

· 论 著 ·

## P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 和 HPV DNA16/18 在绝经后妇女宫颈鳞状上皮病变中表达的意义

胡俊波, 孙 军

(湖北省妇幼保健院病理科, 武汉 430070)

**摘要:**目的 探讨 P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 及高危型人乳头状瘤病毒在绝经后妇女宫颈萎缩及不同程度鳞状上皮病变中的表达及临床病理意义。方法 采用原位杂交及免疫组化方法, 检测人乳头状瘤病毒的 HPV DNA16/18, P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 蛋白在 104 例萎缩和不同程度宫颈病变组织中的表达情况。结果 HPV16/18 在不同程度宫颈病变中总检出率为 28.57%(24/84); 在 CIN II/III 级、宫颈鳞癌组中阳性表达率较高。随着宫颈病变严重程度的增加, P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 的阳性表达率及染色强度呈递增趋势。P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 与 HPV16/18 型感染关系密切。萎缩病变 HPV16/18、P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 为阴性表达。结论 P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 可以作为绝经后宫颈 HPV 感染有关的肿瘤性病变的标记物, 对区分绝经后宫颈萎缩及上皮内瘤变有重要意义。

**关键词:** 宫颈上皮内瘤变; 人乳头状瘤病毒; P16<sup>INK4A</sup>; Ki-67; 萎缩; 绝经

**中图分类号:** R730.23; R737.33

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2010)02-0140-03

### Clinicopathologic significance of P16<sup>INK4A</sup>, Ki-67 and HPV DNA16/18 expression in squamous cell lesions of postmenopausal women cervix

HU Jun-bo, SUN Jun

(Department of Pathology, Hubei Maternal and Child Health Hospital, Wuhan 430070, China)

**Abstract: Objective** To explore the clinicopathologic significance of HPV DNA16/18, P16<sup>INK4A</sup>, Ki-67 expression in atrophy and squamous cell lesions of postmenopausal women cervix. **Methods** In situ hybridisation and immunohistochemistry were used to detect the expression of the HPV DNA16/18, P16<sup>INK4A</sup>, Ki-67 in 104 cases of the pathologic cervix tissues with atrophy and different degree of severity. **Results** The positive rate of HPV16/18 in all specimens was 28.57%(28/84), which was mostly detected in the groups of cervical squamous cell carcinoma, CIN II/III subgroups. The positive rates and staining intensity of P16<sup>INK4A</sup>, and Ki-67 increased with the severity of diseased cervical tissues. There was close correlation between the expression of P16<sup>INK4A</sup>, Ki-67 and HPV16/18 infection. P16<sup>INK4A</sup>, Ki-67 and HPV16/18 were all negative in atrophy. **Conclusion** P16<sup>INK4A</sup> and Ki-67 should be regarded as useful surrogate biomarkers of HPV-related postmenopausal cervical neoplasias, and may have potential value in the differential diagnosis of atrophy and squamous cell lesions of postmenopausal cervix.

**Key words:** human papilloma virus; cervical intra-epithelial neoplasia; P16<sup>INK4A</sup>; Ki-67; atrophy; postmenopausal

2008 年底, 我国 60 岁以上老年人口已达到 1 亿 5989 万人, 占总人口的 12%, 表明已经进入了老龄化社会, 老年人的健康日益引起社会的广泛关注。宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 和高危 HPV 感染密切相关<sup>[1-2]</sup>。老年宫颈癌预后差, 病死率高, 严重威胁老年妇女身心健康。阴道镜活检做病理检查作为诊断宫颈病变的金标准, 降低了宫颈癌的发病率。绝经后妇女因雌激素水平降低常常导致宫颈上皮萎缩, 细胞层次减少, 部分区域核深染, 与高级别上皮内瘤变易混淆, 成为诊断的陷阱<sup>[3-5]</sup>。本研究对 104 例绝经后患者宫颈组织进行总结, 以期找出有效的诊断标准。

#### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 取自湖北省妇幼保健院病理科 2004 年 12 月至 2008 年 12 月宫颈活检及手术切除标本的存档蜡块共 104 例。其中 CIN I 级 43 例、CIN II~III 级 19 例、宫颈浸润癌 22 例, 20 例萎缩的宫颈组织为对照组。肿瘤分型按 WHO(2003) 女性生殖系统肿瘤分类标准进行。本组 104 例患者年龄 55~75 岁, 平均(58.37±4.82)岁。

**1.2 方法** 用原位杂交法(ISH)检测 HPV DNA16/18; 用免疫组化 Envision 法检测 P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 抗原。地高辛标记的 HPV 16/18 原位杂交探针、放大系统检测试剂盒(福州泰普公司产品), 单克隆抗体 P16<sup>INK4A</sup> 及多克隆抗体 Ki-67 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验步骤严格按照试剂盒说明

书进行。HPV 检测阳性对照用子宫颈瘤阳性片加阳性探针, TBS 液代替阳性探针作为阴性对照。Envision 检测用 TBS 代替一抗作为阴性对照, 乳腺癌组织作阳性对照。

结果判断: 在高倍镜下随机选取 3 个视野, 每个视野计数 200 个肿瘤细胞或鳞状细胞。HPV 原位杂交: 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性。P16<sup>INK4A</sup> 蛋白定位细胞核或细胞质内出现有棕黄色颗粒。按其染色有无及强弱程度划分为: 阳性细胞数小于 5% 或无阳性细胞为阴性; 6%~25% 为弱阳性; 26%~50% 为阳性; 大于 50% 为强阳性。Ki-67 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性, 仅基底层细胞有表达为(-); 阳性细胞数 1%~20% 为(+); 21%~50% 为(++); 大于 50% 为(+++)。

**1.3 统计学方法** 处理采用 SAS 8.12 软件分析, 计数资料比较使用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

#### 2 结 果

**2.1 HPV 与宫颈病变的关系(表 1)** HPV16/18 在宫颈鳞癌、CIN 组中均有阳性表达, 在萎缩对照组中无表达(图 1)。HPV16/18 型在宫颈鳞癌及 CIN 组中的表达水平与萎缩对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 并且随着 CIN 组织学分级的增加呈升高趋势, 尤其在宫颈 CIN II/III 级、鳞癌两组中的表达最明显(图 2)。本实验宫颈病变中 HPV 总检出率为 28.57%(24/84)。

**2.2 P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 与宫颈病变的关系** P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 在宫

颈鳞癌、CIN III / II、I 组的阳性表达率与萎缩对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。随着宫颈病变严重程度增加, P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 的阳性表达率呈增加趋势, 尤其在宫颈鳞癌和 CIN 中的阳性表达率明显增高 (表 2)。P16<sup>INK4A</sup> 在宫颈鳞癌、CIN III、CIN II 组中, 表达以胞核和胞浆强阳性为主 (图 3); 在 CIN I 组中仅为弱阳性表达。Ki-67 在宫颈鳞癌和 CIN III 中以强阳性表达为主 (图 4)。P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 在萎缩对照组中呈阴性表达 (图 5、6)。

表 1 HPV DNA 16/18 在不同程度宫颈病变中的表达

宫颈病变	n	HPV DNA16/18	
		阳性	阳性率 (%)
萎缩	20	0	0
CIN I	43	7	16.3
CIN II ~ III	19	9	47.3
鳞癌	22	8	36.4

表 2 P16<sup>INK4A</sup>、Ki-67 在不同程度宫颈病变中的表达

宫颈病变	n	P16 <sup>INK4A</sup>				Ki-67			
		+	++	+++	%	+	++	+++	%
萎缩	20	0	0	0	0	0	0	0	0
CIN I	43	27	3	0	69.76	34	7	0	95.3
CIN II ~ III	19	0	4	15	100	2	3	14	100
鳞癌	22	0	3	19	100	0	4	18	100

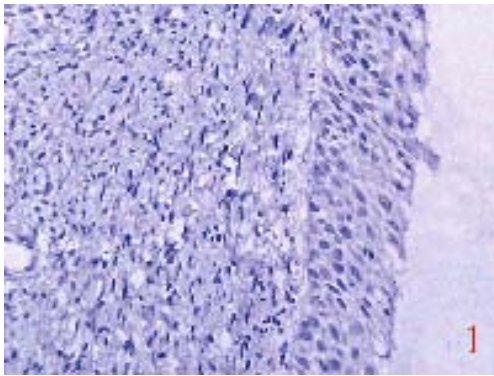


图 1 萎缩性黏膜细胞核 HPV16/18 不表达 (-) ISH 法

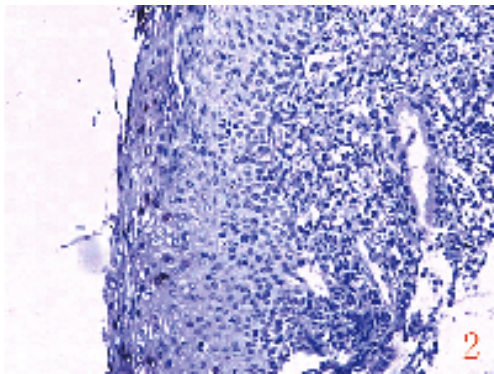


图 2 CIN III 中, 中、表层细胞核出现散在棕黄色颗粒的细胞为 HPV16/18 (+) ISH 法

2.3 HPV DNA 16/18 感染与 P16<sup>INK4A</sup> 表达程度之间的比较见表 3。在绝经后妇女子宫颈萎缩病变中, HPV DNA 16/

18 感染与 P16<sup>INK4A</sup> 蛋白表达为阴性, 随着 CIN 组中 HPV DNA 16/18 阳性率愈高, P16<sup>INK4A</sup> 蛋白表达的强度就愈强。

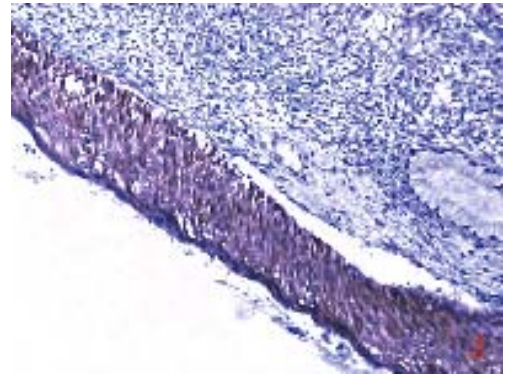


图 3 CIN III 中, P16<sup>INK4A</sup> 在细胞核及细胞浆中出现弥漫棕黄色颗粒 (+) SP 法

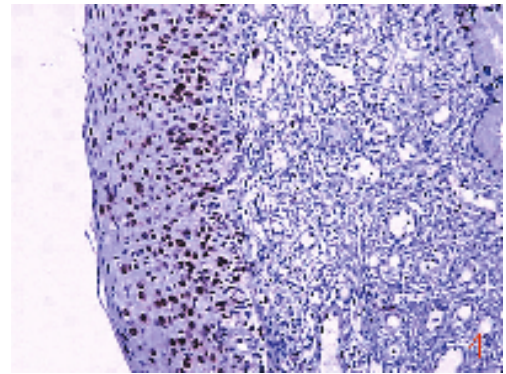


图 4 Ki-67 全层细胞核表达呈棕黄色颗粒 (+) SP 法

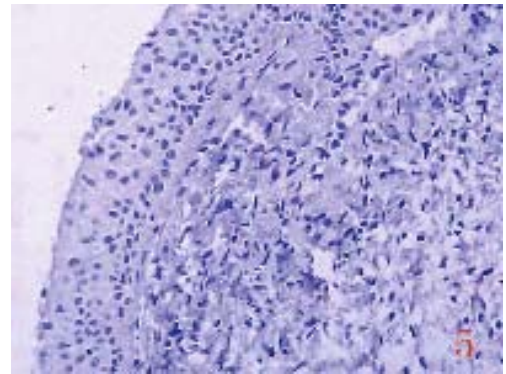


图 5 萎缩性黏膜细胞浆及细胞核 P16<sup>INK4A</sup> 不表达 (-) SP 法

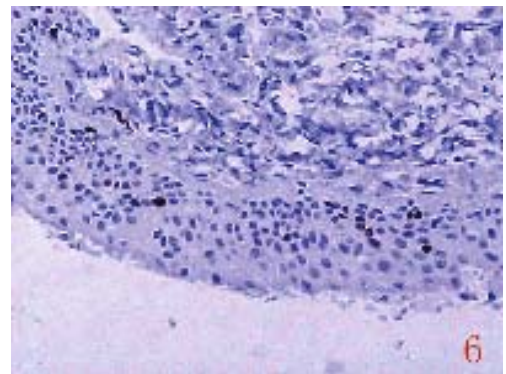


图 6 萎缩性黏膜基底及旁基底细胞核 Ki-67 呈散在棕黄色颗粒 (-) SP 法

表 3 HPV DNA 16/18 的感染与 P16<sup>INK4A</sup> 的关系

HPV DNA 16/18	n	P16 <sup>INK4A</sup>			
		-	+	++	+++
+	24	2	5	4	13
-	80	31	22	6	21
合计	104	33	27	10	34

### 3 讨 论

HPV 感染是宫颈癌及癌前病变形成的最重要的原因,特别是持续性高危型 HPV 16/18 感染,如 HPV16 型可在差不多 50% 的宫颈高度上皮鳞状上皮内瘤变(HSIL)和鳞癌中发现,HPV18 型与 15% 的鳞癌有关。老年患者的 HPV 病毒负荷量是较高的,研究发现,HPV 感染在人群中呈 U 型或 S 型分布,第 1 个高峰在 25~35 岁,第 2 个高峰在大于 55 岁年龄段<sup>[6-8]</sup>。大多数 HR-HPV 感染(大于 55 岁)与 HSIL 及鳞癌密切相关,其中 HPV16/18 是最常见的病毒亚型。当 HPV16/18 感染宫颈时,可将 HPV DNA 整合到宿主细胞基因组中,进而病毒 DNA 上的 E6、E7 癌基因表达蛋白能引起自身调节和宿主调节基因表达失调,从而影响正常细胞周期调控,导致宫颈上皮细胞发生恶变。本研究结果显示:HPV16/18 DNA 在 19 例 CIN II/III 级和 22 例宫颈癌组织中的阳性表达率分别为 47.3%、36.4%,与文献<sup>[9]</sup>报道近似。子宫颈 CIN II/III 级和鳞癌组 HPV16/18DNA 阳性表达率明显高于萎缩组( $P < 0.01$ ),且高于 CIN I 级组,证实子宫颈鳞状细胞癌发生与高危型 HPV16/18 感染密切相关。萎缩组表达阴性,表明 HPV16/18 DNA 在易误诊为 HSIL 的萎缩病变时可作为有效的鉴别诊断工具。本研究结果还显示,原位杂交技术是一种检测 HPV 感染的特异性强、技术成熟的方法,特异性可能比基于液体的方法强,定位准确,阳性预测值高,可直接发现整合到宿主细胞内的 HPV 核酸<sup>[2]</sup>。而免疫组化检测 HPV 不敏感,检出率低;美国 Digene 公司 HC2 检测 HPV 是非特异性(部分阳性病例是正常人群,可能为一过性病毒感染)<sup>[10]</sup>。结果提示原位杂交可作为临床 HPV 检测有效手段。

HPV 与细胞周期的变化有关,特别是高危险性的 HPV,所以细胞周期生物标志物能够起 HPV 感染的替代标志物的作用,而且可以用于促进宫颈前体病变的精确诊断。P16<sup>INK4A</sup> 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,在宫颈鳞状上皮非肿瘤性病变中阳性率极低或全部阴性,而在 CIN 尤其在高级别 CIN 中阳性率极高,作为辅助的诊断标记物可以有效地区分出 CIN 病变<sup>[11-12]</sup>。本研究的结果显示 P16<sup>INK4A</sup> 蛋白在老年患者正常或萎缩性宫颈鳞状上皮中均为阴性表达,而在 CIN 病变中阳性率显著增加,随着 CIN 级别升高,其表达强度亦相应增加,在 CIN II/III 级和鳞癌组阳性率达 100%,与 Qiao 等<sup>[13]</sup>报道相一致。据此可使绝大部分 CIN 病变区分出来,并客观准确的分级。随着 CIN 组中 HPV DNA 16/18 阳性率愈高,P16<sup>INK4A</sup> 蛋白表达的强度就愈强,表明 P16<sup>INK4A</sup> 蛋白具有高危 HPV 的强烈阳性预测值。本研究结果显示 Ki-67 在萎缩性宫颈鳞状上皮标本中局限于基底及旁基底层,数量较少且散在,为阴性;在低级别鳞状上皮内瘤变中阳性表达可达中层而高级别病变则可达全层;随着病变级别增加,阳性表达也相应增高,可有助于区分萎缩与 HSIL。但炎性及修复性病变中 Ki-67 表达也高,需联合 P16<sup>INK4A</sup> 蛋白(表达阴性),将假阳性病变排除。

综上所述,在绝经后宫颈鳞状上皮瘤变中免疫组化检测 P16<sup>INK4A</sup> 蛋白和 Ki-67 抗原,原位杂交检查高危型 HPV 感染,作为一种临床病理有效辅助诊断工具,可明确地区分萎缩和

CIN 病变,并指导 CIN 分级,有较好的临床应用价值。

### 参考文献:

- [1] Chen S, O'Sullivan H, Tabrizi SN, et al. Prevalence and genotyping of HPV in cervical cancer among Australian women[J]. Int J Gynaecol Obstet, 1999, 67(3): 163.
- [2] Levert M, Clavel C, Graesslin O, et al. Human papillomavirus typing in routine cervical smears. Results from a series of 3778 patients[J]. Gynecol Obstet Fertil, 2000, 28(10): 722.
- [3] Feng J, Al-Abbadi MA, Bandyopadhyay S, et al. Significance of high-risk human papillomavirus DNA-positive atypical squamous cells of undetermined significance pap smears in perimenopausal and postmenopausal women[J]. Acta Cytol, 2008, 52(4): 434.
- [4] Johnston EI, Logani S. Cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance in perimenopausal and postmenopausal women, lessons learned from human Papillomavirus DNA testing[J]. Cancer, 2007, 111(3): 160.
- [5] Vetrano G, Aleandri V, Ciolli P, et al. Conservative approach to preneoplastic cervical lesions in postmenopause[J]. Anticancer Res, 2008, 28(6B): 3941.
- [6] Syrjänen K, Kulmala SM, Shabalova I, et al. Epidemiological, clinical and viral determinants of the increased prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in elderly women[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2008, 29(2): 114.
- [7] Eltoun IA, Chhieng DC, Roberson J, et al. Reflex human papilloma virus infection testing detects the same proportion of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 in young versus elderly women[J]. Cancer, 2005, 105(4): 194.
- [8] Kutza J, Smith E, Levy B, et al. Use of hormone replacement therapy (Hrt) And detection of human papillomavirus (Hpv) Dna in postmenopausal women[J]. Ann Epidemiol, 2000, 10(7): 465.
- [9] Smith EM, Johnson SR, Ritchie JM, et al. Persistent HPV infection in postmenopausal age women[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2004, 87(2): 131.
- [10] 李军果, 李力, 郭建新, 等. 375 例宫颈病变患者高危型人乳头瘤病毒感染的研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(9): 935.
- [11] Bolanca IK, Ciglar S. Evaluation of P16<sup>INK4A</sup> in cervical lesion of premenopausal and postmenopausal women[J]. Coll Antropol, 2007, 31(Suppl 2): 107.
- [12] Engelsens IB, Stefansson I, Akslen LA, et al. Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 195(4): 979.
- [13] Qiao X, Bhuiya TA, Spitzer M. Differentiating high-grade cervical intraepithelial lesion from atrophy in postmenopausal women using Ki-67, cyclin E, and p16 immunohistochemical analysis[J]. J Low Genit Tract Dis, 2005, 9(2): 100.