

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.03.010

◇临床医学◇

P16^{INK4A}、Ki-67 共表达检测对宫颈上皮内瘤样病变的诊断价值

尹璐^{1,2a}, 郑磊贞¹, 赵学军^{2b}作者单位:¹上海交通大学医学院附属新华医院肿瘤科, 上海 200092;²上海市长宁区妇幼保健院,^a妇产科,^b病理科, 上海 200051

通信作者: 郑磊贞, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤学, E-mail: zhengleizhen2006@126.com

基金项目: 上海市长宁区科学技术委员会项目(CNKW2016Y12)

摘要:目的 研究p16基因(P16^{INK4A})、Ki-67共表达检测在宫颈上皮内瘤样病变(CIN)鉴别诊断中的临床和经济价值。**方法** 选取上海市长宁区妇幼保健院2016年12月至2018年8月收诊的液基细胞学(LCT)诊断为≥意义不明的不典型鳞状细胞(ASCUS)女性病人431例,其中因细胞量不足、细胞学不满意无法行P16/Ki-67双染剔除21例,最终有效标本数量为410例,均经采取P16^{INK4A}、Ki-67单染及P16/Ki-67双染检测,以阴道镜活检作为金标准,分析P16^{INK4A}、Ki-67对CIN的诊断价值(诊断准确性、敏感性、特异性)及其与人乳头状瘤病毒(HPV)感染的关联性。**结果** (1)P16^{INK4A}、Ki-67与HPV感染关联性:经Spearman相关性分析,P16^{INK4A}、Ki-67与HPV感染呈正相关($r_1=0.572, P_1=0.005; r_2=0.554, P_2=0.011$);(2)阴道镜活检结果:经阴道镜活检,410例LCT诊断为≥ASCUS女性病人中,132例为阳性病人,占32.20%,阴性病人278例,占67.80%;(3)P16^{INK4A}、Ki-67诊断结果:P16^{INK4A}单染检查,阳性144例,阴性266例;Ki-67单染检查,阳性143例,阴性267例;P16/Ki-67双染检查,阳性168例,阴性242例;(4)诊断价值:P16/Ki-67双染诊断准确性90.27%、敏感性98.48%高于P16^{INK4A}、Ki-67单染(85.37%、84.15%)、(81.82%、79.55%)($P<0.05$);P16/Ki-67双染诊断特异性86.33%与P16^{INK4A}单染87.05%、Ki-67单染86.33%相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** P16^{INK4A}、Ki-67应用于CIN鉴别诊断中,与HPV感染具有正相关关系,可显著提高诊断准确性、敏感性,为临床判断CIN病情程度、制定治疗方案等提供有力参考依据。但P16^{INK4A}、Ki-67及P16/Ki-67双染检测经济费用较高,致使临床应用受限。

关键词: 宫颈上皮内瘤样病变; Ki-67抗原; 基因, p16; 阴道镜检查; 乳头状瘤病毒感染; 诊断, 鉴别

The diagnostic value of P16^{INK4A} and Ki-67 co-expression detection in cervical intraepithelial neoplasia

YIN Lu^{1,2a}, ZHENG Leizhen¹, ZHAO Xuejun^{2b}

Author Affiliations: ¹Department of Oncology, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; ^{2a}Department of Obstetrics and Gynecology, ^{2b}Department of Pathology, Changning Maternity and Child Healthcare Hospital of Shanghai, Shanghai 200051, China

Abstract: Objective To study the clinical and economic value of P16^{INK4A} and Ki-67 co-expression detection in the differential diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). **Methods** From December 2016 to August 2018, 431 female patients with ≥ atypical squamous cell (ASCUS) of unknown significance diagnosed by liquid-based cytology (LCT) were selected in our hospital. Among them, 21 cases of P16/Ki-67 double staining were eliminated due to insufficient cell volume and cytological dissatisfaction. The number of valid specimens was 410 cases. By using P16^{INK4A}, Ki-67 single staining and P16/Ki-67 double staining, colposcopic biopsy as gold standard, the diagnostic value of P16^{INK4A} and Ki-67 for CIN (diagnostic accuracy, sensitivity, specificity) and its association with human papillomavirus (HPV) infection were analyzed. **Results** (1) Association of P16^{INK4A}, Ki-67 with HPV infection: Spearman correlation analysis showed that P16^{INK4A} and Ki-67 were positively correlated with HPV infection ($r_1=0.572, P_1=0.005; r_2=0.554, P_2=0.011$). (2) Colposcopic biopsy results: Among 410 women diagnosed with ≥ASCUS by LCT, 132 cases were positive, accounting for 32.20%, 278 cases of negative patients, accounting for 67.80%; (3) P16^{INK4A} and Ki-67 diagnostic results: P16^{INK4A} single stain test was positive in 144 cases and negative in 266 cases; Ki-67 single stain test showed positive in 143 cases and negative in 267 cases; P16/Ki-67 double staining showed positive in 168 cases and negative in 242 cases. (4) Diagnostic value: The diagnostic accuracy and sensitivity of P16/Ki-67 double staining were 90.27% and 98.48% respectively, which were higher than those of P16^{INK4A} and Ki-67 single staining (85.37% and 84.15%), (81.82% and 79.55%) ($P<0.05$). The specificity of P16/Ki-67 double stain-

ing diagnosis was 86.33% compared with P16^{INK4A} single staining 87.05% and Ki-67 single staining 86.33%, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions** P16^{INK4A} and Ki-67 are used in the differential diagnosis of CIN and have positive correlation with HPV infection. It can significantly improve the diagnostic accuracy and sensitivity, and provide a strong reference for clinical judgment of CIN and formulation of treatment programs. However, the high cost of P16^{INK4A}, Ki-67 and P16/Ki-67 double staining tests result in limited clinical application.

Key words: Cervical intraepithelial neoplasia; Ki-67 antigen; Genes, p16; Colposcopy; Papillomavirus infections; Diagnosis, differential

宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是宫颈癌前病变的主要疾病状态,在正常宫颈上皮组织发展到宫颈癌的连续过程中,具有至关重要作用^[1]。早期明确、诊断CIN并准确判断其病情程度及预后转归情况对减少宫颈癌发生和发现早期宫颈癌意义重大。但相关研究表明,CIN进行组织学诊断时,极易与不成熟鳞状上皮化生和萎缩及修复性/反应性上皮改变产生混淆现象,导致诊断结果受到影响^[2]。近年来,临床为提高CIN诊断准确性、减少诊断差异,逐渐于辅助诊断客观指标中引入生物学标志物。其中,P16^{INK4A}(可简称为P16)在多种肿瘤组织中通过缺失表达降低或甲基化、突变加快肿瘤疾病发生与进展^[3]。Ki-67是一种非组蛋白抗原,属于核增殖标志基因,研究显示Ki-67过度表达可对多种肿瘤恶性生物学行为产生密切影响^[4]。因此,本研究选取液基细胞学(liquid-based cytology test, LCT)诊断为≥意义不明的不典型鳞状细胞(atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS)女性病人作为研究对象,以探讨P16^{INK4A}、Ki-67共表达在CIN鉴别诊断中的临床和经济价值。具体总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取上海市长宁区妇幼保健院2016年12月至2018年8月收诊的经LCT诊断为≥ASCUS女性病人431例,其中因细胞量不足、细胞学不满意无法行P16/Ki-67双染剔除21例,最终有效标本数量为410例,年龄(49.01 ± 5.84)岁,范围为21~70岁,病程(1.16 ± 0.14)年,范围为9个月至3年。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 选取标准

1.2.1 纳入标准 (1)均具有明确信息(如年龄、性别、病史等);(2)年龄范围为21~70岁;(3)均经LCT诊断为≥ASCUS;(4)宫颈完整,且未接受过宫颈手术或物理治疗;(5)无临床怀孕疑似症状;(6)病人及近亲属理解研究程序,自愿参与,且均签订知情承诺书。

1.2.2 排除标准 (1)样本信息不全者;(2)既往罹

患宫颈尖锐湿疣、宫颈息肉等宫颈疾病者;(3)伴有其他宫颈疾病者;(4)处于妊娠期、哺乳期女性;(5)不符合样本制作要求;(6)同时参加其他临床研究者。

1.3 方法

1.3.1 样本采集方法 所有研究对象均由经验丰富的妇科医生对其进行常规妇科检查,同时采集标本,具体采集步骤:采用BD SurePath™细胞学采样器(由广州市宝迪科技有限公司提供)将宫颈脱落细胞标本收集充足,于宫颈口对准宫颈刷尖端,在施加合适压力条件下同方向旋转宫颈刷,持续5~8周,尽可能使宫颈刷于宫颈移行带上刷取细胞,保障获取充足细胞成分。取出后,将细胞标本放置于富含保存液的细胞保存瓶内,填写病理报告,于15~30℃条件下保存标本,送至病理科检测。

1.3.2 人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)检测方法 选择PCR毛细管电泳法检测HPV,采用由宁波海尔施基因科技有限公司提供的贝克曼GeXP全自动核酸检测系统进行检测,操作步骤严格按照说明书完成,目的是检查18种高危型HPV(16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82型)和7种低危型别(6, 11, 42, 43, 44, 81, 83)。高危型HPV结果只要有一项为阳性则记为阳性,结果均阴性记为阴性。

1.3.3 LCT检查方法 采用BD SurePath™系统(由广州市宝迪科技有限公司提供)制备细胞学玻片,具体操作步骤:对标本进行预处理(消化液),以保障获取足量细胞,保证制作质量。于BD SurePath™制片片中放置样本存放瓶,进行程序化制片,之后于乙醇(95%)固定玻片,实行巴氏染色,根据阴道细胞学诊断分类系统(the bethesda system, TBS)报告结果。具体分类:未见上皮内病变细胞和恶性病变细胞(No intraepithelial lesions / malignant, NILM)、不典型腺细胞(atypical glandular cell, AGC)、ASCUS、鳞状上皮内低度病变(low-squamous intraepithelial lesion, LSIL)、非典型鳞状上皮细胞,不除外高级别鳞状上皮内病变(atypical squamous cells not except

high lesion, ASC-H)、鳞状上皮内高度病变(high-squamous intraepithelial lesion, HSIL)、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC),将ASCUS及以上细胞学诊断定义为细胞学阳性。

1.3.4 P16/Ki-67单染及双染方法 P16、Ki67单染采用免疫细胞化学染色法进行检测,分别制片后加入鼠抗人P16和兔抗人Ki67,具体详细步骤均按照试剂盒说明书操作。P16/Ki-67双染检测采用由罗氏公司提供的全自动免疫组化分析仪(型号为Cintec PLUS),将标本经BD SurePath™制片后,固定于乙醇中(95%),对标本进行染色,清洗(洗洁精),最后将其封固。由专业检验医师在显微镜条件下进行观察、分析,并将观察画面采用拍照形式记录下来。P16^{INK4A}结果判读方法为细胞质或(和)细胞核着棕黄色,则判定为P16^{INK4A}呈现阳性表达。Ki-67结果判读方法为阴性:阳性细胞数<10%或无阳性细胞;其阳性细胞通常见于细胞核,弱阳性:阳性细胞数10%~25%;阳性:阳性细胞数>25%~50%;强阳性:阳性细胞数>50%,于上皮全层弥漫分布。P16/Ki-67双染结果判读方法为将P16细胞质定义为染色棕色、Ki-67细胞核定义为染色红色,在同一焦距条件下进行观察,若结果显示特定红染细胞核、棕染细胞质,则认定为阳性细胞,单个细胞双染则判定为阳性;同一细胞内仅见1种颜色或未见两种颜色则判定为阴性。判读标准独立于形态学检查结果,任何强弱、任何水平表达均可。如图1,2。

1.3.5 阴道镜活检 由经验丰富的专业医师进行相关检查操作,具体操作步骤:于宫颈依次涂抹醋酸(3%)、复方碘溶液(1%),组织标本采集处选择可疑部位,实行病理活检。若阴道镜图像不满意,则于宫颈管采取常规搔刮措施,采集后固定组织标本(4%甲醛),实施病理检查。病理诊断中CIN II、CIN III(相当于HSIL)及浸润癌判定为阳性;CIN I(相当于LSIL)及宫颈炎症判定为阴性。

1.4 观察指标 (1)P16^{INK4A}、Ki-67与HPV感染关联性。(2)阴道镜活检结果。(3)P16^{INK4A}、Ki-67单染及P16/Ki-67双染诊断结果。(4)诊断价值(诊断准确性、敏感性、特异性)。

1.5 统计学方法 运用SPSS 21.0软件处理数据,计数资料采用例(%)表示,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P16^{INK4A}、Ki-67与HPV感染关联性 Spearman相关性分析,P16^{INK4A}、Ki-67与HPV感染呈正相关($r_1=0.572, P_1=0.005; r_2=0.554, P_2=0.011$)。

2.2 阴道镜活检结果 经阴道镜活检,410例LCT诊断为 $\geq$ ASCUS女性病人中,132例为阳性病人,占32.20%,其中CIN II占34.09%(45/132),CIN III占39.39%(52/132),浸润癌占26.52%(35/132);阴性病人278例,占67.80%,其中子宫炎症占56.83%(158/278),CIN I占43.17%(120/278)。

2.3 P16^{INK4A}、Ki-67单染及P16/Ki-67双染诊断结果 P16^{INK4A}单染检查,阳性144例,阴性266例,其中漏诊24例,误诊36例;Ki-67单染检查,阳性143例,阴性267例,其中漏诊27例,误诊38例;P16/Ki-67双染检查,阳性168例,阴性242例,其中漏诊2例,误诊38例。见表1。

表1 P16^{INK4A}、Ki-67单染及P16/Ki-67双染鉴别诊断
宫颈上皮内瘤样病变410例结果/例

阴道镜活检	例数	P16 ^{INK4A} 单染		Ki-67单染		P16/Ki-67双染	
		+	-	+	-	+	-
+	132	108	24	105	27	130	2
-	278	36	242	38	240	38	240
合计	410	144	266	143	267	168	242

2.4 诊断价值 P16/Ki-67双染诊断准确性、敏感性高于P16^{INK4A}、Ki-67单染($P<0.05$);P16/Ki-67双染诊断特异性与P16^{INK4A}、Ki-67单染相比,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 P16^{INK4A}、Ki-67单染及P16/Ki-67双染鉴别诊断
宫颈上皮内瘤样病变410例诊断价值/(n/N)

诊断方法	诊断准确性	诊断敏感性	诊断特异性
P16 ^{INK4A} 单染	85.37(350/410)	81.82(108/132)	87.05(242/278)
Ki-67单染	84.15(345/410)	79.55(105/132)	86.33(240/278)
P16/Ki-67双染	90.27(370/410)	98.48(130/132)	86.33(240/278)
χ^2 值	7.345	24.354	0.083
P值	0.025	0.000	0.960

3 讨论

近年来我国宫颈癌发病率呈现逐渐上升趋势,发病人群呈现年轻化趋势,对女性生命安全造成严重威胁,防治形势严峻^[5]。宫颈癌通常是由高危型HPV感染所致,其发展过程通常认为需经过宫颈正常上皮组织—宫颈癌前病变—宫颈癌的演变过程,其中宫颈癌前病变CIN具有至关重要作用^[6-7]。临床为降低宫颈癌发病率,需及早确诊CIN,在明确病情基础上采取有效措施治疗,控制疾病进展。研究表明,CIN组织学诊断结果可直接关系到病人病情程度判断及治疗方案制定,对其预后情况具有间接影响^[8-9]。

近年来,生物学标志物成为临床研究热点。周

文俊^[10]研究中表明,在CIN、宫颈癌组织中,P16^{INK4A}、Ki-67与HPV感染具有明显正相关关系。本研究结果也显示,P16^{INK4A}、Ki-67与HPV感染呈正相关($P < 0.05$),表明P16^{INK4A}、Ki-67可随HPV感染发生、进展呈现逐渐上升趋势,在诊断CIN及宫颈癌中具有一定辅助作用。P16^{INK4A}属于细胞周期素依赖性激酶抑制物,半衰期较短,可作用于除G0期外所有细胞周期阶段,可将细胞G1期至S期进展过程阻断,从而发挥抑制细胞增殖作用,可达到抑制癌症的目的,若出现甲基化、突变或缺失表达降低等现象,则可引发肿瘤疾病^[11-12]。临床实践证实,P16^{INK4A}参与HPV感染而致的宫颈病变进展过程,且具有重要作用^[13]。Ki-67则属于细胞核内蛋白,与细胞分裂增殖关系密切,可准确反映细胞增殖活性^[14]。相关研究表明,Ki-67可有效反映宫颈癌细胞增殖情况^[15]。同时,研究显示Ki-67过度表达对多种肿瘤疾病预后产生不同程度影响^[16-17]。近年来,P16/Ki-67双染逐渐应用于临床肿瘤疾病诊断中,若同一细胞内同时检测出P16^{INK4A}、Ki-67,则标志着细胞周期失调,对检出真正病变细胞具有明确辅助作用,且不依赖于形态学检查结果^[18-19]。本研究结果显示,P16/Ki-67双染诊断准确性、敏感性高于P16^{INK4A}、Ki-67单染($P < 0.05$),可见P16^{INK4A}、Ki-67应用于CIN鉴别诊断中,可显著提高诊断准确性、敏感性,有助于判断CIN病情程度。

现阶段,P16^{INK4A}、Ki-67在临床肿瘤疾病诊断中的应用具有一定局限性,主要是由于其检测过程中所需BD SurePath™系统、生化分析仪、抗体、试剂盒等一系列相关检验设备经济费用相对较高,加之操作过程相对繁琐复杂,导致应用受限。但本研究在P16^{INK4A}、Ki-67与CIN分级之间具体关系方面未作详细探究,需作进一步分析与探讨。

综上所述,P16^{INK4A}、Ki-67应用于CIN鉴别诊断中,与HPV感染具有正相关关系,可在不影响诊断特异性基础上显著提高诊断准确性、敏感性,可为临床判断CIN病情程度、制定治疗方案等提供有力参考依据,但P16^{INK4A}、Ki-67及P16/Ki-67双染检测经济费用较高,临床应用受限。

(本文图1,2见插图3-4)

参考文献

- [1] VIDAL AC, SMITH JS, VALEA F, et al. HPV genotypes and cervical intraepithelial neoplasia in a multiethnic cohort in the south-eastern USA[J]. Cancer Causes Control, 2014, 25(8): 1055-1062.
- [2] 何裕, 钱德英, 陈观娣, 等. 宫颈转化区类型不同对阴道镜诊断宫颈上皮内瘤变的影响[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(12): 1918-1920.
- [3] 段志珍, 程艳香. P16^{INK4a}联合CK17在宫颈上皮内瘤变中的表达意义[J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(9): 843-846.
- [4] 郭继梅, 朱高香, 吕玲. 宫颈上皮内瘤变组织OLFM4和Ki-67表达及意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2015, 30(2): 129-131.
- [5] 陈敏. 宫颈上皮内瘤变诊治的相关研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2016, 43(4): 436-441.
- [6] 谷小乐, 石岩, 郝怀海, 等. 肿瘤标志物、微血管密度与血流参数检测宫颈癌和宫颈上皮内瘤样病变的相关性及临床意义[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(11): 1278, 1282.
- [7] KAWANA K, ADACHI K, KOJIMA S, et al. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3(CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients[J]. Vaccine, 2014, 32(47): 6233-6239.
- [8] 郑萍, 李辛辛, 林思彤, 等. 结合醋酸白试验、病理组织学与Ki67和p63表达诊断宫颈上皮内瘤变的研究[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(1): 22-26.
- [9] 洪恩. 宫颈LCT结合阴道镜及宫颈活检对宫颈上皮内瘤变和宫颈癌患者的早期诊断价值研究[J]. 实用癌症杂志, 2014, 29(7): 823-825.
- [10] 周文俊. P16、Ki-67蛋白表达与宫颈鳞状上皮病变中HPV感染的相关性分析[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(4): 48-50.
- [11] LBE DC, TRIGLIA RM, LALA A. p16INK4a, cytokeratin 7, and Ki-67 as potential markers for low-grade cervical intraepithelial neoplasia progression[J]. J Low Genit Tract Dis, 2017, 21(3): 171-176.
- [12] 李思琦, 董颖, 毕蕙, 等. 年轻妇女宫颈上皮内瘤变I~II级组织中p16~(InK4a)和Ki67的表达及意义[J]. 实用妇产科杂志, 2014, 30(4): 263-265.
- [13] 姚秀华, 黄卓敏, 王耀楷, 等. 年轻妇女宫颈鳞状上皮内病变、宫颈癌组织中P16^{INK4a}和Ki-67的表达及其预测作用[J]. 中国计划生育学杂志, 2016, 24(2): 111-113.
- [14] CIAVATTINI A, SOPRACORDEVOLE F, DI GJ, et al. Cervical intraepithelial neoplasia in pregnancy: interference of pregnancy status with p16 and Ki-67 protein expression[J]. Oncol Lett, 2017, 13(1): 301-306.
- [15] 赵义, 杨义军, 涂海健. 宫颈病变中PCNA、Ki-67的表达及其与高危型HPV感染的相关性分析[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(4): 523-526.
- [16] 付贞花, 汪炼, 凌玲, 等. 宫颈上皮内瘤样病变I级经聚焦超声治疗前后局部P16、Ki-67基因及Fas表达的变化[J]. 中国介入影像与治疗学, 2016, 13(4): 230-233.
- [17] 孔守芳, 戴淑真, 孙选, 等. Stathmin-1、P27及ki-67在宫颈上皮内瘤变的表达与残留、复发相关性的研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2015, 16(1): 19-21.
- [18] 朱长乐, 贺亚敏, 可飞. p16、Ki-67免疫组化双染法在宫颈病变诊断中的应用[J]. 诊断病理学杂志, 2014, 21(11): 封3.
- [19] 石克, 吕新全. p16、Ki-67双染在子宫颈上皮内病变病理诊断和分级中的应用[J]. 诊断学理论与实践, 2016, 15(6): 602-607.

(收稿日期: 2019-05-06, 修回日期: 2019-06-20)