

FISH 检测两种基因在宫颈癌筛查中的价值*

朱园园,冯定庆,沈国栋,程 民(安徽医科大学附属省立医院,安徽省立医院分子医学实验室,合肥 230001)

【摘要】 目的 探讨荧光原位杂交(FISH)检测人类染色体末端酶基因(hTERT)和 c-MYC 基因扩增在宫颈癌筛查以及疾病转归中的预警价值。**方法** 收集符合条件的妇科门诊患者宫颈标本 1 000 例,行液基细胞学(TCT)和 hTERT、c-MYC 基因检测,任一项阳性者在阴道镜下取活检。病理异常者分别在第 3、6、12 个月重复行细胞学和基因检测及阴道镜随访。**结果** hTERT 和 c-MYC 阳性率分别为 7.3%、4.6%。无论是细胞学或者病理学分类,两种基因的异常扩增率均随着病变级别加重而升高($P < 0.05$)。两基因表达也呈正相关性($P < 0.01$)。随访发现 5 例患者存在恢复缓慢或疾病进展甚至术后复发,其中 4 例为 hTERT 和 c-MYC 共同表达的患者。hTERT 基因的灵敏度和约登指数高于 c-MYC,但是特异度较低。**结论** hTERT 基因和 c-MYC 基因的异常扩增阳性率随宫颈病变程度、宫颈细胞异常程度增加而增加。两者可以与细胞学互为补充,用于宫颈病变初筛和高度病变风险的评估。

【关键词】 子宫颈癌; 人类染色体端粒酶基因; 基因,myc; 荧光原位杂交

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.15.010 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)15-2065-03

Amplification of hTERT and c-MYC detected by FISH in screening of cervical cancer ZHU Yuan-yuan, FENG Ding-qing, SHEN Guo-dong, CHENG Min (Laboratory of Molecular Medicine, Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui 230001, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the amplification of hTERT and c-MYC detected by FISH in screening of cervical cancer and to predict the prognosis. **Methods** The cervical cell specimens from 1000 women were undertaken Liquid-based cytologic test TCT and FISH objected to hTERT and c-MYC. If any result was positive, colposcopy and cervical biopsy were done. The patients with pathologic abnormalities would repeated checking with cytology and gene detection and colposcopy at 3, 6, 12 months after first biopsy. **Results** The positive rates of hTERT and c-MYC were 7.3% and 4.6% respectively. Abnormal amplification rates of two genes rised with the increasing lesion grades of cytology or pathology ($P < 0.05$). Gene expression of c-MYC was positive correlation with hTERT's ($P < 0.01$). Patients restored slower even got worse, in which 4 are hTERT and c-MYC co-expression. The sensitivity and youden index of hTERT were higher than these of c-MYC, but lower in specificity. **Conclusion** hTERT gene and c-MYC gene detected by FISH can be applied in screening of cervical cancer and assessment of the risks of progressing to high-grade lesions.

【Key words】 cervical cancer; human chromosome telomerase gene; gene,myc; fluorescence in situ hybridization

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,发病率位居女性生殖系统恶性肿瘤第 2 位。它的发生和发展是一个长期的、多因素相关的复杂病理过程。进行定期筛查、准确发现早期病变、及时干预,则可以大大降低宫颈癌的发病率及病死率。如何提高筛查的灵敏度、特异度,优化筛查方案,便成了首当其冲的问题。人端粒酶(TERC)RNA 是人端粒酶组分之一,其编码基因人类染色体末端酶基因(hTERT)位于染色体 3q26。TERC 扩增预示着端粒酶活性增加,通过延长端粒、阻碍细胞凋亡导致肿瘤发生。c-MYC 癌基因定位于染色体 8q24,其编码蛋白参与细胞增殖、分化与凋亡,并且涉及人类肿瘤的形成和演进。本研究通过荧光原位杂交(FISH)技术检测 hTERT 和 c-MYC 基因在不同程度宫颈病变上皮细胞中的扩增情况,判断两者在宫颈癌筛查以及疾病转归中的预警价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 经患者知情同意,选择 2012 年 3~6 月在本院妇产科门诊就诊患者 1 000 例作为研究对象,年龄范围为 25

~64 岁,有性生活史,非妊娠期、哺乳期和月经期;排除标准:已做过阴道镜活检者或已经治疗过的病例。从健康体检中心收集 20 例临床检查无异常,液基细胞学(TCT)和人乳头瘤病毒检查阴性的病例用于 FISH 建立阈值。

1.2 仪器与试剂 宫颈 TCT 检查采用广州安必平公司全自动沉降式制片染色机进行制片。结果采用 2001 版国际癌症协会推荐的 TBS 诊断系统分级^[1]:未见上皮内病变或恶变(NILM);非典型鳞状细胞(ASC);鳞状上皮内低度病变(LSIL),包括人类乳头状瘤病毒(HPV)感染及宫颈上皮内病变(CIN) I 级;鳞状上皮内高度病变(HSIL),包括 CIN II、CIN III 和原位鳞状细胞癌;鳞癌(SCC);意义不明确的不典型腺细胞(AGCUS)和腺癌(AC)。细胞学阳性是指病变为 ASC 及以上。基因扩增检测试剂盒由北京金菩嘉医疗科技公司提供。hTERT 探针杂交到 3 号染色体长臂 26.3,信号为红色,对照探针为 3 号染色体着丝粒探针 CSP3,信号为绿色。hTERT 阳性:单个间期细胞核中绿色信号不少于两个,红色信号超过两

* 基金项目:安徽医科大学校科研基金(2011xkj076)。 作者简介:朱园园,女,硕士,主管技师,主要从事肿瘤分子生物学研究。

个;c-MYC 阳性:探针杂交到 8q24,单个间期细胞核中红色信号超过两个为异常扩增。每 100 个细胞中异常扩增细胞数超过阈值为标本阳性。

1.3 方法 纳入对象行常规细胞学检查后,利用 FISH 技术分别检测 TCT 剩余标本中 hTERT 和 c-MYC 扩增情况,再对细胞学或基因检测阳性患者行阴道镜检查,在醋白、碘试验异常区取活检送病理检验。若病理诊断为正常或 CIN I 则不进行临床治疗,若为 CIN II 及以上则进行相应的临床治疗。对所有病理异常者在第 3、6、12 个月进行阴道镜随访及 TCT、hTERT、c-MYC 检查,任一指标阳性则做病理活检,根据病理结果进行相应处理。

1.4 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件,应用 χ^2 检验的方法对各组数据率进行比较,用相关性分析两基因表达关系,检验水准 $\alpha=0.05$ 。若同一样本两种基因均异常扩增则分别计入相应分组。

2 结 果

2.1 FISH 正常阈值的建立 FISH 检测 20 例正常宫颈脱落细胞标本中 hTERT、c-MYC 基因的表达,统计每例标本出现基因扩增的异常细胞个数,阈值=均数+3×标准差。经计算,hTERT 的阈值=5.60%,c-MYC 的阈值=6.0%。超过阈值为基因扩增阳性。

2.2 基因检测结果与液基细胞学分级的关系 在 1 000 个病例中,共检出 TCT 异常者 109 例,阳性率 10.9%。从 NILM、ASCUS、LSIL、HSIL 到 SCC,各级别 hTERT 阳性率分别为 2.0%、33.8%、60.0%、85.7%、100%,c-MYC 阳性率分别为 0.9%、24.2%、44.0%、52.4%、100%,两者阳性率均随着 TBS 分级升高而增加。hTERT 和 c-MYC 的阳性率及双阳性率在各级别间差别均有统计学意义(χ^2 值分别为 407.50、300.49、243.84, $P<0.05$)。相关分析显示两者表达呈正相关性($r=0.993 5, P<0.01$)。见表 1。

表 1 1 000 例患者 hTERT 和 c-MYC 基因在宫颈脱落细胞中的表达情况[n(%)]

细胞学分级	n	hTERT 阳性	c-MYC 阳性	双阳性
NILM	891	18(2.0)	8(0.9)	4(0.4)
ASCUS	62	21(33.8)	15(24.2)	11(17.7)
LSIL	25	15(60.0)	11(44.0)	8(32.0)
HSIL	21	18(85.7)	11(52.4)	8(38.1)
SCC	1	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)
合计	1 000	73(7.3)	46(4.6)	32(3.2)

2.3 基因检测结果与组织病理学分级的关系 在 1 000 个病例中,有 871 例 TCT、hTERT、c-MYC 三项均为阴性,仅进行常规随访。三项任一阳性者有 129 例,病理证实 49 例病变,其中 CIN I 21 例,CIN II/III 24 例,宫颈癌 4 例。(其中 TCT 阴性 3 例),80 例病理阴性中有 63 例 TCT 阳性。FISH 检测发现,从宫颈炎到 CIN I、CIN II/III、SCC,hTERT 阳性率分别为 35.0%、66.7%、87.5%、100%,c-MYC 阳性率分别为 18.8%、52.3%、62.5%、75.0%,两者阳性率均随着病变程度加深逐渐增高。hTERT 阳性率、c-MYC 阳性率及双阳性率各组别间有统计学意义(χ^2 值分别为 26.88、23.10、25.46,均有 $P<0.05$)。相关分析显示两者表达呈正相关性($r=0.628 4, P<0.01$)。具体见表 2。

表 2 129 例患者在不同组织学分级中 hTERT、c-MYC 的异常表达情况[n(%)]

组织学分级	n	hTERT 阳性	c-MYC 阳性	双阳性
慢性宫颈炎	80	28(35.0)	15(18.8)	8(10.0)
CIN I	21	14(66.7)	11(52.3)	8(38.1)
CIN II/III	24	21(87.5)	15(62.5)	12(50.0)
宫颈癌	4	4(100.0)	3(75.0)	3(75.0)

2.4 细胞学与 FISH 单独或联合应用对宫颈病变的诊断效率

由表 3 可以看出,细胞学诊断宫颈病变敏感性很好,但特异性过低。FISH 检测 hTERT 灵敏度和约登指数均优于 c-MYC (79.6% : 59.2%, 0.45 : 0.40),但是特异性较差 (65.0% : 81.3%)。与单一基因相比,如果选用两基因同时阳性作为标准则能大大提高特异性和阳性预测值 (90.0%、74.2%),但敏感度和阴性预测值最差 (46.9%、73.5%),若选任一基因阳性作为筛查标准则正好相反,提高敏感度却降低了特异性。

表 3 TCT、hTERT、c-MYC 单独或联合应用对宫颈病变的诊断效率(%)

检测指标	TCT	hTERT	c-MYC	hTERT+c-MYC	hTERT/c-MYC
灵敏度	93.9	79.6	59.2	46.9	91.8
特异度	21.3	65.0	81.3	90.0	56.3
准确度	48.8	70.5	72.9	73.6	69.8
阳性预测值	42.2	58.2	65.9	74.2	56.3
阴性预测值	85.0	83.9	76.5	73.5	91.8
约登指数	0.15	0.45	0.40	0.37	0.48

2.5 49 例宫颈病变患者随访情况 对初次筛查出病理异常的 49 例患者分为未治疗组 (CIN I, 21 例) 和治疗组 (CIN II 及以上, 28 例) 进行随访。治疗组有 2 例双阳性 (2/12) CIN III 患者在术后随访第 3 个月时仍为 hTERT 阳性、阴道镜下正常,在第 6 个月时发现为 CIN I (hTERT 阳性),再次锥切术后随访才转为完全正常。其他 27 例在术后第 3、6、12 个月检查均完全正常。未治疗组大部分患者 (18/21) 在随访至 12 个月时恢复正常,但是有 1 例 hTERT+、1 例双阳性患者在第 12 个月仍为 CIN I,1 例双阳性患者在第 12 个月进展为 CIN II,随后手术治疗。

3 讨 论

2013 年美国阴道和子宫颈癌协会发布最新宫颈癌筛查异常和癌前病变处理指南,建议 30~64 岁女性每 5 年筛查一次,并且强调细胞学和人乳头状瘤病毒 (HPV) 检测两种方法联合应用于初筛^[2]。虽然 HPV 阳性率和阴性预测值高,但是大部分女性在感染 HPV 后会在一两年内将其清除,仅有很少会导致高级别病变^[3]。相对于 HPV 检查来说,TCT 阳性率较低,且易受主观因素影响。本研究中共检出 TCT 异常者 107 例,阳性率 10.7%,虽然敏感度达 93.9% 可是准确度低,只有 48.8%。分析可能是大量病例由于炎症、感染等引起反应性增生,被认为是 ASCUS,而实际上组织学正常。因此细胞学对于这种轻微的不典型增生特异性过低,可能会造成过度检查、过度治疗的问题。因此找到更准确可靠的生物标记物来判断病变风险、指导治疗显得尤为重要。

国外学者早就发现,端粒酶激活是 HPV 整合入宫颈细胞后, CIN 向宫颈癌转化的关键步骤^[4,5]。而宫颈细胞由非典型性发育异常向宫颈癌转变的过程中几乎都伴有 3 号染色体长臂扩增,通过鉴定共同扩增基因发现位于 3q26 上的 hTERT 基因最为重要,它的异常 copy 数增加多预示着端粒酶的激活。Obermann 等^[6]用 HPV、MYC、TERT 多色探针对 370 例液基细胞学样本进行检测,发现从正常到 ASUS、LSIL 到 HSIL, MYC 和 TERC 的扩增率都呈现大幅度的增加,但是对 132 例 LSIL 进行随访表明,消退组与进展组之间仅 TERC 的扩增率有明显统计学意义,提示 TERC 是 LSIL 的主要预后指标。Costa 等^[7]认为 hTERT 异常扩增多预示着 LSIL 到 HSIL 的转变,而 myc 则与 CIN II/III 进展为宫颈癌有关,提示 myc 可以作为疾病进展的预后因子。本研究发现无论是细胞学或者组织学分级,两个基因异常表达率均随着宫颈病变级别升高而增加,不仅可以明确区分正常组与轻微病变组,在各级别病变之间差异也比较明显,尤其是 hTERT,其阳性率不仅高而且在低级别与高级别病变之间差异也比 c-MYC 大。这与文献报道基本一致^[8-9]。根据随访结果来看,86% 的 CIN I 患者不进行物理或手术治疗可在一年内恢复正常。就过程而言, hTERT 和 c-MYC 双阳性的患者比单基因阳性的患者相对恢复时间更长甚至更易进展,但是由于病例数不足,未进行统计学分析。

另外本研究发现,在人群中 c-MYC 基因单独表达较少,多是伴随着 hTERT 异常扩增,在 CIN II/III 组共同表达率达到 50%,统计学分析认为二者表达呈正相关性。也有文献报道^[10] c-MYC 和 hTERT 异常扩增之间存在相关性。TERT 为端粒酶的催化亚基,是端粒酶活性的关键调控因子, c-MYC 可以结合 TERT 的启动子,在转录水平上调 hTERT 表达^[11]。而端粒酶需利用其 RNA 亚基作为模板合成端粒重复序列。因此初步推测 c-MYC 和 hTERT 共同扩增与 c-MYC 激活端粒酶活性有关,但是具体机制有待研究。

总之,本文认为应用 FISH 检测 hTERT 和 c-MYC 这两个基因其特异度和准确度均较好,可以大大弥补液基细胞学的不足。不过由于特异性荧光探针成本较高,临床可以根据不同目的进行选择检测,作为常规项目液基细胞学和 HPV 检测的补充,应用于宫颈病变的初筛和高度病变风险的评估。

参考文献

[1] Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System; terminology for reporting results of cervical cytology[J]. JAMA, 2002, 287(16): 2114-2119.
 [2] Massad LS, Einstein MH, Huh WK, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors[J]. Obstet Gynecol, 2013, 121(4): 829-846.

[3] Jaisamrarn U, Castellsague X, Garland SM, et al. Natural History of Progression of HPV Infection to Cervical Lesion or Clearance; Analysis of the Control Arm of the Large, Randomised PATRICIA Study [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79260.
 [4] Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, et al. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer[J]. J Pathol, 2006, 210(4): 412-419.
 [5] Liu H, Liu S, Wang H, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (hTERT) associated with human papillomavirus is related to the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer[J]. Diagn Pathol, 2012, 7(1): 147.
 [6] Obermann EC, Savic Prince S, Barascud A, et al. Prediction of outcome in patients with low-grade squamous intraepithelial lesions by fluorescence in situ hybridization analysis of human papillomavirus, TERC, and MYC[J]. Cancer Cytopathol, 2013, 121(8): 423-431.
 [7] Costa C, Espinet B, Molina MA, et al. Analysis of gene status in cervical dysplastic lesions and squamous cell carcinoma using tissue microarrays[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(7): 821-829.
 [8] Yin G, Li J, Zhu T, et al. The detection of hTERT amplification using fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia: a case control study[J]. World J Surg Oncol, 2012, 10(1): 168.
 [9] 汪志辉, 生秀杰. FISH 检测 hTERT 基因在不同级别宫颈病变中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2013, 9(8): 1209-1211.
 [10] Chen S, Yang Z, Zhang Y, et al. Genomic amplification patterns of human telomerase RNA gene and C-MYC in liquid-based cytological specimens used for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. Diagn Pathol, 2012, 7(1): 40.
 [11] Wahlstrom T, Belikov S, Arsenian HM. Chromatin dynamics at the hTERT promoter during transcriptional activation and repression by c-Myc and Mnt in Xenopus laevis oocytes[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(20): 3160-3169.

(收稿日期: 2014-03-19 修回日期: 2014-05-03)

刊误更正

本刊 2013 年 2 月 14 日出版的第 10 卷 3 期 289 页, 由湖南省怀化市第一人民医院检验科石书凡、杨长顺撰写的论文《耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性分析》一文, 由于排印错误, 误将作者顺序印刷为: 杨长顺、石书凡, 更正为: 石书凡、杨长顺。

特此更正, 并谨向作者致歉!

《检验医学与临床》编辑部