

• 临床研究 •

P16^{INK4A} 和 Ki-67 在宫颈腺上皮病变中的表达及意义*

王伟源, 肖小琴, 程文德, 林梅英

(深圳市龙华区中心医院病理科, 广东深圳 518110)

摘要:目的 检测 P16^{INK4A} 和 Ki-67 在宫颈腺上皮病变中的表达水平并探讨其临床意义, 为判断腺上皮病变发展趋势及宫颈腺癌的诊疗和预后评估提供客观依据。方法 选择该院病理科正常宫颈腺体 40 例(正常组), 宫颈良性腺体病变 20 例(对照组), 宫颈腺癌 20 例(观察组), 检测 P16^{INK4A} 和 Ki-67。评估各组及不同宫颈腺癌患者 P16^{INK4A} 和 Ki-67 表达水平。结果 观察组 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性评分分别为(6.60±0.32)、(3.69±0.35)分, 和阳性率分别为 75.00%(15/20)、90.00%(16/20), 均高于对照组和正常组, 对照组高于正常组, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。Ⅲ~Ⅳ期、中低分化及病灶转移患者组织 P16^{INK4A} 阳性评分分别为(7.26±0.31)、(7.41±0.33)、(7.32±0.26), Ki-67 阳性评分分别为(7.49±0.29)、(7.26±0.31)和(7.58±0.32)分, 均高于Ⅰ~Ⅱ期、高分化及未出现转移患者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。Ⅲ~Ⅳ期、中低分化及病灶转移患者组织 P16^{INK4A} 阳性率分别为 91.67%(11/12)、91.67%(11/12)、100.00%(11/11), Ki-67 阳性率分别为 100.00%(11/11)、100.00%(7/7)和 100.00%(7/7), 均高于Ⅰ~Ⅱ期、高分化及未出现转移患者, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 P16^{INK4A} 和 Ki-67 在宫颈腺上皮病变中呈现较强表达, 随着肿瘤恶化程度上升, 检测宫颈癌组织中 P16^{INK4A} 和 Ki-67 的水平, 可评估肿瘤的分化程度、分期及转移, 在临床诊治中具有重要意义。

关键词: P16; Ki-67; 宫颈腺上皮病变; 宫颈癌**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.029**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2017)13-1806-03

宫颈腺癌是宫颈腺上皮的恶性病变, 临床上常采用宫颈细胞学进行筛查, 其诊断作用较为有限。P16^{INK4A} 是一种肿瘤抑制基因, 有研究表明^[1], P16^{INK4A} 的失活、突变和甲基化不仅与肿瘤发生发展有关, 且与肿瘤细胞多药耐药亦密切相关。目前 P16^{INK4A} 在妇科肿瘤中的研究主要集中在 P16^{INK4A} 在宫颈鳞状细胞病变的作用, 与宫颈腺上皮病变的关系研究较少。Ki-67 又称细胞核增殖抗原, 是一种与细胞增殖密切相关的核抗原, 与细胞的有丝分裂有关^[2]。本研究通过检测 P16^{INK4A} 和 Ki-67 在宫颈腺上皮病变中的表达情况, 探讨宫颈良性腺体病变及宫颈腺癌的诊断与鉴别诊断中可利用的标志物并分析其临床意义, 为判断腺上皮病变发展趋势, 提高宫颈腺癌的诊疗和预后判断提供可靠的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2007 年 1 月至 2014 年 12 月龙华新区中心医院病理科正常宫颈腺体 40 例(正常组), 宫颈良性腺体病变 20 例(对照组), 宫颈腺癌 20 例(观察组), 所有病例均进行重新读片确认诊断。正常组患者年龄 28~61 岁, 平均(43.90±6.32)岁; 对照组患者年龄 29~60 岁, 平均(43.91±6.40)岁; 观察组患者年龄 30~62 岁, 平均(44.12±6.76)岁, 其中Ⅰ~Ⅱ期 8 例, Ⅲ~Ⅳ期 12 例; 中低分化 11 例, 高分化 9 例; 转移 7 例; 三组入选研究对象年龄比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法 应用免疫组化法分别检测 P16^{INK4A} 和 Ki-67 各组收集病例宫颈腺体组织中的表达情况, 主要步骤: 10%甲醛组织固定、石蜡包埋、切片, 脱蜡、梯度酒精水化; 高压 EDTA 热修复或 pH6.0 柠檬酸缓冲液抗原修复, 滴加 3% H₂O₂, 阻断内源性过氧化物, 10 min。PBS 冲洗后滴加正常非免疫血清阻断非特异反应; 分别滴加 P16^{INK4A} 和 Ki-67 一抗, 抗体工作浓度均为 1:100; 滴加相对应的二抗; 加适量底物显色液(DAB), 苏木素复染 8~10 min; 二甲苯透明; 封片观察。DAB 显色试剂

盒、兔抗人 P16^{INK4A} 和 Ki-67 单克隆抗体免疫组化试剂盒(均购自福建迈新生物技术有限公司)^[3]。

两位高年资的病理科医生进行双盲阅片, 避开肿瘤坏死及边缘区域, 建立组织阳性和阴性对照, 选择背景颜色浅淡, 阳性表达必须在细胞或组织特定的部位, 细胞边界清楚。取 5 个高倍视野, 每个视野下计数 100 个肿瘤细胞, 采用半定量积分法对每张切片的阳性细胞的染色强度分别进行分级记分, 然后根据两项之积确定其阳性强度。每张切片阳性细胞的染色强度按无着色、淡黄色和棕褐色分别计分为 0、1、2、3 分, 按阳性细胞面积计 0 分为 0%~<1%、1 分为 1%~25%、2 分为 >25%~50%、3 分为 >50%~75%、4 分为 >75%~100%。根据两项打分之积判断结果: 0 分为阴性(-), ≤3 分阳性(+), 4~6 分为中度阳性(++), ≥7 分为强阳性(+++)^[4]。

主要观察各组患者组织 P16^{INK4A} 和 Ki-67 水平, 并观察不同分期、肿瘤类型、分化程度、淋巴结转移及治疗前后 P16^{INK4A} 和 Ki-67 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 对数据进行统计学处理, 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 计数资料比较用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组宫颈(癌)组织 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性结果比较 P16^{INK4A} 和 Ki-67 经免疫组化染色, 阳性均为细胞质呈黄色或棕黄色颗粒。观察组 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性评分分别为(6.60±0.32)、(3.69±0.35), 阳性率分别为 75.00%(15/20)、90.00%(16/20), 均高于对照组和正常组, 对照组高于正常组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 宫颈癌不同分期、分化程度和转移患者组织 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性结果比较 Ⅲ~Ⅳ期、中低分化及病灶转移患者组织 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性评分和阳性率均高于Ⅰ~Ⅱ期、高分化及未出现转移患者, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 2。

* 基金项目: 深圳市龙华新区科技创新项目(20140917A1030031)。

表 1 各组宫颈(癌)组织 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性结果比较

组别	n	P16 ^{INK4A}		Ki-67	
		评分(分)	阳性率[n(%)]	评分(分)	阳性率[n(%)]
正常组	40	1.04±0.21	2(5.00)	1.15±0.27	1(2.50)
对照组	20	3.51±0.29 [△]	9(45.00) [△]	3.69±0.35 [△]	10(50.00) [△]
观察组	20	6.60±0.32 ^{△▲}	15(75.00) ^{△▲}	6.87±0.30 ^{△▲}	16(90.00) ^{△▲}

注:△与正常组比较,▲与对照组比较,差异具有统计学意义(P<0.05)。

表 2 宫颈癌不同分期、分化程度和转移患者组织 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性结果比较

组别		n	P16 ^{INK4A}		Ki-67	
			评分(分)	阳性率[n(%)]	评分(分)	阳性率[n(%)]
临床分期	I~Ⅱ期	8	6.13±0.28	4(50.00)	5.92±0.27	5(62.50)
	Ⅲ~Ⅳ期	12	7.26±0.31 [△]	11(91.67) [△]	7.41±0.33 [△]	11(91.67) [△]
分化程度	高分化	9	6.05±0.30	4(44.44)	6.11±0.34	5(55.56)
	中低分化	11	7.32±0.26 [△]	11(100.00) [△]	7.49±0.29 [△]	11(100.00) [△]
转移	否	13	6.13±0.28	8(61.54)	5.87±0.24	9(69.23)
	是	7	7.26±0.31 [△]	7(100.00) [△]	7.58±0.32 [△]	7(100.00) [△]

注:△分别与 I~Ⅱ期、高分化和未出现转移患者比较,差异具有统计学意义(P<0.05)。

3 讨 论

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤,其发病率呈上升趋势且发病年龄逐渐年轻化。早期宫颈癌行根治性手术切除可取得较好的临床疗效,因此,寻找宫颈癌的客观性指标以进行早期诊断,具有重要的临床意义。P16^{INK4A} 是一种 P16 基因编码产物,为 P16 蛋白的简称,位于人染色体 9p21^[5]。Ki-67 蛋白又称细胞核增殖抗原,是一种 DNA 结合蛋白,位于人类第 10 号染色体,由 15 个外显子组成,作为一种细胞增殖标记物在临床诊治中越来越引起关注^[6]。

有研究认为^[7],P16^{INK4A} 基因以缺失、突变方式参与肿瘤形成,P16^{INK4A} 基因甲基化是宫颈癌发生的早期事件,反映了细胞增殖状态和肿瘤的发生发展。Ki-67 表达于 G₀ 期以外处于其他细胞周期的细胞,可判断细胞的增殖活性,是确定良、恶性组织生长状态的重要标记物。本次研究结果显示,观察组 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性评分和阳性率均高于对照组和正常组,差异均具有统计学意义(P<0.05)。提示 P16^{INK4A} 和 Ki-67 在良性的宫颈上皮中基本呈阴性表达,在 P16^{INK4A} 和 Ki-67 在宫颈腺上皮病变中的表达呈现上升趋势,且随着宫颈肿瘤恶化程度的增加组织中阳性强度也增加。宫颈癌的发生、发展是渐进的过程,细胞的过度分裂与增殖是肿瘤恶变的重要环节,P16^{INK4A} 可直接参与细胞周期调控,调控点位于 G₀ 至 S 期的限制点,在正常细胞,P16^{INK4A} 与细胞周期受周期素(cyclin)及依赖性激酶(CDK)结合,形成 P16^{INK4A}-cyclinD-CDK4 复合物,磷酸化灭活视网膜母细胞瘤蛋白(pRb),促进转录因子的释放,使细胞由 G₁ 期进入 S 期。P16^{INK4A} 的过表达使 P16^{INK4A} 精细调节级联反应出现失控,促进细胞由 G₁ 期进入 S 期,诱导宫颈上皮细胞恶性转变^[8-9]。Ki-67 作为核增殖抗体,表达于增殖期细胞中。Ki-67 表达于细胞进入 G₁ 期开始时,在 S 期和 G₂ 期逐渐升高,M 期达到高峰,而在有丝分裂后迅速减少,与细胞增殖存在正相关性,可判断细胞的增殖活性^[10]。本次研究结果显示随着肿瘤分期的增加、分化程度的降低及病灶转移,患者组织 P16^{INK4A} 和 Ki-67 阳性评分和阳性率呈现增加趋势,进一步证实 P16^{INK4A} 和 Ki-67 反映了细胞的增殖状态,在宫

颈癌的发生发展中扮演着重要角色。宫颈癌在早期病变时,P16^{INK4A} 和 Ki-67 呈现低表达,随着肿瘤的恶化和肿瘤的侵袭性增加,P16^{INK4A} 和 Ki-67 呈现高表达,一定程度上反映了肿瘤细胞的增殖活性。

综上所述,P16^{INK4A} 和 Ki-67 在宫颈腺上皮病变中呈现较强表达,随着肿瘤恶化程度的增加而上升,检测宫颈癌组织中 P16^{INK4A} 和 Ki-67 的水平,可判断肿瘤的分化程度、分期及转移,在临床诊治中具有重要意义。

参考文献

[1] 段志珍,程艳香. P16^{INK4A} 联合 Ki-67 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.

[2] Novak M, Lester J, Karst AM, et al. Stathmin 1 and p16 (INK4A) are sensitive adjunct biomarkers for serous tubal intraepithelial carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2015, 139(1):104-111.

[3] 张燕,王一,王建华,等. p16、Ki-67 在 440 例宫颈病变中的表达及其病理诊断价值[J]. 诊断病理学杂志,2013,20(3):171-175.

[4] 胡高峰,续薇. p16 INK4a 检测应用于宫颈癌筛查的研究进展[J]. 临床检验杂志,2015,33(9):705-708.

[5] 石婷,孙立新. 宫颈腺癌早期诊断及预后研究进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2015,9(10):154-158.

[6] Uguen A, Conq G, Doucet L, et al. Immunostaining of phospho-histone H3 and Ki-67 improves reproducibility of recurrence risk assessment of gastrointestinal stromal tumors[J]. Virchows Arch, 2015, 467(1):47-54.

[7] 宋丽君,陈碧. P16 INK4A 在宫颈不典型鳞状细胞涂片中的表达特点及与 HPV 感染的关系[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(20):3330-3333.

[8] 刘丽娜,李瑶,杨永秀,等. MCM5 和 P16 INK4A 在宫颈鳞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 西安交通大学学报

(医学版),2015,36(6):825-829.
[9] 董永学. 宫颈病变 PCNA、Ki-67 表达检测及其与 HPV 感染相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36 (21): 3083-3085.
[10] 易韦,张著学,吴倩,等. IMP3, Ki-67 和 P16 INK4a 表达
• 临床研究 •

与宫颈上皮内瘤变发生发展相关性[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30 (25): 4379-4381.

(收稿日期:2017-02-02 修回日期:2017-04-06)

血清 AFU 联合 GP73 在原发性肝癌诊断中的应用价值*

杨 涛¹, 刘 侃², 邹继华³, 贾江花³, 黎 鹏³

(1. 湖北省荆州市中医医院, 湖北荆州 315104; 2. 哈尔滨二四二医院检验科, 哈尔滨 150060;
3. 美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104)

摘 要:目的 探讨血清 a-L-岩藻糖苷酶(AFU)、高尔基体蛋白 73(GP73)在原发性肝癌(HCC)早期诊断中的应用价值及其与临床病理特征的关系。方法 2014 年 6 月至 2016 年 6 月应用 ELISA 法测定 120 例 HCC 患者, 120 例肝硬化患者, 120 例慢性乙型肝炎患者及 100 例健康对照者血清 AFU、GP73 水平, 比较各组血清 AFU、GP73 阳性表达情况, 分析血清 AFU、GP73 阳性表达与 HCC 患者临床特征的关系, 应用受试者特异度曲线(ROC)分析血清 AFU、GP73 在肝癌中的应用价值。结果 HCC 组血清 AFU、GP73 水平及阳性表达率高于肝硬化组、慢性肝炎组及对照组($P<0.05$), 而肝硬化组血清 AFU、GP73 水平及阳性表达率高于慢性肝炎组及对照组($P<0.05$), 而慢性肝炎组血清 AFU、GP73 水平及阳性表达率与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。HCC 组中, 不同浸润程度、临床分期、淋巴转移、血管侵犯、Child-Pugh 分级患者的血清 AFU 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$), 不同肿瘤分期、血管侵犯、淋巴结转移、Child-Pugh 分级的患者 GP73 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$)。血清 AFU 诊断肝癌灵敏度为 93.33%, 特异度为 96.00%, 准确率为 94.54%; GP73 诊断肝癌的灵敏度为 90.00%, 特异度为 96.00%, 准确率为 92.73%。结论 血清 AFU、GP73 表达水平升高与 HCC 发生及病情进展有密切的关系。通过测定血清 AFU、GP73 水平将有助于评价 HCC 发生及病情进展情况。

关键词: a-L-岩藻糖苷酶; 高尔基体蛋白 73; 原发性肝癌; 临床病理

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.030 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)13-1808-04

原发性肝癌(HCC)被认为是临床上恶性程度最高的肿瘤之一,其具有病情进展快、侵袭性强、预后差、病死率高等特点^[1]。早期 HCC 临床症状不典型,当患者觉察不适时大多数病情已经发展到一定程度,已失去最佳手术时机,因此尽早诊断及预防以提高患者生存期限具有重要的意义。目前 HCC 诊断方法除了依靠病理学、影像学检查外,肿瘤血清标记物检测在 HCC 早发现、早诊断中也起到重要的作用^[2]。血清 a-L-岩藻糖苷酶(AFU)主要存在于哺乳动物体细胞内,参与机体中各种糖蛋白、糖脂、黏多糖等大分子分解,近年相关研究认为 AFU 异常表达与恶性肿瘤的发生、侵袭、转移等病理生理过程有密切的关系^[3]。高尔基体蛋白 73(GP73)属于高尔基体Ⅱ型跨膜蛋白,在正常生理状况下,GP73 主要存在胆管上皮细胞中,而在肝脏细胞中基本不表达或表达量极低,但在肝脏病变或肝组织损伤中,肝细胞会大量释放 GP73 至血液中,使血清中 GP73 水平明显升高。近年国内外已开展 GP73 在肝癌诊断方面的研究^[4]。因此本研究应用 ELISA 法测定肝癌患者血清 AFU、GP73 水平,并结合临床病理特征,探讨 AFU、GP73 表达与肝癌侵袭、转移及预后的关系及其对肝癌诊断的临床价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 6 月至 2016 年 6 月选取荆州市中医医院肿瘤科收治的 120 例 HCC 患者为 HCC 组,纳入标准:患者 Karnofsky 功能状态评分(KPS)≥60 分;患者均经病理组织学、影像学确诊;均签署知情同意书。排除标准:免疫系统抑制

者;预计生存期限小于 6 个月者;活动性胃肠出血、凝血功能障碍者;合并其他部位恶性肿瘤者。其中男 65 例,女性 55 例,年龄为 48~74 岁,平均(56.8±3.2)岁。肿瘤直径小于 5 cm 62 例,≥5 cm 58 例;血管侵犯 75 例;分化程度:低分化 48 例,中分化癌 32 例,高分化癌 40 例;TNM 分期:Ⅰ期 42 例,Ⅱ期 33 例,Ⅲ期 28 例,Ⅳ期 17 例;淋巴结转移 68 例,无淋巴结转移 52 例;肿瘤浸润:T1~T2 62 例,T3~T4 58 例;Child-Pugh 分级:A 级 50 例,B 级 70 例。另选取 120 例肝硬化患者纳入肝硬化组,符合《肝硬化的诊断标准和治疗方案》相关诊断,经影像学及病理组织学确诊,其中男 54 例,女 66 例,年龄 42~78 岁,平均(56.5±3.7)岁。选取 120 例慢性乙型肝炎患者纳入慢性肝炎组,符合《慢性乙型肝炎防治指南》中相关诊断标准,患者经血清学确诊,其中男 58 例,女 62 例,年龄 52~76 岁,平均(57.2±2.8)岁。选取 100 例健康体检者为对照组,其中男 48 例,女 52 例,年龄 48~78 岁,平均(56.9±3.4)岁。各组性别构成比、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 检测方法 所有入组人群均在治疗前或是体检时进行外周静脉血的空腹采集,采集外周静脉血 4 mL,放置 30 min 后进行离心,采用北京同德创业科技有限公司提供的 TD4ZWS 型号离心机,离心速率为 3 000 r/min,离心半径为 5 cm,分离血清。利用电化学发光法对 AFU、GP73 进行检测,检测结果放入全自动免疫分析仪中分析(罗氏 Cobas e601 美国贝克曼),实验遵守说明书上的操作严格进行,试剂选择罗氏原装进

* 基金项目:国家海洋经济创新发展区域示范项目(2014-09)。