

· 专题报道:妇科肿瘤 ·

# FAM19A4 基因启动子甲基化在高危型 HPV 阴性 宫颈癌诊断中的作用

伍恒英 彭苏琚 布俏雯 张亮 王三锋 雷雯 李辉斌 马健 罗喜平

广州医科大学附属广东省妇幼保健院妇科(广州 510010)

**【摘要】 目的** 探讨 FAM19A4 基因启动子甲基化在高危型 HPV(hr-HPV)阴性宫颈癌诊断中的作用。**方法** 收集 2013 年 6 月至 2017 年 12 月在广东省妇幼保健院妇科治疗的宫颈癌患者共 490 例,其中术前宫颈刷液荧光定量 PCR 检测 HPV 结果为 hr-HPV 阴性的患者共 25 例,提取石蜡包埋标本中的 DNA,依次经荧光定量 PCR、HC-II、高通量靶向测序 3 种检测方式检测 HPV 型别,并评估 hr-HPV 阴性宫颈癌的临床特征,进一步检测标本中 FAM19A4 基因甲基化的表达情况。**结果** 25 例样本中经荧光定量 PCR 及 HC-II 方法检测结果为 hr-HPV 阴性共 12 例(48.0%, 12/25),将 12 例样本进行高通量测序,仍为阴性有 9 例(36%, 9/25);hr-HPV 阴性宫颈癌标本的 FAM19A4 基因甲基化检出率为 100%(9/9);hr-HPV 阴性宫颈癌与 hr-HPV 阳性宫颈癌相比,在组织病理学有统计学差异( $P < 0.05$ )。**结论** hr-HPV 阴性宫颈癌一种临床病理较为特殊的宫颈癌,经过更加敏感的检测方法检测后,发病率将进一步下降,结合 FAM19A4 基因启动子甲基化检测将对 hr-HPV 阴性宫颈癌的诊断有重要的辅助意义。

**【关键词】** 高危型 HPV 阴性宫颈癌; 基因测序; 甲基化; FAM19A4

**The role of FAM19A4 gene promoter methylation detection in the diagnosis of high-risk HPV-negative cervical cancer** WU Hengying, PENG Sujun, BU Qiaowen, ZHANG Liang, WANG Sanfeng, LEI Wen, LI Huibin, MA Jian, LUO Xiping. Department of Obstetrics and Gynaecology, Guangdong Women and Children's Hospital and Health Institute Medical University, Guangzhou 510010, China  
Corresponding author: LUO Xiping E-mail: 2488692399@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role methylation of FAM19A4 gene promoter methylation in tissue the diagnosis of high-risk HPV (hr-HPV) negative cervical cancer. **Methods** A total of 490 patients with cervical cancer who were treated by gynecology in Guangdong Provincial Maternal and Child Health Hospital from June 2013 to December 2017 were enrolled. Quantitative PCR was used to detect HPV using preoperative cervical brushing liquid and 25 cases of hr-HPV negative were found. Then the DNA extracted from FFPE tissues of the 25 hr-HPV negative were used to confirm the HPV existence by quantitative PCR, HC-II and High-throughput sequencing. The clinical characteristics of hr-HPV-negative cervical cancer were evaluated, and the status of FAM19A4 gene methylation in the specimen was detected by qMS-PCR. **Results** (1) The FFPE DNA results of using quantitative qPCR and HC-II were the same. In the 25 samples, hr-HPV was negative in 12 cases (48.0%, 12/25). 12 samples were DNA sequenced and 9 sample were still negative (9%, 36%, 9/25). (2) The methylation of FAM19A4 gene methylation was 100% (9/9) in the hr-HPV-negative cervical cancer group. (3) Compared with hr-HPV-positive cervical cancer, hr-HPV-negative cervical cancer was statistically different in histopathology and clinical stage ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** hr-HPV-negative cervical cancer is a kind of cervical cancer with special clinicopathological features. After more sensitive detection, the incidence will be further reduced. Combined with the FAM19A4 gene promoter methylation assay will have important auxiliary significance for the diagnosis of hr-HPV negative cervical cancer.

**【Key words】** hr-HPV negative cervical cancer; high-throughput sequencing; methylation; FAM19A4

宫颈癌是女性第二大常见恶性肿瘤,其发病率在女性生殖器官恶性肿瘤中排第 2 位,其中约

90% 的宫颈癌死亡发生在发展中国家。研究<sup>[1]</sup>表明,宫颈癌患者中 HPV 感染的概率达到了 99%,而且高危型 HPV (high risk human papillomavirus, hr-HPV) 感染是导致宫颈癌的必要因素,因此针对 HPV 感染的检测和治疗手段已经开展并得到广泛应用。HPV + TCT(液基薄层细胞学检查)的检测方

doi: 10.3969/j.issn.1006-5725.2019.05.002  
基金项目:广东省科技厅课题(编号:2017ZC0317)  
通信作者:罗喜平 E-mail: 2488692399@qq.com

法和HPV疫苗的使用,使宫颈癌成为可预防的恶性肿瘤。研究<sup>[2-3]</sup>表明,无论何种检测方法,仍有一小部分宫颈癌患者HPV的检测结果为阴性,并提出HPV阴性宫颈癌可能代表生物学上,与HPV阳性宫颈癌相比预后较差的肿瘤亚群。现行依靠HPV的宫颈癌筛查方法存在较大的漏诊风险,因此,寻找能够区别于HPV之外,有效识别宫颈癌的特异性分子标志物,补充目前hr-HPV阴性宫颈癌易漏诊的不足,具有重要意义。研究<sup>[4]</sup>表明DNA启动子甲基化是恶性肿瘤发生的早期事件,且与宫颈癌的发生发展密切相关,可作为宫颈癌早期诊断的特异性分子标志。具有序列相似性的19家族[趋化因子(C-Cmotif)-样]成员A4(family with sequence similarity 19 member A4, FAM19A4)是TAFA基因家族成员,国外已有研究<sup>[5]</sup>发现FAM19A4基因启动子甲基化能有效识别宫颈癌,有望成为新型肿瘤标记物。但国内外目前尚无文献报道FAM19A4基因启动子甲基化与hr-HPV阴性宫颈癌相关性的研究。为探讨FAM19A4基因启动子甲基化在我国妇女hr-HPV阴性宫颈癌诊断中的价值,在前期研究基础上,本文采用双探针荧光定量PCR技术,检测hr-HPV阴性及阳性宫颈癌甲基化检出率,研究FAM19A4基因启动子甲基化在hr-HPV阴性宫颈癌诊断中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集2013年6月至2017年5月在我院治疗的宫颈癌患者。本研究的纳入标准为:病理切片经我院病理科确诊或会诊的宫颈癌患者,临床分期及治疗方式均以国际妇产科联盟(FIGO, 2009年)为依据。排除标准为:(1)病理切片未经我院病理科会诊;(2)同时发现两种及两种上妇科恶性肿瘤;(3)未按照国际妇产科联盟(FIGO, 2009年)未标准进行治疗,无法获取病理石蜡作为样本。符合入选条件共490例。从中筛选出术前宫颈刷液HPV检测结果为高危型阴性宫颈癌患者25例为实验组,从中随机选择3例术前宫颈刷液HPV检测结果为高危型阳性宫颈癌患者为对照组。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 DNA的提取** 利用TIANamp FFPE DNA提取试剂盒(北京天根公司生产)提取石蜡包埋标本的DNA,按试剂盒说明书提供的方法操作。以上提取的DNA使用Quawell Q5000紫外分光光度计进行浓度测量,保存于-20℃冰箱备用。

**1.2.2 HPV-DNA高通量测序** 由北京迈基诺基

因科技股份有限公司完成,基本过程,将提取的DNA,捕获目的一部分进行样品文库的制备,进一步对该文库进行质量检测,捕获目的DNA片段,使用NextSeq500、HiSeq2500(Rapid)测序仪测序,测序策略为PE150,进行最后的信息分析,得到最终的样本信息。

**1.2.3 定量PCR检测** 重亚硫酸盐修饰将剩余的DNA进行重亚硫酸氢盐处理(模板DNA浓度为500 ng),利用EZ DNA Methylation-Direct™试剂盒(美国Zymo Research公司产品),按试剂盒说明书提供的方法操作。重亚硫酸盐修饰后的DNA立即用于荧光定量PCR检测,剩余样本储存在-20℃冰箱。

**1.2.4 双探针荧光定量PCR** 美国ABI 7500型实时荧光定量PCR系统(Life Tech)用于进行实时荧光定量PCR技术检测样本中FAM19A4基因的甲基化情况。以hr-HPV阳性宫颈癌FFPE-DNA、hr-HPV阴性宫颈癌FFPE-DNA、双蒸水分别作为阳性对照、阴性对照和空白对照模板。反应体系共20 μL,主要包括:2×Premix Type试剂10 μL;50×Rox Reference Dye II试剂0.2 μL;FAM19A4基因上、下游引物各0.5 μL;ACTB内参基因上、下游引物各0.5 μL;FAM19A4基因及ACTB内参基因探针各0.8 μL;纯水5.2 μL;样本量1 μL(FAM19A4基因及ACTB内参基因的引物及探针序列如表1所示)。PC反应条件:95℃预变性3 min;然后95℃变性15 s,56℃退火20 s及65℃延伸40 s,共进行50个循环。每个样本均进行了3次重复试验。扩增结果判定:荧光定量PCR技术扩增后,经ABI 7500收集荧光信号,获得内参基因和目标基因的循环阈值(CT值)及扩增曲线,计算两基因CT值间的阈值差(ΔCT),综合判定不同样本的甲基化程度。以ACTB为内参,计算ΔCT=CT目标基因-CT内参,并同时结合扩增曲线判断甲基化情况,且ΔCT值越小,扩增曲线目标基因越早扩增,表示基因甲基化水平越高。

**1.3 统计学方法** 采用SPSS 23.0软件进行统计学分析。计数资料采用 $\chi^2$ 检验或连续校正或Fisher精确概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 荧光定量检测HPV病毒** 25例宫颈癌样本经过荧光定量PCR、HC-II两种方法检测HPV病毒感染情况,12例(48.0%, 12/25)为hr-HPV阴性,二者检测结果相仿。将12例样本作进一步高通量

表1 FAM19A4及ACTB基因的引物及探针序列

Tab.1 The sequences of primers and probes for the FAM19A4 and ACTB genes

基因类别	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
FAM19A4-F	CGGGCGGTTCGGTTAATT	101
FAM19A4-R	AAAACGACGCGCAATTAAC	101
FAM19A4-P	FAM-CCGAACCCAACTAACGCGCTAACCA-BHQ1	
ACTB-F	TGGTGATGGAGGTTTAGTAAGT	133
ACTB-R	AACCAATAAAACCTACTCTCCCTTAA	133
ACTB-P	HEXACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-BHQ1	

测序,最后结果见表2。实验组中12例样本仅剩余9例为hr-HPV阴性,对照组中3种检测方法类型完全吻合。对照组3例样本经3种检测方法检测,HPV结果吻合。

表2 样本组织学类型,以及经HC-II、荧光定量PCR、高通量靶向测序检测结果

Tab.2 Sample histology type, as well as HC-II, qPCR, High-throughput sequencing test results

	组织病理学	HC-II	荧光定量PCR	高通量测序
实验组 1	鳞癌	0.63	hr-HPV(-)	hr-HPV(-)
2	子宫内膜样腺癌	0.78	hr-HPV(-)	52
3	鳞癌	0.21	hr-HPV(-)	hr-HPV(-)
4	腺癌	0.11	hr-HPV(-)	hr-HPV(-)
5	腺癌	0.67	hr-HPV(-)	hr-HPV(-)
6	鳞癌	0.11	hr-HPV(-)	26
7	鳞癌	0.63	hr-HPV(-)	16
8	鳞癌	0.29	hr-HPV(-)	82
9	腺癌	0.18	hr-HPV(-)	39
10	腺癌	0.17	hr-HPV(-)	hr-HPV(-)
11	鳞癌	0.61	hr-HPV(-)	hr-HPV(-)
12	鳞癌	0.12	hr-HPV(-)	hr-HPV(-)
对照组 1	鳞癌	1.96	16	16
2	鳞癌	1.12	18	18
3	鳞癌	1.65	16	16

注:\*,当HC-II检测的荧光读数与阴性测定值(RLU/CO)比值≥1.0时为高危型HPV感染阳性,<1时为高危型HPV感染阴性;随机选取3例术前荧光定量PCR及HC-II结果hr-HPV阳性样本作为对照组

2.2 hr-HPV 阴性与 hr-HPV 阳性宫颈癌患者的临床病理特点比较 表3显示hr-HPV阴性及阳性宫颈癌的女性在FIGO分期、组织病理学、淋巴转移情况的比较。临床分期:490例宫颈癌患者中,早期共162例,其中hr-HPV阴性8例,hr-HPV阳性348例;局部晚期共312例,其中hr-HPV阴性1例,hr-HPV阳性117例。临床分期中hr- HPV 阴性与阳性患者的构成比分别比较,差异没有统计学意

义( $P>0.05$ )。病理类型:490例子宫颈癌患者中,鳞癌共387例,hr-HPV阴性6例,hr-HPV阳性381例;腺癌共38例,hr-HPV阴性3例,hr-HPV阳性35例。腺癌中hr-HPV阴性的比例明显高于hr-HPV阳性患者( $P<0.05$ )。淋巴转移情况:490例子宫颈癌患者中,有明确的淋巴转移情况记录共233例,淋巴转移共40例,hr-HPV阴性2例,hr-HPV阳性38例;淋巴未转移193例,hr-HPV阴性7例,hr-HPV阳性186例。淋巴转移情况中hr- HPV 阴性与阳性患者的构成分别比较,差异没有统计学意义( $P>0.05$ )。

表3 hr-HPV 阴性与 hr-HPV 阳性宫颈癌患者的临床病理特点比较

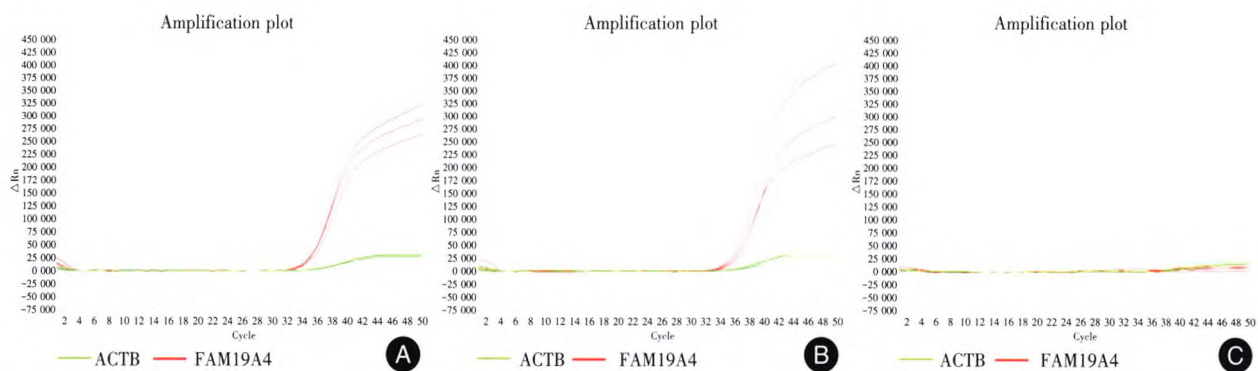
Tab.3 Comparison of clinicopathological features of hr-HPV-negative and positive cervical cancer patients 例

组别	Hr-HPV 阴性宫颈癌		Hr-HPV 阳性宫颈癌		P 值
	例数	百分比(%)	例数	百分比(%)	
FIGO 分期 <sup>*</sup>	9		465		
早期(Ia-Ib1)	8	89	348	75	0.564
局部晚期(Ib2-IV)	1	11	117	25	
病理类型 <sup>Δ</sup>	9		416		
鳞癌	6	67	381	92	0.038
腺癌	3	33	35	8	
淋巴转移情况 <sup>#</sup>	9		224		
有转移	2	22	38	17	1.0
无转移	7	78	186	83	

注:FIGO分期(Ia-Ib1)为临床早期,(Ib2-IV)为局部晚期。临床分期比较,\* $P>0.05$ ,Fisher确切概率;病理类型比较, $\Delta P<0.05$ ,Pearson卡方;淋巴转移情况比较, $\#P>0.05$ ,Fisher确切概率

2.3 hr-HPV 阴性与 hr-HPV 阳性宫颈癌及空白对照样本的扩增曲线 采用双探针荧光定量PCR分别检测hr-HPV阴性与hr-HPV阳性宫颈癌组织FFPE中,FAM19A4基因启动子发生甲基化的情况,发现在hr-HPV阴性与阳性宫颈癌的样本中甲基化检出率都是100%。见图1。





注：A，hr-HPV 阳性宫颈癌(对照组)；B，hr-HPV 阴性宫颈癌(实验组)；C，ddH<sub>2</sub>O 白对照(组)。每个实验样本重复 3 次

图 1 高危型 HPV 阴性、阳性宫颈癌及空白对照样本的扩增曲线

Fig.1 qMS-PCR amplification curve of high-risk HPV-negative and positive cervical cancer and blank control samples

3 讨论

宫颈癌是中国女性最常见的恶性肿瘤之一，1974 年德国病毒学家 ZURHAUSEN 等<sup>[6]</sup>提出了 HPV 可能在子宫颈癌的发病过程中起到重要作用的观点，HPV 与宫颈癌的研究便在国内外从未停止，目前普遍认知 hr-HPV 的持续性感染是宫颈癌发病的主要原因，HPV 检测已经被纳入宫颈癌的筛查方案。临床上关于 hr-HPV 阴性宫颈癌的报道也不少见，HPV 感染阴性率也是层出不穷，且有报道<sup>[7]</sup>hr-HPV 阴性宫颈癌的发病率不断升高。RODRÍGUEZ-CARUNCHIO 等<sup>[8]</sup>研究显示，用 HC-II 方法初次检测子宫颈癌患者的 HPV 感染状况，其阴性率为 10.2%，当再次用高敏感度的 PCR 技术重复检测时，其阴性率减少为 5.8%。与本研究结果相似，说明，检测方法的不同是导致子宫颈癌患者 HPV 感染阴性率报道大相径庭的原因之一；也提示，临床应选用敏感的 HPV 检测方法进行子宫颈癌筛查。在本研究中使用高通量测序的检测方法，证明存在宫颈癌存在 hr-HPV 阴性的可能，然而采用高通量测序的方法去进行 hr-HPV 阴性宫颈癌的诊断，在临床投入使用的可行性较差，经济性、效率等方面存在着明显的不足，那么寻找一种对 HPV 检测更加精准，又或者能独立于 HPV 病毒之外的宫颈癌的筛查方法显得尤为重要。

高危型 HPV 感染是宫颈癌及其癌前病变的主要致病原因，hr-HPV 还能诱导宿主细胞发生遗传及表观遗传学的改变导致癌变<sup>[9]</sup>。那么通过表观遗传学进行肿瘤早期诊断是否能成为一条新的检测路径？DNA 甲基化是最常见的表观遗传学之一，通过检测表观遗传学的变异，诊断肿瘤具有更高的稳定性、灵敏度和特异度。STEENBERGEN 等<sup>[9]</sup>首先使用人染色体核型分析技术在宫颈组织水平验证了 FAM19A4 基因启动子甲基化有望作为宫

颈癌的新型靶向分子标记物。研究<sup>[10]</sup>发现，正常宫颈相比，FAM19A4 基因甲基化检出率在宫颈癌中异常增高，能有效的检测宫颈癌。FAM19A4 基因甲基化可能促进宫颈癌的发生发展，是宫颈细胞癌变的特异性生物标志物。在本研究中，对照组及实验组的 hr-HPV 阳性宫颈癌及阴性宫颈癌甲基化检出率没有差异。因此推测，甲基化诊断宫颈癌的检测方法能够不受 HPV 的干扰，尤其是在 hr-HPV 阴性宫颈癌的诊断优势更加突出。因此甲基化的检测方法在宫颈癌筛查中的意义不容忽视。

本研究与先前报道的结果一致，hr-HPV 阴性更常见于腺癌<sup>[11-12]</sup>。这可能与宫颈腺癌的亚型较多，HPV 检测无法完全覆盖有关，甚至有学者<sup>[13]</sup>提出宫颈腺癌致病原因是 HPV 以外的病原体引起。hr-HPV 阴性宫颈癌的发病机制尚不明确，仍需进一步研究。本研究还发现在临床分期中本研究中 hr-HPV 阴性宫颈癌患者的临床分期更偏早期，这与 FISCHEROVÁ 等<sup>[14]</sup>研究结果相反。推测是因为宫颈癌的不断进展，HPV 病毒脱失，进而造成晚期宫颈癌 hr-HPV 检测结果呈阴性。研究<sup>[15]</sup>发现 FAM19A4 基因甲基化可能与病理类型、临床分期及淋巴结转移状态无关。因此，hr-HPV 阴性宫颈癌是一种临床病理较为特殊的宫颈癌，将甲基化检测用于它的诊断，能够减少临床病理不同带来的影响，减少漏诊风险。

综上所述，本研究从宿主基因水平的变化表明了宫颈组织可能受表观遗传影响发生癌变，突破传统的宫颈癌伴随着高危型 HPV 感染的观念。本研究的主要优势在于使用荧光定量 PCR、HC-II、高通量测序多种 HPV 检测方法重复检测样本 HPV 感染情况，且以高通量测序为金标准，进行分析，探讨 FAM19A4 基因甲基化在 hr-HPV 阴性宫颈癌诊断中的作用。本研究的主要局限是样本量较

少,需要更大的样本量,减少实验中可能存在的偏倚;而且FEEP样本提取DNA过程中,有可能出现HPV病毒脱失或者病毒已被免疫机制清除等可能,导致取材受到影响。未来研究中将继续收集高危型HPV阴性宫颈癌组织及宫颈细胞刷液样本进行分析,减少统计结果中的偏倚,希望将该基因甲基化检测应用在高危型HPV阴性宫颈癌的早期诊断中。

#### 参考文献

- [1] ROYCHOWDHURY A, SAMADDER S, ISIAM M S, et al. Identification of changes in the human papilloma virus 16 (HPV16) genome during early dissemination of cervical cancer cells may complement histological diagnosis of lymph node metastasis[J]. *Pathoh Oncol Res*, 2017, 23(4):845-852.
- [2] HOLL K, NOWAKOWSKI A M, POWELL N, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(12):2858-2868.
- [3] RONCO G, DILLNER J, ELFSTROM K M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials[J]. *Lancet*, 2014, 383(9916):524-532.
- [4] TIAN Y, WU N Y Y, 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.
- [5] DE STROOPER L M, MEIJER C J, BERKHOF J, et al. Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(12):1251-1257.
- [6] ZUR HAUSEN H, MEINHOF W, SCHEIBER W, et al. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus[J]. *Int J Cancer*, 1974, 13(5):650-656.
- [7] 周静,李征宇,李佳琦,等. HPV+/-宫颈癌患者临床特点与预后的对比分析[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(15):2860-2863.
- [8] RODRIGUEZ-CARUNCHIO L, SOVERAL I, STEENBERGEN R D, et al. HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: a distinct type of cervical cancer with poor prognosis[J]. *Bjog*, 2015, 122(1):119-127.
- [9] STEENBERGEN R D, SNIJDERS P J, HEIDEMAN D A, et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(6):395-405.
- [10] LUTTMER R, DE STROOPER L M, DIJKSTRA M G, et al. FAM19A4 methylation analysis in self-samples compared with cervical scrapes for detecting cervical (pre)cancer in HPV-positive women[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(5):579-587.
- [11] 王遥,杨佳欣. 非HPV感染相关宫颈腺癌的研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2018, 45(01):60-65.
- [12] MBTANI N, ADAMS T, WIIJK L V, et al. Performance of an human papillomavirus test in samples from women with histopathologically confirmed invasive cervical cancer[J]. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 2016, 20(2):151-153.
- [13] MOLIJN A, JENKINS D, CHEN W, et al. The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(2):409-416.
- [14] FISCHEROVA D. Cervical cancer staging - preoperative assessment of tumor extent (a review of the most recent ultrasound studies)[J]. *Ceska Gynekol*, 2014, 79(6):436-446.
- [15] 布俏雯,张亮,王三锋,等. FAM19A4基因启动子甲基化检测在宫颈癌组织中的临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(09):1541-1544+1553.

(收稿:2018-11-07 编辑:把云杉)