

· 临床研究 ·

高危型 HPV、p16、COX-2 在宫颈癌中的表达及临床意义

徐晓英¹, 汤春辉^{2△}, 薛晓玲¹

(1. 南通大学附属海安医院妇产科, 江苏海安 226600; 2. 南通大学附属医院妇产科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 检测高危型人类乳头瘤病毒 (HPV16/18)、p16、环氧合酶-2(COX-2)在宫颈癌中的表达情况,并探讨其在宫颈癌发生、发展中的意义。方法 收集宫颈活检或手术标本 151 例,采用原位杂交技术检测 HPV16/18 表达情况,采用免疫组化技术检测 p16、COX-2 表达情况。结果 正常宫颈、宫颈低级别上皮内瘤变(LSIL)、宫颈高级别上皮内瘤变(HSIL)和 CC 组织中 HPV16/18 的阳性率分别为 9.09%、42.86%、69.23%和 85.48%,p16 阳性率分别为 4.55%、53.57%、76.92%和 88.71%,COX-2 阳性率分别为 9.09%、46.43%、64.10%和 79.03%。随着宫颈癌组织病理学分级的升高,p16 阳性率逐渐上升,差异有统计学意义($P=0.019$)。COX-2 表达与宫颈癌临床分期、组织病理学分级及有、无淋巴结转移有关($P<0.05$)。结论 高危型 HPV、p16 及 COX-2 的高表达在宫颈癌的发生、发展中均起作用。

关键词:高危型人乳头状瘤病毒;环氧合酶-2;宫颈肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.12.026

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)12-1199-03

The expression and clinical significance of high-risk HPV, p16 and COX-2 in cervical carcinoma

Xu Xiaoying¹, Tang Chunhui^{2△}, Xue Xiaoling¹

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, Affiliated Haian Hospital of Nantong University, Haian, Jiangsu 226600, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To detect the expression of high-risk human papilloma virus (HPV16/18), p16 and Cyclooxygenase-2 (COX-2) in cervical carcinoma, and investigate the significance of it in invasive cervical carcinoma. **Methods** 151 cases of submission of cervical biopsy or surgical specimens were collected. The expression of HPV16/18 was detected by hybridization in situ. The expression of P16 and COX-2 was analyzed by immunohistochemistry. **Results** Positive expression rates of HPV16/18 were 9.09%, 42.86%, 69.23% and 85.48% in the normal, LSIL, HSIL and CC samples, 4.55%, 53.57%, 76.92% and 88.71% for p16, 9.09%, 46.43%, 64.10% and 79.03% for COX-2, respectively. With the increase of tumor differentiation, positive expression rates of p16 were increased gradually ($P=0.019$). COX-2 expression was found to be correlated with clinical stages, histopathological types and metastasis in lymph node ($P<0.05$). **Conclusion** Expressions of HPV16/18, p16 and COX-2 are probably involve in the process of cervical carcinoma. Expressions of high-risk HPV, p16 and COX-2 in cervical carcinoma can be detected, and might provide clinical guidance on the early diagnosis of cervical cancer, evaluation of surgery and chemotherapy, and assessment of prognosis.

Key words: high-risk human papilloma virus; Cyclooxygenase-2; uterine cervical neoplasms

宫颈癌(cervical carcinoma, CC)是严重危害妇女健康和生命的主要疾病之一,其发病机制非常复杂,是一个多因素参与的、多步骤的复杂过程,其中抑癌基因的功能丧失和癌基因的表达是其细胞癌变的分子基础。在已发现的数个抑癌基因中,p16 基因与 CC 关系密切^[1-2];近年来的研究亦表明环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)与炎症和肿瘤的发生、发展有密切关系。人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一种易侵犯人鳞状上皮细胞的 DNA 肿瘤病毒,目前已经明确高危型 HPV 感染是 CC 发生的必要因素。本研究旨在观察高危型 HPV、p16 及 COX-2 在 CC 中的表达水平,探讨其作为生物学指标在辅助宫颈癌的筛查、诊断和判断预后中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南通大学附属医院妇产科 2006 年 1 月至 2008 年 6 月送检的宫颈活检或手术标本 151 例。其中正常宫颈 22 例,患者年龄 24~57 岁,平均(41.5±4.5)岁;宫颈低级别上皮内瘤变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)28 例,患者年龄 22~56 岁,平均(45.5±3.5)岁;宫颈高级别上皮内瘤变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)39 例,患者年龄 23~61 岁,平均(47.2±5.5)岁;CC 62

例,患者年龄 25~70 岁,平均(50.5±5.3)岁。CC 按病理类型分:鳞癌 51 例,腺癌 11 例;按肿瘤生长类型分:外生型 31 例,内生型 12 例,溃疡型 9 例,颈管型 10 例;按组织病理学分:高分化 30 例,中分化 21 例,低分化 11 例;按临床分期分[按照 2000 年国际妇产科联盟(FIGO)的标准];I 期 24 例,II 期 29 例,III 期 9 例;有淋巴结转移 13 例,无淋巴结转移 49 例;所有患者术前均未接受放、化疗。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 (1)制做组织切片;(2)运用原位杂交技术检测 HPV,试剂购自福建泰普生物科技有限公司;(3)运用免疫组化技术检测 p16、COX-2,所用一抗及 ELIVISION 试剂盒均为北京中杉生物技术公司产品。工作流程按说明书操作。

1.2.2 结果判定 所有切片采用双盲法由 2 位有经验的病理科医生阅片。p16 阳性细胞表现为细胞核和(或)细胞质着棕黄色;COX-2 阳性细胞表现为细胞质着棕黄色,参照 Sinicrope 等^[3]的标准,随机观察 5 个高倍镜视野,按每高倍镜视野阳性细胞百分比计分:阳性细胞数小于 5%为 0 分,5%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4

分。按着色强度计分:着色弱为 1 分,着色中度为 2 分,着色强为 3 分。两种记分的乘积即为阳性强度:0 分为阴性(-),1~4 分为弱阳性(+),>4~8 分为中度阳性(++),>8~12 分为强阳性(+++);HPV 16/18 阳性结果表现为以上皮细胞核内棕褐色着色为主。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件。根据适用条件对 p16 和 COX-2 表达阳性率在各组间的差异采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法进行检验。两者相关性采用 Spearman 等级相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV 16/18 的表达 HPV16/18 阳性细胞表现为以上皮细胞核内棕褐色着色为主,见封 3 图 1~3。正常宫颈、LSIL、HSIL 和 CC 组织中 HPV16/18 阳性率逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。但 HPV 16/18 的表达与宫上皮内瘤变(CIN)分级、病理类型、肿瘤生长类型、组织病理学分级、临床分期及有、无淋巴结转移均无关($P > 0.05$),见表 2。

2.2 p16 的表达 p16 阳性细胞表现为细胞核和(或)细胞质

着棕黄色,见彩插 I 图 4~6。随着 CC 组织病理学分级的升高,p16 阳性率逐渐上升,差异有统计学意义($P = 0.019$),而 p16 表达与有、无淋巴结转移及临床分期、病理类型和生长类型无关($P > 0.05$),见表 2。p16 在 LSIL、HSIL、CC 组织中的阳性率明显高于正常宫颈组织($P < 0.05$),LSIL、HSIL 和 CC 组织中 p16 的表达逐渐增强,呈正相关($r = 0.584, P < 0.05$),见表 3。

表 1 HPV16/18、p16 和 COX-2 在各组中的表达[n(%)]

组别	n	HPV16/18 阳性	p16 阳性	COX-2 阳性
正常宫颈组	22	2(9.09)	1(4.55)	2(9.09)
LSIL 组	28	12(42.86)	15(53.57)	13(46.43)
HSIL 组	39	27(69.23)	30(76.92)	25(64.10)
CC 组	62	53(85.48)	55(88.71)	49(79.03)
χ^2		45.989	55.951	35.173
P		0.000	0.000	0.000

表 2 CC 组织中 HPV 16/18、p16 和 COX-2 的表达与临床病理特征的关系[n(%)]

病理特征	n	HPV 16/18			p16			COX-2		
		阳性[n(%)]	χ^2	P	阳性[n(%)]	χ^2	P	阳性[n(%)]	χ^2	P
病理类型										
鳞癌	51	45(88.24)	1.754	0.185	47(85.45)	3.411	0.065	42(82.35)	1.913	0.167
腺癌	11	8(72.73)			8(72.73)			7(63.64)		
生长类型										
外生型	31	27(87.10)	1.057	0.835	29(93.55)	3.091	0.335	25(80.65)	1.308	0.762
内生型	12	10(83.33)			11(91.67)			9(75.00)		
溃疡型	9	7(77.78)			7(77.78)			8(88.89)		
颈管型	10	9(90.00)			8(80.00)			7(70.00)		
组织病理学分级										
高分化	30	26(86.67)	0.410	0.896	23(76.67)	7.184	0.019	19(63.33)	8.373	0.011
中分化	21	18(85.71)			21(100.00)			19(90.48)		
低分化	11	9(81.81)			11(100.00)			11(100.00)		
临床分期										
I	24	19(79.17)	1.232	0.697	21(87.50)	1.933	0.347	16(66.67)	5.831	0.047
II	29	26(89.66)			27(93.10)			25(86.21)		
III	9	8(88.89)			7(77.78)			8(88.89)		
淋巴结转移										
有	13	10(76.92)	0.971	0.324	11(84.62)	0.275	0.600	13(100.00)	4.364	0.037
无	49	43(87.76)			44(89.80)			36(73.47)		

表 3 p16 在各组中的表达强度(n)

组别	n	p16				r	P
		-	+	++	+++		
正常宫颈组	22	21	1	0	0	0.584	0.000
LSIL 组	28	16	7	5	0		
HSIL 组	39	12	4	12	11		
CC 组	62	9	8	20	25		

2.3 COX-2 的表达 COX-2 阳性细胞表现为细胞质着棕黄色,见彩插 I 图 7~9。COX-2 在 LSIL、HSIL、CC 组织中的阳性率明显高于正常宫颈组织($P < 0.05$),LSIL、HSIL 和 CC 组织中 COX-2 的表达逐渐增强,呈正相关($r = 0.527, P < 0.05$),见表 4。COX-2 表达与 CC 临床分期、组织病理学分级及有、无淋巴结转移有关($P < 0.05$),而与病理类型和生长类型无关($P > 0.05$),见表 2。

2.4 HPV16/18 感染与 p16 高表达及 COX-2 表达的相关性 对 62 例 CC 组织中高危型 HPV16/18 阳性率与 p16 及

表 1 两组术中、术后指标比较(*t* 检验)

组别	平均手术时间 (min)	平均住院时间 (d)	下地行走时间 (周)	骨折愈合时间 (周)	术中出血量 (mL)	术后引流量 (mL)	术后输血量 (mL)
解剖钢板组	90	15	12	13	150	60	400
PFN 组	90	15	12	13	140	70	400

表 2 两组术后并发症比较(χ^2 检验, *n*)

组别	固定松动	内固定断裂	骨不连接	髓内翻	髌关节畸形	股骨干 功能障碍	肢体 短缩骨折	大腿痛
解剖钢板组	1	0	0	2	1	0	1	0
PFN 组	0	1	1	1	0	1	1	1

术后指标见表 1, 术后并发症见表 2, 术后疗效评定(Harris 评分)见表 3。两组患者在术中及术后指标、术后并发症、疗效评定等方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。骨折术后愈合情况见图 1、2。

表 3 两组疗效比较(χ^2 检验, *n*)

组别	<i>n</i>	优	良	好	差	优良率(%)
解剖钢板组	33	28	3	1	1	93.94
PFN 组	36	31	3	2	0	94.44



图 1 解剖钢板固定术后 10 个月骨折骨性愈合



图 2 PFN 固定术后 12 个月骨折骨性愈合

3 讨 论

3.1 解剖钢板与 PFN 治疗不稳定型股骨转子间骨折的生物力学特征及优劣 研究表明髌关节载荷是人体体质量的 3~5 倍, 髌关节负重时, 股骨近端内侧骨皮质处于压应力, 外侧骨皮

质处于张应力, 而转子间骨折后, 骨折部还存在旋转应力和剪应力。近年来以股骨近端解剖钢板、滑动鹅头钉板(DHS)为代表的钉-板系统因固定于股骨近端外侧骨皮质, 主要分担张应力传导, 结构连接方便, 螺钉固定角度灵活, 使复杂骨折复位固定变得容易且较为牢靠, 具有静力和动力加压作用, 使骨折端紧密接触, 产生一定的压力, 有利于骨折愈合^[4]。术前在 C 型臂监视下良好复位, 术中只需显露大转子及其下方股骨外侧即可, 因其具有手术创伤小、出血少、操作方便、手术时间大大缩短、骨折愈合率高等优点而得以临床广泛应用^[5]。但一些学者临床观察发现, 尤其是后内侧骨皮质缺损的不稳定型骨折, 通过股骨矩区的压应力难以传导, 应力集中于钢板上, 会引起头钉割裂股骨头或钉板交界处的疲劳性折断导致髓内翻, 本研究解剖钢板组发生 2 例。因此, 认为从生物力学的角度来讲, 髓内固定更符合髌部的力学原理, 靠近负重力线, 能更多地承担压应力, 即使后内侧骨皮质的连续性破坏或连续性中断也能有力地防止髓内翻^[6]。但经过长期随访观察发现, 髓内固定(如 PFN)治疗此类骨折仍存在很多问题, 生物力学结果显示固定之后股骨近端所受应力明显减少而股骨远端所受应力增加, 导致靠近钉尾部的股骨远端常发生继发骨折, 本研究 PFN 组发生 1 例。

3.2 对于股骨转子间骨折采取髓内固定还是髓外固定应酌情而定 转子间骨折呈多样化, 对不稳定型转子间骨折, 因其股骨距骨皮质缺损, 为防止引发螺钉松动及钉尖切割, 许多学者认为髓内钉固定有着生物力学和技术方面的优势, 理应选择髓内钉固定。Slika 等^[7]对 100 例老龄股骨转子间骨折采用 Ender 钉、DHS 固定对比观察发现 DHS 组在平均住院时间、手术时间、术后引流量、术后并发症等方面均较 Ender 钉组低, 手术创伤小, 因此, 认为对不稳定型股骨转子间骨折手术指征应予拓展。近年来多名作者 Parker(1998)、Ladsen(1996)、Parker(2003)对于股骨转子间骨折髓内、外固定进行了回顾性研究, 特别是 Parker 的 2 472 例大样本、多中心统计结果显示, 2 种固定方式在骨折愈合、手术时间、术中出血量及合并症等方面没有显著差异^[8]。并认为髓内固定手术操作要求较高, 固定之前骨折需获得良好复位; 在某种情况下只有外展位才能获得复位而在此位置髓内针则无法打入; 另外髓内针操作技术的学习时间较长。最近 Liu 等^[9]对 1 257 例转子间骨折采用 Gamma 钉、DHS 固定, 通过对比观察发现二者在伤口感染、死亡率、再手术、恢复后独立行走等方面差异无统计学意义。本研究通过对骨折类型、手术资料、术后并发症及髌关节功能恢复等方面进行临床对比分析也发现两组无显著差异, 而采用股骨近端解剖钢板固定治疗也取得了显著疗效, 因此, 对此类骨折采用何种方式进行固定应根据患者年龄、全身情况、合并症、骨折类

型、骨质疏松程度、术者对内固定器材力学原理及使用要领熟悉程度等综合进行选择,能用简单手术达到治疗目的者就不选用复杂手术。

3.3 取得良好疗效的关键是重视术前评估、术中规范操作及术后的康复训练 不稳定型转子间骨折多见于高龄患者,术前合并疾病多,创伤后的应激反应可使病情变得更加复杂,充分评估及治疗术前疾病是手术成功的前提^[10]。作者术前常规对所有患者进行超声心动图和肺功能检查并进行心肺功能评估,对心脑血管疾病、高血压、糖尿病等基础疾病请内科和麻醉科医师会诊纠正各种疾患,改善全身情况,创造手术机会,保证安全度过手术期。术中严格规范操作程序,因为骨折手术的成功与骨折区血供生物学环境、骨折坚强固定、术者的技术性操作密切相关。强调微创化,规范操作的准确性,置入内固定力求符合正确的生物力学原理,有利于骨折愈合和髋关节功能恢复^[11]。作者认为术者在 C 型臂监视下,常规利用骨科手术牵引床牵引维持良好的复位是手术成功的关键。虽然关于头钉(如解剖钢板)及主钉(如 PFN)置放的合理位置存在争议^[12],但要保证其固定的强度,安放在股骨颈内的头钉和主钉时,应尽量放置在股骨颈的中下部,此区为张力骨小梁和压力骨小梁交叉,骨质最致密,对螺钉把持力度高。而对于小转子骨折是否复位固定,可根据具体情况灵活掌握,波及股骨距的大块小转子骨块,一定要满意复位,以螺丝钉或钢丝予以有效固定^[13];对骨折块较小,或已成小碎片,难以复位固定时,也不必强求,一般均可获得骨性愈合。王亚梓等^[14]认为小转子作为股骨近端内侧弓的一部分,影响股骨转子部位的稳定性,但不是唯一的因素,目前众多学者跟踪随访观察小转子未固定的病例也并未出现髓内翻。本研究出现 3 例髓内翻(解剖钢板组 2 例、PFN 组 1 例)是因患者过早负重行走所致。因此,下地和负重程度应根据患者体质、骨折类型、骨质疏松程度加以综合考虑^[15]。强调在医护人员的科学指导下合理有序进行术后康复功能锻炼,术后 4 周扶拐下地不负重行走,定期摄片证实有明显骨痂生长后可逐步负重行走,骨折完全愈合方可弃拐,坚持早活动、晚负重、减少并发症的原则,以尽快恢复到伤前功能为目的。

参考文献:

[1] Kitamura S, Hasegawa Y, Suzuki S, et al. Functional outcome after hip fracture in Japan[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998, 34(8): 29-31.

(上接第 1201 页)

cervix adenocarcinoma[J]. Virchows Arch, 2006, 448(5): 597-599.

[12] Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM. Diagnostic utility of p16 INK 4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies [J]. Pathology, 2008, 40(4): 335-337.

[13] Queiroz C, Silva TC, Alves VA, et al. p16 (INK 4a) expression as a potential, prognostic marker in cervical preneoplastic and neoplastic lesions[J]. Pathol Res Pract, 2006, 202(2): 77-80.

[14] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1306-1308.

[2] 徐丛, 赵国军, 李连泰, 等. 不同性别 Singh 指数与双能 X 射线骨密度仪测量骨密度的相关性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 28(14): 5305-5306.

[3] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学[M]. 3 版. 北京: 人民军医出版社, 2006: 708-710.

[4] 普洪, 常敏, 杨宏锬. 股骨粗隆间骨折 4 种内固定方法的比较[J]. 中华骨科杂志, 2001, 7(1): 54-55.

[5] 崔丙军, 孙宝群, 崔文峰, 等. 股骨近端解剖钢板治疗 30 例股骨粗隆间粉碎性骨折[J]. 重庆医学, 2010, 39(7): 853-854.

[6] 王建辉, 刘长贵, 刘瑞波. PFN 和 DHS 治疗股骨转子间骨折的生物力学研究及临床疗效观察[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2004, 19(6): 739-741.

[7] Slika A, Zgoda M, Gorski R, et al. Comparison of the ender's nailing and dynamic hip screw(DHS) fixation in the treatment of trochanteric fractures in elderly patients[J]. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol, 2006, 71(4): 269-273.

[8] 王满宜. 加强股骨近端骨折的临床研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(5): 481-483.

[9] Liu M, Yang Z, Pei F, et al. A meta-analysis of the gamma nail and dynamic hip screw in treating peritrochanteric fractures[J]. Int Orthop, 2009, 29(4): 256-258.

[10] 张保中, 邱贵兴. 高龄股骨转子间骨折的手术治疗[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(8): 582-584.

[11] 许杰, 马若凡, 彭焰, 等. 股骨转子间骨折术后并发症的原因分析及处理[J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8(7): 630-633.

[12] 危杰. 股骨转子间骨折[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(5): 554-446.

[13] 叶一林, 柴卫兵, 朱天岳, 等. 股骨粗隆间骨折内固定手术后并发症原因分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(12): 890-892.

[14] 王亚梓, 王蕾, 张海生, 等. 股骨转子间粉碎骨折: 小转子必须固定吗[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(9): 970-978.

[15] 张勇华, 艾昌森, 朱国权, 等. 解剖钢板内固定治疗股骨转子间骨折 28 例疗效分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(24): 3173-3174.

(收稿日期: 2010-09-16 修回日期: 2010-11-17)

[15] Zhi H, Wang L, Zhang J, et al. Significance of COX-2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2006, 27(6): 1214-1216.

[16] Hseu YC, Chen SC, Tsai PC, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 and induction of apoptosis in estrogen-nonresponsive-breast cancer cells by antrodia camphorata[J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(7): 1107-1109.

[17] 张云雷, 黄俊星, 宋振细, 等. 环氧合酶-2 和细胞周期调节蛋白在食管鳞癌中的表达[J]. 江苏医药, 2010, 36(3): 261-263.

(收稿日期: 2010-09-26 修回日期: 2010-11-10)