

· 论 著 ·

p16、Ki-67 和 CK7 在宫颈癌前病变中的表达及临床意义*

王维俊, 吴 强[△]

(南京医科大学附属肿瘤医院/江苏省肿瘤医院/江苏省肿瘤防治研究所妇瘤科, 江苏南京 210008)

摘要:目的 探讨 p16 蛋白(p16)、Ki-67 抗原(Ki-67)及细胞角蛋白 7(CK7)在宫颈癌前病变中的表达及临床意义。方法 选取 2014 年 1 月至 2017 年 3 月收治的 96 例宫颈上皮内瘤样变(CIN)患者的石蜡组织标本, 并按病变程度将其分为 CIN I 组(25 例)、CIN II 组(36 例)和 CIN III 组(35 例), 同时选取 64 例慢性宫颈炎患者的石蜡组织标本为对照组, 采用免疫组化 SP 法检测各组 p16、Ki-67 和 CK7 阳性表达率及表达模式, 评价其对宫颈癌前病变的诊断效能。结果 CIN I 组、CIN II 组和 CIN III 组 p16、Ki-67 和 CK7 的阳性表达率均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); p16、Ki-67 和 CK7 表达总评分与宫颈癌前病变程度具有一致性($Kappa$ 值分别为 0.546、0.628、0.349); 受试者工作特征曲线分析结果显示, p16、Ki-67 和 CK7 联合检测的曲线下面积(0.978)高于各项单独检测(0.930、0.966、0.837), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 p16、Ki-67 和 CK7 的表达与宫颈病变程度具有相关性, 且三者联合检测有利于提高对宫颈癌前病变的诊断效能, 可应用于宫颈病变的辅助诊断及高风险进展宫颈癌前病变的预测。

关键词:宫颈癌前病变; p16 蛋白; 增殖细胞核抗原 Ki-67; 细胞角蛋白 7

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3091-04

Expression and clinical significance of p16, Ki-67 and CK7 in cervical precancerous lesion*

WANG Weijun, WU Qiang[△]

(Department of Gynecological Oncology, Affiliated Tumor Hospital of Nanjing Medical University/Jiangsu Provincial Tumor Hospital/Jiangsu Provincial Tumor Prevention and Treatment Institute, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of p16 protein(p16), Ki-67 antigen(Ki-67) and cytokeratin 7(CK7) in cervical precancerous lesion. Methods The paraffin embedded tissue samples in 96 cases of cervical intraepithelial neoplasia(CIN) from January 2014 to March 2017 were selected and divided into the CIN I group(25 cases), CIN II group(36 cases) and CIN III group(35 cases) according to the lesion severity; meanwhile the paraffin embedded tissue samples in 64 cases of chronic cervicitis were selected as the control group. The positive expression rates and expression modes of p16, Ki-67 and CK7 in different degrees of cervical lesion tissue were detected by adopting the immunohistochemistry method. Results The positive expression rates of p16, Ki-67 and CK7 in the CIN I, II and III groups were significantly higher than those in the control group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The total score of p16, Ki-67 and CK7 had consistency with the degree of cervical precancerous lesions($Kappa$ values were 0.546, 0.628 and 0.349 respectively). The receiver operating characteristic curve analysis results showed that the area under the curve of p16, Ki-67 and CK7 combined detection was higher than that of single detection of these 3 indexes(0.978 vs. 0.930, 0.966, 0.837), the difference was statistically significant($P < 0.05$). Conclusion The expression of p16, Ki-67 and CK7 has the correlation with the degree of cervical precancerous lesions. Their joint detection is helpful to improve the diagnostic efficiency of cervical precancerous lesions and could be used in the assisted diagnosis of cervical lesion and prediction of high risk progress cervical precancerous lesion.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia; p16; Ki-67; CK7

宫颈癌发病率居我国妇科恶性肿瘤的首位^[1], 且发病呈现年轻化趋势。宫颈上皮内瘤变(CIN)是宫颈癌的癌前病变^[2], 主要反映宫颈癌发生发展的连续过程, 而这一癌变进程中涉及了大量的分子及细胞生物学的变化, 并伴随着特异性基因和蛋白的表达。宫颈癌的筛查目标是早期检出不同程度 CIN 并识别具有高风险进展的癌前病变, 但形态学诊断并不能准确预测 CIN 的进展, 生物学标记物是否有助于筛查出易进展为癌的上皮内病变已成为研究的重点领域。故探讨宫颈癌及宫颈癌前病变中的特异性分子生物学标记物成为目前研究的热点, 国外研究提示同时进行多个标志物的监测能提高预测 CIN 转归的准确性^[3-4]。近年的研究已证实 p16 蛋白(p16)是临床应用较

多的一种标记物, Ki-67 抗原(Ki-67)是目前一种反映肿瘤细胞增殖指数较理想的标志物, 而细胞角蛋白 7(CK7)在宫颈病变诊断中的研究报道在国内比较少见。本研究旨在探讨宫颈癌前病变中分子生物学标记物 p16、Ki-67 和 CK7 的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2017 年 3 月南京医科大学连云港临床医学院确诊的 96 例 CIN 患者的宫颈石蜡组织标本进行研究, 并按病变程度将其分为 CIN I 组(25 例)、CIN II 组(36 例)和 CIN III 组(35 例), 另选取同期经病理确诊的 64 例慢性宫颈炎患者的宫颈石蜡组织标本为对照组。本研究经

* 基金项目:江苏省干部保健课题(BJ14019)。

作者简介:王维俊,女,主任医师,主要从事妇科肿瘤研究。 △ 通信作者, E-mail:qiangw88@126.com。

南京医科大学连云港临床医学院伦理委员会讨论并通过,并经患者知情同意并签署患者知情同意书。所有研究对象未经免疫治疗,年龄 28~56 岁,平均 43 岁,排除妊娠与产褥期患者。各组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法 采用免疫组化过氧化物酶标记链霉卵白素(SP)法检测不同程度宫颈病变组织中 p16、Ki-67 和 CK7 表达水平。兔抗人 p16 单克隆抗体(克隆号 AbM51100, 批号 1703377)、兔抗人 Ki-67 单克隆抗体(克隆号 SP6, 批号 1706031)、兔抗人 CK7 单克隆抗体(克隆号 OV-TL12/30, 批号 1706145)和 SP 试剂盒(SP-9002)均购自广州安必平公司,操作按试剂盒说明书进行。

1.3 判定标准 以出现淡黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达,p16 阳性表达位于细胞质和/或细胞核,Ki-67 阳性表达位于细胞核,CK7 阳性表达位于细胞质。采用组织学评分,按照各自染色程度和染色细胞数进行综合量化分析,表达结果由两位经验丰富的病理科医师分别独立判定。染色强度:无着色

为 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。阳性细胞所占百分比: $<10\%$ 为 0 分, $11\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $50\% \sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分。以染色强度与阳性细胞所占百分比评分的乘积为总评分:0 分为阴性表达(-),1~3 分为弱阳性(+),4~6 分为中等阳性(2+),7~9 分为强阳性(3+)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Kappa 检验分析 p16、Ki-67 和 CK7 表达总评分与宫颈癌前病变程度的一致性;采用受试者工作特征(ROC)曲线分析指标的诊断效能;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 p16、Ki-67 和 CK7 表达情况 CIN I 组、CIN II 组和 CIN III 组 p16、Ki-67 和 CK7 阳性率逐渐上升,与对照组比较差异有统计学意义(χ^2 值分别为 129.339、128.519、61.150, $P<0.01$)。见表 1、图 1。

表 1 各组 p16、Ki-67 和 CK7 表达情况

组别	p16					Ki-67					CK7				
	- (n)	+(n)	2+(n)	3+(n)	阳性率(%)	- (n)	+(n)	2+(n)	3+(n)	阳性率(%)	- (n)	+(n)	2+(n)	3+(n)	阳性率(%)
对照组	54	10	0	0	15.6	43	19	1	1	32.3	50	8	5	1	21.5
CIN1 组	10	13	2	0	60.0	0	15	10	0	100.0	8	11	5	1	68.0
CIN2 组	1	5	21	9	97.2	0	2	21	13	100.0	7	4	18	8	80.6
CIN3 组	0	0	4	31	100.0	0	0	1	34	100.0	2	6	11	7	94.3
χ^2			129.339					128.519							61.150

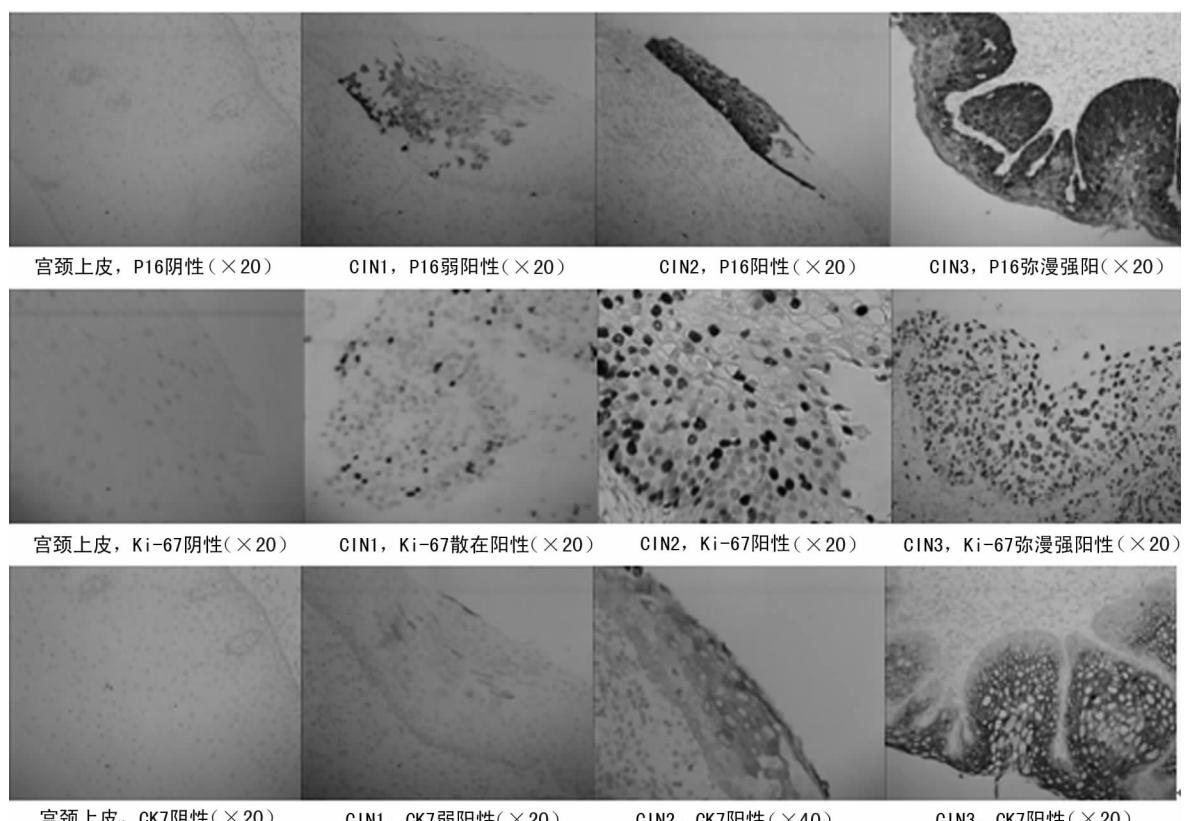


图 1 p16、Ki-67 和 CK7 在不同病变组织中的表达

2.2 p16、Ki-67 和 CK7 表达总评分与宫颈癌前病变程度的一致性 p16、Ki-67 和 CK7 表达总评分与宫颈癌前病变程度具

有一致性,其 Kappa 值分别为 0.546、0.628 和 0.349($P<0.05$)。p16、Ki-67 与宫颈癌前病变程度的一致性高于 CK7。

2.3 各指标单独及联合检测对宫颈癌前病变的诊断价值
p16、Ki-67 和 CK7 单独检测的曲线下面积分别为 0.930、0.966 和 0.837, 与三者联合检测的曲线下面积(0.978)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。三者联合检测的灵敏度为 0.939, 低于 Ki-67, 但明显高于 p16、CK7, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 三者联合检测的特异度为 0.924, 低于 p16, 但明显高于 Ki-67、CK7, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各指标单独及联合检测对宫颈癌前病变的诊断价值

检测指标	灵敏度(%)	特异度(%)	曲线下面积
p16	0.878	0.955	0.930
Ki-67	0.949	0.879	0.966
CK7	0.806	0.818	0.837
p16、Ki-67 和 CK7 联合	0.939	0.924	0.978

3 讨 论

宫颈癌是妇女常见的恶性生殖道肿瘤, 发病率仅次于乳腺癌, 在我国位居女性恶性生殖道肿瘤之首, 且发病呈现年轻化趋势。CIN 是宫颈癌的癌前病变, 由 CIN 发展形成宫颈浸润癌的病程大约 10 年。CIN I 是一种不稳定状态, 大约有 60% 的患者可以自行消退, 另有部分患者可能发展为高级别 CIN^[5]。基于形态学进行 CIN 等级分类并不能有效反映其发展为宫颈癌的风险, 故宫颈病变的生物学标记物成为本领域研究的热点。

目前对宫颈癌及其癌前病变的肿瘤性增殖现象研究较多。p16 可作为宫颈癌变程序启动的重要分子生物学标志, 在宫颈癌的癌前病变的早期诊断中具有一定的临床价值^[6]。有学者对 CIN 患者进行回顾性研究, 发现 p16 表达水平与 CIN 进展为癌有关, 提示 p16 是判定 CIN 病变转归的有价值的标志物^[7]。以往许多研究发现, 几乎所有高级别 CIN 中都能检测到 p16 表达, 而在不成熟化生或萎缩等反应性病变中, p16 表达都是阴性或仅有局灶性表达。因此, p16 表达在高级别 CIN 中具有无可争议的重要意义^[8-9]。本研究结果显示, p16 在慢性宫颈炎组织中无阳性表达或仅少量表达, 其阳性表达强度随着宫颈病变程度的加重而逐渐增强, 在 CIN 各级别中的阳性表达率逐渐上升, p16 表达的总评分与宫颈癌前病变程度有一致性($Kappa$ 值为 0.546, $P < 0.05$)。但有文献指出, p16 单一免疫组织化学染色法需要通过形态学分析来区分上皮内病变细胞和正常宫颈细胞, 因正常细胞(如化生细胞)偶尔也会过表达 p16, 这是对异常鳞状上皮分化的应激反应^[10]。

Ki-67 是一个优于增殖细胞核抗原指数、DNA 指数等增殖的指标^[11], 其作为一种提示细胞增殖活性的常见核蛋白, 与肿瘤分化、浸润、转移等均存在明显相关性^[12]。近年来, 有关 Ki-67 的异常表达与肿瘤发生、发展的关系研究已成为肿瘤分子生物学研究的热点。谢丽等^[13]研究认为, Ki-67 在定量分析肿瘤的生长、肿瘤的分级、增生程度和预后的判断中均有意义。国内外研究一致认为, Ki-67 是鉴别正常宫颈、低级别 CIN、高级别 CIN 及宫颈癌的有效指标。但也有研究指出, Ki-67 在良性反应性增生与 CIN I 中也可以表达, 故在鉴别宫颈病变时最好与其他指标联合使用^[14]。本研究结果显示, Ki-67 表达强度随宫颈病变级别的升高而增高($P < 0.05$), 其表达的总评分与宫颈癌前病变程度具有一致性。这表明 Ki-67 表达是细胞增殖活性的体现, 与宫颈病变呈正相关, 对细胞恶性程度和预后

具有一定的提示作用, 对 CIN 的进展有较好的预测价值。

目前, 关于 CIN 病变的细胞分化的研究较少, CK7 是与细胞分化相关的上皮细胞特征性标记物, 其表达具有组织特异性、细胞特异性和分化特异性。近年来细胞角蛋白的研究集中在肿瘤的诊断方面, 即利用细胞角蛋白在上皮细胞表达的特异性来确定肿瘤的分类、分型或者来源, 特别是判定肿瘤早期微小转移灶及监测、评价肿瘤预后等^[15], 有国外学者研究提示 CK7 可以作为 CIN I 可能进展为高级别病变的生物标记物^[16]。本研究发现: CK7 在低级别及高级别 CIN 中阳性表达, 但前者多以弱阳性为主, 其表达范围与强度随着宫颈病变级别的升高明显增加($P < 0.05$); CK7 阳性表达细胞分布于上皮的全层, 尤其下 1/3 的基底层和基底上层。这表明 CIN I 有分化成熟的趋势, CIN II 和 CIN III 中出现细胞分化紊乱。ROC 曲线分析结果显示, p16、Ki-67 和 CK7 联合检测的曲线下面积(0.978)高于三者单独检测(分别为 0.930、0.966 和 0.837), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。这提示 CK7 可以作为宫颈病变的生物学标记物, 可用于早期诊断和预测进展。有国外学者指出, CK7 表达阳性的 CIN I 更有可能进展为 CIN III, 同时 CK7 也可能是 CIN III 进展为宫颈癌的预测标记物^[17], 这与本研究结果相一致。也有研究表明, 在高危型人乳头状病毒感染的宫颈病变同时伴有 p16 和 CK7 表达阳性则可预测其进展为高级别的癌前病变的可能性更大^[18]。

综上所述, p16、Ki-67 和 CK7 在 CIN 中均呈高表达, 而在慢性宫颈炎中呈低表达或不表达, 三者阳性率在癌前病变的演变过程中逐渐上升, 与病变程度相一致, 三者联合检测可以提高诊断灵敏度和特异性, 可运用于宫颈病变的辅助诊断及对高风险进展宫颈癌前病变的预测。

参考文献

- Chen WP. Cancer statistics in China [J]. Canc Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- Camargo MJ, Russomano FB, Tristão MA, et al. Large loop versus straight-wire excision of the transformation zone for treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial of electrosurgical techniques [J]. BJOG, 2015, 122(4): 552-557.
- Su MK, Lee JU, Lee DW, et al. The prognostic significance of p16, Ki-67, p63, and CK17 expression determined by immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia [J]. Korean J Obstet Gynecol, 2011, 54(4): 184-191.
- Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions [J]. Hum Pathol, 2011, 42(7): 1007-1012.
- 张为远, 武明辉, 张淑文, 等. 2007—2008 年北京地区 25~54 岁已婚妇女宫颈上皮内瘤变的流行病学现状调查 [J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(3): 161-164.
- 杨君, 周德平, 王彬, 等. 宫颈上皮内瘤变组织中 P16 蛋白表达与 HR-HPV 病毒载量的相关性研究 [J]. 实用妇产科杂志, 2014, 30(1): 43-45.
- Da CL, Triglia RM, Fran AM, et al. p16 (INK) (4a) expression as a potential marker of low-grade cervical intraepithelial neoplasia progression [J]. APMIS, 2015, 123(3): 185-189.

(下转第 3096 页)

有研究报道抗-HI 抗体阳性患者可因输血引起急性或迟发性溶血性输血反应。Ibanez 等^[9]报道,1 例镰状细胞贫血患者因产生联合抗体,经筛选对应阴性抗原的 O 型红细胞输血后,抗-HI 抗体导致迟发性溶血性输血反应的发生。Darabi 等^[10]也报道,1 例 A1 型患者体内存在抗-HI 抗体,在输注 1 袋抗人球蛋白法配血阴性的同型红细胞后,出现急性溶血性输血反应,后经调查发现该献血者与受血者在盐水介质中配血为阳性,抗人球蛋白配血为阴性,献血者血型为 A2 亚型,但在后续治疗过程中,患者保温输注 A1 型红细胞,无输血不良反应发生。红细胞上 H 抗原量的分布为:O>A2>B>A2B>A1>AB^[11],文献报道的这 2 例患者均由于输入 H 抗原水平较高的 O 型或 A2 亚型红细胞引起溶血性输血反应。一般认为在 37 °C 有反应活性的抗体为有临床意义的抗体,无反应活性的抗体认为无临床意义或临床意义不大,但从文献报道来看,室温有反应的抗体也不能忽略^[12]。本研究中 2 例治疗用血患者输注了 ABO 同型且盐水试管法和 IAT 配血结果均相合的血液成分,输血后 Hb 水平上升达到预期结果,未发生输血不良反应。

综上所述,为抗-HI 抗体阳性患者输血时,应选择 ABO 同型且盐水试管法和 IAT 配血结果均相合的血液,防止发生输血不良反应。

参考文献

- [1] Daniels G. ABO, H, and Lewis systems: Human blood groups[M]. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 11-95.
- [2] Rosenfield RE, Schroeder R, Ballard R, et al. Erythrocytic antigenic determinants characteristic of H, I in the presence of H^[IH], or H in the absence of i^[H(-i)][J]. Vox Sang, 1964, 9(4): 415-419.
- [3] Campbell SA, Shirey RS, King KE, et al. An acute hemo-

(上接第 3093 页)

- [8] Van Der Marel J, Van Baars R, Alonso I, et al. Oncogenic human papillomavirus-infected immature metaplastic cells and cervical neoplasia[J]. Am J Surg Pathol, 2014, 38(4): 470-479.
- [9] Pino MD, Garcia S, Fusté V, et al. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1[J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 201(5): 488e1-488e7.
- [10] Dijkstra MG, Heideman DA, Roy SC, et al. p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions [J]. J Clin Pathol, 2010, 63(11): 972-977.
- [11] Duchrow M, Gerdes J, Schluter C, et al. The proliferation-associated Ki67 protein: definition in molecular terms[J]. Cell Prolif, 1994, 27(5): 235-242.
- [12] 汪勤,解正新,张卫琴. p16, p53 和 Ki-67 蛋白在宫颈上皮内瘤变中的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(5): 551-553.
- [13] 谢丽,安瑞芳. Ki67 在妇科肿瘤中的研究与应用[J]. 国外

lytic transfusion reaction due to anti-IH in a patient with sickle cell disease[J]. Transfusion, 2000, 40(7): 828-831.

- [4] 于洋,孙晓琳,马春娅,等. 61 例自身免疫性溶血性贫血者血型血清学特征及输血疗效评估[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(5): 1275-1279.
- [5] 刘景汉,汪德清. 临床输血学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 401-406.
- [6] Joshi SR, Vasantha K, Robb JS. An unusual anti-H lectin inhibited by milk from individuals with the Bombay phenotype[M]. Immunohematology, 2005, 21(1): 1-4.
- [7] Klein HG, Anstee DJ. Mollison's blood transfusion in clinical medicine[M]. 11th ed. Malden: Blackwell Publishing, 2005: 142-143.
- [8] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 89-90.
- [9] Ibanez C, Habibi A, Mekontso-Dessap A, et al. Anti-HI can cause a severe delayed hemolytic transfusion reaction with hyperhemolysis in sickle cell disease patients[J]. Transfusion, 2016, 56(7): 1828-1833.
- [10] Darabi K, Makar RS. Acute hemolysis of transfused A2 red cells by an auto-HI antibody[J]. Transfusion, 2008, 48(5): 964-968.
- [11] Reid ME, Lomas-Francis C. The blood group antigen factsbook[M]. 2nd ed. London: Academic press, 2004: 35-37.
- [12] Leger RM, Garratty G. Weakening or loss of antibody reactivity after prewarm technique[J]. Transfusion, 2003, 43(11): 1611.

(收稿日期:2017-03-20 修回日期:2017-07-09)

医学(妇幼保健分册), 2004, 15(6): 391-392.

- [14] 仲文玉,董建春,宋秀娥. Survivin、Ki67 在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达意义[J]. 中外医疗, 2009, 28(8): 55-56.
- [15] Lambaudie E, Chereau E, Pouget N, et al. Cytokeratin 7 as a predictive factor for response to concomitant radio-chemotherapy for locally advanced cervical cancer: a preliminary study[J]. Anticancer Res, 2014, 34(1): 177-181.
- [16] Mills AM, Paquette C, Terzic T, et al. CK7 immunohistochemistry as a predictor of CIN1 progression: a retrospective study of patients from the quadrivalent HPV vaccine trials[J]. Am J Surg Pathol, 2017, 41(2): 143-152.
- [17] Paquette C, Mills AM, Stoler MH. Predictive value of cytokeratin 7 immunohistochemistry in cervical low-grade squamous intraepithelial lesion as a marker for risk of progression to a high-grade lesion[J]. Am J Surg Pathol, 2016, 40(2): 236-243.

(收稿日期:2017-04-12 修回日期:2017-07-13)