

免疫组织化学检测 P16、Ki67 在宫颈鳞状上皮内病变中的应用

郑艳,陈珊珊,罗卉丽
(十堰市妇幼保健院,湖北 十堰 420000)

摘要:**目的** 分析免疫组化 P16、Ki67 在宫颈鳞状上皮内病变中的应用及意义。**方法** 收集经活检或手术切除宫颈组织标本,其中宫颈鳞状上皮内病变 80 例将其作为病例组,此外将 30 例非宫颈病变手术切除正常宫颈组织标本作为对照组。采用 S-P 免疫组化方法对所有标本进行 P16、Ki67 表达的检测,并分析其表达及意义。**结果** P16 阳性率依次由对照组、CIN I、CIN II、CIN III 组呈上升趋势,对照组与病例组两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组 Ki67 阳性率明显低于病例组 CIN I、CIN II、CIN III,差异有统计学意义($P < 0.05$),病例组内比较差异无统计学意义($P > 0.05$);P16、Ki67 的关联性比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Ki67 和 P16 的表达情况可有效甄别子宫颈良性反应病变情况,但二指标的关联性不强,提示其对病变的指示方向并非相同,因此,对于 Ki67 和 P16 的表达情况进行联合检测,可以更为公允的帮助相关人员鉴定子宫颈病变情况,值得在临床中进一步推广。

关键词:免疫组织化学;P16;Ki67;宫颈鳞状上皮内病变

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.01.024

The application and significance of immunohistochemical detection of P16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions

ZHENG Yan, CHEN Shanshan, LUO Huili
(Shiyan Maternal and Child Care Service Centre, Shiyan, Hubei 420000, China)

Abstract:**Objective** To analyze the application and significance of Immunohistochemical P16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions. **Methods** Eighty cases of cervical squamous intraepithelial lesions collected from menstruation biopsy or the cervical tissue of surgical removal samples were selected as the case group. 30 cases specimens of normal cervical tissues were resected by surgery of non-cervical lesions were taken as the control group. S-P immunohistochemical method was taken to detect p16, Ki67 in all the specimens from which the expressions were analyzed. **Results** The positive rate of P16 were elevated in the control group, CIN I, CIN II, CIN III group, and there was significant difference between the control group and case group ($P < 0.05$). The positive rate of Ki67 in the control group was significantly lower than those in the CIN I, CIN II, CIN III groups, and there existed statistically significant differences ($P < 0.05$). The positive expression of P16 and Ki67 was no statistical significance ($P > 0.05$) in the case group. **Conclusion** The expression of Ki67 and P16 can effectively identify the cervical benign lesions. However the correlation which is not strong means that the tip on the direction of pathological changes is not the same. Therefore, the associated detection of Ki67 with P16 show promise to identification of cervical lesions, which is worth popularizing in the clinic.

Key words:Immunohistochemical; P16; Ki67; Cervical squamous intraepithelial lesions

宫颈癌是一种死亡率仅次于乳腺癌的常见恶性肿瘤,每年全世界约有 50 万新增病例,其中我国占到约 1/4^[1]。宫颈鳞状上皮内病变(CIN)即宫颈癌癌前病变,目前将其分为三个等级,癌变可能性低且属自限性病变的 CIN I 及危险性较高的可能转变为癌的 CIN II、CIN III^[2]。采取准确及时的治疗和诊断 CIN 对减低宫颈癌发病率和死亡率显得尤为重要,特别是对 CIN II、CIN III 病变病人。有关文

献报道^[3] P16 基因在宫颈病变进展过程中是一个较有价值的标志物。Ki67 是一种与增殖细胞相关的核抗原,其增殖指数的高低与肿瘤的分化程度、浸润、转移以及预后等存在着密切的关系^[4]。基于此,本试验为较准确对宫颈组织切片进行病理诊断,对宫颈鳞状上皮内病变和非宫颈病变手术切除正常宫颈组织标本进行 P16、Ki67 测试,取得了较为理想的诊断效果,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集十堰市妇幼保健院 2015 年 1 月—2016 年 1 月经活检或手术切除宫颈组织标本,

基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(2015Z115)
通信作者:罗卉丽,女,副主任技师,研究方向:肿瘤检测,E-mail:
1505412104@qq.com

其中 80 例宫颈鳞状上皮内病变(CIN)作为病例组,其中 19 例 CIN I 病变标本,29 例 CIN II 病变标本,32 例 CIN III 病变标本。此外将病检报告为正常宫颈组织标本 30 例作为对照组。所有切除宫颈组织送病理检查的病人均有临床指征且经病人知情同意。所有切片均是由 3 位及以上富有经验的病理医师根据 WHO(2007)标准做出诊断,且最终诊断以 2 位及以上的病理医师一致的意见。

1.2 试剂 鼠抗人 P16 单克隆抗体、鼠抗人 Ki67 单克隆抗体、SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购至罗氏诊断产品(上海有限公司)。

1.3 方法 10% 的福尔马林对所有标本进行固定并采用常规石蜡进行包埋,进行连续切片厚 0.4 μm ,从每例标本中选取 1 张病变最典型切片进行常规 HE 染色,光镜下行细胞形态学观察,确定病理诊断及分组。采用 S-P 法对所有切片进行免疫组化染色。采用磷酸盐缓冲溶液进行高压抗原修复,冲洗 3 次,每次 3 min。此外通过滴加 DAB 显色液进行显色,显微镜观察 3~8 min。自来水充分冲洗,苏木精复染,经过梯度乙醇脱水干燥,中性树胶封片。以 PBS 代替一抗为阴性对照,以已知阳性片作为阳性对照。具体操作见说明书。

1.4 结果判定 P16 阳性定位在细胞核和(或)细胞浆,具体为阳性表达为胞核和胞浆中出现棕黄色颗粒,正常宫颈组织其鳞状上皮细胞呈阴性(-);Ki67 阳性定位在细胞核,以细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性,(+)为正常宫颈上皮基底细胞核,将其视为(-)。按染色强弱程度划分为 4 级:(-)表示未出现阳性细胞;(+)表示<25%的阳性细胞;(+ +)表示 $\geq 25\% \sim \leq 50\%$ 的阳性细胞;(+ + +)表示>50%的阳性细胞。

1.5 统计学方法 本实验使用 SPSS20.0 专业统

计学软件。数据主要为计数资料,以例(%)表示。各组间 P16 及 Ki67 表达的比较采用秩和检验和 χ^2 检验,该两个指标的关联性分析使用配对样本 χ^2 检验。当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P16 及 Ki67 的表达 结果显示 P16 及 Ki67 阳性率依次由对照组、CIN I、CIN II、CIN III 组呈上升趋势。P16:对照组与 CIN I 比较, $\chi^2 = 15.66, P = 0.004$;对照组与 CIN II 比较, $\chi^2 = 29.26, P = 0.003$;对照组与 CIN III 比较, $\chi^2 = 47.02, P = 0.003$;Ki67:对照组与 CIN I 比较, $\chi^2 = 14.82, P = 0.004$;对照组与 CIN II 比较, $\chi^2 = 22.53, P = 0.01$;对照组与 CIN III 比较, $\chi^2 = 31.49, P = 0.007$,以上两组比较均差异有统计学意义,见表 1。

2.2 P16 及 Ki67 表达的关联性 资料见表 2。经配对 χ^2 检验,关联性检验 $P > 0.05$,提示两个指标关联不密切,其检测数据不指向同一诊断或临床意义;优势性检验差异有统计学意义($P < 0.05$),但由于关联性检验不明显,故此指标没有准确含义。

3 讨论

鳞状上皮与柱状上皮的交界处是宫颈移行区,常发生病变。鳞状上皮化生是一种最常见的化生形式,指柱状上皮区域的储备细胞转化成鳞状上皮的过程,此外鳞状上皮化生也是宫颈上皮在炎症环境中发生的一种适应性反应^[5-6]。初期化生表现为不成熟病变,在此期间缺乏明显的鳞状上皮各层的特征,主要表现为细胞核大、深染、层次不清,当上皮病变逐渐成熟后会具备成熟鳞状所具有的各层的特征^[7]。临床诊断中鳞状上皮不成熟病变和鳞状上皮成熟病变往往较为相似,在对其诊断过程中常存在较多争议,不同病理医师得出不同病例结果,甚至同一病理医师可能出现同一张病理切片在

表 1 所有标本的 P16 及 Ki67 的表达比较/例

组别	例数	P16					Ki67				
		-	+	++	+++	阳性率/%	-	+	++	+++	阳性率/%
对照组	30	28	2	0	0	6.67	20	8	2	0	33.33
CIN I	19	8	5	4	2	57.89 ^a	2	10	5	2	89.47 ^a
CIN II	29	7	8	10	4	75.86 ^a	2	8	14	5	93.10 ^a
CIN III	32	2	8	10	12	93.75 ^a	0	9	10	13	100.00
整体比较 Hc(χ^2) 值				50.663		(21.634)			48.199		(23.634)
P 值				0.000		0.000			0.000		0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

表2 P16 及 Ki67 表达的相关性/例

项目	Ki67		χ^2 值	P 值	备注
	+	-			
P16	+	62	16	0.017	0.896 关联性检验
	-	1	1	11.530	0.001 优势性检验

不同的时间得出不同的诊断结果^[8]。

P16 在细胞的增生调控中起着重要的作用,其不但可以对细胞周围进行调控,还可以抑制肿瘤生长。相关文献[9]显示不能产生 P16 蛋白基因的细胞易发生恶性病变,此外出现 P16 蛋白基因失活时将造成肿瘤细胞无限生长。通过 P16 表达缺失免疫组化蛋白检测可反映 P16 基因的失活状况。本实验研究结果显示 P16 阳性表达依次由对照组、CIN I、CIN II、CIN III 组呈上升趋势,对照组与试验组两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$),该实验结果与张萍等^[1]的报道一致,说明高表达的 P16 参与了 CIN 宫颈癌演化的过程,提示需进一步探讨 P16 的失活对宫颈癌变机制的参与情况。

P16 蛋白能够在宫颈鳞状上皮内病变过程中加以表达,且表达的强度和阳性率情况会随着宫颈鳞状上皮病理变化程度而呈现出增高趋势。P16 在 CIN I III 内的阳性表达逐渐上升。Ki67 可以反映出宫颈的上皮细胞异型性标志物,存在一定灵敏性,其在正常宫颈组织,CIN 以及宫颈癌中的表达水平呈现出了逐渐上升的趋势。值得说明的是,HPV 感染为宫颈上皮内瘤以及宫颈鳞状细胞癌发生的主要因素。HPV 为引致宫颈鳞状上皮内病理变化的重要分子学基础。

宫颈发生肿瘤是由多个因素和步骤长期作用的结果,目前普遍认为增生是一个与 CIN 及宫颈癌相关的早期指标^[10]。目前反映细胞群体增殖活性的一个较为全面和客观的指标是 Ki67,其与增殖指数高低、肿瘤的分化程度、浸润转移以及预后密切相关^[11]。可在所有活动的细胞周期进行表达,G0 期通常不表达^[12]。本实验研究结果显示对照组 Ki67 阳性率明显低于试验组 CIN I、CIN II、CIN III,差异有统计学意义($P < 0.05$),试验组内比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明随着病情的演进,细

胞的增殖活性增强提示 Ki67 可用于 CIN 的分级。此外本研究对 P16、Ki67 的相关性进行了分析发现两者之间不存在相关性,提示 P16、Ki67 在 CIN I、CIN II、CIN III 发生过程中可能是通过不同的作用方式参与的。

综上所述,通过对正常宫颈标本组织和宫颈鳞状上皮内病变的标本组织中的 P16、Ki67 监测认为 P16、Ki67 在诊断 CIN 方面具有较高的临床使用价值,可有效的减少实际工作中的误诊和漏诊,为提高诊断癌前病变的准确率提供依据。

参考文献

[1]

张萍,王怀莉,陈龙. CK17、P16 及 Ki-67 在宫颈鳞状上皮不成熟化生和宫颈上皮内瘤变中的意义[J]. 宁夏医学杂志,2012, 34(4):300-302.

[2]

陈昊宾,张敏,罗贤勇,等. 免疫组织化学技术在子宫颈上皮内病变中的应用及其临床病理学意义[J]. 中国性科学,2014,23 (9):43-45.

[3]

朱梅娟. Ki67、P16 和 HPV 在宫颈病变组织中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健,2013,28(19):3095-3097.

[4]

李瑶,刘丽娜,杨永秀. MCM7、Ki67 在宫颈鳞状细胞癌及其癌前病变中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健,2014,29 (13):2085-2088.

[5]

石森林. P16、Ki67 在诊断高低级别 CIN 中的作用及与 hrHPV 感染相关性研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2009.

[6]

戴一菲,杨继洲,李蓓. P16、Ki67、MMP2 在宫颈 CIN 累腺与微小浸润癌鉴别中的意义[J]. 中华全科医学,2013,11(7): 1014-1015,1029.

[7]

肖兰. p16、Ki-67、MMP-2 在宫颈疾病中的应用研究进展[J]. 医学综述,2014,20(18):3285-3286.

[8]

谢小丽. p16、Ki-67 在宫颈良性病变与 CIN 中的表达差异及意义[J]. 中外医疗,2014,33(12):171-172.

[9]

赵向荣,赵合保,张晚鱼,等. P16 INK4 a 和 Ki67 在宫颈病变中的表达和意义[J]. 航空航天医学杂志,2014,25(4):435-436.

[10]

左云海,袁迎春. p16 和 Ki-67 在宫颈鳞癌前病变中的表达及其诊断价值[J]. 现代中西医结合杂志,2013,22(27):2974-2975,2983.

[11]

崔芳瑜,李青,黄文斌. P16 和 Ki-67 在宫颈鳞癌前病变中的表达及其诊断价值[J]. 中国医疗设备,2012,27(11):40-42, 45.

[12]

潘升华,安慧敏,吴文珍,等. p16 和 ProEx C 在宫颈活检低度鳞状上皮内病变中的表达及意义[J]. 温州医学院学报,2013, 43(10):660-663.

(收稿日期:2016-06-21,修回日期:2016-11-23)