧啶 (uracil);但若为甲基化胞嘧啶 (methylated cytosine),经重亚硫酸盐处理后其碱基形态并不会受到改变,仍为胞嘧啶,藉以区分核酸分子上有甲基化与无甲基化的区域;③甲基特异 PCR (methylation-specific PCR, MSP),以目标基因 (PAX1) 甲基化专一性引子及对应的荧光水解探针进行 RT-PCR 反应,用以检测样本基因组中是否有甲基化的基因,并以第二型胶原蛋白 (Col2A) 基因

的专一性引子及荧光水解探针,作为内部控制组,与目标基因同时进行放大反应及检测,目的是为了计算检体中目标基因甲基化的比例、测试的检体量是否足够与是否出现 PCR 抑制反应。

1.3 统计学方法 使用 SPSS19.0 软件进行统计分析,Origin 9.0 软件进行数据绘图。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验;计数资料以 % 表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,绘制 ROC 曲线区分恶性与非恶性病变的截断值。

2 结果

2.1 组织病理学检测、TCT、HPV 和 PAX1 基因甲基化检测结果,见表 1。

表 1 组织相关检测结果(例)

组别	年龄	样本数 (例)	TCT 检测 (\geq ASCUS) (例)	HPV 检测阳性 (例)	PAX1 基因 高度甲基化 (例)
正常宫颈组	47.00 \pm 9.53	22	7	11	3
低级别病变组	50.71 \pm 13.10	6	1	4	2
高级别病变组	45.10 \pm 11.76	11	6	10	9
癌症组	53.53 \pm 9.80	15	11	12	15

2.2 确定区分恶性与非恶性宫颈病变的 PAX1 基因甲基化截断值

根据不同组织中 PAX1 基因甲基化程度,选取合适的截断值用于区分恶性与非恶性宫颈病变。根据 ROC 曲线,其曲线下面积(AUC)为 0.88,提示该方法具有较高的诊断价值。ROC 曲线分析中,该检测方法的截断值(约登指数: Youden index)为 13.28,此时灵敏度为 92.31%,特异度为 78.57%。见图 1。

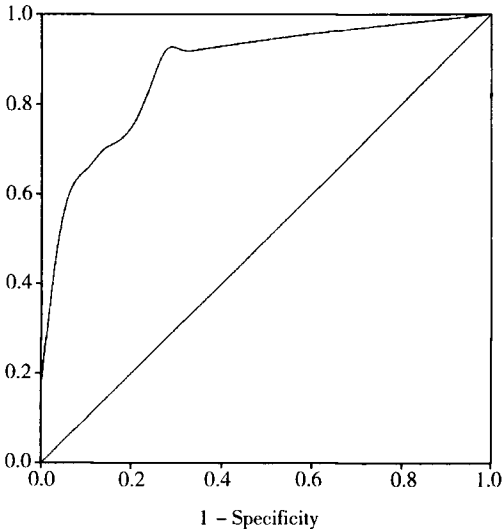


图 1 PAX1 基因甲基化定量检测诊断方法的 ROC 曲线

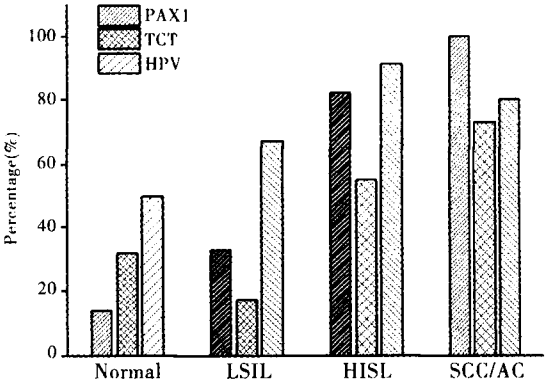
2.3 不同检测方法的灵敏度(Sensitivity)、特异度(Specificity)、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)和曲线下面积(AUC)。见表 2。

表 2 不同检测方法的相关指标

Test Method	Cut - off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC (%)	P value
TCT(Thin - Cytologic Test)	\geq ASCUS	65.38	71.43	65.38	67.86	66.62	0.015
	\geq ASC - H/ AGC/HSIL	30.77	92.86	80	59.09	61.81	0.026
HPV		84.62	46.43	59.46	76.47	65.52	0.014
PAX1m		92.31	78.57	80	91.67	90.18	<0.001

注:以大于等于 HSIL 的病理结果作为检测终点, χ^2 求 P 值, $P < 0.05$ 具显著性

2.4 不同检测方法在病理分类中的检出率,见表 2。



注:Normal 为正常组,LSIL 为低级别病变组,HSIL 为高级别病变组,SCC 为宫颈鳞状细胞癌,AC 为宫颈腺状细胞癌

图 2 不同检测方法在病理分类中的检出率

图 2 显示在不同级别病变中,PAX1 基因甲基化检测、TCT 检测和 HPV 检测的检出率,其中 PAX1 基因甲基化检测检出率在病理结果大于等于 HSIL 情况下是非常高的,相对应的在正常组是则非常低。TCT 检测在高级别病变及以上阶段的检出率高于低级别病变,但是整体的检出率并不理想。HPV 检测虽然在高级别病变及以上阶段高的检出率,但是在低级别病变及正常阶段也有高的检出率。

3 讨论

本研究中样本类型为宫颈脱落细胞,采用的是 RT - PCR。因此,不同的检测阈值、样本类型和实验方法也会导致 PAX1 基因甲基化 cut - off 值存在差异^[5-6]。同时,在研究中由于针对的是样本中所有细胞的基因甲基化程度进行检测,检测结果反应的是此次样本中所含病变基因的比例。因此,在某种程度上,样本中病变细胞的含量,会对检测的结果有一定的影响。然而,每次取样,又必然存在着随机性,这也导致了研究中标本的数量会对基因检测 cut - off 值产生影响。为了进一步降低样本数量对 cut - off 值的影响,我们还需要标准化、大规模的临床数据^[7]。

参考文献

[1] 胡尚英,郑荣寿,赵方辉,等. 1989 至 2008 年中国女性子宫颈癌发病和死亡趋势分析[J]. 中国医学科学院学报,2014(2): 119 - 125.

[2] Kaufman R H, Adam E, Icenogle J, et al. Relevance of human papillomavirus screening in management of cervical intraepithelial neoplasia[J]. American journal of obstetrics and gynecology, 1997, 176(1): 87 - 92.

[3] Huh W K, Ault K A, Chelmow D, et al. Use of primary high - risk humanpapillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance[J]. 2015. 94:153 - 156

[4] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents[J]. The Lancet. Oncology, 2009 (10)4:321 - 322.

[5] 张珂,罗晓梅,唐双玲. 人高危型乳头瘤病毒检测联合液基薄层细胞学在宫颈癌和癌前病变筛查中的应用价值[J]. 中国基层医药,2017,24(4):589 - 592.

[6] Lai HC, Lin YW, Huang RL, Chung MT, Wang HC, Liao YP, et al. Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasms type 3 and worse[J]. Cancer. 2010;116:4266 - 4274.

[7] 林晓,徐军,徐灵,夏子茵,等. 定量检测 PAX1 甲基化对于高级别宫颈癌前病变的诊断价值[J]. 中国临床医学,2015,22(3): 381 - 383.