

- CT 表现[J]. 放射学实践, 2015, 30(9): 909-912.
- [9] 罗益贤, 陆普选, 乐晓华, 等. 艾滋病相关淋巴瘤的影像学表现[J]. 罕见疾病杂志, 2015, 22(2): 58-61.
- [10] WINSTONE T A, MAN S F, HULL M, et al. Epidemic of lung cancer in patients with HIV infection[J]. Chest, 2013, 143(2): 305-314.
- [11] SILVERBERG M J, LAU B, ACHENBACH C J, et al. Cumulative incidence of cancer among persons with HIV in North America a cohort study[J]. Ann Intern Med, 2015, 163(7): 507.
- [12] 程增辉, 施裕新, 袁敏, 等. 艾滋病合并肺癌的 CT 表现[J]. 放射学实践, 2015, 30(9): 901-904.
- [13] ALLEN C M, AL-JAHDALI H H, IRION K L, et al. Imaging lung manifestations of HIV/AIDS[J]. Ann Thorac Med, 2010, 5(4): 201-216.
- 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 19. 034

(收稿日期: 2018-01-18 修回日期: 2018-05-22)

联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分对 CIN 病变的分级预测

沈晓健¹, 朱东兵¹, 环 静¹, 孙 健^{2△}

(1. 江苏省如皋市人民医院病理科 226500; 2. 山东省青岛市立医院血液净化中心 266071)

摘要:目的 探讨联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分对宫颈上皮内瘤变(CIN)分级的预测价值以及 P16 的表达与宫颈人乳头瘤病毒(HPV)感染的相关性。方法 选取 2013 年 6 月至 2014 年 6 月如皋市人民医院妇科门诊经宫颈液基薄层细胞学检查(TCT)诊断异常的 200 例患者作为研究对象。根据患者的常规 HE 染色病理诊断将其分为宫颈慢性炎症组(112 例)、CIN I 组(42 例)、CIN II 组(20 例)、CIN III 组(18 例)及宫颈癌组(8 例)。采用 HPV 分型检测和宫颈阴道镜活检检测所有患者, 联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色进行半定量评分, 并对宫颈病变进行病理诊断分级。结果 随着宫颈 CIN 病变程度越高, P16 和 Ki-67 的阳性表达程度越强, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。对比 P16 和 Ki-67 的免疫组织化学染色半定量评分评定的病理诊断分级和常规 HE 染色的病理诊断分级, 宫颈慢性炎症患者的诊断一致率为 100.00%, CIN 患者的诊断一致率为 85.22%。所有患者中 HPV 的感染率为 68.00%, 且 HPV 感染率随着 P16 表达强度升高而增高, 且 P16 不同表达情况的患者中 HPV-16、HPV-58、HPV-52、HPV-18、HPV-68 和高危混合型的感染率的比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 联合应用 P16 和 Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分对 CIN 病变的分级预测具有较高的敏感度和特异度, 且对 P16 表达的检测能准确提示宫颈 CIN 病变合并 HPV 感染的预后和转归情况。

关键词: P16; Ki-67; 免疫组织化学; 宫颈上皮内瘤变; 人乳头瘤病毒

中图法分类号: R711.74

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)19-2955-04

宫颈癌在我国发病率、病死率较高, 是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤, 严重危害女性健康^[1]。流行病学研究结果显示, 宫颈癌的发生主要与人乳头瘤病毒(HPV)感染, 特别是高危型 HPV 持续性感染有关, 随着世界范围内的 HPV 感染发生情况日益增多, 宫颈癌的发病率也逐年升高^[2]。近些年, 随着细胞学筛查技术和 HPV 分子生物学技术的不断发展, 对于宫颈癌癌前病变的发现及治疗也在不断更新^[3]。越来越多国外研究发现, P16 联合 Ki-67 染色能有效减少临床工作人员对组织形态学的过度依赖, 以客观的蛋白表达提示组织细胞所处的增殖状态, 且 P16、Ki-67 的表达可能与宫颈病变诊断以及宫颈 HPV 感染存在一定的相关关系。因此联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色及其半定量评分有可能成为宫颈癌癌前病变筛查、诊断、治疗及预后的新靶点^[4-6]。本研究以此为依据, 采用细胞学—HPV 检测—阴道镜检

查三阶梯筛查方案对 200 例液基薄层细胞学检测(TCT)诊断异常[非典型鳞状上皮细胞-意义不明(ASC-US)及以上]的患者进行检测, 探讨联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分在不同宫颈上皮内瘤变(CIN)分级诊断中的表达情况, 以及 P16 的表达与宫颈 HPV 感染的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 6 月至 2014 年 6 月经如皋市人民医院妇科门诊 TCT 筛查^[7]诊断异常(ASC-US 及以上)的 200 例患者作为本次研究的对象, 排除全身性疾病, 以及糖尿病、冠心病及其他恶性肿瘤等患者。按照常规 HE 染色病理诊断对患者进行分组: 其中 112 例诊断为宫颈慢性炎症, 42 例为 CIN I 级, 20 例为 CIN II 级, 18 例为 CIN III 级, 另有 8 例确诊为宫颈癌。所有患者均已被告知本研究相关内容, 自愿参加本研究并已签署相关的知情同意书。

△ 通信作者, E-mail: yx_2293@163.com。

1.2 方法 (1)采用 TCT 技术收集患者宫颈脱落细胞,分离、提取分泌物中的细胞 DNA,采用 HPV 分型检测试剂盒[聚合酶链反应(PCR)+膜杂交法,凯普公司]对细胞 DNA 进行 PCR 扩增及核酸分子快速导流杂交,同时检测患者脱落细胞中的 HPV 亚型。(2)将患者病理组织制成石蜡切片,脱蜡、进水,浸入乙二胺四乙酸二钠的修复液,于高档微波 12 min 使抗原热修复。为阻断内源性过氧化物酶活性,于室温滴加 100 μ L 过氧化氢,孵育 10 min。滴加 100 μ L 一抗(抗稀释度 P16 为 1:100, Ki-67 为 1:50),于室温孵育 90 min。滴加 100 μ L PV-6000 二抗,孵育 20 min。滴加新鲜配制的 100 μ L 二氨基联苯胺溶液,于显微镜下观察显色^[2]。采用磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照,阳性对照采用明确表达 P16 和 Ki-67 的宫颈癌组织。

1.3 评价指标 (1)细胞学诊断标准^[8]:阴性表现为 TBS 诊断系统报告正常范围内或炎症,阳性表现为未明确意义的 ASC-US、不典型腺细胞(ASC-H)及以上级别病变。(2)HPV 分型检测判读标准:高危型病毒包括 HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-56、HPV-58、HPV-59 及 HPV-68 等 13 种亚型;其中单一型感染可划分为高危型(HR-HPV)和低危型(LR-HPV);混合感染的 HR-HPV 中至少含有一种 HR-HPV, LR-HPV 感染则全部为 LR-HPV。(3)CIN 分级诊断标准:病理组织切片由两位病理科医师单独进行阅片并对 CIN 作出免疫组织化学分级诊断。阳性信号表示 P16 在细胞核和细胞质中都有表达,而 Ki-67 仅在细胞核表达。根据 P16 和 Ki-67 的表达强度和分布对阳性结果进行半定量评分:“—”表示 P16 不表达,仅细胞质染色或局灶表达阳性, Ki-67 不表达或仅基底或基底旁表达;“+”表示染色位于基底及基底旁细胞;“++”表示染色位于基底下 1/3 内的细胞;“+++”表示染色位于超过基底下 1/3 而不足 2/3 的细胞;“++++”表示染色位于超过基底下 2/3 的全层细胞。

1.4 统计学处理 将本组研究数据录入 SPSS19.0 行数据分析,计数资料以例数或率表示,组间比较行 χ^2 检验,等级资料的相关性分析采用 Spearman 秩相关,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 P16 的表达结果 宫颈慢性炎症组、CIN I 组、CIN II 组、CIN III 组以及宫颈癌组中, P16 的阳性表达率分别为 0 (0/112)、71.43% (30/42)、100.00% (20/20)、100.00% (18/18)、100.00% (8/8),且随着宫颈 CIN 病变程度越高, P16 表达的阳性程度越高, 差异有统计学意义($\chi^2=156.012, P<0.01$)。由相关性分析可得 P16 阳性表达的 Spearman 秩相关系数为 0.846 ($P<0.01$), 且 P16 表达的阳性程度对 CIN 病变分级诊断的敏感度为 86.36%, 特异度为 100.00%,

准确度为 94.00%。见表 1。

表 1 宫颈病变中 P16 表达比较(n)						
组别	n	—	+	++	+++	++++
宫颈慢性炎症组	112	112	0	0	0	0
CIN I 组	42	12	14	16	0	0
CIN II 组	20	0	0	11	9	0
CIN III 组	18	0	0	0	16	2
宫颈癌组	8	0	0	0	0	8

表 2 宫颈病变中 Ki-67 表达比较(n)						
组别	n	—	+	++	+++	++++
宫颈慢性炎症组	112	40	72	0	0	0
CIN I 组	42	0	13	28	1	0
CIN II 组	20	0	0	9	11	0
CIN III 组	18	0	0	0	16	2
宫颈癌组	8	0	0	0	1	7

表 3 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分 分级诊断结果					
组别	n	P16	Ki-67	病例数 (n)	比例 (%)
宫颈慢性炎症组	112	—	—	40	35.71
		—	+	72	64.29
CIN I 组	42	—	+	1	0.85
		—	++	11	26.19
		—	+++	1	0.85
		+	+	8	19.05
		+	++	4	9.52
		+	+++	1	0.85
		++	+	2	4.76
		++	++	12	28.57
CIN II 组	20	++	+++	1	0.85
		+++	++	11	55.00
		+++	++	9	45.00
		+++	+++	3	16.67
		+++	++++	4	22.22
CIN III 组	18	++++	+++	7	38.89
		++++	++++	4	22.22

2.2 Ki-67 的表达结果 宫颈慢性炎症组、CINI组、CINII组、CINIII组以及宫颈癌组患者 Ki-67 的阳性表达率分别为 0 (0/112)、49.05% (29/42)、100.00% (20/20)、100.00% (18/18)、100.00% (8/8),且随着宫颈 CIN 病变程度越高, Ki-67 表达的阳性程度越高, 差异有统计学意义($\chi^2=152.727, P<0.01$)。由相关

性分析可得 Ki-67 阳性表达的 Spearman 秩相关系数为 0.732($P<0.01$),且 P16 表达的阳性程度对 CIN 病变分级诊断的敏感度为 85.23%,特异度为 100.00%,准确度为 93.50%。见表 2。

2.3 联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分分级诊断及其与 HE 分级诊断的一致性 各组患者 P16 和 Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分分级诊断结果见表 3。宫颈慢性炎症患者的诊断一致率为 100.00%(112/112),CIN 患者的诊断一致率为 85.22%(75/88)。见表 4。

2.4 P16 与 HPV 感染的关系 P16 呈阴性表达“—”HPV 感染率为 57.26%(71/124),“+”为 78.57%(11/14),“++”为 85.12%(23/27),“+++”为 88.00%(22/25),“++++”为 90.00%

(9/10),说明 P16 表达的阳性程度越高,HPV 感染的发生率越大,差异有统计学意义($P<0.01$)。P16 不同表达情况的患者中 HPV-16、HPV-58、HPV-52、HPV-18、HPV-68 和高危混合型感染率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

表 4 P16 和 Ki-67 半定量评分分级诊断与 HE 分级诊断的一致性[n(%)]

HE 分级诊断	P16 和 Ki-67 分级诊断			
	宫颈慢性炎症	CIN I	CIN II	CIN III
宫颈慢性炎症	112(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
CIN I	2(4.76)	39(92.86)	1(2.38)	0(0.00)
CIN II	0(0.00)	0(0.00)	20(100.00)	0(0.00)
CIN III	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	16(88.89)

表 5 P16 表达的阳性程度与 HPV 分型的关系(n)

HPV 亚型	—(n=124)	+(n=14)	++(n=27)	+++ (n=25)	++++ (n=10)	χ^2	P
16	26	2	6	12	6	4.295	0.038
58	6	0	3	3	0	5.327	0.021
18	1	0	2	1	0	13.831	0.001
52	3	1	2	1	0	8.807	0.003
39	5	1	0	0	0	0.933	0.334
33	3	1	0	0	0	0.568	0.451
31	5	1	2	0	1	1.375	0.241
51	3	0	1	0	0	0.426	0.514
53	2	2	0	0	0	—	1.000
68	2	0	0	0	0	17.273	0.007
高危混合型	14	3	7	5	2	11.489	0.001
低危混合型	1	0	0	0	0	0.055	0.815

注:—表示无数据

3 讨 论

宫颈癌是目前临床上唯一一种已明确病因的恶性肿瘤^[9]。近年来 UIJTERWAAL 等^[10]提出了通过对宫颈脱落细胞进行筛查和阴道镜活检等方法能有效提高对宫颈癌诊断的准确性。CIN 作为与宫颈癌密切相关的一组癌前病变,通过对 CIN 尽早诊断和相应有效治疗,可明显减少宫颈癌的发病率和病死率。有研究报道,宫颈癌患者宫颈脱落细胞中的 P16 和 Ki-67 等因子在癌症不同发展阶段中的表达程度存在一定的差异性。因此,检测患者宫颈脱落细胞 P16 和 Ki-67 的表达程度,对宫颈癌的诊断以及 CIN 分级具有非常重要的临床价值^[11]。

P16 是一种定位于染色体 9p21 的抑制蛋白,其生物效应极为广泛,具有强有力的细胞增殖的活性,能阻止抑癌基因视网膜母细胞瘤基因(pRB)磷酸化,从而抑制 DNA 合成。因此,P16 在机体抑癌机制的过程中具有十分重要的地位,其在宫颈脱落细胞中的

表达程度被多数学者认为是反映宫颈癌 CIN 分级最敏感的指标。已有大量资料表明,早期宫颈脱落细胞中 P16 的异常表达与多种原发性肿瘤密切相关,近年来又有报道称 P16 在宫颈癌及高级别 CIN 中出现过表达的现象。因此,通过检测宫颈上皮脱落细胞中 P16 的表达还有助于提示 HPV 感染以及帮助临床鉴别 CIN 的分级^[12]。Ki-67 是一种存在于除 G0 期以外的所有细胞周期中的对肿瘤具有较高敏感度和特异度的细胞表达因子,是检测肿瘤细胞增殖活性最可靠的指标。有研究报道,Ki-67 在正常宫颈慢性炎症组织、低级别 CIN 宫颈组织、高级别 CIN 宫颈组织及宫颈癌组织中的表达程度具有明显的差异,在一定程度上可反映肿瘤的生物学发展和肿瘤细胞的增殖活性,有效指导临床对肿瘤的治疗和预后^[13]。

本研究通过联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分对宫颈病变进行病理诊断分级并对比常规 HE 染色病理诊断,结果显示:伴随 CIN 病变

程度越高, P16 和 Ki-67 的阳性表达程度呈逐渐上升的趋势, 即 P16 和 Ki-67 的阳性表达强度越高提示 CIN 等级越重, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分对比常规 HE 染色对宫颈慢性炎症患者的诊断一致率为 100.00%, 对宫颈 CIN 患者的分级诊断一致率为 85.22%。联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分对 CIN 级别的预测具有非常重要的意义, 可应用于 CIN 病变分级的筛查或辅助诊断。

目前已确定的 HPV 基因型总共有 120 余种, 其中有 40 余种 HPV 亚型与人体生殖系统病变有关。临床案例研究结果显示, 高危混合型 HPV 亚型具有极高的恶变倾向, 是导致宫颈癌的主要原因之一^[14]。本研究中 200 例 TCT 诊断异常的患者宫颈脱落细胞标本中, HPV 阳性检出例数为 136 例, 阳性检出率为 68.00%, 且 HPV 感染率随着 P16 表达强度升高而增高。其中 P16 不同表达情况的患者中 HPV-16、HPV-58、HPV-52、HPV-18、HPV-68 和高危混合型感染率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明宫颈病变患者 HPV 的感染亚型与 P16 的表达程度有一定的关系, 且 HPV 主要基因型别为 16、58、52、18、68 和高危混合型。

综上所述, CIN 级别越高, P16、Ki-67 表达越强烈。因此, 联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分能客观反映宫颈 CIN 患者的病变分级, 可显著提高对宫颈癌癌前诊断的敏感度, 提示细胞表达因子的检查在 CIN 诊断和筛查方面起到重要作用。P16 水平与宫颈 CIN 病变合并 HPV 感染患者的预后及转归具有一定的相关性。

参考文献

- [1] ROBIAL R, LONGATTO-FILHO A, ROTELI-MARTINS CM, et al. Frequency of Chlamydia trachomatis infection in cervical intraepithelial lesions and the status of cytological p16/Ki-67 dual-staining [J]. Infect Agent Cancer, 2017, 12(1): 3-8.
- [2] 王婷婷, 周瑾, 黄百灵, 等. HPV 感染与宫颈癌预防的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(20): 3988-3990.
- [3] HILLEMANN S P, SOERGEL P, HERTEL H A. Epidemiology and early detection of cervical cancer[J]. Oncol Res Treat, 2016, 39(9): 501-506.
- [4] LUTTMER R, DE STROOPER L M, STEENBERGEN R D, et al. Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2016, 16(9): 961-974.
- [5] WHITE C, BAKHIET S, BATES M, et al. Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study[J]. Cytopathology, 2016, 27(4): 269-276.
- [6] HOPLEY R, GILLESPIE A. Cervical FISH testing for triage and support of challenging diagnoses: a case study of 2 patients[J]. Lab Med, 2016, 47(1): 52-56.
- [7] BERGERON C, IKENBERG H, SIDERI M, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results[J]. Cancer Cytopathol, 2015, 123(6): 373-381.
- [8] ZHONG P, LI J, GU Y, et al. P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 2979-2986.
- [9] FUJII T, SAITO M, HASEGAWA T, et al. Performance of p16 (INK4a)/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese gynecologic oncology group study [J]. Int J Clin Oncol, 2015, 20(1): 134-142.
- [10] UIJTERWAAL M H, WITTE B I, VAN KEMENADE F J, et al. Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study[J]. Br J Cancer, 2014, 110(6): 1579-1586.
- [11] CHEN L, SUN M J, SHI H Y, et al. Association of human papillomavirus L1 capsid protein with koilocytosis, expression of p16, and Ki-67, and its potential as a prognostic marker for cervical intraepithelial neoplasia[J]. Anal Quant Cytopathol Histopathol, 2013, 35(3): 139-145.
- [12] TOLL A D, KELLY D, MALEKI Z. Utility of P16 expression and Ki-67 proliferation index in ASCUS and ASC-H pap tests[J]. Diagn Cytopathol, 2014, 42(7): 576-581.
- [13] KOO Y J, HAHN H S, LEE I H, et al. Dual immunostaining of cervical cytology specimens with atypical squamous cells for p16/Ki-67 does not exclude the existence of a high-grade squamous intraepithelial lesion[J]. Virchows Arch, 2013, 463(5): 689-696.
- [14] CHANG M S, OH S, JEONG E J, et al. High-Risk human papillomavirus load and biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer[J]. Modern Pathol, 2013, 26(2): 269-273.

(收稿日期: 2018-01-01 修回日期: 2018-03-06)