

• 论 著 •

P16、Ki-67 蛋白表达及 HPV 检测在宫颈上皮内瘤变中的意义*

张 坤^{1,2}, 刘 慧^{1△}, 白 石²

(1. 徐州医科大学, 江苏徐州 221002; 2. 宿迁市钟吾医院病理科, 江苏宿迁 223800)

摘要:目的 探讨 P16、Ki-67 蛋白在宫颈上皮内瘤变(CIN)中的表达情况和意义及人乳头瘤病毒(HPV)感染与 CIN 的关系。**方法** 选取 2017 年 1 月至 2018 年 2 月宿迁市钟吾医院 160 例行宫颈组织活检或宫颈 LEEP 术活检患者作为研究对象, 其中 40 例正常宫颈黏膜上皮组织的患者作为对照组, 120 例出现 CIN 患者作为观察组, 两组均检测 P16、Ki-67 蛋白的表达情况, 同时检测 HPV 的感染情况。**结果** 对照组 P16、Ki-67 的阳性率明显低于观察组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组在高度宫颈上皮内瘤变(CIN II 和 CIN III)患者中, P16 和 Ki-67 的表达呈正相关($r = 0.785, P < 0.05$), 高度上皮内瘤变患者 P16、Ki-67 阳性率明显高于轻度宫颈上皮内瘤变(CIN I)患者。观察组 HPV 阳性率明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), HPV 阳性率与 P16 的表达呈正相关($r = 0.486, P < 0.05$), 且 HPV 阳性率随 CIN 的发展而升高。**结论** 联合检测 P16 和 Ki-67 可作为诊断 CIN 的有效指标, HPV 的感染与 CIN 的发生有着密切联系, 对临床上诊断 CIN 有着重要的意义。

关键词: 宫颈组织; 宫颈上皮内瘤变; P16; Ki-67; HPV 检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.07.009 中图法分类号: R737.33

文章编号: 1673-4130(2020)07-0803-04 文献标识码: A

Significance of P16, Ki-67 protein expression and HPV detection in cervical intraepithelial neoplasia*ZHANG Kun^{1,2}, LIU Hui^{1△}, BAI Shi²

(1. Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Department of Pathology, Zhongwu Hospital of Suqian, Suqian, Jiangsu 223800, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of P16 and Ki-67 protein in cervical intraepithelial neoplasia(CIN) and the relationship between HPV infection and CIN. **Methods** From January 2017 to February 2018, 160 cases with cervical biopsy or cervical LEEP operation as the research object in Zhongwu Hospital of Suqian, 40 cases of normal cervical mucosa epithelial tissue of patients as control group, 120 cases with CIN of patients as observation group, two groups were detected the expression of P16 and Ki-67 protein, while detecting HPV infection status. **Results** The positive rate of P16 and Ki-67 in the control group was significantly lower than that in the observation group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In the high-grade cervical intraepithelial neoplasia(CIN II and CIN III), the expression of P16 and Ki-67 was positively correlated($r = 0.785, P < 0.05$). The positive rate of P16 and Ki-67 in highly intraepithelial neoplasia was significantly higher than that in mild cervical intraepithelial neoplasia(CIN I). The positive rate of HPV in the observation group was significantly higher than that in the control group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The positive rate of HPV was positively correlated with the expression of P16($r = 0.486, P < 0.05$), and the positive rate of HPV increased with the development of CIN. **Conclusion** Combined detection of P16 and Ki-67 can be used as an effective indicator for the diagnosis of CIN. HPV infection is closely related to the occurrence of CIN, and has important significance for clinical diagnosis of CIN.

Key words: cervical tissue; cervical intraepithelial neoplasia; P16; Ki-67; HPV detection

宫颈上皮内瘤变(CIN)是妇科临床上的一种最为常见的病症之一,是与子宫颈癌有紧密联系的一组癌

* 基金项目:江苏省优势学科建设工程项目(YSHL3707-11)。

作者简介:张坤,男,副主任医师,主要从事临床病理研究。△ 通信作者, E-mail: 13952269920lh@163.com。

本文引用格式:张坤,刘慧,白石. P16、Ki-67 蛋白表达及 HPV 检测在宫颈上皮内瘤变中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(7): 803-

前病变的统称^[1]。CIN 反映的是一段宫颈癌前病变的连续过程,即由最初的宫颈不典型增生最终发展为浸润性宫颈癌的一系列病理变化,由于其癌前病变过程较长,根据世界卫生组织(WHO)的分类标准,可将 CIN 分为 CIN I、CIN II 和 CIN III 3 个等级^[2]。其中, CIN I 为轻度病变,约 65% 的患者可自行恢复, CIN II 和 CIN III 为高度上皮内瘤样病变,需对患者采取有效的治疗措施。近年来,宫颈癌在妇科临床上呈高发态势,已成为导致女性死亡的第二大恶性肿瘤,所以对宫颈癌患者需及早诊断并加以治疗,但由于 CIN 的临床特征不明显,对 CIN 的鉴别诊断存在一定的困难。因此,探究一种 CIN 的早期诊断方法显得尤为迫切。现有研究表明, P16 是一种抑癌基因,细胞内的 P16 蛋白直接参与细胞周期的调节, P16 蛋白的减少会导致细胞无限制增生,进而引发癌变^[3]; Ki-67 是一种肿瘤增殖抗原,是判断癌细胞增殖情况的一个重要指标^[4-6],二者的表达情况对肿瘤细胞的判定具有重要意义。近年随着流行病学和分子生物学研究的不断深入,人们发现人乳头瘤病毒(HPV)具有致癌性^[7],并且 HPV 的感染与 CIN 的发生有着紧密的联系。本研究旨在通过联合检测 P16、Ki-67 蛋白的表达及 HPV 的感染情况,进而找到其与 CIN 的联系,为临床上 CIN 的诊断提供新的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2018 年 2 月来宿迁市钟吾医院进行宫颈组织活检或宫颈 LEEP 术的患者 160 例作为研究对象。其中 120 例出现 CIN 患者作为观察组。观察组 CIN I 级 36 例, CIN II 级 43 例, CIN III 级 41 例。年龄 26 ~ 61 岁,平均(42.61 ± 1.56)岁。纳入标准:(1)依据国际妇产科联盟(FIGO)的诊断标准^[8],经阴道镜检查 and 宫颈组织活检确定为 CIN 的患者;(2)非 HIV 感染者,且患者无子宫内病变史;(3)遵守医学实验伦理学原则,经与患者和家属沟通,其自愿签订知情同意书。排除标准:(1)妊娠期或哺乳期内的患者;(2)就诊前半个月发生过感染性疾病;(3)合并有器官衰竭,肝、肾疾病和其他肿瘤疾病史;(4)宫颈组织活检前进行过化疗或者放疗的患者。对照组为 40 例正常宫颈黏膜上皮组织的患者,平均(43.25 ± 1.25)岁,无肝、肾疾病,无肿瘤史。对照组与观察组在年龄等方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 即用型 P16 鼠单克隆抗体和即用型 Ki-67 鼠单克隆抗体购自赛默飞世尔科技有限公司, SP 广谱超敏试剂盒、PBS 液和 DAB 过氧化物酶显色底物剂等购自北京中杉生物科技有限公司, HPV-DNA 检测试剂盒、基因杂交信号放大仪和自动恒温加热器等购自凯杰企业管理(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化法检测 P16 和 Ki-67 实验中所用标本先由 10% 的甲醛溶液固定,用 HE 染色经显微镜观察后严格挑选得出。采用免疫组化 SP 法,具体操作严格按照试剂盒的使用说明书的步骤进行。结果判断根据切片中阳性细胞的染色情况, P16 阳性细胞为细胞核或细胞质出现棕黄色颗粒, Ki-67 阳性细胞为细胞核出现棕黄色颗粒。在高倍镜下于染色区域随机选择 5 个视野,共计数 500 个肿瘤细胞,分别计算 P16 和 Ki-67 细胞阳性率。判断标准:细胞阳性率小于 5% 为阴性(-), 5% ~ < 25% 为弱阳性(+), 25% ~ < 50% 为中等阳性(++), ≥ 50% 为强阳性(+++)。

1.3.2 HPV 检测 采用 Digene 公司推出的第二代杂交捕获实验(HC2)测定 HPV-DNA 水平,详细操作严格按照仪器和试剂盒的使用说明书的步骤执行。检测结果依据 HPV-DNA 水平分为阳性和阴性,其中 HPV-DNA ≥ 1.0 pg/mL 为阳性(+), HPV-DNA < 1.0 pg/mL 为阴性(-)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。两变量间相关性采用 Spearman 法分析。

2 结果

2.1 P16 和 Ki-67 的表达情况及相关性 对照组 P16、Ki-67 阳性率分别为 7.50% (3/40)、15.00% (6/40); 观察组 P16、Ki-67 的总阳性率分别为 85.00% (102/120)、92.50% (111/120), 观察组 P16、Ki-67 阳性率明显高于对照组,两组之间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。从观察组内来看, CIN I 患者 P16 阴性表达最多, P16 阳性表达中主要是以弱阳性为主, Ki-67 的表达则是弱阳性最多; 而 CIN II 和 CIN III 患者 P16、Ki-67 的表达绝大部分都是阳性,且强阳性的表达例数最多。据此可分析得出: P16 与 Ki-67 在 CIN 中的表达与 CIN 的分级呈正相关($r = 1.000$, $P < 0.05$), 且 P16 和 Ki-67 的强阳性表达提示着高度宫颈上皮内瘤变。进一步分析发现, CIN I 患者 P16、Ki-67 阳性率,明显低于 CIN II 和 CIN III 患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、2。

表 1 两组中 P16 表达情况比较

组别	n	P16 表达情况(n)				阳性率 (%)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
对照组	40	37	3	0	0	7.50		
观察组								
CIN I	36	15	11	5	5	58.33	79.875	0.000
CIN II	43	2	12	14	15	95.35		
CIN III	41	1	10	13	17	97.56		

P16 和 Ki-67 在高度宫颈上皮内瘤变的表达情况见表 3。可以看出,在高度宫颈上皮内瘤变的患者中,P16 和 Ki-67 都表达为阳性的数量最多,且二者均表达为阴性的情况不存在,提示 P16 和 Ki-67 的高表达与高度宫颈上皮内瘤变有关。将 P16 和 Ki-67 的阴性表达记为 0,弱阳性表达记为 1,中等阳性表达记为 2,强阳性表达记为 3,经统计学软件分析后得出结论:在本研究中,对照组和 CIN I 患者的 P16、Ki-67 表达不具有相关性。在高度宫颈上皮内瘤变中(CIN II 和 CIN III),P16 和 Ki-67 的表达呈正相关($r = 0.785, P < 0.05$)

表 2 两组中 Ki-67 表达情况比较

组别	n	Ki-67 表达情况(n)				阳性率 (%)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
对照组	40	34	6	0	0	15.00		
观察组								
CIN I	36	8	13	9	6	77.78	91.688	0.000
CIN II	43	1	13	14	15	97.67		
CIN III	41	0	9	14	18	100.00		

表 3 高度宫颈上皮内瘤变中 P16 和 Ki-67 的表达情况

Ki-67 表达情况	P16 表达情况(n)			
	-	+	++	+++
-	0	1	0	0
+	3	13	6	0
++	0	8	15	5
+++	0	0	6	27

2.2 HPV 检测情况 观察组 HPV 总阳性率为 81.67% (98/120), 而对照组 HPV 阳性率仅有 12.50% (5/40), 观察组阳性率明显高于对照组, 两组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。从观察组来看, CIN I 患者 HPV 阴性的例数有 13 例, 随着 CIN 病变级别的升高, HPV 阴性的例数骤降至 6 例和 3 例, HPV 阳性率随之逐渐升高, 将高度宫颈上皮内瘤变与低度宫颈上皮内瘤变中 HPV 阳性率对比, 发现二者的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。经 Spearman 法分析后还发现, 在观察组中 HPV 阳性率与 P16 蛋白的表达情况呈正相关 ($r = 0.486, P < 0.05$)。

表 4 HPV-DNA 的表达情况

组别	n	HPV 表达(n)		阳性率 (%)	χ^2	P
		HPV 阴性	HPV 阳性			
对照组	40	35	5	12.50		
观察组						
CIN I	36	13	23	63.89	62.581	0.000
CIN II	43	6	37	86.05		
CIN III	41	3	38	92.68		

3 讨 论

宫颈癌目前在我国已成为危害妇女健康的第二大恶性肿瘤, 但现代医疗技术对其发生率的影响有限, 所以目前宫颈癌的防治有赖于对其进行行之有效的人群筛查^[8]。CIN 反映的是一段浸润性宫颈癌的癌前病变过程, CIN 与宫颈癌的发生有着极其密切的关系, 因此 CIN 的准确诊断对妇科临床尤其是宫颈癌的防治有着重要的意义。但由于 CIN 的临床特征不明显, 所以仅凭临床症状来诊断 CIN 十分困难。近年来的研究表明, P16 和 Ki-67 的表达与肿瘤细胞的增殖息息相关, 且 HPV 的感染是导致 CIN 的重要因素。

P16 基因是一种抑癌基因, 其编码的产物 P16 蛋白直接作用于细胞周期。P16 蛋白可抑制细胞周期依赖酶 CDK4 的活性, 从而阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期, 进而抑制细胞增殖。若 P16 基因突变或缺失, 则 CDK4 的活性增强, 进而引起细胞分裂加速, 最终导致细胞恶性增殖^[9-10]。在本研究中, 观察组的 P16 阳性率 (85.00%), 明显高于对照组阳性率 (7.50%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而且在观察组中 CIN II 和 CIN III 患者 P16 阳性率明显高于 CIN I 患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。推测 P16 与 CIN 有着紧密的联系, P16 的阳性表达可视为 CIN 发生的危险因素, 且 P16 的阳性率随 CIN 病变程度的加深而增高。Ki-67 是一种位于细胞核内的非组蛋白, 其作用于细胞分裂的 G₁、S、G₂、M 期^[11-12], Ki-67 在细胞中表达越高, 表明细胞增殖越快, 细胞分化越差^[13], 研究已证实 Ki-67 可作为判断肿瘤细胞增殖能力的标记物。在本研究中, 观察组 Ki-67 的阳性率, 明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 推测 Ki-67 的阳性表达是 CIN 发生的标志之一。从观察组来看, 轻度宫颈上皮内瘤变患者的 Ki-67 阳性率较低, 且强阳性和中等阳性的表达例数较少; 而高度宫颈上皮内瘤变患者 Ki-67 阳性率较高, 且强阳性和中等阳性的例数较 CIN I 型有明显的增多, 可推知 Ki-67 的表达水平随 CIN 的发展而增强。经相关性分析得知在高度上皮内瘤变中 P16 与 Ki-67 的表达呈正相关 ($r = 0.785, P < 0.05$), 在低度宫颈上皮内瘤变中不相关, 相关研究表明这是由于二者在细胞增殖的不同阶段表达的情况不同^[13], 据此推测 P16 和 Ki-67 蛋白表达的差异还可以作为 CIN 病变程度的区分标准, 而且两种蛋白在高度宫颈上皮内瘤变中的表达水平存在一定的联系。所以, 联合检测 P16 与 Ki-67 的表达情况有助于提高 CIN 诊断的准确率。

HPV 是一种环状双链结构的病毒, 目前已有研究证实 HPV 感染是引发宫颈癌的最主要因素^[14-16], 本研究中, 观察组与对照组 HPV 阳性率比较, 差异有

统计学意义($P < 0.05$),表明 HPV 的感染是诱发 CIN 的因素,进一步分析发现在观察组内 HPV 的阳性率随 CIN 的发展而升高,推测 HPV 的感染推进宫颈病变的加重。研究中还发现,HPV 阳性率与 P16 蛋白的表达呈正相关($r = 0.486, P < 0.05$),说明 P16 的表达与 HPV 的感染有关,且 HPV 的感染推动着 P16 蛋白的高表达,临床上对 CIN 的诊断及预后可将 HPV 的阳性率作为重要指标。

综上所述,本研究通过检测 P16、Ki-67 蛋白的表达情况来说明了二者的阳性表达与 CIN 的密切关系,进一步证实了两种蛋白在高度宫颈上皮内瘤变中的相关性,但未能具体说明低度宫颈上皮内瘤变中 P16、Ki-67 蛋白表达情况不相关的原因。实验还通过对 HPV-DNA 的检测来说明了 HPV 的感染是诱发 CIN 的重要原因,并发现 HPV 的感染推动着 P16 蛋白的表达,但 HPV 与 P16 蛋白二者存在相关性的证据还需进一步探究。与以往的研究相比,此次研究不仅证实了 P16、Ki-67 蛋白表达情况的差异与 CIN 的病变程度的关系,还进一步探究了 HPV 在 CIN 中的作用机制,为临床上 CIN 的检测与分型提供了新的理论依据。

4 结 论

以上实验表明,HPV 的感染是诱发 CIN 的重要因素,P16 和 Ki-67 的阳性表达可作为判断 CIN 发生的提示因素,且在高度宫颈上皮内瘤变中 P16 与 Ki-67 的表达呈正相关。通过联合检测 HPV-DNA、P16 和 Ki-67 的表达情况可作为判断 CIN 的新的依据。本研究证实了联合检测 P16、Ki-67 及 HPV 的表达不仅能提高 CIN 诊断的准确率,并能进一步鉴别 CIN 的病变程度,对 CIN 的临床诊断及筛查有重要价值。

参考文献

[1] 韩翠娜,邹歌,李丹丹,等.不同宫颈病变组织中 HPV 分型及 P16、Ki-67 的表达[J].华北理工大学学报(医学版),2017,25(5):31-33.

[2] 李克红,赖俊玲,张苑平,等.高危型 HPV 与 P16、Ki-67 检测在宫颈癌早期筛查中的价值[J].中国当代医药,2018,50(14):66-68.

[3] WHITE C, BAKHIET S, BATES M, et al. Triage of LSIL/ASC-US with P16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study[J]. *Cytopathol*, 2016, 27(4): 269-276.

[4] 杨安强,赵华,付锦艳. P16、Ki-67 在 HPV 相关宫颈上皮内瘤变中的表达及意义[J].职业与健康,2016,32(13): 1764-1767.

[5] 王媛媛,邓小丽,胡西华. HPV16/18 感染与 Ki-67、P16INK4a 表达在宫颈癌和宫颈上皮内瘤变组织中的变化分析[J].现代医学与健康研究,2018,20(4):1-2.

[6] POOMTAVORN Y, TANPRASERTKUL C, SAMMOR A, et al. Predictors of absent high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in loop electrosurgical excision procedure specimens of patients with colposcopic directed biopsy-confirmed high-grade CIN[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(3): 849-854.

[7] SUN X, KAUFMAN P D. Ki-67: more than a proliferation marker[J]. *Chromo*, 2018, 127(2): 175-186.

[8] CHRISTENSEN J T, ZAMANI M, BRASK J, et al. Association between oropharyngeal cancers with known HPV and P16 status and cervical intraepithelial neoplasia: a Danish population-based study[J]. *Acta Oncol*, 2019, 58(3): 267-272.

[9] 王海瑞,廖光东,陈汶,等. P16/Ki-67 免疫细胞化学双染在宫颈癌筛查中的应用价值[J].中华肿瘤杂志,2017,39(8):636.

[10] 沈晓健,朱东兵,环静,等.联合应用 P16、Ki-67 免疫组织化学染色半定量评分对 CIN 病变的分级预测[J].检验医学与临床,2018,15(19):117-120.

[11] 林建松,倪婧,许淑霞,等. P16/Ki-67 免疫细胞化学双染法对宫颈病变的筛查价值[J].中华病理学杂志,2018,47(3):207.

[12] HUANG J, QIAN Z, GONG Y, et al. Comprehensive genomic variation profiling of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer identifies potential targets for cervical cancer early warning[J]. *J Med Genet*, 2019, 56(3): 186-194.

[13] 印永祥,赵华,梁洁,等.细胞免疫化学 P16/Ki-67 双染预测子宫颈上皮内高级别瘤变[J].临床与实验病理学杂志,2017,21(3):49-53.

[14] GAO G, WANG J, KASPERBAUER J L, et al. Whole genome sequencing reveals complexity in both HPV sequences present and HPV integrations in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 352.

[15] KUMAR R, TANWAR P, SINGH A R, et al. Impact of HPV on the pathobiology of cancers[J]. *Gulf J Oncol*, 2019, 1(29): 72-75.

[16] HOSSEINI M S, KHOSRAVI D, FARZANEH F, et al. Evaluation of anal cytology in women with history of abnormal pap smear, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer and high risk HPV for anogenital dysplasia[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(11): 3071-3075.