

p16/微小染色体维持蛋白 2 和 p16/Ki-67 双重染色对高危型人乳头瘤病毒呈阳性妇女的宫颈病变筛查

廖光东^{1,2} 康乐妮^{2,3} 李静⁴ 曾玺^{1,2} 郝明蓉^{1,2}

【摘要】 目的 探讨 p16/微小染色体维持蛋白(MCM)2 和 p16/Ki-67 免疫组织化学双重染色,对高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)呈阳性妇女宫颈病变的筛查效果。**方法** 选择 2015 年 4 月至 10 月,于四川省成都市双流区招募的符合本研究纳入、排除标准,并且于四川大学华西第二医院进行 HPV DNA 检测,诊断为 HR-HPV 呈阳性的 62 例妇女为研究对象。采集这 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者的宫颈脱落细胞学标本,均采取新柏薄层液基细胞学检查(TCT)及 p16/MCM2、p16/Ki-67 免疫细胞化学双重染色。对于 HPV-16、-18 呈阳性,或其他 12 种 HR-HPV(HPV-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-66、-68)呈阳性,并且 TCT 结果为 $\geq$ 未明确意义的非典型鳞状细胞($\geq$ ASCUS)的受试者,均进行阴道镜检查,若阴道镜检查结果异常,再进行宫颈活组织检查。统计学比较 p16/MCM2、p16/Ki-67 双重染色与 TCT,对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的敏感度、特异度、受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC),评估 p16/MCM2 和 p16/Ki-67 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的有效性。本研究经过四川大学医学伦理委员会批准(批准编号:K2014018)。所有受试者均同意参加宫颈癌筛查,并签署临床研究知情同意书。**结果** ①纳入本研究的 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者中,p16/Ki-67、p16/MCM2 阳性率,均随宫颈病变程度增高而呈上升趋势($\chi^2 = 21.947, P < 0.001$; $\chi^2 = 5.268, P = 0.022$)。TCT 阳性率与宫颈病变程度无显著相关性($\chi^2 = 1.850, P = 0.174$)。② HPV-16、-18 呈阳性受试者的 p16/Ki-67 阳性率为 69.2%(9/13),显著高于其他 12 种 HR-HPV 呈阳性受试者的 36.7%(18/49),并且差异有统计学意义($\chi^2 = 4.413, P = 0.036$)。HPV-16、-18 呈阳性受试者与其他 12 种 HR-HPV 呈阳性受试者的 p16/MCM2 阳性率相比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.510, P = 0.113$)。③ TCT 及 p16/Ki-67、p16/MCM2 双重染色,对纳入本研究的 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者的宫颈病变筛查的敏感度分别为 47.1%(8/17)、94.1%(16/17)、88.2%(15/17),特异度分别为 68.9%(31/45)、75.6%(34/45)、42.2%(19/45)。p16/Ki-67 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC-AUC 为 0.848,显著大于 TCT 的 0.580,二者比较,差异有统计学意义($Z = 2.736, P = 0.006$)。p16/MCM2 双重染色和 TCT 对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC-AUC 相比较,差异无统计学意义($Z = 0.651, P = 0.515$)。**结论** p16/Ki-67 双重染色对 HR-HPV 呈阳性妇女宫颈病变筛查的敏感度和特异度,均高于 TCT。该方法操作简单,结果容易判读,有望成为医疗资源严重短缺地区的 HR-HPV 呈阳性妇女阴道镜转诊分流的有效方法。p16/MCM2 双重染色对 HR-HPV 呈阳性妇女宫颈病变的筛查效果,有待进一步研究、证实。

【关键词】 乳头状瘤病毒科; 宫颈肿瘤; p16/Ki-67; p16/微小染色体维持蛋白 2; 免疫细胞化学; 双重染色; 妇女

P16 /minichromosome maintenance protein 2 and p16 /Ki-67 double staining in cervical lesions screening of high-risk human papillomavirus positive women Liao Guangdong^{1,2}, Kang Leni^{2,3}, Li Jing⁴, Zeng Xi^{1,2}, Qie Mingrong^{1,2}. ¹ Department of Gynecology and Obstetrics, ² Key Laboratory of

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2017.04.010

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81602504)

作者单位:610041 成都,四川大学华西第二医院妇产科¹,出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室²,全国妇幼保健监测办公室³;610041 成都,四川大学华西公共卫生学院环境与职业医学系⁴

通信作者:郝明蓉,Email:qmrjzz@126.com

Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, ³National Office for Maternal and Child Health Surveillance of China, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ⁴Department of Environmental and Occupational Health, West China School of Public Health, No. 4 West China Teaching Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Corresponding author: Qie Mingrong, Email: qmrjzz@126.com

【Abstract】 Objective To explore the clinical efficacy of p16/minichromosome maintenance protein (MCM) 2 and p16/Ki-67 immunocytochemical double staining in screening cervical lesions in high-risk human papilloma virus (HR-HPV) positive women. **Methods** From April to October, 2015, a total of 62 women who were tested as HR-HPV positive in a cervical cancer screening program conducted in Shuangliu County, Chengdu, Sichuan Province and consistent with the inclusion and exclusion criteria of this study were selected as research subjects. The cervical exfoliative cytology specimens of these 62 HR-HPV positive women were collected and ThinPrep liquid-based cytology test (TCT) detection, p16/MCM2 and p16/Ki-67 immunocytochemical double staining were performed on the same specimen of each HR-HPV positive woman. Women infected with HPV-16/18, or other 12 types of HR-HPV (HPV-31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66, -68) with cytological abnormalities in cervical exfoliated cells TCT detection ($\geq$ atypical-squamous cells of undetermined signification, $\geq$ ASCUS) were examined by colposcopy. And if the colposcopy result was abnormal, cervical biopsy was then conducted on the woman. The sensitivities, specificities and area under curve (AUC) of the operator characteristic (ROC) curves of p16/MCM2 and p16/Ki-67 double staining in HR-HPV positive women for the detection of cervical lesions were compared with those of cervical exfoliated cells TCT detection by statistical methods, in order to evaluate the efficiency of p16/MCM2 and p16/Ki-67 double staining. This study was approved by the Medical Ethics Committee of Sichuan University (No. K2014018). All women signed informed clinical research consents.

Results ① Among the 62 HR-HPV positive women, the positive rates of p16/Ki-67 and p16/MCM2 were both significantly increased with the histological severity, and both the differences were statistically significant ($\chi^2=21.947$, $P<0.001$; $\chi^2=5.268$, $P=0.022$). While the positive rate of cervical exfoliated cells TCT detection had no obvious relationship with the histological severity, and the difference was not statistically significant ($\chi^2=1.850$, $P=0.174$). ② The positive rate of p16/Ki-67 in HPV-16/18 positive women was 69.2% (9/13), which was significantly higher than that in other 12 HR-HPV positive women 36.7% (18/49), and the difference was statistically significant ($\chi^2=4.413$, $P=0.036$), while there was no significant difference with regards to p16/MCM2 ($\chi^2=2.510$, $P=0.113$). ③ Among the 62 HR-HPV positive women, the sensitivities of cervical exfoliated cells TCT detection, p16/MCM2 and p16/Ki-67 double staining and in HR-HPV positive women for the detection of cervical lesions were 47.1% (8/17), 94.1% (16/17), and 88.2% (15/17), respectively, and the specificities were 68.9% (31/45), 75.6% (34/45), and 42.2% (19/45), respectively. The ROC-AUC curve of p16/Ki-67 double staining in HR-HPV positive women for the detection of cervical lesions was 0.848, which was larger than that of cervical exfoliated cells TCT detection 0.580, and the difference was statistically significant ($Z=2.736$, $P=0.006$), while there was no significant difference between p16/MCM2 double staining and cervical exfoliated cells TCT detection ($Z=0.651$, $P=0.515$). **Conclusions** The sensitivity and specificity of p16/Ki-67 double staining are both higher than those of cervical exfoliated cells TCT detection in HR-HPV positive women for the detection of cervical lesions. And p16/Ki-67 double staining is simple to operate, its results are easy to interpret. It is highly prosperous to be used as an effective triage method for colposcopy referral in areas with serious shortage of medical resources and cytologist. However, the diagnostic value of p16/MCM2 double staining in HR-HPV positive women for the detection of cervical lesions needs further study to confirm.

【Key words】 Papillomaviridae; Uterine cervical neoplasms; P16/Ki-67; P16/minichromosome maintenance protein 2; Immunocytochemistry; Double staining; Women

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81602504)

宫颈癌是全球第4大常见女性恶性肿瘤。2012年,全球约有53万例宫颈癌新发病例和27万例宫颈癌死亡病例^[1]。其中,85%以上宫颈癌新发病例发生在贫困地区,约占所有女性恶性肿瘤的12%^[1]。虽然人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)预防性疫苗已经上市,但是,宫颈癌筛查,仍然是目前全球预防宫颈癌的主要手段^[2]。多年来,中国开展宫颈癌筛查面临的困境是细胞病理学医师严重缺乏,细胞学诊断质量差。2013年,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)建议将HPV检测,作为宫颈癌一线筛查方法单独使用^[3]。但是,多数HPV感染是一过性的、可被机体自动清除的,并不会导致病变,将所有HPV呈阳性妇女直接转诊至阴道镜检查,将造成过度诊疗。因此,寻找新的生物学标志物,对HPV呈阳性妇女是否需进一步进行阴道镜检查进行评估,是临床迫切需要解决的问题。

高危型人乳头瘤病毒(high risk human papilloma virus, HR-HPV)的E7蛋白,可竞争性抑制细胞周期蛋白质依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)4与视网膜母细胞瘤蛋白质(retinoblastoma protein, pRb)相结合。E7蛋白与pRb结合,可导致pRb对E2F家族转录因子的抑制作用失活,E2F家族转录因子被释放。这些游离的E2F家族转录因子,可激活许多参与G₁/S期调控点的细胞周期调控基因,从而使具有增殖潜能的宫颈细胞过度表达p16。文献报道,在宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌中,利用免疫组织化学技术,可检测到p16表达呈阳性,并且p16阳性率随宫颈病变加重而升高^[4]。目前,病理学医师已经利用p16免疫组织化学染色作为辅助诊断CIN的方法之一,以提高临床诊断CIN的准确性。文献报道,采用p16免疫组织化学染色,可对HPV呈阳性妇女是否需进一步进行阴道镜检查进行评估^[5-6]。但是,p16表达呈阳性也可出现于宫颈化生细胞、萎缩细胞和正常柱状细胞中,并且p16免疫组织化学染色结果易受细胞学标本量的影响,对于宫颈病变筛查的特异度较差。

细胞核抗原Ki-67表达于G₀期以外的所有细胞周期中,可作为评价细胞增殖的生物学标志物。微小染色体维持蛋白(minichromosome

maintenance protein, MCM)2是真核生物DNA复制的主要调节因子,在DNA复制起始和延伸过程中发挥着重要作用。MCM2通过在DNA复制前,将复合物加载于DNA上,并通过解旋酶活性解链DNA,启动DNA合成,进而参与所有真核细胞的DNA复制^[7-8]。文献报道,由MCM2和拓扑异构酶Ⅱα(topoisomerase Ⅱ alpha, TOP2A)2种抗体组成,被称为ProExC的免疫组织化学检测技术,已被作为鳞状上皮内病变的辅助诊断方法应用于临床^[9-10]。迄今尚未见有关p16和MCM2抗体联合,作为肿瘤相关生物学标志物的文献报道^[10]。本研究探讨p16/Ki-67和p16/MCM2免疫细胞化学双重染色,对HR-HPV呈阳性妇女宫颈病变筛查的临床有效性,旨在寻找对HR-HPV呈阳性妇女阴道镜转诊进行分流的有效方法。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2015年4月至10月,于四川省成都市双流区招募的,符合本研究纳入、排除标准,并且于四川大学华西第二医院进行HPV DNA检测,诊断为HR-HPV呈阳性的62例妇女为研究对象。其中,HPV-16、-18呈阳性者为13例,其他12种HR-HPV(HPV-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-66、-68)呈阳性者为49例。本研究纳入标准:受试者年龄为35~64岁,无恶性宫颈疾病史,非妊娠期妇女,HPV DNA检测结果为HR-HPV呈阳性者,了解本研究程序并签署临床研究知情同意书者。排除标准:排除宫颈脱落细胞新柏液基薄层细胞学检查(ThinPrep liquid-based cytology test, TCT)结果不满意者,细胞标本不足,无法满足进行p16/Ki-67和p16/MCM2双重染色者。本研究经过四川大学医学伦理委员会批准(批准编号:K2014018)。所有受试者均同意参加宫颈病变筛查,并签署临床研究知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 p16/Ki-67检测试剂盒(批号:2015087722,福州迈新生物技术开发有限公司); p16/MCM2检测试剂盒(批号:201500011,福州迈新生物技术开发有限公司); HPV基因分型试剂盒

(批号:198001,上海之江生物科技股份有限公司);新柏细胞保存液(美国 Hologic 公司)。

1.2.2 标本采集 与本研究的每位受试者签署临床研究知情同意后,由本院妇科医师使用宫颈刷,收集每位受试者的宫颈脱落细胞标本 1 份,并转移至新柏细胞保存液中,制备成细胞学标本,用于 HPV DNA 检测、TCT 及 p16/Ki-67、p16/MCM2 双重染色。

1.2.3 HPV DNA 检测 取每位受试者 1.2.2 中制备的宫颈脱落细胞标本 1 mL,分别使用 HPV 基因分型试剂盒进行检测。该试剂盒通过核酸杂交技术,检测 HPV DNA,可检测 14 种 HR-HPV,包括 HPV-16、-18,以及其他 12 种 HR-HPV (HPV-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-66、-68)。所有 HPV DNA 检测步骤,均严格按照 HPV 基因分型试剂盒操作说明书进行。

1.2.4 宫颈脱落细胞新柏液基薄层细胞学检查及其结果判断标准 取每位受试者 1.2.2 中制备的宫颈脱落细胞标本 15 mL 进行制片,用于 TCT。所有受试者的宫颈脱落细胞 TCT 结果的阅片工作,均由四川大学华西第二医院 2 位经验丰富的细胞病理学医师独立进行。若其诊断结果不一致时,则由第 3 位高年资细胞病理学医师再次阅片,若这 3 位细胞病理学医师中至少 2 位的意见一致,则将 2 位意见一致的结果,作为最终诊断结果。细胞学诊断结果,严格按照 TBS 诊断系统(宫颈/阴道细胞学诊断报告方式, the Bethesda system)术语进行描述。其中,将 TCT 结果呈阳性定义为 $\geq$ 未明确意义的非典型鳞状细胞(atypical-squamous cells of undetermined signification, ASCUS);反之,则为 TCT 结果呈阴性。

1.2.5 p16/Ki-67 及 p16/MCM2 免疫组织化学双重染色及其结果判读标准 对所有受试者 1.2.2 中剩余宫颈脱落细胞标本分别进行制片后,均进行 p16/Ki-67 和 p16/MCM2 双重染色。采用含有针对 p16 蛋白的小鼠单克隆抗体(MX007)和兔抗人 Ki-67 单克隆抗体的 p16/Ki-67 检测试剂盒,对宫颈脱落细胞标本进行 p16/Ki-67 双重染色,具体操作步骤严格按照 p16/Ki-67 检测试剂盒说明书进行。采用含有针对 p16 蛋白的小鼠单克隆抗体(MX007)和兔抗人 MCM2 单克隆抗体(SP85)的 p16/MCM2 检测试剂盒,对宫颈脱落细胞标本进行 p16/MCM2 双重染色,具体操作步骤严格按照 p16/MCM2 检测试剂盒说明书进行。p16/Ki-67 和 p16/MCM2 双重染色结果判读,均采用盲法阅片、

判读。p16/Ki-67 双重染色结果判读标准为:至少 1 个宫颈上皮细胞同时显示细胞质呈红色(p16)和细胞核呈褐色(Ki-67)者,则被定义为 p16/Ki-67 呈阳性;反之,则被定义为 p16/Ki-67 呈阴性。p16/MCM2 双重染色结果判读标准为:至少 1 个宫颈上皮细胞同时显示细胞质呈红色(p16)和细胞核呈黄褐色(MCM2)者,则被定义为 p16/MCM2 呈阳性;反之,则被定义为 p16/MCM2 呈阴性。

1.2.6 阴道镜和活组织病理学检查及其结果判断标准 对于 HPV DNA 检测结果为 HPV-16、-18 呈阳性者,或其他 12 种 HR-HPV (HPV-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-66、-68)呈阳性,而且 TCT 结果为 $\geq$ ASCUS 者,则转诊阴道镜检查,如果阴道镜检查结果异常,则进行宫颈活组织病理学检查。阴道镜检查在 HPV DNA 检测诊断为 HR-HPV 呈阳性后的 1 个月内完成。对于阴道镜检查结果异常者,在宫颈可疑病变部位或异常部位取多点活组织进行病理学检查(推荐 4 个象限),在每个象限最严重的病变部位取活组织进行病理学检查;当鳞柱交界上移至宫颈管或病变伸入宫颈管时,采取宫颈管内膜刮取术,取活组织进行病理学检查。对手术获取的活组织病理学检查标本,应立即使用 10% 中性缓冲福尔马林溶液固定 24 h 后,进行常规石蜡包埋、切片和检查,这些操作均由四川大学华西第二医院病理科医师完成。对于活组织病理学检查结果,首先由 2 位组织病理学医师独立阅片、诊断,其诊断结果不一致时,再由第 3 位高年资组织病理学医师再次阅片,3 位组织病理学医师中至少 2 位的意见一致时,则将 2 位意见一致的结果,作为最终诊断结果。对于宫颈管内膜组织的病理学诊断标准,参照 WHO 肿瘤分类及诊断标准,包括正常宫颈组织, CIN1、2、3, 以及鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)和腺癌。如果 1 例受试者有多个活组织病理学检查标本,则将最严重的病变级别,作为该例受试者最终活组织病理学诊断结果。

1.2.7 宫颈病变最终诊断结果判断标准 因本研究为国家宫颈癌筛查计划下开展的一项基于人群的流行病学调查研究,无法对所有 HR-HPV 呈阳性受试者均进行宫颈活组织病理学检查。对于 30 例进行了宫颈活组织病理学检查的受试者,宫颈病变最终诊断结果以宫颈活组织病理学检查结果为准。其中,宫颈活组织病理学检查结果诊断为 CIN2、3 及 SCC 和腺癌者,记为 CIN2+ (即活组织病理学诊断结果 $\geq$ CIN2),最终诊断为宫颈病变呈阳性;宫颈活组织病理学检查诊断为正常或 CIN1 者,最终诊

断为宫颈病变呈阴性^[11]。对于 32 例未进行宫颈活组织病理学检查的受试者,即其他 12 种 HR-HPV (HPV-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-66、-68)呈阳性,但是 TCT 结果呈阴性者(19 例),以及转诊阴道镜检查但检查结果呈阴性者(13 例),均判断为正常人群,其宫颈病变最终诊断结果均为宫颈病变呈阴性^[11]。

1.3 统计学分析方法

本研究数据采用 SPSS 19.0 统计学软件包进行统计学分析。采用 Ssize 软件确定满足本研究统计检验的最小样本量。对于 p16/Ki-67、p16/MCM2阳性率等计数资料,采用率(%)表示;不同宫颈病变的 HR-HPV 呈阳性受试者 p16/Ki-67、p16/MCM2 阳性率比较,采用线性趋势 χ^2 检验;HPV-16、-18 呈阳性者与其他 12 种 HR-HPV 呈阳性者的 p16/Ki-67、p16/MCM2 阳性率比较,采用四格表 χ^2 检验。通过计算 TCT 及 p16/Ki-67、p16/MCM2 双重染色,对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的敏感度、特异度,评估这 3 种方法对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的准确性。计算这 3 种方法对 HR-HPV 呈阳性者宫颈病变筛查的受试者工作特征(receiver operator characteristic,ROC)曲线下面积(area under curve,AUC),并采用 Z 检验进行比较。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种宫颈病变筛查方法在不同宫颈病变的 HR-HPV 呈阳性受试者中的率比较

本研究 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者中,

p16/Ki-67、p16/MCM2 阳性率,均随宫颈病变程度增高而呈上升趋势($\chi^2=21.947,P<0.001$; $\chi^2=5.268,P=0.022$)。TCT 阳性率与宫颈病变程度无显著相关性($\chi^2=1.850,P=0.174$)。3 种宫颈病变筛查方法在不同宫颈病变的 HR-HPV 呈阳性受试者中的阳性率比较,见表 1。

2.2 HR-HPV 呈阳性受试者 p16/Ki-67、p16/MCM2 表达情况

本研究 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者中,p16/Ki-67和 p16/MCM2 阳性率分别为 43.5%(27/62)和 66.1%(41/62)。HPV-16、-18 呈阳性受试者的 p16/Ki-67 阳性率,显著高于其他 12 种 HR-HPV呈阳性受试者,并且差异有统计学意义($\chi^2=4.413,P=0.036$)。HPV-16、-18 呈阳性受试者与其他 12 种 HR-HPV 呈阳性受试者的 p16/MCM2 阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=2.510,P=0.113$)。不同 HR-HPV 呈阳性受试者的p16/Ki-67、p16/MCM2 表达情况比较,见表 2。

2.3 3 种宫颈病变筛查方法对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的有效性分析

本研究 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者中,TCT 及 p16/Ki-67、p16/MCM2 双重染色对其宫颈病变筛查的敏感度分别为 47.1%(8/17)、94.1%(16/17)、88.2%(15/17),特异度分别为 68.9%(31/45)、75.6%(34/45)、42.2%(19/45),见表 3~5。

TCT 及 p16/Ki-67、p16/MCM2 双重染色,对 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC 曲线分析结果显示,这 3 种方法对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC-AUC分别为

表 1 3 种宫颈病变筛查方法在不同宫颈病变的 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者中的阳性率比较

宫颈病变筛查方法	正常 [% (n/n')]	CIN1 [% (n/n')]	CIN2 [% (n/n')]	CIN3 [% (n/n')]	宫颈癌 (n/n')	χ^2 值	P 值
p16/Ki-67 双重染色法	23.7(9/38)	28.6(2/7)	100.0(3/3)	91.7(11/12)	2/2	21.947	<0.001
p16/MCM2 双重染色法	55.3(21/38)	71.4(5/7)	100.0(3/3)	83.3(10/12)	2/2	5.268	0.022
TCT	31.6(12/38)	28.6(2/7)	0(0/3)	58.3(7/12)	1/2	1.850	0.174

注:n 表示相应宫颈病变筛查方法筛查结果呈阳性的 HR-HPV 呈阳性受试者例数,n'表示不同宫颈病变的 HR-HPV 呈阳性受试者例数。HR-HPV 为高危型人乳头瘤病毒,MCM2 为微小染色体维持蛋白 2,TCT 为新柏液基薄层细胞学检查,CIN 为宫颈上皮内瘤变

表 2 不同 HR-HPV 呈阳性受试者的 p16/Ki-67、p16/MCM2 表达情况比较[例数(%)]

不同 HR-HPV 呈阳性受试者	例数	p16/Ki-67 表达		p16/MCM2 表达	
		阳性	阴性	阳性	阴性
HPV-16、-18 呈阳性	13	9(69.2)	4(30.8)	11(84.6)	2(15.4)
其他 12 种 HR-HPV 呈阳性	49	18(36.7)	31(63.3)	30(61.2)	19(38.8)
χ^2 值		4.413		2.510	
P 值		0.036		0.113	

注:其他 12 种 HR-HPV 是指 HPV-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-66、-68。HR-HPV 为高危型人乳头瘤病毒,MMC2 为微小染色体维持蛋白 2,HPV 为人乳头瘤病毒

0.580(95%CI:0.417~0.743, $P=0.336$),0.848(95%CI:0.746~0.951, $P<0.001$),0.652(95%CI:0.509~0.796, $P=0.066$),见图1。p16/Ki-67 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC-AUC,显著大于 TCT,二者比较,差异有统计学意义($Z=2.736,P=0.006$)。p16/MCM2 双重染色和 TCT,对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC-AUC 比较,差异无统计学意义($Z=0.651,P=0.515$)。

表3 TCT 对 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变的筛查结果

TCT	宫颈病变最终诊断结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	8	14	22
阴性	9	31	40
合计	17	45	62

注:TCT 为新柏液基薄层细胞学检查,HR-HPV 为高危型人乳头瘤病毒

表4 p16/Ki-67 双重染色对 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变的筛查结果

p16/Ki-67 双重染色	宫颈病变最终诊断结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	16	11	27
阴性	1	34	35
合计	17	45	62

注:HR-HPV 为高危型人乳头瘤病毒

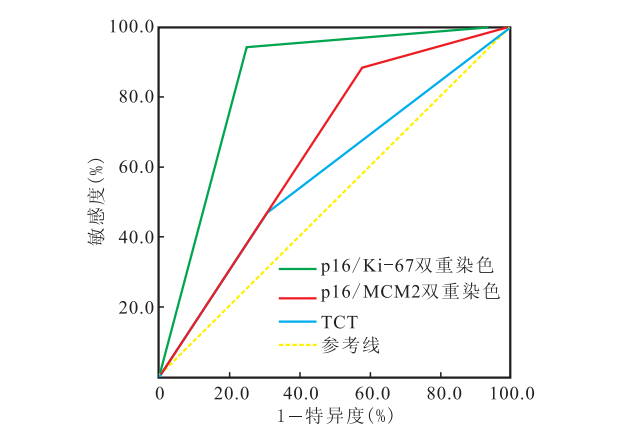
表5 p16/MCM2 双重染色对 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变的筛查结果

p16/MCM2 双重染色	宫颈病变最终诊断结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	15	26	41
阴性	2	19	21
合计	17	45	62

注:MCM2 为微小染色体维持蛋白 2,HR-HPV 为高危型人乳头瘤病毒

3 讨论

本研究是在中国宫颈癌筛查人群中,首次采用 p16/MCM2 和 p16/Ki-67 双重染色,对 HR-HPV 呈阳性妇女阴道镜转诊分流效果的研究。本研究结果显示,在 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者中,p16/Ki-67、p16/MCM2 阳性率,均随宫颈病变程度增高而呈上升趋势,并且差异均有统计学意义($P<0.001$)。在正常情况下,p16 和 Ki-67 不会共同表



注:TCT 为新柏液基薄层细胞学检查,MCM2 为微小染色体维持蛋白 2,HR-HPV 为高危型人乳头瘤病毒,ROC 为受试者工作特征

图1 TCT 及 p16/Ki-67、p16/MCM2 双重染色对 62 例 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC 曲线比较

达于同一个细胞内,但在细胞周期调控机制受损后,p16 和 Ki-67 可共同表达于同一个细胞内^[12-13]。研究表明,在 HR-HPV 导致的宫颈病变中,可检测到 MCM2 过表达^[13]。本研究结果显示,p16/Ki-67 表达与 HR-HPV 感染状态具有显著相关性,HPV-16、-18 呈阳性受试者的 p16/Ki-67 阳性率为 69.2%(9/13),显著高于其他 12 种 HR-HPV 呈阳性受试者的 36.7%(18/49),并且差异有统计学意义($\chi^2=4.413,P=0.036$);但是 HPV-16、-18 呈阳性受试者与其他 12 种 HR-HPV 呈阳性受试者的 p16/MCM2 阳性率相比较,差异无统计学意义($\chi^2=2.510,P=0.113$)。究其原因可能是,HPV-16、-18 与宫颈癌关系更为密切,HPV-16、-18 呈阳性者机体分泌更多 HPV-16、-18 癌蛋白所致^[14]。

本研究结果发现,在 HR-HPV 呈阳性受试者中,p16/Ki-67 双重染色筛查宫颈病变的敏感度为 94.1%(16/17),这表明 p16/Ki-67 双重染色可检测出大部分宫颈癌前病变,从而明显减少 HR-HPV 呈阳性者的阴道镜转诊率。本研究结果显示,在 HR-HPV 呈阳性受试者中,p16/Ki-67 双重染色筛查宫颈病变的敏感度和特异度,均高于 TCT,这与以往研究结果一致^[15]。p16/Ki-67 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC-AUC,亦显著大于 TCT,二者比较,差异有统计学意义($Z=2.736,P=0.006$),这说明 p16/Ki-67 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的价值,较 TCT 高。

本研究评价 p16/MCM2 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查有效性的结果显示,在 HR-HPV 呈阳性受试者中,p16/MCM2 双重染色筛查宫颈病变的敏感度达到 88.2%(15/17),显著高于 TCT 的 47.1%(8/17),略低于 p16/Ki-67 双重染色的 94.1%(16/17);p16/MCM2 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的特异度为 42.2%(19/45),低于 TCT 的 68.9%(31/45)和 p16/Ki-67 双重染色的 75.6%(34/45);p16/MCM2 双重染色与 TCT 对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的 ROC-AUC 相比较,差异无统计学意义($Z=0.651, P=0.515$)。

综上所述,p16/Ki-67 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的敏感度、特异度,均高于 TCT,可有效识别宫颈异常细胞,提高宫颈细胞学诊断的准确性。p16/Ki-67 双重染色操作简单,结果容易判读,技术人员经过短期培训后即可独立进行。故笔者推测,p16/Ki-67 双重染色有望成为包括中国在内的医疗资源严重短缺地区 HR-HPV 呈阳性妇女阴道镜转诊分流的新方法。p16/MCM2 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查的敏感度高于 TCT,但特异度低于后者,其对于 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变的筛查效果,仍有待进一步研究、证实。

本研究不足之处为:①因本研究是基于我国国家癌症筛查计划进行的,无法对所有 HR-HPV 呈阳性妇女进行宫颈活组织病理学检查,对其宫颈病变程度进行确诊。②本研究是一项评价 p16/Ki-67 和 p16/MCM2 双重染色对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变筛查效果的横断面研究,这 2 种方法对 HR-HPV 呈阳性受试者宫颈病变的筛查效果,有待大样本、多中心、随机对照的前瞻性研究进一步证实。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012[EB/OL]. [2017-06-20]. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- [2] Herrero R, González P, Markowitz LE. Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5): e206-e216.
- [3] World Health Organization. WHO guidelines for screening

and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention[M]. Geneva: World Health Organization, 2013: 60-62.

- [4] Sahebali S, Depuydt CE, Segers K, *et al*. P16INK4a as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(6): 871-876.
- [5] Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, *et al*. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(2): 168-1676.
- [6] Carozzi F, Confortini M, Palma PD, *et al*. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(10): 937-945.
- [7] Gonzalez MA, Tachibana KE, Laskey RA, *et al*. Control of DNA replication and its potential clinical exploitation[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(2): 135-141.
- [8] Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, *et al*. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? [J]. *Hum Pathol*, 2005, 36(10): 1101-1107.
- [9] Depuydt CE, Makar AP, Ruymbeke MJ, *et al*. BD-ProExC as adjunct molecular marker for improved detection of CIN2+ after HPV primary screening[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(4): 628-637.
- [10] Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProEx™C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(7): 957-964.
- [11] Practice bulletin No. 168 summary: cervical cancer screening and prevention[J]. *Obstet Gynecol*, 2016, 128(4): 923-925.
- [12] Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, *et al*. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(5): 652-656.
- [13] Singh M, Mockler D, Akalin A, *et al*. Immunocytochemical colocalization of P16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma[J]. *Cancer Cytopathol*, 2012, 120(1): 26-34.
- [14] Castle PE, Stoler MH, Wright TJ, *et al*. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(9): 880-890.
- [15] Yu LL, Chen W, Lei XQ, *et al*. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 21181-21189.

(收稿日期:2017-06-19 修回日期:2017-07-21)

廖光东, 康乐妮, 李静, 等. p16/微小染色体维持蛋白 2 和 p16/Ki-67 双重染色对高危型人乳头瘤病毒呈阳性妇女的宫颈病变筛查[J/CD]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2017, 13(4):425-431.