

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.13.014

细胞免疫化学 p16/Ki-67 双染结合 DNA 倍体分析预测 HSIL 的研究*

张金秋,朱萍,陆敏华,董建峰,印永祥[△],赵华

(南京医科大学附属无锡市妇幼保健院病理科,江苏无锡 214002)

[摘要] **目的** 探讨 DNA 倍体分析联合细胞免疫化学 p16/Ki-67 双染检测对宫颈高级别鳞状上皮内病变(HSIL)及宫颈鳞癌(SCC)的诊断价值。**方法** 随机收集细胞学检查 73 例,其中有少量 DNA 倍体异常细胞 53 例,DNA 倍体阴性 20 例,通过细胞免疫化学双染检测 p16/Ki-67 结果。以病理结果为金标准,对比分析 DNA 倍体分析和 DNA 倍体分析联合 p16/Ki-67 双染对 HSIL+ 的诊断价值。**结果** 20 例 DNA 倍体阴性的标本中 p16/Ki-67 双染结果全部阴性。DNA 倍体分析对 HSIL+ 的阳性预测值为 34.62%,DNA 倍体分析联合 p16/Ki-67 双染对 HSIL+ 的敏感性为 84.62%,特异性为 92.31%,阳性预测值为 78.57%,阴性预测值为 94.74%,明显高于 DNA 倍体分析对 HSIL+ 的阳性预测值($P < 0.05$)。**结论** p16/Ki-67 双染可以明显提高 HSIL 检出的预测值,DNA 倍体分析联合 p16/Ki-67 双染是预测 HSIL+ 的有效方法,适合在医疗资源缺乏的地区实施。

[关键词] 宫颈上皮内瘤样病变;p16/Ki-67 双染;细胞免疫化学;DNA 倍体分析**[中图分类号]** R711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)13-1770-03

Study on immunocytochemistry p16/Ki-67 double staining combined with DNA ploidy analysis for analyzing and predicting cervical high grade squamous intraepithelial lesion*

Zhang Jinqiu, Zhu Ping, Lu Minhua, Dong Jianfeng, Yin Yongxiang[△], Zhao Hua

(Department of Pathology, Affiliated Wuxi Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Wuxi, Nanjing 214002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the diagnostic value of DNA ploidy analysis combined with immunocytochemistry p16/Ki-67 double staining in cervical high grade squamous intraepithelial neoplasia(HSIL) and cervical squamous cell carcinoma(SCC). **Methods** A total of 73 cases of cytological tests were randomly collected. Among them, 53 cases were small DNA ploidy abnormal cells and 20 cases were DNA ploidy negative. The p16/Ki-67 results were detected by immunocytochemistry double staining. With the pathological results as the golden standard, the diagnostic values of DNA ploidy analysis and DNA ploidy analysis combined with p16/Ki-67 double staining in HSIL + was contrastively analyzed by pathologic results. **Results** Among 20 samples of DNA ploidy negative, the p16/Ki-67 double staining results all were negative. The positive predictive value of DNA ploidy analysis for HSIL + was 34.62%. The sensitivity of DNA ploidy analysis combined with p16/Ki-67 double staining for HSIL + was 84.62%, and its specificity was 92.31%, the positive predictive value was 78.57% and the negative predictive value was 94.74%, which were significantly higher than those of DNA ploidy analysis($P < 0.05$). **Conclusion** p16/Ki-67 double staining can significantly improve the prediction value of HSIL. The DNA ploidy analysis combined with p16/Ki-67 double staining is an effective method for predicting HSIL +, which is suitable for the implementation in the areas with lack of medical resources.

[Key words] cervical intra epithelial neoplasia;p16/Ki-67 double staining;immunocytochemistry;DNA ploidy analysis

宫颈癌发病率居女性恶性肿瘤的第二位,病死率居恶性肿瘤的第七位。许多因素导致我国宫颈癌筛查工作的第一阶梯细胞学检查不确定性、不稳定性、不标准性,加上细胞学只具有适度的敏感性,需要其他检测提高宫颈癌筛查有效性。近年来 DNA 倍体分析用来进行宫颈癌筛查。最近国内外大量研究显示:肿瘤的发生、发展及预后与肿瘤抑制基因 p16 及增殖细胞核抗原 Ki67 活性密切相关^[1-2]。本文通过细胞免疫化学 p16/Ki-67 双染、DNA 倍体检测和病理活检结果探讨细胞免疫化学 p16/Ki-67 双染在预测宫颈高级别鳞状上皮内病变(HSIL)中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年无锡市妇幼保健院病理科行细胞学 DNA 倍体检测结果中可见 DNA 倍体异常细胞且具有活检结果 53 例,年龄 21~68 岁,中位年龄 40.5 岁。同期选择细胞学 DNA 倍体检测阴性 20 例,年龄 22~60 岁,中位年龄 40 岁。

1.2 DNA 倍体检测 所有 DNA 染色片由南京福怡科技发展有限公司全自动细胞 DNA 定量分析系统(SPICM-DNA 型全自动细胞肿瘤筛查分析系统)进行扫描。每张玻片扫描 5 000 个以上细胞核,系统根据不同细胞核所具有的不同参数特征进行计数和分类。结果分为:(1)未见 DNA 倍体异常细胞;(2)少量 DNA 倍体异常细胞:出现 1~2 个病变细胞($DI > 2.5$ 的异倍体细胞或 5%~10% 的细胞 $1.25 < DI < 2.5$);(3)可见 DNA 倍体异常细胞,出现 3 个或者以上 $DI > 2.5$ 的异倍体细胞或超过 10% 的细胞 $1.25 < DI < 2.5$ 。少量 DNA 倍体异常细胞为阳性标准^[3]。

1.3 病理活检结果判断 按 2014 年 WHO《女性生殖器官肿瘤分类》标准分级,分宫颈炎、宫颈低级别鳞状上皮内病变(LSIL)、HSIL、宫颈鳞癌(SCC)。以 HSIL 及以上病变称为 HSIL + 认为组织学阳性。

1.4 细胞学 p16/Ki-67 双染方法 细胞学 p16/Ki-67 双染试剂盒购置福州迈新生物技术开发公司。细胞薄片置于 95% 乙

* 基金项目:江苏省无锡市卫计委妇幼保健健康成果技术推广项目(FYTG2016-2);江苏省无锡市卫生计生科技成果和适宜技术推广项目(T201645)。作者简介:张金秋(1993-),本科,技师,主要从事肿瘤病理方面的研究。△ 通信作者,E-mail:yinyrh@sina.com。

醇中固定 30 min,流水冲洗 1 min。(1)对标本进行 EDTA8.0 95 °C 热修复 20 min。(2)滴加过氧化物酶室 100 μL,室温孵育 10 min。(3)滴加组合 p16 抗体、Ki-67 抗体的一抗 100 μL,室温孵育 60 min。(4)滴加显色剂 AP-RED 100 μL,室温孵育 20 min。(5)滴加显色剂 DAB 100 μL,室温孵育 5 min。(6)苏木素衬染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。

1.5 细胞学 p16/Ki-67 双染检测结果判断 p16 定位在细胞核和细胞质上,呈红色;Ki-67 定位在细胞核上,呈黄色;细胞核部分交叉反应呈棕褐色。阳性结果是指染色片中出现一个或一个以上的“双染细胞”。“双染细胞”是指一个染色细胞,其细胞质呈红色同时细胞核呈黄色或棕褐色。阴性结果是指染色片中无“双染细胞”,但可以无或没有“单染细胞”。“单染细胞”一个染色细胞,仅细胞质呈红色而细胞核无黄色或棕褐色着色,或细胞核呈黄色或棕褐色而细胞质无红色显色的状态。

1.6 统计学处理 利用 SPSS19.0 软件进行统计分析,采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

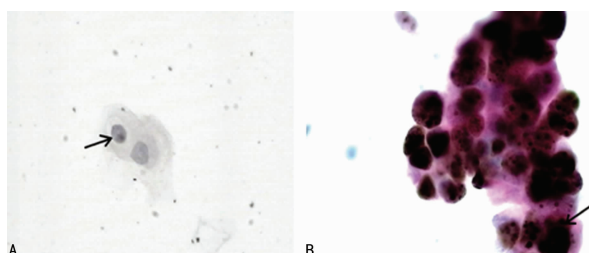
73 例宫颈细胞学 DNA 倍体分析结果显示,20 例宫颈细胞学 DNA 倍体检测阴性,53 例宫颈细胞学 DNA 倍体检测为可见少量 DNA 倍体异常细胞,组织活检结果发现宫颈炎 16 例、LSIL 18 例、HSIL 13 例、SCC 5 例。检测 HSIL+ 的阳性预测值为 33.96%。

20 例宫颈细胞学 DNA 倍体检测阴性病例中 P16/Ki-67 双染检测结果全部阴性,因 DNA 倍体检测阴性没有做宫颈活检,认为是宫颈正常。53 例 DNA 倍体检测可见少量 DNA 倍体异常细胞病例中因有 1 例细胞学重新制片检测时细胞学中无病变细胞故剔除不计在内,52 例病例中有 14 例 P16 和 Ki-67 双染阳性,14 例 P16 和 Ki-67 双染阳性病例中活检结果 HSIL+11 例,LSIL 3 例。

DNA 倍体联合 p16/Ki-67 双染检测对 HSIL+ 的敏感性 84.62%,特异性 92.31%,阳性预测值 78.57%,阴性预测值 94.74%。与 DNA 倍体检测对 HSIL+ 的阳性预测值相比,DNA 倍体联合 p16/Ki-67 双染检测可明显提高 HSIL+ 的阳性预测值($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 p16/Ki67 双染结果与宫颈高级别病变比较

| p16/Ki-67 | HSIL+ | | 敏感性 | 特异性 | 阳性预测值 | 阴性预测值 |
|-----------|-------|----|--------|--------|--------|--------|
| | 阳性 | 阴性 | | | | |
| 阳性 | 11 | 3 | | | | |
| 阴性 | 2 | 36 | 84.62% | 92.31% | 78.57% | 94.74% |



A:p16/Ki-67 双染阴性;B:p16/Ki-67 双染阳性。

图 1 p16/Ki-67 双染在宫颈细胞学上的表达

3 讨 论

目前在很多发达国家所沿用的常规细胞学或巴氏检查被证实能有效降低宫颈癌的发病率和病死率。超过 99% 的宫颈癌与高危型人乳头状病毒(HR-HPV)相关^[4]。HPV 检测有很高的阴性预测值,HPV 阴性的妇女在 5~7 年内不会发展为宫

颈癌,因为有非常可信的证据显示从最初感染 HPV 到宫颈癌至少需要 8 年时间^[5]。文献报道认为 6 个月后重复检测细胞学只发现少数 HSIL,其中 28% 的 HSIL HPV 持续感染最终诊断,认为通过重复检查细胞学或 HPV 检测在减少阴道镜方面缺乏有效性^[6]。需要增加新的检测方法提高宫颈高级别病变检出率。

目前为了对抗宫颈癌及其癌前病变,几种辅助诊断方法已经应用于提高细胞学和组织学诊断的准确度。有癌变趋势或已经癌变的细胞核酸异常增生,核酸改变早于细胞形态改变,定量分析细胞内 DNA 核酸是否改变和改变多少可以直接判断是否异常。由于遗传不稳定性引起染色体的非整倍性已公认肿瘤形成的主要事件,通过图像检测 DNA 倍体可能是肿瘤形式的标记物^[7]。

DNA 倍体检测认为是用来预测宫颈癌前病变的一线主观诊断的方法。当然 DNA 非整倍体宫颈上皮异常对于每个病人而言,不足以预测临床预后^[8]。DNA 倍体分析预测宫颈高级别鳞状上皮内病变的敏感度为 78.26%,阳性预测值为 33.33%^[9]。本研究同样发现 DNA 倍体分析预测 HSIL+ 的阳性预测值为 33.96%。有文献报道常规细胞学检测预测 HSIL+ 的阳性预测值是 35.2%,DNA 倍体检测的阳性预测值是 65.9%^[10],结果不一致可能与选择标本、例数多少有关。

细胞学诊断是形态学检测,因形态变化缺少客观的判断标准,造成诊断结果重复性不好。最近研究已证实 p16 和 Ki-67 的表达均与 HR-HPV 感染相关^[11-12]。目前 p16 单染和或 Ki-67 单染已应用于组织学宫颈鳞状上皮病变辅助诊断中,但需要与组织形态学和染色方式结合鉴别鳞状上皮是病变还是化生、反应性改变或萎缩性改变。以往细胞学上研究大多是 p16 单染和或 Ki-67 单染进行评估,结果欠佳。有文献报道,p16 过表达提示经 HPV E7 癌蛋白激活,但 p16 也表达在非异常的细胞上,p16 只可能作为 CIN I 级的预后因子^[13]。也有相反的报道,使用 p16 染色用于裁定女性生殖道下段及肛门标本上可能会更准确预测病变级别,避免不必要的切除治疗^[14]。本研究发现,p16 不仅仅局限于表达在异常细胞上,也部分表达在正常子宫内膜细胞、柱状细胞和化生细胞中。

最近一个重要的生物标记物观点,报道在宫颈细胞学标本上检测 p16/Ki-67 双标蛋白表达。p16 过表达诱导细胞周期阻滞,Ki-67 作为通过 HPV 转化感染介导细胞周期调控的代替标记物^[15]。在一个细胞上 p16/Ki-67 双阳可以作为通过 HPV 基因蛋白调控细胞周期的标记物,可能是 HPV 转化感染的标记物^[16]。Solares 等^[17]报道,对 130 例最初的阴道镜检查正常的病例随访 1 年发现,有 9 例发生宫颈鳞状上皮病变或高级别病变,这 9 例病例中 2/3 的病例中最初 p16/Ki-67 双标阳性。最新文献显示,p16/Ki-67 双标在 HSIL+ 的阳性预测值明显高于 HPV 的阳性预测值^[18]。本文的研究数据表明,p16/Ki-67 双标检测在 DNA 倍体阳性标本中敏感性 84.62%,特异性 92.31%,阳性预测值 78.57%,阴性预测值 94.74%。p16/Ki-67 双标具有重要的临床意义,p16/Ki-67 双阳性可明显提高预测宫颈高级别鳞状上皮内病变,与 Donà 等^[16]的报道相符。当然也存在一定的假阳性率和假阴性率,目前仍然没有一个抗体可以 100% 预测细胞的恶性潜能^[19]。

通过 p16/Ki-67 双染,阳性计数独立于细胞形态学。P16 作为宫颈鳞状上皮病变的早期事件,而 Ki-67 在宫颈鳞状上皮病变进展中持续存在^[20]。尽管目前在重复细胞学制片中存在少数病例中无阳性特征细胞,笔者有理由认为有可重复性的细胞学制片的基础上,在 DNA 倍体分析的基础上进一步进行 p16/Ki-67 双染可以减少一过性感染造成的假阳性,可明显提

高宫颈高级别鳞状上皮内病变检出的预测值,减少了阴道镜和宫颈活检创伤性检查、不必要的患者心理压力和经济负担,特别在细胞学医师缺乏、医疗资源缺乏的地区实施。细胞免疫化学 p16/Ki-67 双染有可能成为实现宫颈细胞学精准筛查的有效辅助方法之一。

参考文献

- [1] 文华清,耿源源,蔡金凤,等. p16 和 Ki-67 蛋白在宫颈上皮内瘤变中的临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2010,15(7):613-616.
- [2] Barber BR, Biron VL, Klimowicz AC, et al. Molecular predictors of locoregional and distant metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. J Otolaryngol Head Neck Surg,2013,42(1):53.
- [3] 朱晓娟,赵华,詹惠英. DNA 倍体分析在宫颈病变筛查中的应用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(9):1294-1296.
- [4] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol,1999,189(1):12-19.
- [5] Liebrich C, Brummer O, Von Wasielewski R, et al. Primary cervical cancer truly negative for high-risk human papillomavirus is a rare but distinct entity that can affect virgins and young adolescents[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2009,30(1):45-48.
- [6] Luyten A, Scherbring S, Reinecke-Lüthge A, et al. Risk-adapted primary HPV cervical cancer screening project in Wolfsburg, Germany—experience over 3 years[J]. J Clin Virol,2009,46(Suppl 3):S5-10.
- [7] Böcking A, Nguyen VQ. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma[J]. Cancer,2004,102(1):41-54.
- [8] Reich O, Ballon M. DNA cytometry as a first-line method for diagnosis of cervical precancer with respect to clinical behaviour[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2010,31(4):372-374.
- [9] 林丹,罗新,蒋学风,等. DNA 倍体分析联合高危型人乳头瘤病毒检测筛查宫颈病变[J]. 实用妇产科杂志,2014,30(7):531-534.
- [10] Grote HJ, Nguyen HV, Leick AG, et al. Identification of progressive cervical epithelial cell abnormalities using DNA image cytometry[J]. Cancer Cytopathol,2004,102(6):373-379.
- [11] Samir R, Asplund A, Tot T, et al. High-risk HPV infection and CIN grade correlates to the expression of c-myc, CD4+, FHIT, E-cadherin, Ki-67, and p16INK4a[J]. J Low Genit Tract Dis,2011,15(4):280-286.
- [12] Mimica M, Tomic S, Kardum G, et al. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection[J]. Int J Gynecol Cancer,2010,20(1):116-119.
- [13] Del Pino M, 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):488.
- [14] Maniar KP, Sanchez B, Paintal A, et al. Role of the biomarker p16 in downgrading in 2 diagnoses and predicting higher-grade lesions[J]. Am J Surg Pathol,2015,39(12):1708-1718.
- [15] Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triaging pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 dual-stained cytology[J]. Gynecol Oncol,2011,121(3):505-509.
- [16] Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, human papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy[J]. Gynecol Oncol,2012,126(2):198-202.
- [17] Solares C, Velasco J, Álvarez-Ruiz E, et al. Expression of p16/Ki-67 in ASC-US/LSIL or normal cytology with presence of oncogenic HPV DNA[J]. Anticancer Res,2015,35(11):6291-6295.
- [18] Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal papanicolaou cytology: PALMS study results[J]. Cancer Cytopathol,2015,123(6):373-381.
- [19] Fowler LJ, Lachar WA. Application of immunohistochemistry to cytology[J]. Arch Pathol Lab Med,2008,132(3):373-383.
- [20] Zhong P, Li J, Gu Y, et al. P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(3):2979-2986.

(收稿日期:2016-11-28 修回日期:2017-01-16)

(上接第 1769 页)

- [11] Targownik LE, Leslie WD, Davison KS, et al. The relationship between proton pump inhibitor use and longitudinal change in bone mineral density: a population-based from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos)[J]. Am J Gastroenterol,2012,107(9):1361-1369.
- [12] 司小北,蓝宇.长期使用质子泵抑制剂的不良反应[J].药物不良反应杂志,2015,17(3):218-221.
- [13] 蒋绚,张庆文,张振宇,等.长期应用质子泵抑制剂的风险观察[J].中华医学杂志,2014,94(4):284-288.
- [14] 董锐,项征,林汉生,等.应用抑酸剂与骨质疏松性骨折关系的 Meta 分析[J].中国组织工程研究,2014,18(33):5402-5406.
- [15] Roux C, Goldstein JL, Zhou X, et al. Vertebral fracture efficacy during risedronate therapy in patients using proton pump inhibitors[J]. Osteoporos Int,2012,23(1):277-284.

(收稿日期:2016-11-27 修回日期:2017-01-15)