

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2017.01.015

医学信号处理与医学仪器

基于数学模型的高危 HPV E6/E7 mRNA 定量分析在宫颈病变筛查中的作用

徐瑛,高志斌,黄丽丽,熊雅波,赵莺
余姚市人民医院病理科,浙江 余姚 315400

【摘要】目的:研究高危人乳头瘤病毒(HPV)E6/E7 mRNA 定量分析在宫颈病变筛查中的作用。**方法:**采用原位杂交技术对440例不同宫颈病变[炎症、低级别上皮内瘤变(CIN)、高级别 CIN、浸润性鳞癌]患者行高危 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数进行定量检测,建立数学模型对检测结果进行分析。**结果:**4组之间 HPV E6/E7 mRNA 阳性率不全相等,具有统计学差异($P<0.0050$);炎症组与其他3组宫颈病变之间高危 HPV E6/E7 mRNA 阳性率均有统计学差异($P<0.0083$)。拷贝数大小与病变程度呈正相关,可知当 mRNA 小于500时,炎症的可能性比较高;500~10 000时,很可能是 CIN(包括低级别和高级别);大于10 000时,很可能是高级别 CIN 和癌症。**结论:**高危 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数大小与宫颈病变程度正相关,其定量检测可作为宫颈病变联合筛查的一种有效补充工具。

【关键词】人乳头瘤病毒;宫颈病变;拷贝数;原位杂交技术;数学模型

【中图分类号】R365

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2017)01-0076-04

Application of mathematic model-based quantitative analysis of high-risk human papilloma virus E6/E7 mRNA in cervical lesion screening

XU Ying, GAO Zhibin, HUANG Lili, XIONG Yabo, ZHAO Ying
Department of Pathology, Yuyao People's Hospital, Yuyao 315400, China

Abstract: Objective To study the value of quantitative analysis of high-risk human papilloma virus (HPV) E6/E7 mRNA in cervical lesion screening. **Methods** The copies of high-risk HPV E6/E7 mRNA were quantitatively detected using *in-situ* hybridization technique in 440 patients with different cervical lesions, including inflammatory lesions, low-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN), high-grade CIN, squamous-cell carcinoma. A mathematic model was used to analyze the results of the tests. **Results** The positivity rates of high-risk HPV E6/E7 mRNA differed significantly among the 4 groups ($P<0.005$). The positivity rates of high-risk HPV E6/E7 mRNA showed significant differences between the inflammatory lesions and the other 3 lesions ($P<0.008$). The copies of high-risk HPV E6/E7 mRNA were positively correlated with the severity of the lesions, and a mRNA copy number less than 500 suggested a high probability of inflammatory lesions, whereas a copy number of 500-10 000 indicated a likely diagnosis of CIN (including low- and high-grade ones); a mRNA copy number exceeding 10 000 may support the diagnosis of high-grade CIN or cancer. **Conclusion** The copy number of high-risk HPV E6/E7 mRNA is positively correlated with the pathological grade of the cervical lesion. Quantitative detection of high-risk HPV E6/E7 mRNA can serve as a complementary examination for cervical lesion screening.

Keywords: human papilloma virus; cervical lesion; copy number; *in-situ* hybridization technique; mathematic model

前言

自从上世纪70、80年代开始,德国病毒学家 Hau-

sen 提出生殖道人乳头瘤病毒(HPV)感染与宫颈癌的相关性后,人们对 HPV 进行了几十年的深入研究,现已证实 HPV(尤其是高危 HPV)的持续感染与宫颈癌前病变[如上皮内瘤变(CIN)]、宫颈浸润性鳞状细胞癌密切相关^[1-3]。这使宫颈癌成为一种可预防、可治愈的疾病。研究者对高危 HPV 的致病机制进行研究,认为其致癌性位于 E6/E7 基因^[4-6]。本研究采用原

【收稿日期】2016-09-15

【基金项目】余姚市级科技计划项目(2014Y06)

【作者简介】徐瑛,硕士,主治医师,研究方向:宫颈疾病,E-mail: wind1108@sina.com

位杂交技术,对本标本进行高危 HPV E6/E7 mRNA 定量检测,进而研究高危 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数大小与宫颈病变有无相关性。并利用数学建模计算不同宫颈病变在不同拷贝数区间发生的概率,从而探索能够提示宫颈病变等级的高危 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数参考值区间。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2013 年 1 月~2014 年 12 月余姚市人民医院就诊的宫颈病变患者 440 例,年龄 24~85 岁。均经活检病理证实,其中炎症 305 例;低级别 CIN(CIN II 级以下,不包括 CIN II 级)52 例,高级别 CIN(包括 CIN II 级及以上)65 例;浸润性鳞状细胞癌 18 例。所有病例均无宫颈锥切病史。

1.2 方法

标本取样按常规进行。高危 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数检测采用宫颈稳态检测试剂盒[科蒂亚(新乡)生物技术有限公司],被检测的高危 HPV 亚型有 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68。运用捕获杂交信号放大原理直接捕获待测物质放大被检目标,将患者 TCT 标本中宫颈细胞裂解后,杂交捕获待测物,经 3 步信号放大,冷光仪检测,最终获得拷贝数。拷贝数>0 为阳性。

1.3 相关性研究和发生概率

将相关性研究和不同宫颈病变在不同拷贝数区间的发生概率转化成数学模型。具体方法如下:根据拷贝数,将样本分为 5 组,假设 mRNA 的拷贝数为 n ,则第 1 组为 $n=0$,第 2 组为 $0<n\leq 500$,第 3 组为 $500<n\leq 2\,000$,第 4 组为 $2\,000<n\leq 10\,000$,第 5 组为 $n>10\,000$,对应各组的值分别是 1、2、3、4、5。设 π_{i1} 为第 i 组得炎症的概率, π_{i2} 为第 i 组得低级别 CIN 的概率, π_{i3} 为第 i 组得高级别 CIN 的概率, π_{i4} 为第 i 组得癌症的概率。应用逻辑回归(广义线性模型)计算宫颈病变程度与高危 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数相关性,及不同宫颈病变在不同拷贝数区间的发生概率。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件处理,率的比较和各组 E6/E7 mRNA 阳性率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示 4 组阳性率不全相等。各组之间两两比较时, $P<0.008\,3$ 表示比较的两组之间阳性率有统计学差异。

2 结果

由表 1 可知 4 组之间 E6/E7 mRNA 阳性率不全相

等,具有统计学差异($\chi^2=166.527, P<0.005\,0$),可以看出 E6/E7 mRNA 阳性者均大于阴性者。进一步两两比较,炎症与低级别 CIN($\chi^2=77.720, P<0.008\,3$);炎症与高级别 CIN($\chi^2=113.940, P<0.008\,3$);炎症与浸润癌($P<0.008\,3$);低级别 CIN 与高级别 CIN($\chi^2=1.731, P>0.008\,3$);低级别 CIN 与癌症($P>0.008\,3$);高级别 CIN 与癌症($P>0.008\,3$)。

表 1 各组 E6/E7 mRNA 阳性率
Tab.1 Positivity rates of high-risk HPV E6/E7 mRNA in each group

Group	<i>n</i>	Positive (%)	Negative (%)
Inflammation	305	70 (22.95)	235 (77.05)
Low-grade CIN	52	44 (84.62)	8 (15.38)
High-grade CIN	65	60 (92.31)	5 (7.69)
Squamous-cell carcinoma	18	16 (88.89)	2 (11.11)

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

利用逻辑回归和最小二乘法,得到以下 6 个计算式:

$$\log \frac{\pi_{i2}}{\pi_{i1}} = -2.933\,9 + 0.622\,9x_i$$
$$\log \frac{\pi_{i3}}{\pi_{i1}} = -4.134\,1 + 1.114\,5x_i$$
$$\log \frac{\pi_{i3}}{\pi_{i2}} = -1.200\,2 + 0.491\,7x_i$$
$$\log \frac{\pi_{i4}}{\pi_{i1}} = -4.836\,0 + 0.944\,8x_i$$
$$\log \frac{\pi_{i4}}{\pi_{i2}} = -1.902\,1 + 0.321\,9x_i$$
$$\log \frac{\pi_{i4}}{\pi_{i3}} = -0.701\,9 - 0.169\,8x_i$$

(1)

除最后一个式子之外,其余式子中 x_i 之前的系数均为正,这意味着病变等级与拷贝数之间存在正相关。最后一个式子 x_i 之前的系数为负,但由于这个系数的绝对值较小,仍然可以表明随着 mRNA 数量的增加,我们依然很难区分高级别 CIN 与浸润性鳞癌。

为了研究不同宫颈病变在不同拷贝数区间的发生概率,我们对于给定的拷贝数,给出病变程度的概率公式。以 $\pi_{i1}(x)$ 为基准概率,我们可以得到以下结果:

$$\pi_{i1} = \frac{1}{1 + e^{\frac{-2.933\,9 + 0.622\,9x_i}{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}} + e^{\frac{-4.836\,0 + 0.944\,8x_i}{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}}}$$
$$\pi_{i2} = \frac{e^{\frac{-2.933\,9 + 0.622\,9x_i}{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}}}{1 + e^{\frac{-2.933\,9 + 0.622\,9x_i}{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}} + e^{\frac{-4.836\,0 + 0.944\,8x_i}{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}}}$$
$$\pi_{i3} = \frac{e^{\frac{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}{-4.836\,0 + 0.944\,8x_i}}}{1 + e^{\frac{-2.933\,9 + 0.622\,9x_i}{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}} + e^{\frac{-4.836\,0 + 0.944\,8x_i}{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i}}}$$

$$\pi_{i4} = \frac{e^{-4.836\,0 + 0.944\,8x_i}}{1 + e^{-2.933\,9 + 0.622\,9x_i} + e^{-4.134\,1 + 1.114\,5x_i} + e^{-4.836\,0 + 0.944\,8x_i}} \quad (2)$$

进一步计算后的概率见表2,可知当mRNA小于500

时,炎症的可能性比较高;500~10 000时,很可能是CIN(包括低级别和高级别);大于10 000时,很可能是高级别CIN和癌症。

表2 不同宫颈病变在不同拷贝数区间的发生概率
Tab.2 Association between the probability of different cervical lesions and high-risk HPV E6/E7 mRNA copy number

Cervical lesions	i=1 (n=0)	i=2 (0<n≤500)	i=3 (500<n≤2 000)	i=4 (2 000<n≤10 000)	i=5 (n>10 000)
Inflammation	0.855 90	0.721 40	0.517 50	0.296 50	0.136 90
Low-grade CIN	0.084 87	0.133 40	0.178 40	0.190 50	0.164 00
High-grade CIN	0.041 78	0.107 30	0.234 30	0.409 90	0.576 80
Squamous-cell carcinoma	0.017 48	0.037 89	0.069 92	0.103 10	0.122 40

3 讨论

宫颈癌严重影响女性健康,人们一直在寻找一种高特异性及敏感性,并易于操作的宫颈病变筛查方法。2016年1月美国妇产科医师学会(ACOG)发布了子宫颈癌筛查和预防指南^[7],指南指出对于30岁以上的女性推荐每5年行细胞学及HPV联合检测。目前宫颈病变筛查对HPV的检测主要是依靠HPV DNA检测。已有研究表明,大多数高危HPV感染是可逆的,对于高危HPV DNA阳性的女性在治疗前需评估,尤其是年轻及有生育要求的女性,因为她们的HPV感染可能是一过性的表现^[8-9]。高危HPV的致癌过程需要病毒DNA与宿主DNA的整合^[10-11]。而HPV DNA检测阳性只能显示病毒的存在,而不能分辨病毒的状态,即病毒是否整合到宿主DNA中。因此,HPV DNA检测方法虽然敏感性较高但特异性较低,容易增加患者过度检查或治疗的风险,并可能引起患者社会心理上的负担^[12]。有研究表明E6/E7 mRNA的存在可能是高级别CIN的一种特异标记^[13]。因此,为更好评估HPV的致病活性,发展出了针对HPV致病基因E6/E7转录产物mRNA的检测方法,阳性表示宫颈细胞有高危HPV感染及病毒癌基因E6/E7处于活动期,暗示宫颈细胞正处于病变转化活跃期,患者有一定宫颈病变风险或风险正在增加。

我们分析了高危HPV E6/E7 mRNA阳性率对宫颈病变的影响。在本研究中,E6/E7 mRNA拷贝数的阳性率在炎症组中为22.95%,而在低级别CIN、高级别CIN、浸润性癌中的阳性率分别为84.62%、92.31%、88.89%,4组阳性率不全相等($P<0.005$)。进一步两两比较后发现阳性率差异主要是在炎症组与

其余3组之间($P<0.008\,3$),而低级别CIN、高级别CIN和浸润性癌之间的阳性率无统计学差异($P>0.008\,3$)。

阳性率的比较只是一个定性结果,E6/E7 mRNA检测是一个定量的结果。目前国内外针对E6/E7 mRNA定量数据进行的研究多集中在均数或百分位数,很少有对数据进行更进一步的分析。我们通过数学建模对定量检测数据进行了更深入的分析,证实E6/E7 mRNA拷贝数大小与宫颈病变呈正相关,这一正相关结果在高级别CIN与浸润性宫颈癌之间不明显。这将提示临床医师对高拷贝数的患者引起重视,进行进一步检查,而对于低拷贝数的患者则可以根据其细胞学的相关检查而选择随访或进一步行宫颈活组织检查。此外,我们还计算了不同宫颈病变在不同拷贝数区间的发生概率,并以此寻找一个提示宫颈病变程度的mRNA拷贝数参考值区间。这充分利用了E6/E7检查结果的定量特点,为临床医师评估患者病情提供更直观的依据。

E6/E7 mRNA检测具有HPV DNA检测所没有的优点,已有研究表明,与HPV DNA检测相比,HPV E6/E7 mRNA检测在高级别病变中具有更高的特异性及敏感性^[14],并对鉴别短暂的宫颈不典型增生与潜在进展的宫颈病变提供帮助^[15]。因此可作为目前宫颈病变联合筛查的有效补充工具,我们的研究结果从一个新角度对宫颈病变筛查中的HPV检查提供了补充。我们通过计算mRNA数值预测各宫颈病变的发生概率,尝试划分不同宫颈病变的E6/E7 mRNA拷贝数参考值区间,将对临床准确评估患者病情起到重要作用,减少过度治疗的风险。若能加大样本

量,如获得整个地区人群的数据,很可能会获得一个具有普遍性的参考值区间,这对正确评估宫颈病变起到重要作用。

致谢:感谢中国科学院力学研究所王展研究员对本文数学建模提供的帮助。

【参考文献】

- [1] STANLEY M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 117(2): 5-10.
- [2] WALBOOMERS J M, JACOBS M V, MANOS M M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12-19.
- [3] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(5): 342-350.
- [4] PERSSON M, ELFSTRÖM K M, BRISMAR W S, et al. Triage of HR-HPV positive women with minor cytological abnormalities: a comparison of mRNA testing, HPV DNA testing, and repeat cytology using a 4-year follow-up of a population-based study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e90023.
- [5] CATTANI P, ZANNONI G F, RICCI C, et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12): 3895-3901.
- [6] PIETRZAK B, MAZANOWSKA N, EKIEL A M, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus cervical infection in female kidney graft recipients: an observational study[J]. *Virology*, 2012, 9(1): 1-5.
- [7] LAWSON H W. Practice bulletin No. 157: cervical cancer screening and prevention[J]. *Obstet Gynecol*, 2016, 127(1): e1-e20.
- [8] CATTANI P, SIDDU A, D'ONGHIA S, et al. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(7): 2136-2141.
- [9] LIVERANI C A, CIAVATTINI A, MONTI E, et al. High risk HPV DNA subtypes and E6/E7 mRNA expression in a cohort of colposcopy patients from Northern Italy with high-grade histologically verified cervical lesions[J]. *Am J Transl Res*, 2012, 4(4): 452-457.
- [10] QMICHOU Z, KHYATTI M, BERRAHO M, et al. Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13(1): 378.
- [11] CHAN P K, PICCONI M A, CHEUNG T H, et al. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2012, 49(4): 117-136.
- [12] KWAN T T, CHEUNG A N, LO S S, et al. Psychological burden of testing positive for high-risk human papillomavirus on women with atypical cervical cytology: a prospective study [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011, 90(5): 445-451.
- [13] GALAROWICZ B, JACH R, KIDZIERSKA J, et al. The role of mRNA E6/E7 HPV high oncogenic risk expression in colposcopy of cervical intraepithelial neoplasia (CIN)[J]. *Przegl Lek*, 2012, 69 (9): 651-657.
- [14] ZHAO X, CUI Y, JIANG S, et al. Comparative study of HR HPV E6/E7 mRNA and HR-HPV DNA in cervical cancer screening [J]. *Chin Med J*, 2014, 94(43): 3432-3435.
- [15] MÖCKEL J, QUAAS J, MEISEL H, et al. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing has higher specificity than liquid-based DNA testing in the evaluation of cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 2011, 33(6): 311-315.

(编辑:陈丽霞)