

HPV E6/E7 mRNA 和 TOP2A 对宫颈高级别鳞状 上皮内病变锥切术后复发的影响

吴晨鹏¹, 刘颖², 李雪梅¹, 刘宝利¹, 张志勇^{1*}, 李小华³

(1. 唐山市工人医院病理科, 河北 唐山 063000; 2. 唐山市工人医院检验科;
3. 唐山市妇幼保健院病理科, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 分析宫颈高级别鳞状上皮内病变(HSIL)冷刀锥切术后复发的影响因素。**方法** 收集唐山市工人医院和唐山市妇幼保健院 2015 年 1 月—2020 年 6 月 368 例宫颈 HSIL 患者的临床病理及随访资料,所有患者均行冷刀锥切术,术前均行人乳头瘤病毒(HPV)E6/E7 mRNA 检测并定期复查,应用免疫组织化学方法检测宫颈组织 II A 型拓扑异构酶(TOP2A)和 p16 表达情况,分析术后复发的影响因素。**结果** HPV E6/E7 mRNA 持续感染组复发率(25.4%)显著高于未持续感染组(6.3%),TOP2A 高表达组复发率(12.5%)显著高于 TOP2A 低表达组(2.9%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。年龄、象限受累范围、腺体受累、组织学分级、p16 表达与复发无关($P>0.05$)。Logistic 回归分析显示 HPV E6/E7 mRNA 持续感染和 TOP2A 高表达是术后复发的独立危险因素($OR=4.989, OR=3.883$;均 $P<0.05$)。不同型别 HPV 持续感染复发率的差异无统计学意义($P>0.05$)。HPV E6/E7 mRNA 持续感染与 TOP2A 的高表达呈正相关($P<0.05$)。**结论** HPV E6/E7 mRNA 持续感染与 TOP2A 高表达是宫颈 HSIL 冷刀锥切术后复发的高危因素,二者可能在复发机制上存在内在联系,检测 HPV E6/E7 mRNA 持续感染情况及 TOP2A 表达对宫颈 HSIL 的术后临床管理具有指导意义。

关键词: 宫颈高级别鳞状上皮内病变;冷刀锥切术;HPV E6/E7 mRNA;TOP2A;复发

中图分类号: R737.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3882(2023)06-0420-05

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2023.06.006

Effect of HPV E6/E7 mRNA and TOP2A on the recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion after conization

WU Chenpeng¹, LIU Ying², LI Xuemei¹, LIU Baoli¹, ZHANG Zhiyong^{1*}, LI Xiaohua³

(1. Department of Pathology, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Department of Laboratory, Tangshan Gongren Hospital;

3. Department of Pathology, Tangshan Maternal and Child Health Care Hospital, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: Objective To analyze the influencing factors of the recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) after cold knife conization. **Methods** A total of 368 patients with HSIL who were admitted to Tangshan Gongren Hospital and Tangshan Maternal and Child Health Care Hospital from January 2015 to June 2020 were enrolled and their clinicopathological and follow-up data were analyzed. All the patients underwent cold knife conization. The levels of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA were detected before operation and after operation regularly. The expression of type II A topoisomerase (TOP2A) and p16 was detected by immunohistochemistry. The risk factors of recurrence were analyzed. **Results** The recurrence rate of the HPV E6/E7 mRNA persistent infection group was significantly higher than that without persistent infection (25.4% vs 6.3%, $P<0.05$). The recurrence rate of the TOP2A high expression group was significantly higher than that with TOP2A low expression (12.5% vs 2.9%, $P<0.05$). Age, quadrant involvement, gland involvement, histological grade and p16 expression were not associated with recurrence ($P>0.05$). Logistic regression analysis showed that HPV E6/E7 mRNA persistent infection and high expression of TOP2A were the independent risk factors for postoperative recurrence ($OR=4.989, OR=3.883, P<0.05$). There was no differ-

基金项目: 河北省国际科技合作专项(18397725D);河北省医学科学研究课题计划(20201515)

* 通信作者, E-mail: 1073810505@qq.com

ence in the recurrence rate among different types of HPV persistent infection ($P>0.05$). HPV E6/E7 mRNA persistent infection was positively related to high expression of TOP2A ($P<0.05$). **Conclusions** HPV E6/E7 mRNA persistent infection and high expression of TOP2A are the high risk factors for recurrence of cervical HSIL after cold knife conization, and the two factors may have intrinsic relationship in the mechanism of recurrence. Detection of HPV E6/E7 mRNA persistent infection and expression of TOP2A can facilitate the postoperative management of cervical HSIL.

Key words: cervical high-grade squamous intraepithelial lesion; cold knife conization; HPV E6/E7 mRNA; TOP2A; recurrence

宫颈高级别鳞状上皮内病变 (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) 是一种与宫颈鳞癌发生密切相关的癌前病变,其发病率不断增高^[1],治疗 HSIL 可抑制宫颈癌的发生和发展,锥切手术治疗是主要治疗方法之一,近年来研究发现诸多临床病理因素可影响 HSIL 术后复发^[2]。

人乳头瘤病毒 (HPV) E6/E7 mRNA 检测是新一代 HPV 检测技术,其对宫颈 HSIL 复发的影响国内鲜有报道。II A 型拓扑异构酶 (type II A topoisomerase, TOP2A) 在调节 DNA 拓扑结构中发挥重要作用,其在高分裂细胞中累积^[3],有研究表明 TOP2A 的过度表达与宫颈病变密切相关^[4]。p16 是目前病理诊断宫颈 HSIL 的重要辅助检测指标^[5],但其对复发的影响目前存在争议。本研究分析宫颈 HSIL 患者 HPV E6/E7 mRNA 感染及 TOP2A、p16 的表达对复发的影响,为 HSIL 患者术后临床管理提供指导。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选取 2015 年 1 月—2020 年 6 月唐山市工人医院和唐山市妇幼保健院宫颈 HSIL 患者 368 例,所有患者均行宫颈冷刀锥切术,术后随访 2 年以上,以再次出现 HSIL 为研究终点,随访截止至 2022 年 7 月。纳入标准:①随访资料完整;②术后病理诊断结果为宫颈 HSIL;③术前进行 HPV E6/E7 mRNA 检测,术后每 6 个月定期复查 HPV 感染情况。排除标准:①切缘阳性;②伴有浸润性鳞状细胞癌;③有宫颈其他恶性肿瘤病史。本研究通过唐山市工人医院伦理委员会审查 (GRYY-LL-2019-27)。

1.2 实验方法 HPV E6/E7 mRNA 检测采用豪洛捷公司 (美国) 的 Aptima HPV 检测平台,检测 14 种类型 HPV,包括 16 型、18/45 型和其他 11 型。同种型别 HPV 感染超过 1 年为持续性感染。免疫组织化学检测应用罗氏公司 (美国) Benchmark ULTRA 免疫组织化学染色平台, TOP2A (JS5B4)、p16 一抗购自罗氏公司。

1.3 诊断及判读标准 宫颈 HSIL 复发诊断标准:宫颈锥切术后每 6 个月定期复查 HPV 感染情况,复查结果异常者行阴道镜检查并病理活检,再次病理诊断 HSIL 为疾病复发,病理诊断标准参照宫颈肿瘤 WHO 分类 (第 5 版),由 1 名初、中级病理医师初诊并由 1 名副高级或以上病理医师进行复诊。距切缘 <1 mm 处发现 HSIL 为切缘阳性。TOP2A 根据阳性表达范围分为 4 个等级:0 分 (0)、1 分 (1%~33%)、2 分 (34%~66%) 和 3 分 (67%~100%);根据细胞染色强度分为 3 个等级:1 分 (无着色)、2 分 (浅黄色)、3 分 (褐色和黄色);计算阳性范围和染色强度得分之和,将 TOP2A 的表达分为 2 组:低表达组 (0~2 分) 和高表达组 (3~6 分)^[6]。p16 判读方法:连续的细胞核或者细胞核、细胞质同时强阳性,基底层、副基底层阳性并向上延伸至全层 1/3 以上判读为阳性;仅细胞质阳性、弱阳性及局灶阳性均判读为阴性^[7]。

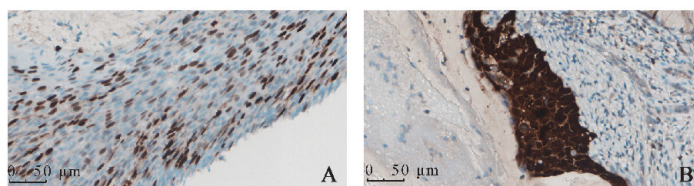
1.4 统计学处理 应用 SPSS 26.0 进行统计学分析,采用 χ^2 检验分析不同组别复发率的差异,采用 Logistic 回归分析复发的危险因素,应用 Spearman 秩相关分析 HPV 持续感染与 TOP2A 高表达的相关性。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 随访情况 368 例宫颈 HSIL 患者中有 36 例出现复发,复发率为 9.8%。HPV E6/E7 mRNA 持续感染 67 例,其中 16 型 20 例、18/45 型 4 例、其他 11 型 31 例、多重混合型 12 例。

2.2 宫颈锥切术后复发的危险因素分析 TOP2A 和 p16 在宫颈 HSIL 中的表达见图 1。单因素分析显示 HPV E6/E7 mRNA 持续感染组复发率 (25.4%) 显著高于未持续感染组 (6.3%), TOP2A 高表达组复发率 (12.5%) 显著高于 TOP2A 低表达组 (2.9%), 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。年龄、象限受累范围、腺体受累、组织学分级、p16 表达与复发无关 (均 $P>0.05$)。多因素分析显示 HPV E6/E7 mRNA 持续感染与 TOP2A 高表达是术后复

发的独立危险因素 (OR = 4.989, OR = 3.883; 均 $P < 0.05$)。见表 1、2。



A. TOP2A 高表达, 定位于细胞核; B. p16 阳性表达, 定位于细胞核及细胞质

图 1 TOP2A 和 p16 在宫颈 HSIL 中的表达 (IHC 染色, ×200)

表 1 单因素对 HSIL 宫颈锥切术后复发的影响 [例 (%)]

变量	未复发 (n=332)	复发 (n=36)	χ^2	P
年龄				
<45 岁	239(91.2)	23(8.8)	1.039	0.308
≥45 岁	93(87.7)	13(12.3)		
受累象限范围				
单象限	182(92.4)	15(7.6)	2.259	0.133
多象限	150(87.7)	21(12.3)		
腺体受累				
否	96(93.2)	7(6.8)	1.445	0.229
是	236(89.1)	29(10.9)		
组织学分级				
Ⅱ级	112(94.1)	7(5.9)	3.031	0.082
Ⅲ级	220(88.4)	29(11.6)		
HPV 持续感染				
否	282(93.7)	19(6.3)	22.560	<0.001
是	50(74.6)	17(25.4)		
TOP2A				
低	101(97.1)	3(2.9)	7.816	0.005
高	231(87.5)	33(12.5)		
p16				
-	64(91.4)	6(8.6)	0.144	0.705
+	268(89.9)	30(10.1)		

表 2 Logistic 回归分析 HSIL 宫颈锥切术后复发的高危因素

变量	β	SE	Wald	P	OR	95%CI
年龄	0.526	0.397	1.753	0.185	1.693	0.777~3.689
受累象限范围	0.322	0.392	0.676	0.411	1.380	0.640~2.975
腺体受累	0.480	0.541	0.785	0.376	1.616	0.559~4.668
组织学分级	0.618	0.530	1.362	0.243	1.855	0.657~5.237
HPV 持续感染	1.607	0.395	16.578	<0.001	4.989	2.301~10.814
TOP2A	1.357	0.632	4.604	0.032	3.883	1.125~13.407
p16	-0.077	0.499	0.024	0.878	0.926	0.348~2.461

2.3 不同型别 HPV 持续感染复发率的比较 16 型、18/45 型、其他 11 型、多重混合型 HPV 感染术

后复发率分别为 30.0%、25.0%、22.6%、25.0%，差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 不同型别 HPV 持续感染复发率的比较[例(%)]

分型	未复发	复发	χ^2	P
16 型	14(70.0)	6(30.0)	0.355	0.949
18/45 型	3(75.0)	1(25.0)		
其他 11 型	24(77.4)	7(22.6)		
多重混合型	9(75.0)	3(25.0)		

2.4 HPV E6/E7 mRNA 持续感染与 TOP2A 的相关性分析 宫颈 HSIL 患者 HPV E6/E7 mRNA 持续

感染与 TOP2A 高表达呈正相关($P<0.001$)。见表 4。

表 4 HPV 持续感染与 TOP2A 的相关性分析

组别	例数	HPV 持续感染(例)		r	P
		-	+		
TOP2A(低)	104	98	6	0.202	<0.001
TOP2A(高)	264	203	61		

3 讨论

宫颈癌发病率高居女性恶性肿瘤第 4 位,目前宫颈癌前病变的筛查与治疗依然是宫颈癌预防的首选方法^[8]。锥形切除是治疗宫颈癌前病变最常用的方法,诸多临床病理因素可影响其复发。切缘阳性可导致术后复发率高的观点已被广泛接受,本研究对象均为切缘阴性者,主要讨论切缘以外的因素对复发的影响。

宫颈 HSIL 的主要病因是 HPV 感染,手术无法彻底清除 HPV。大量研究结果显示 HPV 持续感染可导致宫颈 HSIL 术后复发率增高,但是不同 HPV 检测方法对于复发的预测价值不同,研究表明,与传统的 HPV DNA 检测相比,新一代的 HPV E6/E7 mRNA 检测在预测复发方面具有更高的特异性及诊断价值,可以作为 HSIL 复发的预测指标^[9]。本研究采用 Aptima HPV E6/E7 mRNA 检测方法进行 HPV 感染的监测,结果显示 HPV E6/E7 mRNA 持续感染者复发率显著增高,是复发的独立危险因素,因此对 HPV E6/E7 mRNA 持续感染者可加强随访并采取更积极的治疗策略。有关不同型别的 HPV 感染对复发影响的研究结果存在差异。Kamio 等^[10]研究发现宫颈 HSIL 患者锥切术后 HPV 阳性

与高复发率相关,特别是在 HPV16 和 HPV58 型阳性的患者中。Bogani 等^[11]研究结果表明整体人群中不同型别 HPV 感染的复发率无显著差异,仅在≤25 岁的人群中 HPV16/18 型的感染者复发率更高。本研究中不同型别 HPV 持续感染的复发率无显著差异,但是仅有 16 型、18/45 型及其他 11 种高危型三种分型,结果具有一定局限性。此外,年龄、象限受累范围、腺体受累、组织学分级等临床病理因素均与 HSIL 复发无关。

TOP2A 是 DNA 拓扑异构酶家族成员,其能调节 DNA 拓扑结构,解决 DNA 转录和复制过程中染色单体分离和染色体浓缩的问题,其异常表达常与活跃的细胞增殖密切相关^[3]。多项研究显示 TOP2A 与宫颈病变的发生发展密切相关。有报道在宫颈组织中 TOP2A 的过度表达与宫颈上皮内病变的分级有关, TOP2A 的表达随宫颈病变的严重程度而增加^[4]。在宫颈脱落细胞中 TOP2A 可作为标志物区分不同级别的宫颈癌前病变^[12]。此外,宫颈鳞癌中 TOP2A 高表达者预后更差, TOP2A 是宫颈鳞癌预后的独立危险因素^[13]。有关 TOP2A 对宫颈 HSIL 复发影响的研究国内外鲜见报道,本研究显示 TOP2A 高表达的宫颈 HSIL 患者术后复发率显著增高, TOP2A 高表达是复发的独立危险因素,

检测其表达情况有助于宫颈 HSIL 患者预后评估和个体化治疗。

宫颈癌前病变的组织病理诊断具有主观性,可能存在观察者间的差异,p16 可作为辅助检查,可提高病理诊断的准确性^[14],但是 p16 对宫颈 HSIL 复发的影响目前存在争议。Arredondo-Gálvez 等^[15]指出 p16 阳性与宫颈 HSIL 复发之间没有关联;而 Lukic 等^[7]的研究表明 p16 阳性的年轻 HSIL 患者手术切除后预后较差;Wang 等^[16]也认为 p16 是 HSIL 进展的独立危险因素。本研究显示 p16 表达与 HSIL 患者术后复发无关,其对复发的影响尚待进一步研究。

近来有研究显示 HPV 与 TOP2A 在宫颈病变的致病机制中具有内在联系。Yuan 等^[17]发现 TOP2A 是与 HPV 阳性的宫颈鳞癌关系最为密切的中枢基因之一。Tian 等^[18]研究表明 HPV E7 癌蛋白通过上调 TOP2A 的表达增强了宫颈癌细胞的增殖和迁移。本研究显示 HPV 持续感染与 TOP2A 高表达呈正相关,提示二者可能在宫颈 HSIL 复发过程中发挥协同作用。

综上所述,HPV 持续感染和 TOP2A 高表达是宫颈 HSIL 患者锥切术后复发的独立危险因素,二者可能在复发机制上具有内在联系,检测二者有助于确定宫颈 HSIL 患者的复发风险,从而量身定制宫颈锥切术后随访及治疗临床决策。

参考文献:

- [1] Carrero YN, Callejas DE, Mosquera JA. In situ immunopathological events in human cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: Review [J/OL]. *Transl Oncol*, 2021, 14(5): 101058.
- [2] Alder S, Megyesi D, Sundström K, et al. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia as a predictor of the risk of recurrent disease—a 16-year follow-up study [J/OL]. *Am J Obstet Gynecol*, 2020, 222(2): 172. e1-172172. e12.
- [3] Dong YY, Sun XY, Zhang K, et al. Type IIA topoisomerase (TOP2A) triggers epithelial-mesenchymal transition and facilitates HCC progression by regulating Snail expression [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12967-12979.
- [4] Zuberi Z, Mremi A, Chilongola JO, et al. Expression analysis of p16 and TOP2A protein biomarkers in cervical cancer lesions and their correlation with clinico-histopathological characteristics in a referral hospital, Tanzania [J/OL]. *PLoS One*, 2021, 16(10): e0259096.
- [5] Schmidt D. Squamous cell precancerous lesions of the cervix uteri [J]. *Pathologie*, 2019, 40(1): 7-12.
- [6] Cai HY, Zhu XH, Qian F, et al. High expression of TOP2A gene predicted poor prognosis of hepatocellular carcinoma after radical hepatectomy [J]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9(2): 983-992.
- [7] Lukic A, Rossi S, Frega A, et al. Prognostic role of immunohistochemical overexpression of the p16 protein in women under the age of 35 and diagnosed with HSIL (CIN₂) subjected to “cervix sparing” excision [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3): 1261-1273.
- [8] 周晖, 王东雁, 罗铭, 等. 《FIGO 2021 妇癌报告》: 子宫颈癌指南解读 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2022, 38(5): 538-544.
- [9] Carcea F, Vavoulidis E, Petousis S, et al. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA testing towards HPV-DNA testing and p16/Ki67 immunostaining as a biomarker of high-risk HPV recurrence in Greek women surgically treated for their cervical lesions [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2021, 47(10): 3607-3617.
- [10] Kamio M, Yanazume S, Togami S, et al. Association between positive human papillomavirus status after conization and disease recurrence in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 [J]. *J Obstet Gynecol India*, 2021, 71(1): 66-71.
- [11] Bogani G, Pinelli C, Chiappa V, et al. Age-specific predictors of cervical dysplasia recurrence after primary conization: Analysis of 3,212 women [J/OL]. *J Gynecol Oncol*, 2020, 31(5): e60.
- [12] Del Moral-Hernández O, Hernández-Sotelo D, Alarcón-Romero LDC, et al. TOP2A/MCM2, p16^{INK4a}, and cyclin E1 expression in liquid-based cytology: A biomarkers panel for progression risk of cervical premalignant lesions [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 39.
- [13] 梁建梅, 刘晓旭, 卢雪景, 等. TOP2A 在宫颈鳞癌中的表达及其与临床病理特征及预后的关系 [J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(6): 761-766.
- [14] Mandal R, Ghosh I, Banerjee D, et al. Correlation between p16/ki-67 expression and the grade of cervical intraepithelial neoplasias [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2020, 39(4): 384-390.
- [15] Arredondo-Gálvez CG, Acuña-González D, Cantú-de-León D, et al. Association of p16 and ki-67 with risk of recurrence in previously treated cervical high-grade squamous intraepithelial lesions [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2021, 86(3): 293-298.
- [16] Wang XL, Zhao YH, Zou XL, et al. Relationship of P16 and Ki67 in recurrence of HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(12): 3174-3180.
- [17] Yuan YY, Shi XQ, Li BJ, et al. Integrated analysis of key microRNAs/TFs/mRNAs/in HPV-positive cervical cancer based on microRNA sequencing and bioinformatics analysis [J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(6): 152952.
- [18] Tian SJ, Zhang L, Li Y, et al. Human papillomavirus E7 oncoprotein promotes proliferation and migration through the transcription factor E2F1 in cervical cancer cells [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21(13): 1689-1696.

收稿日期: 2022-11-07 修回日期: 2023-04-08

本文编辑: 李昕