DOI:10.16016/j.2097-0927.202302133

PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 联合检测提高宫颈癌非典型鳞状细胞的诊断效能

王元培,刘雨晨,温 静,孙 怡,程晓冉,任 芳 450052 郑州,郑州大学第一附属医院妇科

［摘要］ **目的** 比较配对盒家族基因 1(paired boxed gene 1,PAXl)甲基化与 p16/Ki-67 双染单独及联合检测在薄层液基细胞学检查(thinprep cytologic test, TCT)为意义不明的非典型鳞状细胞(atypical squamous cells of undetermined significance,ASC-US)及低级别鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion,LSIL)人群中的诊断效能。**方法** 选择郑州大学第一附属医院 2021-2022 年 247 例 TCT 结果为 ASC-US 和 LSIL 患者,以阴道镜下病理结果为金标准,敏感度、特异性、准确度与 ROC 曲线下面积(area under the subject curve,AUC)为评价指标,比较 PAX1 甲基化和 p16/Ki-67 双染单独及联合检测的检验效能。**结果** PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 双染的阳性率随着阴道镜下病理结果的严重程度而增加,PAX1 甲基化和 p16/Ki-67 联合检测在 TCT 为 ASC-US 人群中的敏感度为 91.25%、特异度为 97.72%、准确度为 95.51%,优于甲基化、p16/Ki-67 双染单独检测,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** PAX1 甲基化和 p16/Ki-67 双染联合检测可以提高 TCT 结果为 ASC-US 患者的诊断效能。

［关键词］ PAX1 甲基化;p16/Ki-67 双染;宫颈癌;薄层液基细胞学检查
［中图法分类号］ R446.8; R730.43; R737.33 ［文献标志码］ A

Combined detection of PAX1 methylation and p16/Ki-67 dual staining improves diagnostic performance for atypical squamous cells in cervical cancer

WANG Yuanpei, LIU Yuchen, WEN Jing, SUN Yi, CHENG Xiaoran, REN Fang Department of Gynecology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China

［**Abstract**］ **Objective** To compare paired boxed gene 1 (PAX1) methylation and p16/Ki-67 double staining alone and in combination in thinprep cytologic test (TCT) for distinguishing atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) population. **Methods** A total of 247 patients with TCT results of ASC-US and LSIL admitted in our hospital from January 2021 to December 2022 were enrolled in this study. Detection efficacy of PAX1 methylation and p16/Ki-67 double staining alone and in combination was evaluated with colposcopic pathologic results as the gold standard and the sensitivity, specificity, accuracy and area under the curve (AUC) as evaluation indexes. **Results** The positive rates of PAX1 methylation and p16/Ki-67 double staining were increased with the severity of pathological findings. Combined detection of PAX1 methylation and p16/Ki-67 assay had a sensitivity of 91.25%, specificity of 97.72% and accuracy of 95.51% in the women with TCT of ASC-US, and these values were statistically better than those of PAX1 methylation and p16/Ki-67 double staining alone ($P<0.01$). **Conclusion** The combination of PAX1 methylation and p16/Ki-67 double-staining assay can further improve the diagnostic efficacy in patients with ASC-US on TCT results.

［**Key words**］ methylation of PAX1; p16/Ki-67 double staining; cervical cancer; thinprep cytologic test

Supported by the Project of Science and Technology Development Plan for Outstanding Young Scholars of Henan Province (222300420091). Corresponding author: REN Fang, E-mail: renfang@foxmail.com

［基金项目］ 河南省科技发展计划优秀青年科学基金(222300420091)
［通信作者］ 任 芳,E-mail: renfang@foxmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

在全球范围内,宫颈癌(cervical cancer,CC)仍然是女性常见的癌症之一,每年约有 604 000 例宫颈癌新发病例,其中 342 000 例死亡[1]。薄层液基细胞学检查(thinprep cytologic test, TCT)由于细胞采样质量差、血液干扰、炎症、宫颈细胞数量不足等因素的影响,在检测癌前病变的灵敏度和阳性预测值方面有所不足[2-3]。非典型鳞状细胞(atypical squamous cells of undetermined significance,ASC-US)及低级别鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion,LSIL)占细胞学异常的大部分。ASC-US 镜下特征表现为:细胞鳞状分化、胞核面积为正常中层鳞状细胞核的 2.5~3 倍、核轻度深染。LSIL 的镜下特征表现为:典型挖空细胞和非挖空细胞、胞核面积较正常中层鳞状细胞核大 3 倍以上、核质比增加、细胞核异常。目前病理医师主要依据细胞核面积与正常中层鳞状细胞核的比值和细胞核异常的程度来鉴别 ASC-US 和 LSIL,但是由于细胞核形态不规则、核轮廓染色模糊等原因导致 ASC-US 和 LSIL 鉴别困难[4]。ASC-US 和 LSIL 人群中 TCT 结果假阳性率和假阴性率极高,易造成漏诊及过度检查,给患者带来心理负担及经济压力[5]。目前鉴别 ASC-US 及 LSIL 最常见方法为人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)检测,但有研究显示细胞学诊断为 LSIL 的患者中 HPV 感染率可达 77%[6]。因此,LSIL 不适合仅用 HPV 检测进行分流,寻找检验效能更高的方法对 ASC-US 及 LSIL 患者进行分流,降低 ASC-US 及 LSIL 患者的阴道镜转诊率十分重要。本实验旨在比较 PAXl 甲基化与 p16/Ki-67 双染单独及联合检测在 ASC-US 及 LSIL 人群中,组织病理结果检出高级别鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion,HSIL)及子宫颈癌的检验效能,以期改变 ASC-US 及 LSIL 患者的分流困难这一现状。

1 资料与方法

1.1 研究人群

选取 2021-2022 年至郑州大学第一附属医院妇科就诊的 247 例 TCT 检查结果为 ASC-US 或 LSIL 患者,年龄为(40.1±0.5)岁。纳入标准:①月经间期出血或阴道排液者;②细胞学检查 TCT 为 ASC-US 及 LSIL 的患者;③同时进行 PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 双染检测、阴道镜下病理组织活检的患者。排除标准:①人乳头瘤病毒感染已进行手术治疗者;②恶性肿瘤病史者;③妊娠或哺乳期患者;④合并免疫系统疾病者。本研究已通过郑州大学第一附属医院伦理委员会批准(2023-KY-0351-002)。

1.2 宫颈 TCT 检查

由专业医务人员对患者进行取材,取材前 7 d 未接受过阴道灌洗及阴道用药,避免经期取材,48 h 内避免性交,标本使用超柏氏薄层细胞检测系统进行处理和分析,并由病理科专业医师进行结果判定。

1.3 p16/Ki-67 双染检查

采集宫颈脱落细胞标本制片,使用 p16/Ki-67 免疫细胞双染试剂盒(瑞士罗氏公司)对采集的细胞标本进行 p16/Ki-67 双染检查,操作人员严格依照双染试剂盒使用说明书操作,诊断时采用盲法阅片,当视野内≥1 个宫颈上皮细胞显示细胞质为红色且细胞核为褐色时,诊断为 p16/Ki-67 双染阳性。

1.4 PAX1 甲基化检测

采集标本后,按说明书使用细胞和核酸提取试剂盒(湖南宏雅基因技术有限公司)提取所采集标本中 DNA,并进行甲基化检测,计算 ΔCT 值(样本 PAX1Cp 值-内参 Cp 值),ΔCT≤11 诊断为甲基化阳性;ΔCT>11 诊断为阴性。

1.5 阴道镜下病理组织活检

由 2 名经验丰富的阴道镜医师完成阴道镜检查,在阴道镜引导下取宫颈转化区内可疑病变部位,行病理学检查,由专业的病理科医务人员判定,并审核结果。判定结果:正常、宫颈炎、LSIL、HSIL 及子宫颈癌。

1.6 结果判定

以病理结果为金标准,当病理结果为正常、宫颈炎、LSIL 时,判定为阴性,病理结果为 HSIL 和子宫颈癌时判定为阳性。

联合检测结果判定:PAX1 甲基化和 p16/Ki-67 双染结果均为阳性时判定为阳性,均为阴性时判定为阴性。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 26.0 对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料用(%)表示、组内比较采用 χ^2 检验,用 ROC 曲线比较 3 种方法的诊断效能。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 双染检测的阳性率分析

247 例患者根据阴道镜下病理结果分为 4 组,其中慢性炎组 77 例,LSIL 组 38 例,HSIL 组 102 例,子宫颈癌组 30 例。除慢性炎组与 LSIL 组、HSIL 组与子宫颈癌组 PAX1 甲基化阳性率差异无统计学意义外,其余组间比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。除 HSIL 组和子宫颈癌组 p16/Ki-67 双染检测阳性率无显著差异外,其余组间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

2.2 PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 双染单独及联合检测在 ASC-US 和 LSIL 人群中分流作用比较

结果显示,PAX1 甲基化的特异度、准确度、AUC 优于 p16/Ki-67 双染,差异有统计学意义($P<0.05$)。联合检测敏感度、特异度、准确度、AUC(95.45%、93.91%、94.74%、0.94)与 PAX1 甲基化及 p16/Ki-67 双染单独检测相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2、图 1A。

表 1 PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 在不同病理结果中的阳性率[例(%)]

病理结果	n	PAX1 甲基化阳性率	p16/Ki-67 双染阳性率
慢性炎	77	9(11.68)	15(19.48)
LSIL	38	8(21.05)	12(31.58)
HSIL	102	86(84.31)	80(78.43)
子宫颈癌	30	29(96.66)	29(96.66)
P 值		<0.01	<0.01

表 2 PAX1 甲基化、p16/Ki-67 双染、二者联合检测在 TCT 为 ASC-US 和 LSIL 人群诊断指标对比

检测方法	敏感度/%	特异度/%	准确度/%	AUC	约登指数
PAX1 甲基化	86.36	85.22	85.83	0.86	0.71
p16/Ki-67 双染	81.82	76.52[a]	79.35[b]	0.79[a]	0.58
联合检测	95.45[ac]	93.91[bc]	94.74[bc]	0.94[bc]	0.88

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 PAX1 甲基化比较;c:$P<0.01$,与 p16/Ki-67 双染比较

2.3 PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 双染单独及联合检测检验效能的分层研究

依据 TCT 结果将研究对象分为 2 组,比较 PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 双染检测在 TCT 结果分别为 ASC-US、LSIL 时的诊断效能。TCT 为 ASC-US 的人群中,PAX1 甲基化检测的特异度、准确度、AUC 均优于 p16/Ki-67 双染检测,差异有统计学意义($P<0.05$),2 种方法联合检测敏感度、特异度、准确度为 91.25%、97.72%、95.51%,优于 2 种方法的单独检测,差异有统计学意义($P<0.01$)。在 TCT 结果为 LSIL 人群中,2 种方法联合检测与 PAX1 甲基化单独检测相比,AUC 差异有统计学意义($Z=0.011$),敏感度、特异度、准确度差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3,图 1B、C。

表 3 PAX1 甲基化、p16/Ki-67 双染及二者联合检测分层研究诊断指标对比(%)

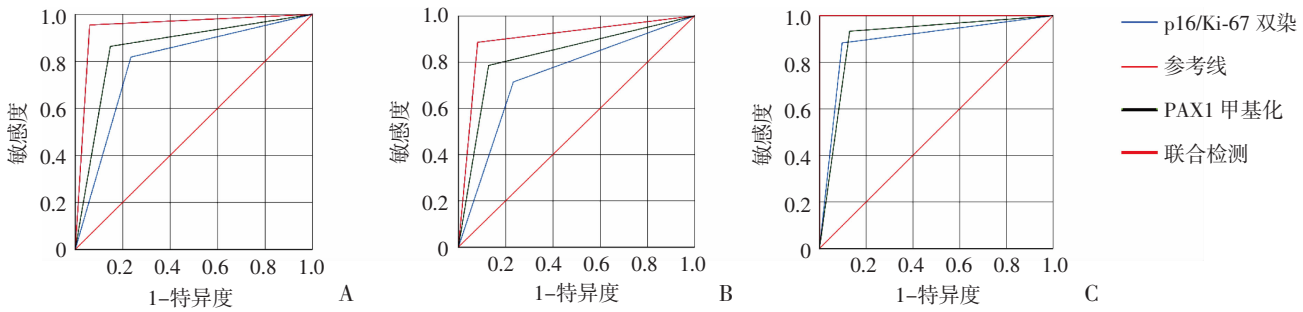
检测方法	敏感度/%	特异度/%	准确度/%	AUC	约登指数
ASC-US					
PAX1 甲基化	80.00	84.09	85.89	0.83	0.64
p16/Ki-67 双染	75.00[a]	78.40[b]	76.92[b]	0.74[a]	0.53
联合检测	91.25[bc]	97.72[bc]	95.51[bc]	0.90[bc]	0.88
LSIL					
PAX1 甲基化	90.00	87.50	88.88	0.88	0.78
p16/Ki-67 双染	86.66	83.33	81.48	0.81	0.62
联合检测	96.66	95.83	96.29	1.00[ac]	0.91

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 PAX1 甲基化比较;c:$P<0.01$,与 p16/Ki-67 双染比较

3 讨论

资料显示,许多患有宫颈癌的女性都有一次或多次宫颈细胞学报告假阴性的病史[7]。宫颈癌筛查的目标是预防发病率和死亡率,防止先兆病变及过度治疗[8]。因此,需要敏感度、特异度、准确度较高的方法对 ASC-US 和 LSIL 患者进行分流,减轻患者的焦虑,减少非必要的病理组织检查。

p16/Ki-67 双染可用于宫颈癌的筛查,p16 的过度表达是由 E7 癌蛋白活性增加引起的,Ki-67 是肿瘤增殖的标志,当 2 个标记物在同一细胞内表达时,p16/Ki-67 双染检测阳性,提示患者在 HPV 转化性感染后,



A:在 TCT 为 ASC-US 和 LSIL 人群诊断 HSIL+ROC 曲线;B:在 TCT 为 ASC-US 人群诊断 HSIL+ROC 曲线;C:在 TCT 为 LSIL 人群诊断 HSIL+ROC 曲线

图 1 PAX1 甲基化和 p16/Ki-67 双染单独及联合检测诊断 HSIL+ROC 曲线

抑癌基因失活,细胞周期失调,可以辅助诊断宫颈癌前病变[9-10]。本研究发现 p16/Ki-67 双染检测的阳性率均随宫颈病变的严重程度而升高,并且在 ASC-US 和 LSIL 人群中具有良好的敏感性(81.82%)、特异性(76.52%)、准确性(79.35%)和 AUC(0.79)。宫颈癌的进展依赖于多种肿瘤抑制基因,PAX1 基因位于染色体 20p11 上,通过与 SETIB 和 WDR5 形成复合体激活磷酸酶抑制致癌的 MAPK 和 SRC 通路,从而抑制癌细胞的生长[11-12]。与正常宫颈组织相比,宫颈癌组织中 PAX1 基因甲基化率高达 94.5%,其甲基化水平与肿瘤分级呈正相关。以往研究发现 PAX1 甲基化检测 HSIL 的敏感性和特异性分别为 86%和 85%[13],本研究发现 PAX1 甲基化检测在 TCT 为 ASC-US 及 LSIL 人群中的敏感度为 86.36%,特异度为 85.22%,准确度为 85.83%,与 HSIL 中的检测结果相符。因此,在 ASC-US 和 LSIL 的人群中,PAX1 甲基化检测效能(特异度、准确度、AUC)优于 p16/Ki-67 双染检测。

据报道,TCT 检查假阳性率和假阴性率发生最高的是 ASC-US 患者[14],若这些人群直接转诊阴道镜,会造成阴道镜资源的浪费、增加患者的经济负担,而盲目纳入随访可能导致 HSIL 的漏诊。目前对于 ASC-US 患者的分流,最常见的方法为 HPV 检测,其特异性为 48%,准确性为 63.15%[15]。因此,HPV 检测联合 TCT 检测在 ASC-US 人群中的分流作用不佳,尚无敏感性和特异性兼具的联合检测方法。KISSER 等[16]研究发现单独使用 p16/Ki-67 双染检测在 ASC-US 人群中分流出 HSIL 的灵敏度、特异度分别为 64%~92%、53%~81%。本研究结果显示,p16/Ki-67 双染检测 ASC-US 人群中分流出 HSIL 及宫颈癌的特异度为 76.52%、准确度 79.35%、AUC 为 0.79,与上述研究基本一致。有研究表明 PAX1 甲基化与 HPVE6/E7mRNA 联合检测,诊断宫颈癌及癌前病变的敏感度为 80.30%、特异度为 88.18%[17]。目前尚未有研究统计 PAX1 甲基化与 p16/Ki-67 双染联合检测对于 ASC-US 人群的分流作用。本研究结果显示,PAX1 甲基化和 p16/Ki-67 联合检测在 ASC-US 人群中的敏感度为 91.25%、特异度为 97.72%、准确度为 95.51%,优于 PAX1 甲基化、p16/Ki-67 双染单独检测及 HPV、E6/E7mRNA 的分流作用,可用于 ASC-US 人群、细胞学与 HPV 联合筛查时 HPV 阳性人群的进一步分流。

对 LSIL 患者进一步分析,发现 PAX1 甲基化、p16/Ki-67 双染及联合检测的敏感度、特异度及准确度均达到 90%以上。2 种方法在 TCT 为 LSIL 人群中均具有良好的诊断效能,二者联合检测敏感度、特异度、准确度与单独检测相比差异无统计学意义。所以可根据当地的经济及医疗条件选择两者其一对 LSIL 患者进行分流,避免过度检查增加患者负担。

综上所述,PAX1 甲基化检测对 ASC-US 和 LSIL 患者有较好的分流作用。在 TCT 为 ASC-US 人群中,使用 PAX1 甲基化检测和 p16/Ki-67 联合检测分流,可进一步提高对 ASC-US 患者的诊断效能,具有临床意义及应用前景。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] SIEBERS A G, KLINKHAMER P J, VEDDER J E, *et al*. Causes and relevance of unsatisfactory and satisfactory but limited smears of liquid-based compared with conventional cervical cytology[J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(1): 76-83. DOI: 10.5858/arpa.2011-0113-OA.

[3] LORINCZ A T. Virtues and weaknesses of DNA methylation as a test for cervical cancer prevention[J]. Acta Cytol, 2016, 60(6): 501-512. DOI: 10.1159/000450595.

[4] BIGRAS G, WILSON J, RUSSELL L, *et al*. Interobserver concordance in the assessment of features used for the diagnosis of cervical atypical squamous cells and squamous intraepithelial lesions (ASC-US, ASC-H, LSIL and HSIL)[J]. Cytopathology, 2013, 24(1): 44-51. DOI: 10.1111/j.1365-2303.2011.00930.x.

[5] REN C C, ZHU Y H, YANG L, *et al*. Prognostic and diagnostic validity of p16/Ki-67, HPV E6/E7 mRNA, and HPV DNA in women with ASCUS: a follow-up study[J]. Virol J, 2019, 16(1): 143. DOI: 10.1186/s12985-019-1251-4.

[6] 张波, 杨志敏, 康子婧, 等. 子宫颈脱落细胞块及 p16/Ki-67 双染在 ASC-US 和 LSIL 分流中的应用进展[J]. 诊断病理学杂志, 2023, 30(2): 194-197. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8096.2023.02.024
ZHANG B, YANG Z M, KANG Z J, *et al*. Application progress of cervical exfoliated cells and p16/Ki-67 double staining in ASC-US and LSIL shunt[J]. Chin J Diagn Pathol, 2023, 30(2): 194-197. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8096.2023.02.024

[7] SAWAYA G F, GRIMES D A. New technologies in cervical cytology screening: a word of caution[J]. Obstet Gynecol,

1999, 94(2): 307-310. DOI: 10.1016/S0029-7844(99)00289-6.

[8] VRDOLJAK-MOZETIČ D, KRAŠEVIĆ M, VERŠA OSTOJIĆ D, *et al*. HPV16 genotype, p16/Ki-67 dual staining and koilocytic morphology as potential predictors of the clinical outcome for cervical low-grade squamous intraepithelial lesions[J]. Cytopathology, 2015, 26(1): 10-18. DOI: 10.1111/cyt.12121.

[9] SUN H Z, SHEN K, CAO D Y. Progress in immunocytochemical staining for cervical cancer screening[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 1817-1827. DOI: 10.2147/cmar.s195349.

[10] LI M Z, YANG J, LIU K Y, *et al*. p16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis[J]. J Cancer, 2020, 11(6): 1457-1467. DOI: 10.7150/jca.35479.

[11] PAIXÃO-CÔRTES V R, SALZANO F M, BORTOLINI M C. Origins and evolvability of the PAX family[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 44: 64-74. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.08.014.

[12] LAI H C, LIN Y W, HUANG T H, *et al*. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer[J]. Int J Cancer, 2008, 123(1): 161-167. DOI: 10.1002/ijc.23519.

[13] LUAN T, HUA Q, LIU X, *et al*. PAX1 methylation as a potential biomarker to predict the progression of cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis of related studies[J]. Int J Gynec Cancer, 2017, 27(7): 1480-1488. DOI:10.1097/IGC.0000000000001011.

[14] GRENKO R T, ABENDROTH C S, FRAUENHOFFER E E, *et al*. Variance in the interpretation of cervical biopsy specimens obtained for atypical squamous cells of undetermined significance[J]. Am J Clin Pathol, 2000, 114(5): 735-740. DOI: 10.1309/K7C9-X5P0-001B-2HK5.

[15] 李碧军. P16/Ki-67 双染和高危 HPV E6/E7mRNA 检测在宫颈癌筛查中的应用[D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
LI B J. Application of P16/Ki-67 double staining and high-risk HPV E6/E7mRNA detection in cervical cancer screening[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2021.

[16] KISSER A, ZECHMEISTER-KOSS I. A systematic review of p16/Ki-67 immuno-testing for triage of low grade cervical cytology[J]. Int J Obstet Gynaecol, 2015, 122(1): 64-70. DOI:10.1111/1471-0528.13076.

[17] 张效东, 苏玥辉, 李盼盼, 等. 配对盒家族基因 1 甲基化与人乳头瘤病毒 E6/E7mRNA 检测在子宫颈病变患者诊断中的应用[J]. 实用妇产科杂志, 2021, 37(4): 315-318. DOI: 10.3969/j.issn.1671-878X.2018.01.027.
ZHANG X D, SU Y H, LI P P, *et al*. Application of methylation of matchbox family gene 1 and detection of human papillomavirus E6/E7mRNA in diagnosis of cervical lesions[J]. J Pract Obstet Gynecol, 2021, 37(4): 315-318. DOI: 10.3969/j.issn.1671-878X.2018.01.027.

(**收稿**:2023-02-27;**修回**:2023-06-07)

(编辑 张艺霖)