

• 临床检验研究论著 •

P16 蛋白检测在预测Ⅰ级宫颈上皮内瘤变进展风险中的应用价值评价^{*}

杨君,王彬,周德平,张轩珍,彭建华,王敏

(重庆市妇幼保健院/重庆市宫颈病特色专科 400013)

摘要:目的 探讨 P16 蛋白免疫组化检测用于预测Ⅰ级宫颈上皮内瘤变(CIN I)病变进展风险的可行性。方法 选择经组织学检查确诊的 CIN I 患者 136 例,以单纯随访为临床治疗方案;采用免疫组化 SP 法检测其相应宫颈组织中 P16 蛋白表达。随访期间,间隔 6 个月复查细胞学、阴道镜,必要时重复宫颈活检。以随访第 36 个月组织学检查结果为近期病变转归结局,分析 P16 蛋白表达作为 CIN I 病变进展预测指标的可行性。**结果** CIN I 组织中 P16 蛋白阳性表达率为 40.44%(55/136)。随访 36 个月,CIN I 病变总进展率为 13.97%(19/136)。以 P16 蛋白表达评分大于或等于 6 分作为 CIN I 进展的预测指标,其灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值分别为 57.89%、93.16%、57.89%、93.16%($P < 0.01$)。**结论** P16 蛋白表达强度与 CIN I 病变转归密切相关,可作为 CIN I 进展风险的预测指标之一。

关键词:宫颈肿瘤; P16; 宫颈上皮内瘤变; 免疫组化; 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)05-0524-02

Feasibility of P16 protein in predicting the evolvement of cervical intraepithelial neoplasia I

Yang Jun, Wang Bin, Zhou Deping, Zhang Xuanzhen, Peng Jianhua, Wang Min

(The Chongqing Special Department of Cervical Disease, Chongqing Obstetric and Gynecology Hospital, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To discuss the feasibility of P16 immunohistochemistry examination in predicting the evolvement of cervical intraepithelial neoplasia(CIN) I. **Methods** 136 patients with CIN I were treated by following up only. The expression of P16 was detected by immunohistochemistry at the original time. Cytology and Colposcopy were repeated every 6 months, and on the 36th months, histology were considered the sequel of CIN I. The feasibility of the expression of P16 in predicting the evolvement of CIN I were evaluated. **Results** The positive rate of P16 in CIN I were 40.44%(55/136). There were 19 cases(13.97%,19/136) deteriorated into lesions over CIN II after 36 months. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the expression of P16 with grading more than 6 in predicting the deterioration of CIN I were 57.89%,93.16%,57.89% and 93.16% respectively($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of P16 was of value in prognosis of CIN I and could be considered one of the measurements to predict deterioration of CIN I.

Key words: uterine cervical neoplasms; P16; cervical intraepithelial neoplasia; immunohistochemistry; gene

宫颈癌是严重威胁妇女生命健康的恶性肿瘤,近年来呈年轻化趋势^[1]。随着宫颈癌早期诊断技术的完善和成熟,其癌前病变,即宫颈上皮内瘤变(CIN)的检出率不断提高,但对 CIN 的预后转归,目前尚无确切的判断方法。P16 基因又称多肿瘤抑制基因,其编码产生的 P16 蛋白是 1 种细胞周期蛋白依赖性抑制因子(CDI),可通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)而对细胞周期起负调控作用。研究表明,P16 表达异常与人乳头瘤病毒(HPV)感染所致宫颈癌密切相关^[2]。本研究通过前瞻性队列研究,分析轻度 CIN(CIN I)组织中 P16 蛋白表达强度与 CIN I 病变发展方向的关系,评价其用于预测 CIN I 进展风险的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2005 年 5 月至 2008 年 10 月于本科室就诊的患者 136 例,纳入标准为:有性生活史 3 年以上,薄层液基细胞学检查(TCT)、阴道镜下宫颈多点活检及宫颈管搔刮术(阴道镜检查满意)、组织病理学检查[按《病理学(第 5 版)》诊断标准,由 2 名以上有经验的专科病理医师检查]确诊为 CIN I 患者,且近 3 个月内未经药物及其他物理治疗,非妊娠期,无合并免疫系统疾病或服用免疫抑制药物等,本人同意、签署《知情同意书》并具备随访条件。患者年龄 18~49 岁,平均 32.80 岁。

1.2 仪器与试剂 含兔抗人 P16 多克隆抗体的免疫组化 SP 法 P16 蛋白检测试剂盒及阳性对照切片均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 宫颈组织切片及染色检查 取宫颈组织石蜡标本行 4 μm 厚连续切片,染色步骤参照试剂盒说明书。以已知阳性切片为阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。染色切片中细胞核和胞质出现棕黄色颗粒判为 P16 蛋白阳性。蛋白表达强度采用显微摄像计算机图像分析系统计算(间质细胞阳性不计人)。判定标准采用 Gatalica 半定量方法^[3],即按照染色强度(I)分为 4 级:无染色为 0,低度染色为 1,中度染色为 2,强染色为 3;按阳性细胞百分率(P)分为:P=0% 为 0 分, $0\% < P \leq 10\%$ 为 1 分, $10\% < P \leq 50\%$ 为 2 分, $51\% < P \leq 80\%$ 为 3 分, $P > 80\%$ 为 4 分;评分为计算公式为:评分 = $I \times P$,评分小于 4 分判为阴性,4~5 分为+,6~8 分为++,9~12 分为+++。

1.3.2 组织学转归 随访间隔为 6 个月,以随访第 36 个月组织学检查结果为本研究病变转归结局,随访期间因病变进展行宫颈锥切术者以术后病理检测结果为病变转归结局。转归结局包括:未发现 CIN 病变存在判为消退,CINI 病变持续存在判为持续,发现 CINII 及以上病变判为进展。随访过程中如果发现

病变进展,及时再次行宫颈活检以确定病变程度,必要时结合患者意愿行宫颈电圈切除术(LEEP)或宫颈锥切等手术治疗。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计学分析;计数资料以百分率表示,组间比较采用卡方检验或四格表确切概率检验,显著性检验水准为 0.05。

2 结 果

2.1 P16 蛋白在不同年龄段患者 CIN I 组织中的表达 P16 阳性检出率为 40.44%(55/136),其中 8 例(5.88%,8/136)为细胞核(质)内出现较粗大深染颗粒,阳性细胞分布区域相对较宽,判为十十。P16 蛋白表达强度在不同年龄段患者之间差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 1。

表 1 136 例患者 CIN I 组织中 P16 蛋白表达情况(n)

年龄(岁)	n	P16 蛋白表达强度			
		-	+	++	+++
<30	51	30	15	4	2
30~40	58	39	10	4	5
>40	27	12	11	3	1
合计	136	81	36	11	8

表 2 患者年龄及 P16 蛋白表达强度与 CIN I 病变转归的关系(n)

病变转归	n	年龄(岁)			P16 蛋白表达强度			
		<30	30~40	>40	-	+	++	+++
消退	72	31	38	3	60	11	1	0
持续	45	16	9	20	21	17	5	2
进展	19	4	11	4	0	8	5	6
合计	136	51	58	27	81	36	11	8

表 3 不同 P16 蛋白表达评分临界值作为 CIN I 病变进展预测指标的可行性

项目	评分		
	4 分	6 分	9 分
χ^2	34.03	31.33	6.67
P	<0.01	<0.01	<0.01
灵敏度(%)	100.00	57.89	31.58
特异度(%)	69.23	93.16	98.29
准确度(%)	73.53	88.24	88.97
阳性预测值(%)	34.55	57.89	75.00
阴性预测值(%)	100.00	93.16	89.84

2.2 患者年龄及 P16 蛋白表达强度与 CIN I 病变转归的关系

136 例患者皆按时完成 36 个月随访,存在病变逆转消退后重复出现现象,未发现病变进展后再自然逆转现象;总病变进展率为 13.97%(19/136),其中 2 例于随访第 12 个月、4 例于第 18 个月进展为 CIN III,4 例于第 24 个月进展为 CIN II,行宫颈 LEEP 或锥切治疗;4 例于随访第 12 个月、5 例于随访第 24 个月进展为 CIN II,因患者拒绝宫颈手术,目前仍在随访中。40 岁以上年龄组以病变持续存在最常见(74.08%,20/27),30 岁以下年龄组病变进展率最低(7.84%,4/51),差异有统计学意义($P<0.01$)。P16 蛋白表达阴性组未发现病变进展,其病

变自然消退率为 74.07%(60/81),随着 P16 蛋白表达增强,病变进展率逐渐增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。详见表 2。

2.3 不同临界值预测 CIN I 病变进展的可行性分析 分别以 P16 蛋白表达强度的 3 个等级分界点,即评分 4、6、9 分,及年龄的 2 个等级分界点,即 30 岁、40 岁为预测指标,评价其作为 CIN I 病变进展预测指标的可行性。经统计学分析,年龄作为预测指标,差异无统计学意义($P>0.05$);以 P16 蛋白表达评分为预测指标,差异有统计学意义。详见表 3。

3 讨 论

HPV 感染是较为明确的宫颈癌病因之一^[4-5]。有研究认为,从 HPV 感染正常宫颈上皮组织到浸润癌的发生,存在两种最基本状态:(1)低度病变,即组织学水平的 CIN I;(2)高度病变,即组织学水平的 CIN II、CIN III。CIN I 在大多数个体为 HPV(包括高危型及低危型)一过性感染,持续约 1 年,大部分可被机体免疫系统清除,所以,CIN 并非单向的病理生理学发展过程,尤其是 CIN I 具有较高的自然转阴率^[6]。本组病例后期随访 36 个月,自然转阴率为 52.94%(72/136)。

既往受对 CIN 认识误区的影响,存在 CIN I 过度治疗现象。美国《阴道镜与子宫颈病理协会(ASCCP)处理指南(2006)》推荐:对于阴道镜检查结果满意的 CIN I,强调单纯随访,细胞学随诊为唯一被推荐的处理选择。但目前还无确切方法确认哪些 CIN I 病变可自然消退、持续不变或进展,患者在随访过程中易出现焦虑情绪或失访率较高负面因素;另一方面,即使满意阴道镜下宫颈多点活检亦可能漏诊部分中、重度 CIN,甚至宫颈浸润癌,单纯随访亦存在一定医疗风险。所以,临幊上迫切需要更为简便、有效的检测手段,协助医生作出判断,在避免过度治疗的同时减少漏诊,及时给予恰当的临床干预。

抑癌基因 P16 基因所编码的 P16 蛋白主要通过与 cyclinD1 竞争性结合 CDk4/CDK6,抑制视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)磷酸化和转录调节因子 E2F 释放,诱导细胞 G1→S 期停滞。另一方面,P16 蛋白还可能通过抑制 sp1 与 hTERT 启动子的结合,诱导染色体端粒缩短,参与肿瘤抑制及启动细胞衰老过程。研究表明,P16 基因在多种肿瘤中发生缺失、突变、甲基化而失活低表达甚至失表达,如神经胶质瘤、食管癌、胃癌、头颈部肿瘤等,但在几乎所有高危型 HPV 阳性宫颈癌和癌前病变中过表达^[1]。推测其主要分子机制为:高危型 HPV 致癌基因 E6、E7 蛋白使宿主细胞 P53 和 Rb 基因失活,阻断了 P16 降低 pRb 磷酸化途径的活性,同时减少了 pRb-E2F 复合物,使 P16 的负反馈抑制解除,P16 过表达是宫颈癌发生的早期分子事件^[7]。Negri 等^[8]认为,P16 弥漫阳性者 CIN 进展为 CIN III 的风险明显高于 P16 阴性者。笔者通过 3 年的临床随访研究,认为以 P16 蛋白表达评分大于或等于 6 分作为临界值,预测 CIN I 进展,具有较高的灵敏度(57.89%)和特异度(93.16%),与 Negri 等^[8]的研究结果相似。

文献报道,CIN 级别随患者年龄增长而递增^[9]。本研究显示,患者年龄对 CIN I 的转归存在影响,30 岁以下年龄组,CIN I 自然转阴率相对较高而进展率低,但以年龄作为病变进展的预测指标,差异无统计学意义($P>0.05$)。考虑与小于 30 岁患者 HPV 自然清除率高有关,因此年龄不能作为独立的影响因素。

目前常用的 P16 检测技术主要有免疫组化、PCR、组织芯片技术等,其中免疫组化具有简单经济,可重复性高、客观性强等优点,已广泛应用于临床。对于组织学检查(下转第 527 页)

仅在酸性罗氏培养基培养为阳性,22 例在两种培养基培养均为阳性。变色液体基培养阳性检出率为 47.4% (109/230), 酸性罗氏基培养阳性检出率为 47.0% (108/230), 组间阳性检出率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。变色液体培养基和酸性罗氏培养基检出涂片阳性标本的平均时间为 12、18 d, 检出涂片阴性但培养阳性标本的平均时间为 23、31 d, 污染率分别为 4.4% (10/230) 和 2.2% (5/230)。

3 讨 论

加强实验室质量控制, 提高痰菌检出率, 发现传染源是治疗结核病和控制结核病流行关键措施。早期及时发现传染源更是控制结核病流行的主要环节。早期发现结核病和非结核分枝杆菌感染患者, 特别是快速发现多药耐药和泛耐药结核病患者, 对临床及时、合理使用抗菌药物, 减少疾病传播及结核病的彻底控制极为重要。如何提供有坚实的技术支持的快速诊断方法日益受到广泛关注。为此, 本研究对分枝杆菌变色液体培养基的临床应用效果进行初步探索, 以期为该检测系统的广泛推广奠定基础。

本研究中, 10 株分枝杆菌标准株在变色液体培养基和酸性罗氏培养基中均生长良好, 表明试验过程可行。变色液体培养基为营养丰富的选择性培养基, 其组成成分中的抗菌药物可抑制其他微生物生长, 而丰富的营养则可促进分枝杆菌生长, 培养基中的色素底物在活的分枝杆菌的作用下被分解而使培养基变为紫红色。

本研究中的临床标本检测表明, 64 例痰涂片阳性患者痰标本变色液体培养基和酸性罗氏培养基培养均为阳性, 说明两法具有良好可比性, 特异度为 100.0%; 230 例痰标本经两种培养基培养, 前者阳性检出率为 47.4% (109/230), 后者为 47.0% (108/230), 组间阳性检出率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。痰涂片阳性标本经变色液体培养基和酸性罗氏培养基培养, 培养阳性结果的平均检出时间为 12、18 d, 痰涂片阴性标本培养阳性结果的平均检出时间为 23、31 d, 说明变色液体培养基培养阳性结果检出时间较酸性罗氏培养基短。变色液体培养基和酸性罗氏培养基的污染率分别为 4.4% (10/230) 和 2.2% (5/230), 虽在可控制范围之内, 但有较大差

(上接第 525 页)

为 CIN I 患者, 采用 P16 蛋白免疫组化检查进行分流, 尤其是对于 P16 蛋白表达评分大于或等于 6 分, 年龄大于或等于 30 岁患者, 宜早期给予临床干预, 预防病变进展。目前, 更大样本量的临床前瞻性研究仍在进行中, 科学的临床干预方案有待进一步总结制订。

参考文献

- [1] Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, et al. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000 [J]. Cancer, 2004, 100(5): 1035-1044.
- [2] Eleuterio J Jr, Giraldo PC, Goncalves AK, et al. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2007, 86(1): 94-98.
- [3] Gatalica Z, Lele SM, Rampy BA, et al. The expression of Fhit protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma [J]. Cancer, 2000, 88(6): 1378-1383.
- [4] Graflund M, Sorbe B, Sigurdardottir S, et al. Relation between

异, 说明变色液体培养基污染率相对较高, 相关原因有待进一步深入研究。

本研究结果与王莉莉等^[12]所进行的变色液体培养基相关研究结果较为一致, 均说明变色液体培养基具有操作简便、费用低廉、无需特殊仪器, 特异度、灵敏度、可比性较好等优点, 值得在基层医疗机构推广应用。

参考文献

- [1] 珊凤玲, 王黎霞, 李亮. 中国全球基金耐多药结核病项目阶段性实施结果分析 [J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(11): 700-704.
- [2] 刘宇红, 姜广路, 赵立平, 等. 第四次全国结核病流行病学抽样调查-结核分枝杆菌耐药性分析与评价 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(4): 224-227.
- [3] 钟球, 尹建军, 钱明, 等. 广东省结核病耐药性基线调查研究 [J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(7): 393-399.
- [4] 李尚伦. 耐多药肺结核防治筹资研究综述 [J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(4): 244-247.
- [5] 韩敏, 乐军. 结核病诊断和耐药性检测新技术 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 260-262.
- [6] 吴雪琼, 张宗德, 乐军. 分枝杆菌分子生物学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 1-185.
- [7] 李鹏, 马艳娇, 夏伟, 等. 环介导等温扩增在病原诊断中应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 343-344.
- [8] 温贵华, 薛碧媚. 3 种检测方法诊断结核病结果分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(6): 507-508.
- [9] 卫生部结核病控制中心. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 7-14.
- [10] 丛玉隆, 尹一兵, 陈瑜. 检验医学高级教程 (下册) [M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 992-995.
- [11] 刘小立, 冯铁建, 梁应周. 慢性病防治工作规范 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 243-245.
- [12] 王莉莉, 张莹蓉, 胡忠义. 分枝杆菌快速变色培养基应用初探 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(8): 460-461.

(收稿日期: 2011-12-03)

HPV-DNA and expression of p53, bcl-2, p21WAF-1, MIB-1, HER-2/neu and DNA ploidy in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome [J]. Oncol Rep, 2004, 12(1): 169-176.

- [5] Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus [J]. J Formos Med Assoc, 2008, 107(3): 198-217.
- [6] 刘从容. HPV 感染的宫颈病理学进展 [J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(5): 337-339.
- [7] Eun JN. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection [J]. J Gynecol Oncol, 2008, 19(3): 162-168.
- [8] Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. P16 (INK4a) expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri [J]. Virchows Arch, 2004, 445(6): 616-620.
- [9] 张凌, 杜辉, 刘志红, 等. 年龄与 HPV 载量对细胞学阴性宫颈上皮内瘤变的辅助诊断价值 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(4): 256-260.

(收稿日期: 2011-12-10)