

## 荧光原位杂交技术检测 hTERC 基因预测宫颈上皮内瘤样病变 1 级自然转归的前瞻性研究\*

李 凌 江 维 曾四元 李隆玉

**摘要** 目的:探讨运用 FISH 方法检测 hTERC 基因,预测子宫颈上皮内瘤变 1 级(CIN1)自然转归的可能性。方法:以人群为基础选取江西省 2 499 例 30~49 岁农村妇女,对其进行了以病理为金标准的宫颈癌筛查。第一次病理学诊断有 74 例 CIN1 患者,入组作为观察对象,同时用宫颈细胞学样本进行 hr-HPV HC-2 和 hTERC 基因检测以了解基线情况。全部入组对象在知情同意的基础上进行为期 2 年的随访不行干预,第 12 个月 hr-HPV HC-2 随访,第 24 个月对所有对象进行 hr-HPV HC-2+阴道镜检查并取活检,以第 24 个月的随访病理结果评价 hTERC 基因和 hr-HPV 检测在预测宫颈上皮内瘤样病变 1 级自然转归中的作用。结果:74 例 CIN1 患者全部随访 24 个月,病变进展 7 例(9.5%),病变持续为 25 例(33.8%),病变消退 42 例(56.7%)。hTERC 基因表达阳性组和阴性组间病变进展率(包括持续和进展)的差别有显著性差异( $\chi^2=21.07, P<0.001$ ),hTERC 基因表达阳性病变进展和持续的相对危险性是 hTERC 基因表达阴性组的 3.24(1.96~5.37)倍。hr-HPV 持续阳性组病变进展率和阴性组(hr-HPV 转阴组+持续阴性组)的差异有统计学意义( $\chi^2=7.645, P=0.006$ )。hTERC 基因和初次检测 hr-HPV 两者均为阳性组病变进展率和两者均为阴性组的差异有统计学意义( $\chi^2=4.544, P=0.033$ )。结论:hTERC 基因异常扩增与宫颈上皮内瘤样病变 1 级进展和持续呈高度正相关。而 hr-HPV 需多次检测,持续阳性与病变进展和持续相关,FISH 方法检测 hTERC 基因异常扩增可能可单独预测 CIN1 自然转归。

**关键词** 荧光原位杂交 子宫颈上皮内瘤变 1 级 高危型人乳头瘤病毒 自然转归

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.01.007

### Prospective study of human telomerase ribonucleic acid component gene detection by fluorescence *in situ* hybridization in predicting natural prognosis of cervical intra-epithelial neoplasia 1

Ling LI, Wei JIANG, Siyuan ZENG, Longyu LI

Correspondence to: Longyu LI; E-mail: lilongyu1103@sina.com

Department of Oncology, Maternal and Child Health Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China

**Abstract Objective:** This study aims to evaluate the prognostic significance of human telomerase ribonucleic acid component (hTERC) gene overexpression in the natural prognosis of cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1). **Methods:** A total of 2499 women aged 30 to 49 years were screened in a population-based cervical cancer screening study from the rural sites of Jiangxi Province. Using pathology as the gold standard, 74 CIN1 patients first diagnosed by pathological examination were studied. They were observed by carrying the hybrid capture2 (hc2) and hTERC genetic testing to understand the baseline. All observed women accepted voluntary follow-up. In the first follow-up conducted 12 months after the screening, the subjects underwent high risk-human papillomavirus (hr-HPV) HC-2 testing. In the second follow-up carried out 24 months after the screening, the patients underwent hr-HPV HC-2, colposcopy, and pathological examinations. **Results:** A total of 74 CIN1 cases observed were followed-up for 24 months, with disease progression observed in 7 cases (9.5%), stable disease in 25 (33.8%), and regression of disease in 42 (56.7%). A significant difference in hTERC amplification was observed between the positive and negative groups ( $\chi^2=21.07, P<0.001$ ). The risk of CIN1 persistence and progression in the positive group was 3.24 (1.96 - 5.37) times higher than that in the negative group. A significant difference was found between hr-HPV persist positive and turn to negative or persist negative group ( $\chi^2=7.645, P=0.006$ ). A significant difference was also noted between the hTERC gene and the initial test of hr-HPV in both the positive and negative groups ( $\chi^2=4.544, P=0.033$ ). **Conclusion:** A strong association was observed between the prevalence of hTERC gene overexpression and CIN1 natural prognosis. The follow-up results indicated that hr-HPV need repeated testing. A significant difference was noted between hr-HPV persist positive and turn to negative/ persist negative group ( $\chi^2=7.645, P=0.006$ ). hTERC gene overexpression could prognoses CIN1 natural prognosis individually.

**Keywords:** fluorescence in situ hybridization, cervical intraepithelial neoplasia 1, high-risk human papillomavirus, natural prognosis

作者单位:江西省妇幼保健院肿瘤科(南昌市 330006)

\*本文课题受江西省卫生厅课题(编号:20094012)资助

通信作者:李隆玉 lilongyu1103@sina.com

浸润性子宫颈癌(invasive cervical cancer, ICC)仍然是我国主要的恶性肿瘤负担之一<sup>[1]</sup>。在子宫颈癌前期病变时期筛查出并阻断其发展是目前控制浸润性子宫颈癌发病的有效方法之一。在过去的几十年里,尽管在我国开展了妇女宫颈癌筛查工作,使子宫颈癌死亡率已有所下降<sup>[2]</sup>,但每年仍然有约12万新发病例。因此,为降低ICC的发病率和死亡率,筛查癌前病变及监测预后是关键。

宫颈上皮内瘤变1级(cervical intraepithelial neoplasia 1, CIN1)是癌前病变起始阶段,其发展过程有3种倾向:1)自然转归;2)持续不变;3)进展为更高一级的CIN乃至宫颈浸润癌。临床上对于CIN1的转归缺乏预测手段,CIN1的干预和处理目前存在较大的盲目性和随意性。荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)已在国内外广泛使用并发现hTERT基因的异常扩增随宫颈病变级别增高而增加<sup>[3-4]</sup>,由于FISH方法检测可能揭示CIN进展的基因学表达的特异性,用FISH方法检测hTERT基因预测CIN1转归可以使CIN1的处理更有针对性。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

以人群为基础选取江西省修水县大桥乡2499例30~49岁妇女,并对其进行了以病理为金标准的宫颈癌筛查。通过组织病理学检查第一次诊断为CIN1患者74例作为观察对象,平均年龄为38岁,同时进行hr-HPV HC-2和hTERT基因检测以了解基线情况。

### 1.2 随访程序及原则

对符合条件且自愿接受随访的妇女建立个人档案。第一次随访于筛查第12个月后进行,对全部对象进行hr-HPV HC-2检测。第二次随访于筛查第24个月,行hr-HPV HC-2、阴道镜+组织病理学检查。

### 1.3 方法

**1.3.1 hr-HPV HC-2检测** 采用第二代杂交捕获实验(hybrid capture 2, HC-2)对宫颈脱落细胞行hr-HPV半定量检测。该方法可一次性检测出13种已确认的致癌基因型高危hr-HPV。判读及评估标准:以每份样本的检测值相对发光单位(relative luminous unit, RLU)与专用试剂盒中hr-HPV阳性对照I临界值(cut off, CO)的比值(RLU/CO)表示宫颈组织细胞hr-HPV DNA的负荷量,如RLU/CO>1.0,则表示标本中hr-HPV DNA的含量>1.0 pg/mL,结果为阳性;反之结果为阴性。

**1.3.2 FISH方法和hTERT基因检测** 取HPV DNA检查保存液中剩余液体,按照FISH检测试剂盒提供

的操作说明,进行细胞滴片制备、预处理、变性、杂交,其中杂交探针由北京金菩嘉医疗科技有限公司提供。阅片并进行FISH信号判断:荧光显微镜下观察3号染色体着丝粒(CSP3)和hTERT基因双色探针杂交情况,前者显示为绿色荧光信号、后者为红色荧光信号。杂交信号结果记录为绿:红,正常细胞为2:2型,异常细胞包括2:3,2:4,3:3,4:4以及hTERT基因高拷贝型(N:5及以上)等。阳性结果判断标准:取20例正常细胞涂片,各计数200个以上细胞,记录其中的异常细胞数,将hTERT基因异常扩增的标准值定为100个细胞中异常细胞的均数+3×标准差×100%,大于此值的患者为hTERT基因异常扩增阳性,反之则为阴性。本研究前取20例正常细胞学涂片,计数100个细胞中异常细胞的均数为2.48个,标准差为1.12,阈值为5.84%,取整数,因此将≥6%者视为hTERT基因异常扩增阳性。

### 1.4 统计学分析

用SPSS 13软件进行统计学分析,采用 $\chi^2$ 检验, Fisher检验和方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CIN1转归情况

74例CIN1患者全部随访24个月,病变进展7例(9.5%),病变持续为25例(33.8%),病变消退42例(56.7%)。其中进展病例至随访截止5例发展为CIN2,2例发展为CIN3。

### 2.2 hTERT基因表达与CIN1转归的关系

74例CIN1病例中,hTERT基因检测阳性23例(31.1%),其中病变进展/持续患者19例(82.6%),病变消退4例(17.4%)。而在hTERT基因检测阴性的51例患者中,病变进展/持续13例(25.5%),病变消退38例(74.5%)。经卡方检验,CIN1患者hTERT基因表达阳性组和阴性组间病变进展率(包括持续和进展)的差异有统计学意义( $\chi^2=21.07, P<0.001$ ),hTERT基因表达阳性病变进展和持续的相对危险度(RR)是hTERT基因表达阴性组的3.24倍(表1)。

表1 hTERT基因表达与CIN1转归的关系

Table 1 Predictive validity of hTERT amplification in CIN1 prognosis

hTERT	Follow-up results of CIN1		RR	95%CI
	Progression/persistence	Regression		
Positive	19	4	3.24	1.96-5.37
Negative	13	38	0.23	0.09-0.58
Total	32	42	-	-

### 2.3 hr-HPV感染状况与CIN1转归的关系

74例CIN1患者中首次检测66例hr-HPV阳性,感染率为89.2%,随访24个月后29例(43.9%)病变进展/

维持,37例(56.1%)病变消退。经卡方检验得出首次检测hr-HPV感染阳性组与阴性组之间病变进展率(包括持续和进展)的差异无统计学意义( $P=0.976$ ,表2)。

表2 hr-HPV初始感染状况与CIN1转归的关系

Table 2 Predictive validity of initial hr-HPV testing in CIN1 prognosis

hr-HPV	Follow-up results of CIN1		RR	95%CI
	Progression/persistence	Regression		
Positive	29	37	1.17	0.46-2.99
Negative	3	5	0.9	0.50-1.60
Total	32	42	-	-

随访第12个月和第24个月,所有74例CIN1患者再次接受hr-HPV检测。其中持续感染者42例(63.6%),有24例(57.1%)病变进展/维持,18例(42.9%)病变消退。hr-HPV持续阳性组病变进展率(57.1%)明显高于hr-HPV转阴性组(20.8%)及hr-HPV持续阴性组(37.5%),hr-HPV持续阳性组病变进展率(包括持续和进展)与阴性组(hr-HPV转阴性组+持续阴性组)比较,差异有统计学意义( $\chi^2=7.645$ ,  $P=0.006$ ),hr-HPV持续感染的病变进展和持续的相对危险度(RR)是hr-HPV阴性组的2.29倍(表3)。

表3 hr-HPV感染变化状况与CIN1转归的关系

Table 3 Predictive validity of hr-HPV testing in CIN1 prognosis

hr-HPV	Follow-up results of CIN1		RR	95%CI
	Progression/persistence	Regression		
Persist Positive	24	18	2.29	1.19-4.40
Ture to Negative	5	19	0.57	0.38-0.86
Persist Negative	3	5	0.57	0.38-0.86
Total	32	42	-	-

#### 2.4 hTERT基因表达和hr-HPV联合预测CIN1转归

分析74例病例hTERT基因和初次检测hr-HPV感染的结果联合预测CIN1转归,两者均检测为阳性21例(28.4%),其中18例(85.7%)病变进展/维持,与两者均检测为阴性组比较,病变进展率(包括持续和进展)差异有统计学意义( $\chi^2=4.544$ ,  $P=0.033$ ),hTERT基因和hr-HPV同时阳性的病变进展和持续的相对危险度(RR)是两者同时阴性的2.29倍(表4)。

表4 hTERT基因表达联合hr-HPV检测与CIN1转归的关系

Table 4 Predictive validity of hTERT amplification combined with initial hr-HPV testing in CIN1 prognosis

hTERT hr-HPV	Follow-up results of CIN1		RR	95%CI
	Progression/persistence	Regression		
Positive Positive	18	3	2.29	0.92-5.69
Either Positive	11	34	0.65	0.23-1.83
Negative Negative	3	5	1	-

### 3 讨论

本研究74例CIN1病例中,hTERT基因的阳性检出率为31.1%,比其他国内外文献报道的检出率5%~25%更高<sup>[5-6]</sup>,这可能与本研究人群集中于江西宫颈癌高发地区,且该地区人群生活及饮食习惯相仿,而其中可能有些高危因素与hTERT基因的扩增表达密切相关。国内外很多学者都研究了FISH方法检测hTERT基因异常扩增在宫颈病变中的临床意义<sup>[7-8]</sup>,但将其应用于预测癌前病变进展的前瞻性研究尚未见报导。但本研究中对CIN1患者分别用hTERT基因单次检测和hr-HPV多次检测进行监测,无干预随访24个月后有56.1%的患者病变消退,43.9%的患者病变进展或维持,研究发现单次检测hTERT基因表达阳性组和阴性组间病变进展率有显著性差异,而首次检测hr-HPV感染阳性组与阴性组之间病变进展率差异无统计学意义。只有随访后的hr-HPV持续阳性组与最终阴性组比较病变进展率差异有统计学意义。因此,hr-HPV作为对宫颈病变进展的检测手段,需通过长期的随访与监测<sup>[9]</sup>,且面临失访、检测成本高、技术更新慢等问题。而本研究中23例hTERT基因检测阳性患者中病变进展/持续19例,占82.6%,且7例进展为CIN2/3的患者hTERT基因检测均为阳性。hTERT基因阳性预测CIN1转归的RR值为3.24(1.96~5.37),高于hr-HPV持续感染的RR值2.29(1.19~4.40),本结果可能提示了hTERT基因检测作为单独初检预测病变进展的指标要优于持续的HR-HPV的检测,其特异度值得肯定。用FISH方法检测hTERT基因异常扩增可能可单独预测CIN1自然转归。

有研究指出在宫颈病变中hTERT表达与hr-HPV整合情况的关系<sup>[10-11]</sup>,hTERT与hr-HPV联合作用影响宫颈病变的进展甚至发展为宫颈癌。在本研究中,hTERT与hr-HPV检测均为阳性的患者21例,其病变进展率为85.7%,与两者检测均为阴性组比较有差异。而相比单独检测hTERT阳性组的病变进展率82.6%,差异无统计学意义,因此,尽管hTERT与hr-HPV在宫颈癌进展中可能存在相互协同的关系,但不影响hTERT基因作为单独预测CIN转归的独立指标。

#### 参考文献

- 董志伟,乔友林,孔灵芝.中国癌症早诊早治的策略与实践[J].中国肿瘤,2008,17(4):257.
- 郎景和.子宫颈癌预防的现代策略[J].中国医学科学院学报,2007,29(5):575-578.
- Heselmeyer-Haddad K, Janz V, Castle PE, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene( TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer[J]. Am J Pathol, 2005, 166(4):1229-1238.

- 4 李静然,魏丽慧,刘 宁,等.FISH检测宫颈脱落细胞hTERT基因的表达及其临床意义[J].现代妇产科进展,2008,17(10):725-729.
- 5 Li YB, Wulan N, Liu ZH, et al. Amplification and clinical significance of hTERT gene in the cervical exfoliated cells from natural population in Shenzhen[J]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2009, 30(9):946-950.
- 6 Andersson S, Sowjanya P, Wangsa D, et al. Detection of genomic amplification of the human telomerase gene TERC, a potential marker for triage of women with HPV-positive, abnormal Pap smears[J]. Am J of Pathol, 2009, 175(5): 1831-1847.
- 7 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 of Surg Oncol, 2012, 10(8):168.
- 8 Jin Y, Li JP, He D, et al. Clinical significance of human telomerase RNA gene (hTERT) amplification in cervical squamous cell lesions detected by fluorescence in situ hybridization[J]. Asian Pacific J Cancer Prevention, 2011, 12(10):1167.
- 9 Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(7):663-672.
- 10 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.
- 11 Van DK, Burk RD. Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk[J]. Virology, 2012, 433(1):216-219.
- (2012-08-15 收稿)  
(2012-10-27 修回)  
(本文编辑:王展宏)

~~~~~  
(上接第20页)

- endothelial cell migration and tube formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 412(3):441-445.
- 7 Zheng Z, Chen H, Zhao H, et al. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(1):64-71.
- 8 Goydos JS. Vascular endothelial growth factor C mRNA expression correlates with stage of progression in patients with melanoma [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(16):5962-5967.
- 9 Modi S, Stopeck A, Linden H, et al. HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(15):5132-5139.
- 10 Pacey S, Gore M, Chao D, et al. A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma[J]. Invest New Drugs, 2012, 30(1):341-349.
- 11 Cheong JH, Hong SY, Zheng Y, et al. Eupatilin Inhibits Gastric Cancer Cell Growth by Blocking STAT3-Mediated VEGF Expression[J]. J Gastric Cancer, 2011, 11(1):16-22.
- (2012-08-15 收稿)  
(2012-10-17 修回)  
(本文编辑:贾树明)