恶性肿瘤实验室研究专题·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.003

FAM19A4 甲基化检测在 HR-HPV 阳性宫颈癌及其癌前病变评估中的临床价值

刘 双,王亚男

湖南省妇幼保健院妇产科,湖南长沙 410008

摘 要:目的 探讨 FAM19A4 甲基化检测在高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)阳性宫颈癌及其癌前病变评估中的临床价值。**方法** 连续性纳入 2020 年 1—12 月该院收治的 80 例宫颈癌患者(宫颈癌组)及 90 例宫颈癌前病变患者(癌前病变组),以同期的 80 例健康体检者作为对照组。采集宫颈脱落细胞,采用杂交捕获法进行人乳头瘤病毒(HPV)的筛查及基因分型;采用双探针荧光定量 PCR 法检测 3 组 HR-HPV 阳性者宫颈脱落细胞中 FAM19A4 基因甲基化表达情况并进行统计学分析。**结果** 宫颈癌组、癌前病变组及对照组的 HR-HPV 阳性率分别为 92.50%(74/80)、55.56%(50/90)及 7.50%(6/80),差异有统计学意义($P<0.05$)。宫颈癌组 HR-HPV 阳性者的 FAM19A4 基因甲基化检出率(97.30%)明显高于癌前病变组(72.00%)与对照组(16.67%),差异有统计学意义($P<0.05$),癌前病变组 HR-HPV 阳性者的 FAM19A4 基因甲基化检出率明显高于对照组($P<0.05$)。宫颈癌组 HR-HPV 阳性者的宫颈脱落细胞中,HPV16/18 阳性者的 FAM19A4 基因甲基化检出率(100.00%)高于非 HPV16/18 阳性者(92.00%),差异有统计学意义($P<0.05$);癌前病变组中 HPV16/18 阳性者的 FAM19A4 甲基化检出率(75.00%)高于非 HPV16/18 阳性者(68.18%),差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** FAM19A4 基因可能是宫颈细胞癌变的特异性分子标志物,检测 PFAM19A4 甲基化程度可为临床防治宫颈癌提供参考。

关键词:宫颈癌; 宫颈癌前病变; 高危型人乳头瘤病毒; FAM19A4 甲基化

中图法分类号:R737.33 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2021)15-2152-04

Clinical value of FAM19A4 methylation detection in evaluation of HR-HPV positive patients with cervical cancer or precancerous lesions

LIU Shuang, WANG Yanan

Department of Obstetrics and Gynecology, Hunan Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Changsha, Hunan 410008, *China*

Abstract:Objective To investigate the clinical value of FAM19A4 methylation detection in the evaluation of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) positive patients with cervical cancer or precancerous lesions. **Methods** Eighty patients with cervical cancer (cervical cancer group) and 90 patients with cervical precancerous lesions (precancerous lesions group) treated in this hospital from January to December 2020 were successively enrolled in the study, meanwhile 80 people who underwent the healthy physical examination were enrolled as the control group. The exfoliated cervical cells were collected. The HPV screening and genotyping were carried out by adopting the hybridization capture method. Taqman probe-based quantitative PCR was used to detect the methylation of FAM19A4 gene of the cervical exfoliated cells in the 3 groups of HR HPV positive patients, among which the differences were statistically analyzed. **Results** The positive rate of HR-HPV in cervical cancer group, precancerous lesion group and control group was 92.50%(74/80), 55.56% (50/90) and 7.50% (6/80), respectively, and the difference was statistically significant($P<0.05$). The detection rates of FAM19A4 methylation of HR-HPV positive people in cervical cancer group(97.30%) was significantly higher than those in precancerous lesions group(72.00%) and control group(16.67%), the difference was statistically significant ($P<0.05$), the detection rates of FAM19A4 methylation of HR-HPV positive people in precancerous lesions group was significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The detection rates of FAM19A4 methylation in cervical cancer group was higher in HPV16/18 group than that in non-HPV 16/18 group (100%.00 *vs*. 92.00%, $P<0.05$), the detection rates of FAM19A4 methylation in

作者简介:刘双,女,医师,主要从事妇科肿瘤与宫颈病变方面的研究。

本文引用格式:刘双,王亚男.FAM19A4 甲基化检测在 HR-HPV 阳性宫颈癌及其癌前病变评估中的临床价值[J].检验医学与临床,2021,18(15):2152-2154.

precancerous lesion group with HPV16/18 were also higher than that in non-HPV16/18 group (75.00% *vs.* 68.18%，$P>0.05$). **Conclusion**　FAM19A4 methylation might be a specific molecular marker of cervical cell carcinogenesis. The detection of FAM19A4 methylation combined with high-risk HPV test can provide reference for early screening of cervical cancer.

Key words：cervical cancer；　cervical precancerous lesions；　high-risk human papillomavirus；　FAM19A4 methylation

宫颈癌是危害女性健康的主要生殖系统恶性肿瘤之一，其病死率可达 50%[1]，因此对宫颈癌进行早发现早干预具有重要的临床实践意义。高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)感染是宫颈癌发生、发展的危险因素，但是从 HR-HPV 感染到成为宫颈癌是一个多基因、多因素共同作用的过程[2]。而目前，宫颈癌的早期筛查方法及标志物比较缺乏，因此寻找一种特异性的分子标志物对宫颈癌及其癌前病变进行早期识别具有重要意义。FAM19A4 是 TAFA 基因家族成员，已经有研究证实，FAM19A4 甲基化与宫颈癌及其癌前病变存在密切关系，有望成为一种新型的宫颈癌早期筛查标志物[3]。但是目前，关于 FAM19A4 甲基化与不同基因型人乳头瘤病毒(HPV)感染宫颈癌相关性方面的研究报道比较少见。基于此，本研究将通过探讨 FAM19A4 甲基化检测在 HR-HPV 阳性宫颈癌及其癌前病变评估中的临床价值，以期为宫颈癌的早期防控提供参考依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料　连续性纳入 2020 年 1－12 月本院收治的 80 例宫颈癌患者作为宫颈癌组，年龄 30～70 岁，平均(47.55±8.43)岁；以 90 例宫颈癌前病变患者作为癌前病变组，年龄 28～70 岁，平均(45.20±6.91)岁；以同期的 80 例健康体检者作为对照组，年龄 20～60 岁，平均(42.19±5.57)岁。3 组研究对象的年龄比较差异无统计学意义($P<0.05$)。病例入选标准：(1)所有患者均在阴道镜下经宫颈组织病理学确诊分组，且经两位高级职称病理科医生核实，宫颈癌按 2018 年 FIGO 指南分期[4]；(2)癌前病变符合《2019 ASCCP 宫颈癌筛查和癌前病变管理指南共识》[5]中的相关诊断标准；(3)纳入研究前未进行相关药物治疗及手术；(4)患者年龄≥18 岁。排除标准：(1)合并其他恶性肿瘤；(2)伴有其他宫颈疾病或并发症；(3)先天性子宫发育不良；(4)临床、影像及病理资料不完整；(5)诊疗依从性比较差。本研究经过医院医学伦理委员会的审批，患者或家属均知情并签署知情同意书。

1.2　方法

1.2.1　HPV 的筛查及基因分型　采集宫颈脱落细胞保存于采集瓶中，保存条件 4 ℃。标本采集前 72 h 禁止性行为、阴道用药及冲洗。采用杂交捕获法进行 HPV 的筛查及基因分型，该方法能够检出 13 种 HR-HPV。

1.2.2　DNA 提取　利用 TIANamp GenomicDNA 提取试剂盒提取 HR-HPV 阳性者的宫颈脱落细胞标本中的 DNA，按试剂盒说明书操作。立即使用紫外分光光度计对以上提取的 DNA 进行浓度测量。

1.2.3　重亚硫酸盐修饰　取 HR-HPV 阳性者的宫颈脱落细胞标本进行 DNA 的提取，然后按照试剂盒说明书要求进行重亚硫酸盐修饰(EZ DNA 甲基化试剂盒-DIRECT 由 Zymo Research 公司提供)；加入 900 μL ddH_2O 和 300 μL M-Dilution Buffer 和 50 μL M-Dissolving S Buffer 到 CT Conversion Reagent 干粉中，充分混匀，室温下漩涡振荡 10 min；将 DNA 标本加入 PCR 管中，130 μL CT Conversion Reagent，充分混匀。反转录反应条件如下：98 ℃，10 min；64 ℃，30 min；4 ℃保存最长 20 h；上述制备的重亚硫酸盐修饰后 DNA 使用 Quawell Q5000 紫外分光光度计进行浓度测量，立即用于 PCR 检测。

1.2.4　荧光定量 PCR　以 ACTB 作为内参基因进行 PCR 扩增，扩增引物见表 1。扩增条件：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 15 s，56 ℃退火 20 s 及 65 ℃延伸 40 s，共 40 个循环。每个标本均重复试验 3 次。扩增结果通过采集荧光信号，得到循环阈值(Ct 值)及 ACTB 和 FAM19A4 的扩增曲线。所有样品的 Ct_{ACTB} 值均＜ 32，以保证样品质量，$Ct_{FAM19A4}$ 值＞40 的标本被认为代表阴性检测结果，$Ct_{FAM19A4}$ 值＜40 的标本计算甲基化评分，计算公式：$2^{(Ct_{ACTB}-Ct_{FAM19A4})}\times 100$。扩增曲线目标基因越早扩增，甲基化评分越高，表示基因甲基化水平越高。

表 1　扩增引物序列

基因	引物序列(5′－3′)	引物长度(bp)
ACTB	F：TGGTGATGGAGGAGGTTAGTAACT	101
	R：AACACATTACCTTGTGAATGCGG	
	P：HEX-ACTGTTGTACCTGTAGTCCG	
FAM19A4	F：TGGTGATGGCTGAGAATGC	133
	R：CCTTGATGTAGTGGGCCTA	
	P：FAM-CCGAACCCACTTGTTGACGT	

注：F 表示基因上游引物；R 表示基因下游引物；P 表示基因探针。

1.3　统计学处理　使用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，

多组间的比较采用单因素方差分析，两两比较采用 SNK-q 检验；计数资料以例数或百分率表示，组间比较采用 χ^2 检验；线性趋势采用 Cochran-Armitage 趋势检验；以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 3 组 HR-HPV 检出率的比较　宫颈癌组、癌前病变组及对照组的 HR-HPV 阳性率分别为 92.50％(74/80)、55.56％(50/90)及 7.50％(6/80)，差异有统计学意义($P<0.05$)。3 组 HR-HPV 阳性者中 HPV16/18 的感染率分别为 66.22％(49/74)、56.00％(28/50)及 16.67％(1/6)。

2.2 3 组 HR-HPV 阳性者 FAM19A4 基因甲基化检出率的比较　宫颈癌组 FAM19A4 基因甲基化检出率最高，对照组检出率最低，组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。采用 Cochran-Armitage 趋势检验发现宫颈病变程度与 FAM19A4 甲基化之间存在线性趋势($P<0.05$)，即随着宫颈病变严重程度增加，FAM19A4 基因甲基化的检出率逐渐升高。见表 2。

表 2　3 组 HR-HPV 阳性者 FAM19A4 基因甲基化检出率的比较

组别	HR-HPV 阳性数(n)	FAM19A4 甲基化		P
		n	检出率(％)	
宫颈癌组	74	72	97.30[ab]	
癌前病变组	50	36	72.00[a]	＜0.001
对照组	6	1	16.67	

注：与对照组比较，[a]$P<0.05$；与癌前病变组比较，[b]$P<0.05$。

2.3 HR-HPV 感染的类型与 FAM19A4 基因甲基化检出率的关系　HR-HPV 阳性者的宫颈脱落细胞中，宫颈癌组 HPV16/18 阳性者的 FAM19A4 基因甲基化检出率(100.00％)高于非 HPV16/18 阳性者(92.00％)，差异有统计学意义($P<0.05$)；癌前病变组中 HPV16/18 阳性者的 FAM19A4 甲基化检出率(75.00％)高于非 HPV16/18 阳性者(68.18％)，但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3　HR-HPV 感染的类型与 FAM19A4 基因甲基化检出率的关系

组别	HR-HPV 阳性数(n)	FAM19A4 甲基化		P
		n	检出率(％)	
宫颈癌组				
HPV16/18 阳性	49	49	100.00	
非 HPV16/18 阳性	25	23	92.00	0.04
癌前病变组				
HPV16/18 阳性	28	21	75.00	
非 HPV16/18 阳性	22	15	68.18	0.59

3 讨　论

宫颈癌对女性的生命健康产生严重影响。HPV 基因分型和液基薄层细胞学检查(TCT)是目前临床对宫颈癌进行筛查的主要手段，但是 TCT 的灵敏度比较低，容易产生假阴性，HPV 基因分型与 TCT 联合检测的灵敏度虽然得到了提高，但是特异性并没有得到改善[6]。有研究证实，降低或者清除 HPV 感染能够对宫颈癌起到有效的防治作用，但是目前还没有治疗 HPV 感染的特效方法[7]。本研究对宫颈癌患者、宫颈癌前病变患者及健康体检者中的 HR-HPV 阳性率进行了筛查，结果显示：宫颈癌患者的 HR-HPV 阳性率(92.50％)最高，其次是宫颈癌前病变患者(55.56％)、健康体检者(7.50％)，具有明显差异，与以往研究的报道一致[8]。说明 HR-HPV 感染对宫颈癌及其癌前病变的早期筛查具有重要意义。

单纯的 HR-HPV 感染并不足以导致宫颈上皮细胞发生恶变，表观遗传学发生改变能够对宫颈癌的发生、发展产生影响[9]。FAM19A4 是一种分泌蛋白，在正常组织中呈低水平表达，在单核细胞及巨噬细胞中呈高水平表达，能够对巨噬细胞的吞噬及迁移起到促进作用，对炎症及应激反应起到调控作用[10]。有研究显示，宫颈癌组织中 FAM19A4 甲基化的检出率明显高于正常组织[11]。多项研究证实，FAM19A4 甲基化在宫颈癌的发生、发展中具有重要作用[12-13]。本研究通过检测 HR-HPV 阳性患者宫颈脱落细胞标本中的 FAM19A4 甲基化，结果显示随着宫颈病变严重程度增加，FAM19A4 甲基化检出率升高。本研究还发现 HR-HPV 阳性宫颈癌患者中 HPV16/18 阳性者的 FAM19A4 基因甲基化检出率高于非 HPV16/18 阳性者($P<0.05$)，在癌前病变组该差异无统计学意义可能与样本量小有关。目前，关于 HPV 感染与宫颈癌基因异常甲基化之间的相关性还不够清楚；有研究显示，HR-HPV 的 E6/E7 基因能够促进 DNA 甲基转移酶 1 的表达，对 E6 基因进行敲除后 DNA 甲基转移酶 1 的表达也降低[14-15]；在转染了 HPV16/18 的细胞中，DNA 甲基转移酶 1 与 DNA 甲基转移酶 3b 均呈高水平的表达[16]。由此，本研究可以认为宫颈癌及其癌前病变组织中 FAM19A4 甲基化的改变，可能与 HPV16/18 诱导的表观遗传重新编程有关。

综上所述，FAM19A4 基因可能是宫颈细胞癌变的特异性分子标志物，该基因甲基化可能在宫颈癌的发生、发展中起着一定作用。宫颈脱落细胞 FAM19A4 基因甲基化检测可能作为宫颈癌及癌前病变的辅助筛查方法。然而，为了进一步确认其诊断价值，需要进行大样本量的前瞻性研究。

参考文献

[1] 刘萍. 中国大陆 13 年宫颈癌临床流行病学大数据评价[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2018，34(1)：41-45.

[2] FLEMING J C，WOO J，MOUTASIM K，et al. HPV，tumour metabolism and novel target (下转第 2158 页)

异性不足，体现了流式细胞术相对于免疫组化方法在临床应用中的一大优势。

本研究资料显示了在胃癌变过程中，细胞凋亡率、Bcl-2、Caspase-3 及 Apo2.7 的量变关系，通过分析其变化趋势可对胃癌的早期诊断及病程监测提供参考，亦说明了细胞凋亡调控在胃黏膜细胞异常增殖及癌变过程中所起的作用。监测细胞凋亡率以及 Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 在胃黏膜组织中的定量表达情况，可推断其疾病进展情况。

参考文献

[1] 常敏，张久聪，周琴，等. 胃癌流行病学研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2017，26(9)：966-969.

[2] 陈伟霞，牛垚飞，王同明，等. 中药诱导胃癌细胞凋亡的研究进展[J]. 中华中医药学刊，2020，38(2)：57-61.

[3] CHEN H Y, ZHENG Y M, LIU M H. Expression of gab2 gene in gastric cancer and its effect on proliferation, apoptosis, migration and ex-pression of AKT, p-AKT, Bax and Bcl-2 in gastric cancer cells[J]. Cancer Prog, 2017, 15(3): 262-266.

[4] WANG Y, YIN B, LI D, et al. GSDME GINiates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 1418-1425.

[5] 梁凯，曹秉振. 线粒体调控的细胞凋亡研究进展[J]. 生物医学工程与临床，2014，18(5)：501-505.

[6] 李敏，林俊. 细胞凋亡途径及其机制[J]. 国际妇产科学杂志，2014，41(2)：103-107.

[7] 慢性胃炎及上皮性肿瘤胃黏膜活检病理诊断共识[J]. 中华病理学杂志，2017，46(5)：289-293.

[8] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[9] 肖丽娜，周先华，张青华. Caspase-3 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系[J]. 检验医学与临床，2019，16(14)：2034-2036.

[10] LI Q, LI J, LIU Y, et al. Anagliptin prevents apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by modulating NOX-4 signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1623-1631.

[11] ZHANG C, AO Z, SETH A, et al. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells[J]. J Immunol, 1996, 157(9): 3980-3987.

[12] 刘爱群，葛莲英，罗元，等. 胃癌变过程中 Hp 感染与凋亡基因 Bcl-2 表达相关性研究[J]. 广东医学，2011，32(4)：444-446.

[13] 杨静，王明娟，程玉，等. 胃癌组织中 Caspase3、Caspase9 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志，2016，32(10)：1159-1161.

(收稿日期：2020-09-16　修回日期：2021-05-05)

(上接第 2154 页)

identification in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2019, 120(3): 356-367.

[3] BU Q, WANG S, MA J, et al. The clinical significance of FAM19A4 methylation in high-risk HPV-positive cervical samples for the detection of cervical (pre)cancer in Chinese women[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 1182-1185.

[4] NEERJA B, DAISUKE A, DAYA N S, et al. Cancer of the cervix uteri[J]. Int J Gynecol Obstet, 2018, 143 (Suppl 2): S22-S36.

[5] 茅娅男，尤志学. ASCCP 2019 共识指南子宫颈癌前病变管理解读[J]. 现代妇产科进展，2020，29(12)：936-941.

[6] 罗媛华. 基于 TCT、HPV 基因分型与 DNA 定量检测的宫颈癌及癌前病变筛查方法[J]. 解放军预防医学杂志，2020，38(3)：84-87.

[7] 武丽蕊，王兰朋，李红霞，等. 免疫细胞及肿瘤标志物与高危型 HPV 感染宫颈癌患者 HPV 水平的相关性及与预后的关系[J]. 癌症进展，2019，17(11)：1342-1346.

[8] 张慧琦，陈群. 宫颈癌前病变和宫颈癌高危型 HPV 分布特点[J]. 医学临床研究，2019，36(9)：1841-1843.

[9] 李桐，张灿，宋芳，等. 基因甲基化在宫颈癌中的研究进展[J]. 癌症进展，2019，17(20)：2375-2380.

[10] 王三锋，布俏雯，张亮，等. 宫颈脱落细胞中 FAM19A4 基因启动子甲基化的检测分析[J]. 中华医学杂志，2019，99(25)：1963-1967.

[11] 布俏雯. FAM19A4 基因启动子甲基化在宫颈癌及其癌前病变诊断中的作用研究[D]. 广州：广州医科大学，2018.

[12] 伍恒英，彭苏珺，布俏雯，等. 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[J]. 实用医学杂志，2019，35(5)：683-687.

[13] 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(9)：1541-1544.

[14] MANAWAPAT-KLOPFER A, WANG L, HAEDICKE-JARBOUI J, et al. HPV16 viral load and physical state measurement as a potential immediate triage strategy for HR-HPV-infected women: a study in 644 women with single HPV16 infections[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(4): 715-722.

[15] 张睿怡. 基因甲基化修饰对宫颈癌病变影响的研究进展[J]. 中国计划生育学杂志，2018，26(7)：639-642.

[16] MARTÍNEZ-PUENTE D H, PÉREZ-TRUJILLO J J, GUTIÉRREZ-PUENTE Y, et al. Targeting HPV-16 antigens to the endoplasmic reticulum induces an endoplasmic reticulum stress response[J]. Cell Stress Chaperones, 2019, 24(1): 149-158.

(收稿日期：2021-01-20　修回日期：2021-05-24)