

DOI: 10.12037/YXQY.2016.12-16

PAX1 基因甲基化定量检测在宫颈癌癌前病变诊断中的应用价值

朱昀恒^{1,2}, 徐军², 李华萍¹ (1. 上海交通大学附属第六人民医院 妇产科, 上海 200233; 2. 复旦大学附属闵行医院 妇产科, 上海 201100)

【摘要】目的 探讨 *PAX1* 基因甲基化定量检测在宫颈癌癌前病变诊断中的应用价值。**方法** 选取 2013 年 1 月至 2015 年 10 月就诊于上海交通大学附属第六人民医院的 121 例高危亚型人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染患者为研究对象。根据病理学结果将其分为正常宫颈组(28 例)、低级别病变组[宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I, 32 例]、高级别病变组(CIN II~III, 34 例)及癌变组[浸润性宫颈癌(invasive cervical cancers, ICC), 27 例]。收集各组患者的宫颈组织标本及宫颈刮片, 采用反转录聚合酶链反应和焦磷酸测序技术定量分析 *PAX1* 基因 9 个位点的甲基化水平, 并通过接受者操作特征曲线(ROC 曲线)计算 *PAX1* 甲基化与各级别宫颈病变的关联性。**结果** 癌变组、高级别病变组、低级别病变组、正常宫颈组 *PAX1* 基因 9 个位点的甲基化平均水平分别为 4.66%、3.55%、2.10%、1.90%, 组间比较差异均具有显著性($P < 0.05$)。各组患者宫颈刮片和宫颈组织 *PAX1* 甲基化水平比较差异均具有显著性($P < 0.01$), 其中, 癌变组 *PAX1* 甲基化发生率及水平均显著高于其他三组($P < 0.05$)。通过 *PAX1* 基因甲基化水平鉴别诊断宫颈癌和 CIN, 结果显示其 ROC 曲线下面积为 0.88 ($P < 0.001$), 具有较高的诊断能力。**结论** 定量检测宫颈组织中 *PAX1* 基因的甲基化水平能够有效诊断高级别宫颈癌前病变, 且其表达与疾病分期有关。

【关键词】 宫颈癌癌前病变; 焦磷酸测序; *PAX1*; 甲基化

Clinical diagnosis value of *PAX1* methylation for detecting patients with cervical intraepithelial neoplasia

ZHU Yun-heng^{1,2}, XU Jun², LI Hua-ping¹ (1. Department of Obstetrics and Gynecology, the 6th People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Minhang Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201100, China)

Corresponding author: LI Hua-ping, E-mail: justinmzx@sina.com

【Abstract】Objective To explore the application value of methylation quantitative detection of *PAX1* gene in the diagnosis of cervical precancerous lesions. **Method** From January 2013 to October 2015, 121 patients with high risk human papilloma virus (HPV) infection in the 6th People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University were selected as the study objects. According to the pathological results, they were divided into normal cervical group (28 cases), low grade lesion group [cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I, 32 cases], high grade lesion group (CIN II~III, 34 cases), cervical cancer group [invasive cervical cancers (ICC), 27 cases]. Collected cervical tissue and cervical smear samples in each group, used reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and pyrosequencing technique quantitatively to analyze *PAX1* gene methylation at 9 sites and calculated the relevance of *PAX1* gene methylation and all levels of the cervix associated lesions by ROC curve. **Result** Cervical 9 methylation sites *PAX1* average gene was 4.66% in cervical cancer group, 3.55% in high grade lesion group, 2.10% in low grade lesion group, and 1.90% in normal cervical group. There were significant differences among four groups ($P < 0.05$). Further, methylation level of *PAX1* gene was associated with higher in cervical cancer group than other groups ($P < 0.05$). The area under the ROC curve detection *PAX1* gene methylation level identification of cervical cancer were 0.88, and associated

基金项目: 上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划(PWRq2013-16)

通讯作者: 李华萍 E-mail: justinmzx@sina.com

with statistically significant ($P < 0.001$). **Conclusion** Quantification of the levels *PAX1* gene methylation of cervical tissue can effectively diagnose the high-level cervical lesions before cervical cancer, and it related to the expression of disease staging.

【Key words】 Cervical precancerous lesions; Pyrosequencing; *PAX1*; Methylation

研究资料表明, 宫颈癌的发病率和死亡率正逐年上升, 已分别居女性恶性肿瘤发病率和死亡率第3位和第4位^[1]。研究显示, 我国宫颈癌每年的新发病例数由2010年的2.85万~13.75万上升为2015年的4.58万~18.85万^[2]。人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的持续性与反复性感染是宫颈癌最常见的病因之一^[3]。研究表明, *PAX1* 基因的异常甲基化表达升高, 可在多个不同阶段及层次上影响宫颈癌及癌前病变的病理进程, 与宫颈癌的发生及进展密切相关^[4,5]。本研究基于反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术及焦磷酸测序技术, 定量分析正常宫颈、低级别病变宫颈、高级别病变宫颈以及患癌宫颈的细胞及组织刮片中*PAX1* 基因的甲基化水平, 定量检测目的基因的甲基化水平, 以明确其在区分各级宫颈病变中的临床应用价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2013年1月至2015年10月就诊于上海交通大学附属第六人民医院的121例高危型HPV感染患者为研究对象。排除妇科良/恶性肿瘤病史、妊娠、免疫及造血系统疾病相关病史患者。所有研究对象均签署知情同意书。121例患者依据病理分级不同分为正常宫颈组(28例)、低级别病变组[宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I, 32例]、高级别病变组(CIN II~III, 34例)及癌变组[浸润性宫颈癌(invasive cervical cancers, ICC), 27例]。正常宫颈组患者平均年龄为(35.26±7.14)岁, HPV DNA定量为(367.35±105.72) mg/ml; 低级别病变组患者平均年龄为(38.45±7.45)岁, HPV DNA定量为(492.74±142.91) mg/ml; 高级别病变组患者平均年龄为(38.78±7.26)岁, HPV DNA定量为(613.65±186.21) mg/ml; 癌变组患者平均年龄为(37.28±2.15)岁, HPV DNA定量为(376.74±114.24) mg/ml。四组患者一般资料

比较差异均无显著性, 具有可比性($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 宫颈标本采集与保存 患者取截石位, 常规消毒铺巾, 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, 并行HPV检查, 4℃保存待用。研究时行宫颈组织活检, 并收集宫颈刮片进行*PAX1* 基因的甲基化检测。上述各组检测结果最终以病理学检查结果作为参照。

1.2.2 宫颈DNA提取、化学修饰与扩增 参照德国Qiagen公司生产的试剂盒说明书分别提取DNA与亚硫酸氢盐DNA后处理, 然后进行*PAX1* 基因转录。*PAX1* 基因外侧上游引物: 5'-AAGTTGATTTAGGGTTTGGGGT-3'; 外侧下游引物: 5'-ACCCA GCTCATCCACACTCCC-3'。*PAX1* 基因上游引物: 5'-GTGGAGACTGTGTCTGGGAGGG-3', 下游引物: 5'-AAATACCCRAGACTAAACGC-3'。采用生物素标记下游引物5'末端。

1.2.3 焦磷酸DNA测序 参照焦磷酸测序仪(PyroMark Q96 ID焦磷酸测序仪, 美国)中甲基化分析相关要求, 首先制备单链DNA模板, 然后进行焦磷酸测序。目的基因所用引物: 5'-GGAGGTAGGTTTTGGAG-3', 可测得*PAX1* 基因有9个胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤岛(cytosine-phosphoric acid-guanine, CpG island)。获得*PAX1* 基因测序结果后, 以单个基因所有检测位点的甲基化率的平均值表示每组样本的基因甲基化水平。经焦磷酸测序技术, 对相关目的基因的9个不同位点进行甲基化定量测试分析。以试剂盒提供的通用DNA作为内参。不同位点检测标本中, 某单一位点的甲基化水平与内参中该位点的甲基化水平的比值, 用以表示该位点的甲基化发生率。

1.3 统计学方法 所有统计学数据均由SPSS 17.0软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 t 检验; 计数资料以%表示, 比较采用 χ^2 检验; 绘制不同组别的接受者操作特征曲线(ROC曲线), 通常以

ROC 曲线下面积进行比较。相关性研究使用散点图形式。检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 宫颈组织 *PAX1* 基因甲基化的定量分析 正常宫颈组、低级别病变组、高级别病变组、癌变组患者病变组织中 *PAX1* 基因相关位点甲基化水平分别为 1.90%、2.10%、3.55%、4.66%，各组组间比较差异均具有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 四组患者病变组织中 *PAX1* 基因甲基化水平的定量分析 四组患者病变组织中 *PAX1* 基因甲基化发生率和 HPV 阳性率比较差异均具有显著性 ($P < 0.05$) (表 1)。各组患者宫颈刮片和宫颈组织 *PAX1* 基因甲基化水平组间两两比较差异均具有显著性 ($P < 0.05$) (表 2)，且癌变组患者宫颈刮片和宫颈组织 *PAX1* 基因甲基化水平显著高于其他三组 ($P < 0.05$)。宫颈刮片与癌变组织 *PAX1* 基因甲基化之间的相关性分析见图 1, $r \geq 0.80$ 表示宫颈刮片与癌变组织 *PAX1* 甲基化水平具有相关性 ($P < 0.05$)。

2.3 *PAX1* 基因甲基化水平诊断宫颈癌和 CIN 的相关性分析 图 2 为 *PAX1* 基因甲基化水平诊断宫颈癌和 CIN 的 ROC 曲线。

表 1 四组患者病变组织中 HPV 阳性率与 *PAX1* 基因甲基化发生率比较 [例 (%)]

组别	例数 (例)	HPV 阳性率	<i>PAX1</i> 基因甲基化发生率
正常宫颈组	28	10 (35.71)	0 (0.00)
低级别病变组	32	26 (81.25)	3 (9.38)
高级别病变组	34	31 (91.18)	15 (44.12)
癌变组	27	25 (92.59)	27 (100.00)
χ^2		25.96	73.47
P		< 0.05	< 0.01

注：HPV：人乳头状瘤病毒

表 2 宫颈刮片和宫颈组织 *PAX1* 基因甲基化水平比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	例数 (例)	宫颈刮片	宫颈组织
正常宫颈组	28	6.43 \pm 0.31	0
低级别病变组	32	9.27 \pm 0.56	9.40 \pm 0.63
高级别病变组	34	34.26 \pm 3.50	29.35 \pm 3.19
癌变组	27	54.18 \pm 4.46*	61.14 \pm 5.02*

注：与其他三组比较，* $P < 0.05$

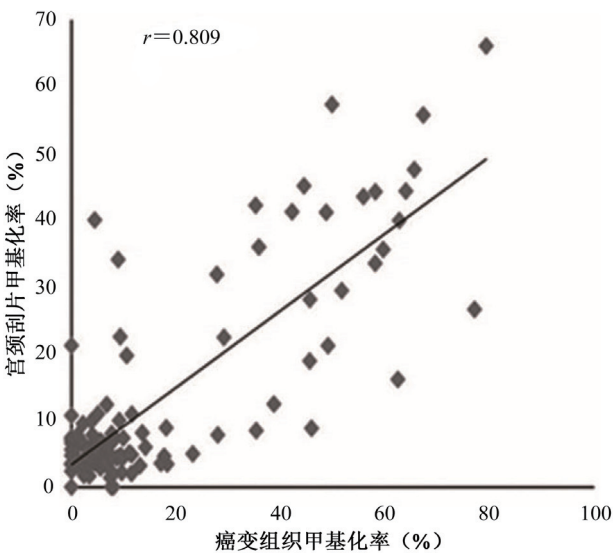


图 1 宫颈刮片和癌变组织中 *PAX1* 基因甲基化的相关性分析

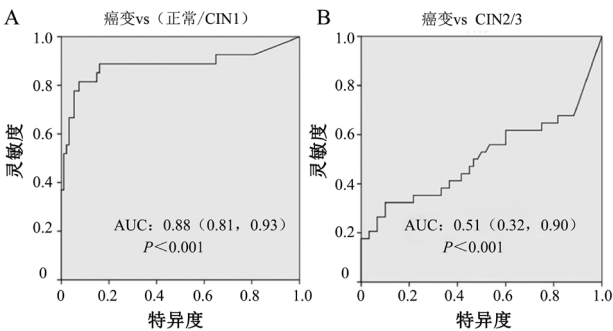


图 2 *PAX1* 基因甲基化水平诊断宫颈癌和 CIN 的 ROC 曲线

注：A：通过 *PAX1* 基因甲基化水平鉴别诊断癌变与正常宫颈和低级别病变的 ROC 曲线下面积为 0.88 (95%CI: 0.81 ~ 0.93, $P < 0.001$)；B：通过 *PAX1* 基因甲基化水平鉴别诊断癌变与高级别病变的 ROC 曲线下面积为 0.51 (95%CI: 0.32 ~ 0.90, $P < 0.01$)；CIN：宫颈上皮内瘤变；AUC：曲线下面积；ROC 曲线：接受者操作特征曲线

3 讨论

临床上，从宫颈癌前病变发展至宫颈癌大多需要数年甚至几十年的时间。宫颈癌早期症状多不明显，待症状明显、恶性程度加剧时往往已属疾病的中晚期。因此，研究宫颈癌的发病机制，寻找有助于临床诊断和治疗的有效分子标志物对提高宫颈癌患者的生存率具有重要意义 [6]。既往研究结果显示，宫颈癌变过程包括诸多基因及表观与调控基因的改变 [4]，其中最重要的是以 DNA 甲基化为代表的表观遗传学改变，该过程主要表现为肿瘤抑制基因的启动子区域发生异常，导致目的基因及调控基因的转录失活，进而促使肿瘤的发生及发展；65% ~ 95% 的宫颈癌组织及细胞中可检测到 DNA

甲基化。因此,在宫颈脱落细胞及宫颈组织活检中,将基因甲基化作为一项检测指标有助于实现宫颈癌的早期诊断。

随着诊断技术的发展以及细胞学检查等技术的推广及普及,HPV病毒微量提取^[7,8]与杂交法^[9]的广泛应用,已使多种类型的宫颈癌前病变及早期浸润性宫颈癌得到诊治。统计分析表明,感染HPV者并不一定会发生癌前病变或宫颈癌,这提示在宫颈癌的发生及发展过程中,可能存在其他协同因子的共同促进效应。基于基因和蛋白水平的特异性检测方法应运而生。多项研究证实,癌基因的异常表达在多方面影响肿瘤的发生及发展(如细胞增殖与分裂的调控);抑癌基因的异常甲基化(调控失调)亦可抑制抑癌基因的表达与下游基因的调控^[10]。已有研究显示 *PAX1* 基因甲基化水平在宫颈癌组织中异常增高,并与启动子的甲基化相关,且 *PAX1* 基因甲基化可在宫颈癌患者的脱落细胞中被检测到^[11-13]。还有研究显示, *PAX1* 基因甲基化阳性率与宫颈癌的病理分级和淋巴转移等关系密切,因此 *PAX1* 基因有望成为宫颈癌早期诊断的分子标志物^[14-19]。目前多数研究仅关注 *PAX1* 基因甲基化状态的定性检测,还难以进行精确地量化判断与评价。

既往研究发现, *PAX1* 基因甲基化水平对宫颈癌的诊断有一定的帮助。Kim等^[12]研究发现, *PAX1* 基因甲基化检测可明显提高宫颈脱落细胞及活检组织检测的准确性,并且可替代50%的阴道镜检查 and 宫颈组织活检。Nikolaidis等^[20]指出 *PAX1* 基因甲基化水平可作为宫颈癌早期诊断的一种辅助手段,其区分CIN2与正常组织的灵敏度与特异度分别为0.66和0.92;此外, *PAX1* 基因甲基化的水平区分CIN3与正常组织的灵敏度与特异度分别为0.77和0.92,与其相对应的ROC曲线下面积分别为0.923和0.931,具有较高的诊断价值。

但既往研究未对患病类型进行区别诊断。本研究使用更为敏感而特异性强的定量分析方法,结果显示,癌变组 *PAX1* 基因甲基化发生率显著高于其他三组;宫颈刮片和宫颈组织中 *PAX1* 基因甲基化水平在各组之间差异均具有显著性,且癌变组患者 *PAX1* 基因甲基化水平显著高于其他三组。上述结

果提示:通过 *PAX1* 基因甲基化发生率及其定量水平的测定,可以在一定程度上对宫颈癌高危人群进行筛选,并为后期定期随访观察提供依据。此外,本研究通过对 *PAX1* 基因甲基化水平鉴别诊断不同癌前病变人群与宫颈癌患者,结果发现其ROC曲线下面积为0.88,具有较高的诊断鉴别能力。当其在最佳阈值下,分析 *PAX1* 基因甲基化水平检测癌前病变与宫颈癌的灵敏度明显优于传统的宫颈脱落细胞形态学检测。本研究结果能够解决临床上基于 *PAX1* 基因甲基化的部分患者的诊疗问题,为临床治疗提供参考依据。

综上所述,定量检测宫颈组织细胞中的 *PAX1* 基因甲基化水平,用以诊断宫颈癌前病变具有临床应用价值。

参考文献

- [1] Chang CC, Huang RL, Wang HC, et al. High methylation rate of *LMX1A*, *NKX6-1*, *PAX1*, *PTPRR*, *SOX1*, and *ZNF582* genes in cervical adenocarcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2014, 24(2):201-209.
- [2] Kan YY, Liou YL, Wang HJ, et al. *PAX1* methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2014, 24(5):928-934.
- [3] 曾新, 韩一栩, 吴丽香. HPV在宫颈炎、宫颈癌前病变、宫颈癌中的检测意义分析[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(1):127-128.
- [4] Yang HJ. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis (review)[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(1):42-48.
- [5] 徐军, 徐灵, 王立峰, 等. 子宫颈脱落细胞中 *PAX1* 基因甲基化定量检测在子宫颈癌早期诊断中的应用[J]. *中华妇产科杂志*, 2014, 49(9):699-702.
- [6] Sheng J, Zhang WY. Identification of biomarkers for cervical cancer in peripheral blood lymphocytes using oligonucleotide microarrays[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(8):1000-1005.
- [7] Adejuyigbe FF, Balogun MR, Sekoni AO, et al. Cervical Cancer and Human Papilloma Virus Knowledge and Acceptance of Vaccination among Medical Students in Southwest Nigeria[J]. *Afr J Reprod Health*, 2015, 19(1):140-148.
- [8] Cobos C, Figueroa JA, Mirandola L, et al. The role of human papilloma virus (HPV) infection in non-anogenital cancer and the promise of immunotherapy: a review[J]. *Int Rev Immunol*, 2014, 33(5):383-401.
- [9] Lüscher-Firzlaff JM, Westendorf JM, Zwicker J, et al. Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation[J]. *Oncogene*, 1999, 18(41):5620-5630.
- [10] Cheng HY, Gao Y, Lou G. DNA methylation of the *RIZ1* tumor

- suppressor gene plays an important role in the tumorigenesis of cervical cancer[J]. Eur J Med Res, 2010, 15(1):20-24.
- [11] Huang J, Liou YL, Kang YN, et al. Real-time colorimetric detection of DNA methylation of the *PAX1* gene in cervical scrapings for cervical cancer screening with thiol-labeled PCR primers and gold nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11:5335-5347.
- [12] Kim MK, Lee IH, Lee KH, et al. DNA methylation in human papillomavirus-infected cervical cells is elevated in high-grade squamous intraepithelial lesions and cancer[J]. J Gynecol Oncol, 2016, 27(2):e14.
- [13] Xu J, Xu L, Yang B, et al. Assessing methylation status of *PAX1* in cervical scrapings, as a novel diagnostic and predictive biomarker, was closely related to screen cervical cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2):1674-1681.
- [14] Lai HC, Lin YW, Huang RL, et al. Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasms type 3 and worse[J]. Cancer, 2010, 116(18):4266-4274.
- [15] Kan YY, Liou YL, Wang HJ, et al. *PAX1* methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening[J]. Int J Gynecol Cancer, 2014, 24(5):928-934.
- [16] Huang TH, Lai HC, Liu HW, et al. Quantitative analysis of methylation status of the *PAX1* gene for detection of cervical cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(4):513-519.
- [17] 徐周敏, 秦士新, 裴峰, 等. *PAX1* 基因甲基化特异性定量 PCR 检测在宫颈癌筛查中的意义 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18 (1): 10-14.
- [18] 林晓, 徐军, 徐灵, 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.
- [19] 徐军, 徐灵, 王立峰, 等. 子宫颈脱落细胞中 *PAX1* 基因甲基化定量检测在子宫颈癌早期诊断中的应用 [J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49 (9): 699-701.
- [20] Nikolaidis C, Nena E, Panagopoulou M, et al. *PAX1* methylation as an auxiliary biomarker for cervical cancer screening: a meta-analysis[J]. Cancer Epidemiol, 2015, 39(5):682-686.

收稿日期: 2016-06-17

• 信息窗 •

人民卫生出版社系列期刊管理委员会第6次工作会议在京召开

为系统总结2015年人民卫生出版社系列期刊的工作,做好“十三五”期刊发展规划的顶层设计,准确把握新时期期刊工作面临的新形势、新任务、新机遇与新挑战,2016年4月9日,人民卫生出版社系列期刊管理委员会第6次工作会议在京召开。国家卫生和计划生育委员会宣传司巡视员王华宁,国家新闻出版广电总局综合业务司副司长丁以绣,北京市新闻出版广电局数字出版处处长王会友,人民卫生出版社总编辑杜贤编审,北京大学图书馆文献计量学研究室研究员蔡蓉华,中国科学技术信息研究所研究员张玉华,中国科学院文献情报中心研究员刘筱敏,系列电子期刊和待批电子期刊的主编、主编代表、编辑部成员,以及人卫社期刊中心全体人员50余人参加了会议。

杜贤总编辑代表人民卫生出版社致辞并讲话,全面介绍了人卫社的发展现状以及人卫社实施强社强刊战略的具体举措,对期刊的工作提出了八个坚持和八个加强:坚持高举旗帜,引领学术导向;坚持不断创新,进行融合发展;坚持办刊质量,打造学术精品;坚持办刊标准,提高学术水平;坚持发展方向,建设学术联盟;坚持以期刊为载体,实现立体化经营;坚持供给侧改革,补齐短板;坚持社会效益首要,社会效益与经济效益有机统一。同时,要加强顶层设计;加强学科体系建设;加强管理;加强质量建设,全方位提升办刊质量;加强品牌建设;加强资源整合;加强创新融合;加强构建强大的立体化学术综合营销平台。

人卫社系列期刊15个编辑部负责人分别对各期刊2015年工作进行了总结,汇报了2016年工作规划,交流了办刊的经验,特别是新媒体在提升期刊影响力的应用、扩大稿源的途径、期刊与会议的互动等热点问题引起了参会人员的积极关注和响应,并寻找了各刊发展的短板和不足。通过此次会议,人卫系列期刊各编辑部均明确了工作目标和方向,一致表示将按照此次会议的工作部署,用实际行动加强质量建设,以期刊为载体,实行立体化的运营和立体化的管理,融合各方资源推动期刊发展,全方位贯彻执行人卫社强社强刊战略。