

ki67、p16 在宫颈病变组织中的表达及其临床意义

董花 何莲芝

【摘要】 目的 探究 ki67、p16 在不同级别宫颈病变组织中的表达情况。方法 对收集 2016 年 9 月—2018 年 9 月本院就诊的 196 例女性的宫颈组织标本,进行 ki67、p16 免疫组化检测,记录患者 TCT 及 HPV 检查结果,其中宫颈炎症 (Inflammation) 组 40 例,低级别宫颈鳞状上皮内病变 (Low-grade cervical squamous intraepithelial lesion, LSIL) 组 61 例,高级别宫颈鳞状上皮内病变 (High-grade cervical squamous intraepithelial lesion, HSIL) 组 67 例,宫颈癌 (Cervical cancer, CA) 组 28 例。**结果** (1) 不同级别的宫颈病变组织中 ki67、p16 的阳性表达率差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。 (2) 感染高危型 HPV (High-risk HPV, hrHPV) 患者宫颈组织中 ki67、p16 的阳性表达率高于 hrHPV 阴性的患者。**结论** (1) 在组织学特征不明确时,ki67、p16 免疫组化检测结果有助于高级别宫颈上皮内病变的诊断,提高病理诊断的准确性。 (2) ki67、p16 表达与 hrHPV 感染具有相关性。

【关键词】 子宫鳞状上皮内病变; 宫颈癌; ki67、p16; hrHPV 感染

[中图分类号] R737 [文献标识码] A DOI: 10.3969/j.issn.1002-1256.2019.16.003

Expression of ki67 and p16 in cervical lesions and its clinical significance DONG Hua. Department of Obstetrics & Gynecology, the first affiliated hospital of Wannan Medical College & Yijishan hospital, Wuhu, Anhui, 241001, China.

【Abstract】 Objective To investigate the expression of ki67 and p16 in different grades of cervical lesions. **Methods** Immunohistochemical examinations was performed to detect ki67 and p16 in cervical specimens collected from 196 patients, and TCT and HPV findings in patients were recorded. Of the 196 samples, including 40 cases of cervical inflammation, 61 cases of low grade cervical squamous intraepithelial lesions (Low-grade cervical), 67 cases of high-grade cervical squamous intraepithelial lesion (HSIL), and 28 cases of cervical cancer (Cervical cancer). **Results** There were significant differences in the positive expression rates of ki67 and p16 in different grades of cervical lesions ($P < 0.001$). The positive expression rate of ki67 and p16 in cervical tissues of patients infected with high-risk HPV (high-risk HPV, hrHPV) was higher than that of patients with negative hrHPV. **Conclusions** When the histological features are not clear, immunohistochemical detection of ki67 and p16 could help the diagnosis of high-grade cervical intraepithelial lesions and improve the accuracy of pathological diagnosis. Ki67 and p16 expression is associated with hrHPV infection.

【Key words】 Cervical squamous intraepithelial lesion; Cervical cancer; Ki67, P16; hrHPV infection

宫颈癌的发生是一个多因素多阶段的长期过程^[1],因此筛查出高风险人群,找出高级别上皮内瘤变患者并给与及时的干预才是宫颈癌防治的关键所在^[2]。目前子宫颈病变临床诊断主要依赖于病理诊断,但在某些情况下,子宫颈的反应性改变、未成熟化生或萎缩性改变可能表现出与子宫颈上皮内病变相似的形态学特征^[3],通过常规的苏木精和伊红染色难以区分炎症、低级别病变和高级别病变,因此,需要更加客观科学的辅助检测作为参考标准用于解决病理诊断中的难题。本项研究旨在评估 p16 和 Ki67 作为高级别宫颈病变的生物标志物,在病理诊断的辅助检测中的实际效果。

一、资料与方法

1. 一般资料:病例纳入标准:选择 2016 年 6 月—

2018 年 9 月本院妇科就诊患者为研究对象,选取其中细胞学异常或有高危 HPV 病毒感染且进行阴道镜检查 and 活检的病例,部分标本来自术前未做放化疗宫颈手术的病例。排除标准:妊娠期宫颈病变患者。根据 TCT 及 HPV 检查结果,分为宫颈炎症组 (40 例)、低级别宫颈鳞状上皮内病变 (LSIL) 组 (61 例)、高级别宫颈鳞状上皮内病变 (HSIL) 组 (67 例)、和宫颈癌 (CA) 组 (28 例) 四组。收集的女性患者平均年龄为 (41.02±8.20) 岁;炎症组、LSIL 组、HSIL 组和宫颈癌组平均年龄依次为 (38.10±8.67) 岁、(42.50±8.23) 岁、(40.05±7.93) 岁、(40.15±7.85) 岁。不同组别患者平均年龄差异无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2. HPV 基因分析检测、液基细胞学检查:采用核酸分子快速导流杂交基因芯片技术 (flow-through hybridization and gene chip) 检测 HPV-DNA。利用精密的过滤装置将收集的宫颈脱落细胞与悬液中的其他杂质分离开来,然后进行细胞涂片,高纯度酒精固

作者单位:241001 安徽芜湖,皖南医学院第一附属医院弋矶山医院妇产科

通讯作者:何莲芝, Email: 429094335@qq.com

定后巴氏染色。

3. 收集标本: 检查前 3 天内不做阴道冲洗, 不使用阴道内药物, 24 小时内禁止性行为, 并在非经期检查。宫颈活检: 对 TCT 检查为 ASCUS 及以上病变或高危 HPV 检测为阳性的妇女均行阴道镜检查, 宫颈上皮如果见到醋酸白色上皮、点状血管、镶嵌、异型血管及碘试验阴性区, 在怀疑病变区域进行活检, 所取组织行常规石蜡切片检查。宫颈环形电刀切除术: 患者取膀胱截石位, 常规消毒、铺巾, 阴道镜定位后, 根据病变程度选择电切环。部分宫颈癌标本取自宫颈手术术后大病理标本。

4. p16, ki67 蛋白检测: 所用试剂: p16 抗体 (鼠抗人 p16 单克隆抗体, 编号 ZM-0205) 及 Ki67 抗体 (兔抗人, 编号 ZM0046) 多克隆抗体, SP 试剂盒, 免疫组化染色程序遵照 SP 试剂盒操作说明进行, 根据说明书对抗原进行修复。p16 染色阳性细胞核或细胞质出现棕黄色颗粒, ki67 染色阳性以细胞核出现深褐色颗粒。

5. 统计学处理: 本项目中所得实验数据均由 SPASS18.0 处理, 免疫组化结果采用卡方检验及 Fisher 精确检验, 患者平均年龄采用 *t* 检验。

二、结果

1. ki67、p16 的在宫颈组织中的表达情况: 图 1 为不同宫颈组织免疫组化及 HE 染色结果 (放大倍数 100 倍图片)。由表 1 可知 p16 在炎症组、LSIL 组、HSIL 组、宫颈癌组中表达阳性率分别为 0.0%、33.3%、74.6% 和 100.0%。ki67 在炎症组、LSIL 组、HSIL 组、宫颈癌组中表达阳性率分别为 2.5%、37.7%、95.1% 和 100.0%。各组 p16、ki67 阳性表达率经 Fisher 精确检验差值均有统计意义。按照阳性细胞 ≤ 5% 者为 (-) [4]; 阳性细胞数 6% ~ 25% 者为 (+); 26% ~ 50% 者为 (++) ; > 50% 者为 (+++) 为标准。图 2 和图 3 是分别根据各组织中 p16、ki67 不同表达量所占的百分比绘制的柱形图。由图 2 和图 3 可知 HSIL 组、宫颈癌组中 ki67、p16 高表达病例数所占比例明显高于炎症组、LSIL 组。

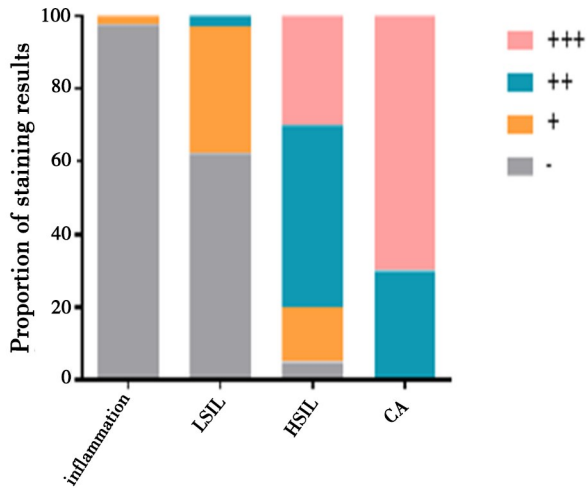


图 2 各组中 P16 不同表达量所占百分比

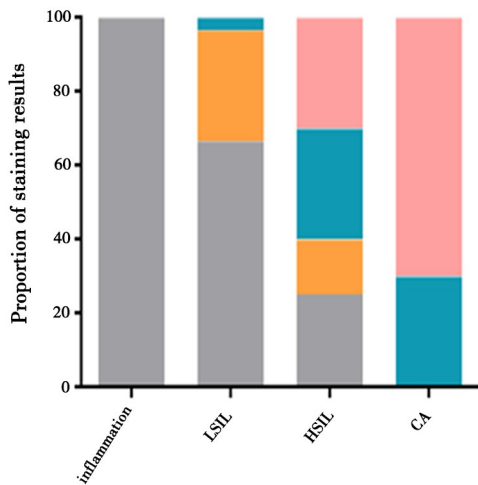


图 3 各组中 ki67 不同表达量所占百分比

表 1 不同类别宫颈组织中 ki67、p16 表达情况 n (%)

组织类型 (n)	免疫组化结果		P ₁ 值	P ₂ 值
	p16 阳性	ki67 阳性		
炎症 (n=40)	0 (0.0)	1 (2.5)	<0.001	<0.001
LSIL (n=61)	20 (33.3)	23 (37.7)		
HSIL (n=67)	50 (74.6)	58 (95.1)		
宫颈癌 (n=28)	28 (100.0)	28 (100.0)		
合计	98 (50.0)	110 (56.1)		

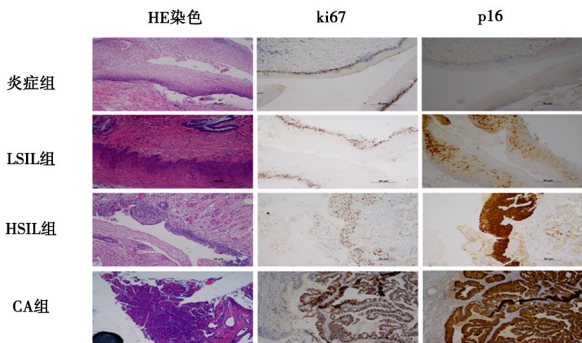


图 1 不同宫颈组织免疫组化及 HE 染色结果 (放大倍数: 100×)

2. ki67、p16 的表达与高危型 HPV 感染的关系: 表 2 和表 3 通过 χ^2 检验比较了高危型 HPV 阳性患者与阴性患者中 p16、ki67 的表达情况, 两组患者中 p16 级 ki67 的阳性表达率差异均有统计学意义。表明 p16、ki67 蛋白的表达与高危型 HPV 的感染也存在一定相关性。

讨论 由于筛查的覆盖面越来越广, 宫颈疾病的检出率也越来越高, 目前宫颈病变的诊断方法主要依靠病理诊断, 而病理诊断过程中参杂了很多主

观因素^[5]。对于那些形态学特征不明确的标本,使临床诊断医师陷入诊断的困境^[6]。随着对宫颈研究的不断深入、检测技术的进步,人们发现新的生物标志可作为病理形态学辅助诊断的一把利器。疾病相关基因及蛋白的在原位组织特异性的过表达,不仅为研究疾病发生发展的机制提供了新的研究思路,也为病变的诊断及治疗提供的特性强的生物标记与靶点。p16 抑癌基因参与细胞增殖调控与多种肿瘤形成的相关^[7-8]。ki67 作为核增殖抗原,已被大量研究证明与肿瘤恶性程度与预后有着密切相关性^[9]。当两种蛋白同时表达于宫颈细胞中,足以说明细胞周期出现异常调控,细胞处于异常增殖状态^[10-11]。p16、ki67 的表达量的量化处理可作为宫颈组织病变等级及恶性程度的标尺辅助临床病理诊断。

临床组织标本免疫组化统计结果显示, p16、ki67 的阳性表达率与宫颈病变等级呈正相关性,表明这两种蛋白质在宫颈肿瘤形成进展中的有着重要作用。在前列腺癌中 p16 表达相关研究表明:p16 阳性病变的恶性进展速度要更快一些^[12]。但本研究中,低级别宫颈鳞状上皮内病变组 p16 的阳性表达率也达到了 33.3%,这预示 p16 的过表达也可能与早期 HPV 感染有关,研究已证实 HPV L1 衣壳蛋白的表达与 SIL 进展和宫颈癌中高百分比的 p16 表达之间的存在相关性^[13]。虽然作为抑癌基因 p16 在细胞转化和肿瘤进展中不能减缓癌变引起的增殖,但其异常的过表达却可作为机体自我防御的调节警示^[14]。由于 Ki-67 抗原存在于所有增殖细胞(正常细胞和肿瘤细胞)中^[11],所以 ki67 在炎症、低级别宫颈上皮内病变组织中也有阳性表达。通过高危型 HPV 阳性与阴性患者 p16、ki67 表达阳性率的比较,我们更加验证以上观点。高危型 HPV 阳性患者宫颈组织中 p16 及 ki67 的阳性表达率明显高于阴性组。

由于宫颈组织中 p16、ki67 的表达与高危型 HPV 的感染之间存在千丝万缕的关系,因此其作为宫颈病变等级的评判标准也可造成一定的假阳性结果。但是 HPV 病毒感染仍是绝大多数的宫颈癌及宫颈上皮内病变患者的主要病因。所以 p16/ki67 这组蛋白作为宫颈病变诊断的生物标记仍具有较大的临床应用价值。准确的诊断评估是精准治疗的前提,是减少过度治疗带来的副作用的最好手段。随着分子机制研究的深入,也可通过基因调控机制抑制 p16、ki67 的过表达,从而起到对抗 HPV 感染导致的细胞恶性转化行为。使 p16、ki67 基因成为今后宫颈病变的治疗的重要靶点。

表 2 高危型 HPV 阳性患者与阴性患者宫颈组织中 p16 表达情况(n)

高危型 HPV	p16(n)		χ^2 值	P 值
	+(98)	-(98)		
+(117)	72	45	15.459	0.001
-(79)	26	53		

表 3 高危型 HPV 阳性患者与阴性患者宫颈组织中 ki67 表达情况(n)

高危型 HPV	ki67		χ^2 值	P 值
	+(100)	-(86)		
+(117)	82	35	22.982	<0.001
-(79)	28	51		

参 考 文 献

- [1] Ginsburg O, Bray F, Coleman PM, et al. The global burden of women's cancers; a grand challenge in global health[J]. Lancet, 2017, 389(10071):847-860.
- [2] Wang FL, YANG Y, Liu ZY, et al. Correlation between methylation of the p16 promoter and cervical cancer incidence[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(10):2351-2356.
- [3] Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA, et al. Clinical implications of (epi) genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(6):395-405.
- [4] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(3):311-22.
- [5] Yang J, Elliott A, Hoffa AL, et al. Potential influence of p16 immunohistochemical staining on the diagnosis of squamous cell lesions in cervical biopsy specimens: observation from cytologic-histologic correlation [J]. Cancer Cytopathol, 2018, 126(12):1003-1010.
- [6] Xue YZ, Bellanger S, Zhang WY, Lim D, et al. HPV16 E2 is an immediate early marker of viral infection, preceding E7 expression in precursor structures of cervical carcinoma [J]. Cancer Res, 2010, 70(13):5316-25.
- [7] Roma AA, Goldblum JR, Fazio V, et al. Expression of 14-3-3sigma, p16 and p53 proteins in anal squamous intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2008, 1(5):419-25.
- [8] Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer[J]. Bmj, 2015, 350:h2372.
- [9] Sobacki M, Mrouj K, Colinge J, et al. Cell - Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki - 67 Expression Levels [J]. Cancer Res, 2017, 77(10):2722-2734.
- [10] Sekoranta D, Fokter AR. Triaging Atypical Squamous Cells - Cannot Exclude High - Grade Squamous Intraepithelial Lesion With p16/Ki67 Dual Stain [J]. J Low Genit Tract Dis, 2017, 21(2):108-111.
- [11] Kanthiya K, Khunharong J, Tangitgamol S, et al. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(7):3201-6.
- [12] Xing Y, Wang CJ, Wu J. Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(26):e7302.
- [13] Stanczuk GA, Baxterer GJ, Currie H, et al. Defining Optimal Triage Strategies for hrHPV Screen - Positive Women - An Evaluation of HPV 16/18 Genotyping, Cytology, and p16/Ki - 67 Cytoimmunochemistry [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017, 26(11):1629-1635.
- [14] Zhang RY, Ge XF, You K, et al. p16/Ki67 dual staining improves the detection specificity of high-grade cervical lesions [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2018, 44(11):2077-2084.

(收稿日期:2019-03-09)

(本文编辑:王涛)