

# 宫颈上皮内瘤变细胞中 Ki67 的表达及与 HPV 感染相关性研究\*

肖庆<sup>1</sup>, 黄震<sup>1</sup>, 迟秀文<sup>2</sup>, 孙俊生<sup>1</sup>, 宋丽君<sup>3</sup>, 蒲荣<sup>4△</sup> (1. 广东省深圳市龙岗中心医院 518116; 2. 广东医学院护理学院, 广东东莞 523808; 3. 广东医学院附属医院, 广东东莞; 4. 广东省东莞市石龙人民医院 523800)

**【摘要】目的** 研究 Ki67 在宫颈上皮内瘤变(CIN)细胞涂片中的表达情况及其与人乳头瘤病毒(HPV)感染的相关性,探讨 Ki67 作为宫颈病变筛查的一种新的有效指标的可行性。**方法** 采用免疫组织化学检测 Ki67 在 138 例不同程度宫颈病变细胞涂片中的表达,同时取 40 例宫颈炎患者作对照,并与病理学及 HPV 分型检测结果进行比较。**结果** Ki67 在宫颈炎、CIN I、CIN II ~ III 组中的阳性率分别为 7.5%(3/40)、60%(30/50)、87.5%(42/48),各组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。HPV 在宫颈炎、CIN I、CIN II ~ III 组中的阳性率分别为 20%(8/40)、66%(33/50)、91.7%(44/48),各组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Ki67 的表达与 HPV 感染在 CIN I 组、CIN II ~ III 组中呈正相关,相关系数在 CIN I 组、CIN II ~ III 组分别为 0.63、0.66( $P < 0.01$ )。**结论** HPV 的感染与宫颈鳞癌的发生密切相关,并与进展有关。检测 Ki-67 可作为筛查宫颈病变、判断预后的有效指标。

**【关键词】** 宫颈上皮内瘤变; Ki67; 人乳头瘤病毒

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.14.015 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)14-2014-02

**Study on correlation between Ki67 expression in cervical intraepithelial neoplasia cells with HPV infection\*** XIAO Qing<sup>1</sup>, HUANG Zhen<sup>1</sup>, CHI Xiu-wen<sup>2</sup>, SUN Jun-sheng<sup>1</sup>, Song Li-jun<sup>3</sup>, PU Rong<sup>4△</sup> (1. Longang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China; 2. Nursing Institute of Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China; 4. Shilong People's Hospital, Dongguan, Guangdong 523800, China)

**【Abstract】Objective** To study the expression level of Ki67 in cell smear of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and its relationship with human papilloma virus (HPV) infection, and to investigate the feasibility of Ki67 as a new effective indicator in screening of cervical lesion. **Methods** The expression of Ki67 was detected by immunocytochemical method in 138 cases of different grade cervical lesions, at the same time, 40 cases of cervicitis were chosen as control and the detection results were compared with the pathology and HPV typing detection results. **Results** The positive rate of Ki-67 in cell smear of cervicitis, CIN I and CIN II - III groups were 7.5%(3/40), 60%(30/50), 87.5%(42/48) respectively, the differences were statistically significant( $P < 0.01$ ). The positive rate of HPV in cervicitis, CIN I and CIN II - III groups were 20%(8/40), 66%(33/50) and 91.7%(44/48) respectively, the differences were statistically significant( $P < 0.01$ ). The expression of Ki67 in CIN I and CIN II - III groups was positively correlated with HPV infection. The correlation coefficients were 0.63 and 0.66 respectively( $P < 0.01$ ). **Conclusion**

HPV infection is closely related with the cervical squamous cell carcinoma occurrence and its progress. The detection of Ki67 could be taken as an effective indicator for screening of cervical lesion and judging prognosis.

**【Key words】** cervical intraepithelial neoplasia; Ki67; human papilloma virus

宫颈上皮内瘤变(CIN)是一组与宫颈癌密切相关的癌前病变的统称,分为 I、II、III 级,级别越高,发展为恶性肿瘤的概率就越大,因此 CIN 的早期诊断及分级对治疗及预后意义重大<sup>[1]</sup>。液基制片技术(TCT)是细胞学标本采集及玻片制备过程的重大改良,但由于取材和形态学观察等原因,在诊断中不可避免地出现误诊。人乳头瘤病毒(HPV)DNA 检测是从病因学角度进行宫颈病变的筛查,诊断方面仍存在着特异性低等问题。因此,寻找有助于细胞学准确诊断的有效指标具有重要意义。Ki67 是一种核增殖标志基因,可能与细胞周期蛋白密切相关,通常被作为肿瘤细胞的增殖标记<sup>[2]</sup>。本研究旨在探讨 Ki67 在宫颈上皮细胞恶变表达水平及与 HPV 感染相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2011 年 5 月至 2012 年 5 月深圳市龙岗

中心医院妇产科就诊患者的 138 例细胞标本,年龄 23~60 岁。所有患者均进行了薄层液基细胞学检测、HPV 分型检测及病理组织检查。根据组织病理学标准诊断进行分组,同一患者中若同时存在不同级别的病变,以最高级别作为该病例的最后病理诊断,其中 CIN I 组 50 例, CIN II ~ III 组 48 例,同时以 40 例宫颈炎作为对照组。免疫组织化学使用鼠抗人单克隆抗体 Ki67 及二抗、SP 系统工作液、DAB 染色液均购自福州迈新公司。HPV 分型检测试剂盒购自潮州凯普公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 收集细胞保存液中细胞**,离心法制片。选择满意的 TCT 制片,95%酒精固定 15 min,自来水冲洗后,进行微波法修复抗原。将切片置于柠檬酸抗原修复液中(PH=6.0),微波炉中加热沸腾后保温 10 min,3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中室温孵育 10 min

\* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(201203315)。

作者简介:肖庆,男,本科,主管检验师,主要从事临床检验研究。△ 通讯作者, E-mail:lj8433@163.com。

阻断内源性过氧化物酶的活性,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗,滴加牛血清,室温下孵育 10 min 后甩去,滴加第一抗体,4 ℃ 冰箱孵育过夜,PBS 液冲洗。先后滴加二抗和 D 液,室温各孵育 10 min。DAB 镜下显色,自来水终止反应,苏木素复染,脱水透明,中性树胶封片。

**1.2.2 HPV 分型检测方法** 用特制毛刷深入宫颈口内 2~3 cm,顺时针旋转 2~3 周,获足够宫颈脱落细胞,采用核酸分子快速导流杂交基因芯片技术检测 21 种 HPV 亚型。检测步骤包括:(1)样本 DNA 提取,采用分离法;(2)基因扩增:加入已提取 DNA 样本 1 μL,反应总体积 25 μL,设置阴、阳性对照组后进行基因扩增:95 ℃ 9 min 后进入循环 95 ℃ 20 s→55 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s 共 40 个循环 最后 72 ℃ 5 min;(3)杂交:将产物 95 ℃ 5 min 变性,冰浴 2 min 以上,使样本分子导流穿过固定有 DNA 探针的低密度基因芯片薄膜后进行快速杂交。显色后观察结果。薄膜上质控点 Biotin 和 IC 点显色,提示检测过程正常。根据芯片薄膜 HPV 亚型分布的相应着色点判断。

**1.2.3 免疫细胞化学染色的结果判定** 采取以下评判标准, Ki67 以细胞核呈黄色或黄褐色颗粒为阳性,根据阳性细胞所占百分比分为:(-)为 0%~<5%,(+)为 5%~<25%,(++)为 25%~50%,(+++)为大于 50%。

**1.2.4 统计学处理** 应用 SPSS11.0 统计软件,各组率的差异性进行  $\chi^2$  检验,各组相关性分析用 kappa 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 Ki67 在不同宫颈病变细胞中的表达** 40 例宫颈炎有 3 例 Ki67 阳性,均为弱阳性,阳性率为 7.5%(3/40);50 例 CIN I 患者有 30 例 Ki67 表达阳性,27 例弱阳性,3 例中度阳性,阳性率为 60%(30/50);CIN II~III 患者有 42 例 Ki67 表达阳性,10 例弱阳性,20 例中度阳性,12 例强阳性,阳性率为 87.5%(42/48)。炎症组与 CIN I 组比较,差异有统计学意义( $\chi^2=26.4, P<0.01$ ),CIN I 与 CIN II~III 组比较,差异有统计学意义( $\chi^2=9.5, P<0.01$ ),炎症组与 CIN II~III 组比较,差异有统计学意义( $\chi^2=55.9, P<0.01$ )。

**2.2 HPV 在不同宫颈病变中的阳性率** 40 例宫颈炎有 8 例 HPV 阳性,阳性率为 20%(8/40);50 例 CIN I 患者有 33 例 HPV 阳性,阳性率为 66%(33/50);CIN II~III 患者有 44 例 HPV 阳性,阳性率为 91.7%(44/48),炎症组与 CIN I 组比较,差异有统计学意义( $\chi^2=19.0, P<0.01$ );CIN I 与 CIN II~III 组比较,差异有统计学意义( $\chi^2=9.6, P<0.01$ );炎症组与 CIN II~III 组比较差异有统计学意义( $\chi^2=46.4, P<0.01$ )。

**2.3 不同宫颈病变中 Ki67 阳性表达与 HPV 感染情况的相关性** 85 例 HPV(+)标本中, Ki67 在炎症组、CIN I 组、CIN II~III 组中的阳性数分别为 1、26、40 例;53 例 HPV(-)标本中, Ki67 在炎症组、CIN I 组、CIN II~III 组中的阳性数分别为 2、4、2 例, Ki67 阳性表达与 HPV 感染在 CIN I 组、CIN II~III 组呈正相关, Ki67 的表达与 HPV 感染的 Kappa 相关系数炎症组( $r=0.36, P>0.01$ ), CIN I 组( $r=0.63, P<0.01$ ), CIN II~III 组( $r=0.66, P<0.01$ )。

**3 讨 论**

Ki67 抗原是标志细胞增殖的重要指标,与肿瘤的发生、发展及预后关系密切,其基因定位于人第 10 号染色体。Ki67 是一种增殖细胞相关的核抗原,其表达范围覆盖了除 G0 期以外的各增殖周期细胞,为目前检测肿瘤细胞增殖活性的最可靠指标之一<sup>[3]</sup>。Ki67 的表达局限在增生的基底部细胞中,因此在正常宫颈刮片中几乎查不出来,而在宫颈异常的组织活检中, Ki67 染色可见于黏膜上皮层表面发育异常的细胞核中,且与

发育异常的程度成比例。本研究显示, Ki67 在非肿瘤性宫颈鳞状上皮标本中限于基底及副基底层,在 CIN I 级中呈阳性表达可达中层,而 CIN II~III 级中则可达全层,本文 Ki67 在宫颈炎、CIN I、CIN II~III 组中细胞的阳性率比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。Ki67 从正常宫颈组织至 CIN 呈逐渐增高趋势,且随 CIN 级别增高,推测 Ki67 的表达与 CIN 进展有关。因此,本文提示 Ki67 可能是宫颈上皮细胞恶性转变过程中出现的生物标志物,能较可靠地反映正常和病变细胞的增殖活性,可作为 CIN 级别评判的一个有效指标,有可能成为预测预后的指标。这与 Sari 等<sup>[4]</sup>报道基本一致。因此 Ki67 可作为术前内分泌治疗及评价乳腺癌术后治疗和预后的可靠预测指标之一<sup>[5]</sup>。

HPV 与 CIN 和宫颈癌有密切关系, HPV 感染应视为与 CIN 相关的早期病变<sup>[6]</sup>。本文 HPV 在宫颈炎、CIN I、CIN II~III 组中的阳性率比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。从 CIN 到浸润性宫颈癌的演变过程中,高危 HPV 感染是宫颈癌的主要致癌因子之一。当宫颈上皮感染 HPV 后细胞增殖活性升高,抑制及破坏人体局部的免疫功能,从而促进细胞过度增殖最终癌变<sup>[7]</sup>。Ki67 的表达与 HPV 感染在 CIN I 组、CIN II~III 组中呈正相关,相关系数在 CIN I 组、CIN II~III 组分别为 0.63、0.66( $P<0.01$ )。 HPV 感染后改变了细胞周期调节基因的表达,促使细胞异常增殖,使 Ki67 呈现过度表达,可见在宫颈病变的发生、发展连续过程中伴有细胞增殖能力的明显增强<sup>[8]</sup>。

综上所述,推测 Ki67 在 HPV 二者表达上调可能与宫颈癌的发生、发展、浸润、转移过程相关,联合检测 Ki67 和 HPV 可作为判断宫颈癌生物学行为及预后的重要指标,有利于运用 Ki67 和 HPV 共同监测宫颈疾病进展情况,协助诊断 CIN,为及时治疗癌前病变提供广阔的发展前景。

**参考文献**

[1] 孙晓燕. 高级别宫颈上皮内瘤变的临床诊断治疗分析[J]. 中国实用医药, 2014, 9(11): 35-36.

[2] 董玉兰, 徐冉, 陈龙山, 等. 3 394 例女性患者宫颈人乳头瘤病毒基因分型及临床意义[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(4): 440-442.

[3] 常丽琴, 吴素慧, 李超, 等. Ki67、Survivin 在早期宫颈癌中的表达与预后相关性分析[J]. 中国医药科学, 2013, 3(7): 20-22.

[4] Sari AF, Safaei A, Pourjabali M, et al. Evaluation of Ki67, p16 and CK17 markers in differentiating cervical intraepithelial neoplasia and benign lesions[J]. Iran J Med Sci, 2013, 38(1): 15-21.

[5] Koc N, Sahin D, Ayas S. Reevaluation of negative cone biopsy results after a positive cervical biopsy finding[J]. J Low Genit Tract Dis, 2013, 17(2): 154-159.

[6] 王敏, 丁悦, 温展申. 宫颈上皮内瘤变临床特点及危险因素分析[J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(16): 3754-3755.

[7] 赵连爽, 陈静静, 云科, 等. 沈阳地区人乳头瘤病毒感染分布及宫颈病变的相关分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(17): 2280-2284.

[8] 徐本群, 马娟, 周琼, 等. P16 与 Ki67 的表达在子宫颈上皮内瘤变组织学诊断与分级中的临床意义[J]. 安徽医药, 2013, 17(9): 1540-1542.