

CIN II-III 级年轻患者宫颈组织 p16、p21 和 Ki-67 表达的改变

赵 杨¹, 钱德英^{1*}, 梅 平², 欧阳云雁¹, 岑坚敏¹, 陈 萍³

(广东省人民医院//广东省医学科学院, 1. 妇产科, 2. 病理科, 3. 广州市科技咨询中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨宫颈上皮内瘤变(CIN) II-III 级 < 35 岁患者宫颈组织中细胞周期素依赖激酶抑制蛋白 p16、p21 和细胞增殖抗原 Ki-67 的表达特点。【方法】选择 2008 年 3 月至 2009 年 8 月广东省人民医院妇科门诊因宫颈疾病就诊患者, 第 2 代杂交捕获试验(HC II)检测高危型人乳头瘤病毒(HPV) DNA 负荷量, 经活检或手术后病理诊断 CIN II-III 级共 109 例, 分为两组, < 35 岁组 48 例, ≥ 35 岁组 61 例, 并用宫颈组织病理切片进行 p16、p21 和 Ki-67 免疫组化检测, 比较两组高危型 HPV DNA 负荷量和 p16、p21 和 Ki-67 蛋白表达差异。【结果】全部病例均检测到高危型 HPV DNA, 阳性率为 100%, 但两组 HPV DNA 负荷量差异无统计学意义[< 35 岁组:(498 ± 848 pg/mL, ≥ 35 岁组:(548 ± 756) pg/mL, $P > 0.05$]; 两组间 p16 阳性表达率无统计学差异 (< 35 岁组:100%, ≥ 35 岁组:96.72%, $P > 0.05$), 但 < 35 岁组 p21 和 Ki-67 表达阳性率(p21: 60.42%, Ki-67:91.67%)明显高于 ≥ 35 岁组(p21:39.34%, Ki-67:75.41%, $P < 0.05$)。【结论】CIN 年轻患者宫颈组织 p21 和 Ki-67 表达率升高, 可增加 p21 和 Ki-67 检测预测宫颈病变进展状态。

关键词: p16; p21; Ki-67; 宫颈上皮内瘤变; 人乳头瘤病毒; 细胞周期; < 35 岁

中图分类号: R71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)02-0242-04

Clinical Analysis on Expression of p16, p21, and Ki-67 in Cervical Intraepithelial Neoplasia II-III of Young Women

ZHAO Yang¹, QIAN De-ying^{1*}, MEI Ping², OUYANG Yun-yan¹, CEN Jian-min¹, CHEN Ping³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, 2. Department of Pathology, Guangdong Provincial People Hospital// Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou Science & Technology Consulting Center, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To explore expression alterations of CKIs p16 and p21 and cell proliferation marker Ki-67 in young women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II-III.【Methods】A total of 109 women were recruited in our study for cervical lesion treatments. They all had high-risk HPV DNA tests by hybrid capture II (HC II) and their final diagnoses of CIN II-III by histopathologic tests were obtained after cervical biopsy and operations. They were divided into two groups according to their ages: group of < 35 years old and of ≥ 35. Then p16, p21 and Ki-67 expressions were determined by immunohistochemical tests.【Results】High-risk HPV DNA was detected in all women with positive rate of 100% and high-risk HPV DNA load showed no significant difference between two groups [group of <35 years old: (498 ± 848)pg/mL, group of ≥ 35: (548 ± 756)pg/mL, $P > 0.05$]. And significant difference didn't exist in p16 expression, either (< 35: 100%, ≥ 35: 96.72%, $P > 0.05$). While compared with group of ≥ 35 years old (p21: 39.34%, Ki-67: 75.41%), positive rates of p21 and Ki-67 in group of < 35 were increased and differed statistically (p21: 60.42%, Ki-67: 91.67%, $P < 0.05$).【Conclusion】Among women with CIN, p21 and Ki-67 expressions in cervical lesions are more frequent in young women. For them, p21 and Ki-67 tests may be added and positive results may predict progressive lesion.

Key words: p16; p21; Ki-67; CIN; HPV; cell cycle; young women

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(2): 242-245]

近年宫颈癌发病特点呈明显年轻化趋势^[1-2], 国外学者将年龄小于 35 岁的宫颈癌患者称为年

轻宫颈癌患者, 美国年轻宫颈癌患者每年增加 7% ~ 35%, 国内也每年增加 2% ~ 3%^[3-5]。宫颈持续高

收稿日期: 2010-12-27

基金项目: 广东省自然科学基金(7001204)

作者简介: 赵杨, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为子宫颈癌病及生殖医学, E-mail: yizs@yahoo.com.cn * 通信作者: 钱德英, 主任医师, 硕士研究生导师; 研究方向为子宫颈癌前病变的早期筛查和合理干预, E-mail: doctorqian1307@gmail.com

危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染引起细胞周期失调、诱发细胞恶性转化是宫颈癌发生的首要因素,年轻女性性活跃、生殖道局部和系统免疫相对不成熟及未被致敏,HPV 持续感染者很可能发展为细胞学异常、进展为宫颈癌。本研究检测细胞周期 G1/S 调控分子 p21、p16 及细胞增殖标志 Ki-67 在<35 岁患者 II-III 级宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 组织的表达改变,同时测定高危型 HPV DNA 负荷量,探讨年轻宫颈癌前病变细胞周期进程改变特点。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2008 年 3 月至 2009 年 8 月到我院妇科门诊就医的子宫颈疾病患者,排除子宫切除、近期妊娠、既往子宫颈疾病史及诊疗史者,排除盆腔放疗史及合并内外科疾病者。常规行宫颈细胞学检查,结果异常者行高危型 HPV DNA 定量检测,并依据 ASCCP 指南予以临床处理。入组共 109 例,年龄 25~75 岁,平均 34.39(S=8.25)岁。依年龄分为 2 组:<35 岁组 48 例,≥35 岁组 61 例。

1.2 研究方法

1.2.1 高危型 HPV 检测 在受检者宫颈管及宫颈外口刷取标本,用美国 Digene 公司第二代杂交捕获试验(hybrid capture, HC II)定量检测 13 种高危型 HPV DNA,包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68 型,阳性诊断标准为 HPV DNA > 1 pg/mL。

1.2.2 阴道镜下活检和病理检查 对宫颈细胞学检查结果异常和/或高危型 HPV 感染者进行阴道镜检查(深圳金科威公司,SLC-2000 电子阴道镜),可疑病灶在镜下定位活检,镜检未见异常及图像不满意者行宫颈多点活检或宫颈管诊刮术。根据活检组织病理检查结果,需进一步诊治者则行宫颈电环切除术或全子宫切除术。

1.2.3 p16、p21 和 Ki-67 检测 选取活检或手术标本病理诊断为 CIN II-III 组织石蜡包埋蜡块进行 p16、p21 和 Ki-67 蛋白免疫组化测定。p16、p21 和 Ki67 鼠抗人单克隆抗体购自丹麦 Dako 公司,按试剂盒说明书操作。石蜡切片免疫组化检测:切片厚 1.5~2 μm,60℃烤片 1 h,二甲苯脱蜡,梯

度酒精至水化,30 mL/L H₂O₂ 处理 10 min,抗原修复,PBS 冲洗,DAB 染色。PBS 代替一抗作为阴性对照。最后苏木素复染,封片。细胞核和(或)细胞浆染色呈棕黄色判定为阳性细胞,每一高倍视野计数 200 个细胞,每张切片随机观察 5 个视野,阳性细胞 > 5%判定为结果阳性。

1.3 统计学处理

计算机 SPSS 13.0 软件系统进行统计学分析,非正态分布的计量资料行非参数检验,计数资料行 χ^2 检验,对有关指标进行相关分析。

2 结 果

2.1 高危型 HPV DNA 检测

全部病例均检出高危型 HPV DNA,两组阳性率均为 100%。<35 岁组高危型 HPV DNA 中位数为 136 pg/mL,四分位间距为 812 pg/mL;≥35 岁组中位数为 154 pg/mL,四分位间距为 580 pg/mL。非参数检验比较两组高危型 HPV DNA 负荷量,结果显示差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 高危型 HPV DNA 负荷量与年龄的关系

对高危型 HPV DNA 负荷量与年龄进行相关分析,结果显示二者无相关性($P>0.05$)。

2.3 p16、p21 和 Ki-67 免疫组化检测

两组均检测到 p16、p21 和 Ki-67 蛋白表达,p16 和 Ki67 表达定位于受染细胞核和(或)细胞浆内(胞核或胞浆棕染),p21 表达定位于受染细胞核内。用 χ^2 检验比较两组 p16、p21 和 Ki-67 阳性表达率,结果表明,p16 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),<35 岁组 p21 和 Ki-67 蛋白表达率明显高于≥35 岁组,差异有统计学意义($P<0.05$,表 1,图 1)。

表 1 CIN II-III p16、p21 及 Ki67 表达结果

Group	n	p16	p21	Ki-67
< 35 years	48	48(100%)	29(60.42%) ¹⁾	44(91.67%) ¹⁾
≥ 35 years	61	59(96.72%)	24(39.34%)	46(75.41%)
χ^2			4.77	4.93

1) $P<0.05$ vs group of ≥35 years old

2.4 年龄与 p21 和 Ki67 蛋白表达率的关联性

进一步分析 p21 和 Ki67 蛋白表达率与年龄

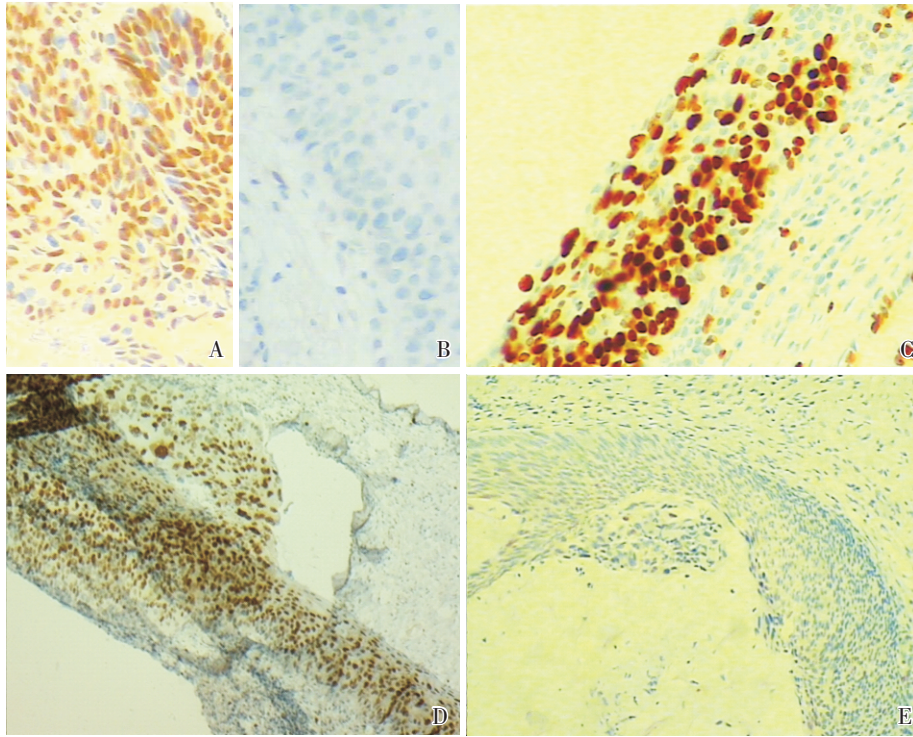


图 1 p16、p21、和 Ki-67 的表达

Fig.1 Expression of p16, p21, Ki-67

A: p16 positive (200×); B: p16 negative; C: ki-67 positive (200×); D: p21 positive (100 ×); E: p21 negative (100 ×); Brownish staining cells (nucleus or/and cytoplasm) were positive expression

的关联性; p21: $\chi^2 = 4.77$, 列联系数为 0.20; Ki-67: $\chi^2 = 4.93$, 列联系数为 0.21。表明 CIN II-III 合并高危型 HPV 感染人群中, 年长者 p21 和 Ki67 蛋白表达率有下降趋势, p21 和 Ki67 蛋白表达率均与年龄有关联性, 但关联程度不密切。

3 讨论

宫颈上皮内瘤变(CIN)是与宫颈浸润癌发生密切相关的一组癌前病变, 患者常无特异症状, 尽早诊断及其随后治疗和随访是阻断病变进展的重要手段。并且, 面对宫颈癌年轻化趋势, <35 岁年轻患者宫颈癌前病变特点少有研究。

CIN 病变局部感染的高危型 HPV 的致癌作用主要表现为破坏细胞周期监控机制的两条重要通路“p53 途径”和“pRb 通道”: HPV DNA 整合到宿主细胞基因组内后, 其 E6、E7 基因持续过量表达, E6 降解肿瘤抑制蛋白 p53 使其丧失抗增殖作用; E7 与生长抑制蛋白 pRb 结合释放转录因子使感染细胞增殖失控。p53 和 pRb 是参与细胞周期 G1/S 期转换的重要负向调控分子, 两者下游调控

因子 p21 与 p16 通过抑制细胞周期素依赖蛋白激酶 2(Cyclin dependent kinase 2, cdk2) 下调细胞周期素 cyclinD1 表达, 使得细胞停滞于细胞周期 G1/S 期^[6]。高危型 HPV 正是阻断这两条通路, 使受染细胞非正常越过 G1→S 检测点, 细胞增殖失控, 这是多步骤癌变过程最基本的一步。

此外, Ki-67 也成为目前临床上广泛应用的检测细胞增殖的标志, 它是与细胞增殖相关的核抗原, 在细胞周期各个时期均有表达^[7], 其表达过度表明细胞增殖活跃, 而高度增生多提示细胞处于癌前病变甚或癌变。

宫颈癌前病变的病理诊断 CIN 仅证实病变程度, 不能提示病变进展状态, 目前很多学者利用上述细胞周期进程调控因子和细胞增殖标志来预测 CIN 发展情况。p16 在正常宫颈组织中不表达, 在病变细胞核和细胞浆内均有表达, 随 CIN 级别进展, p16 表达率升高^[8]。Ki-67 表达与高危型 HPV 感染无关, 但与 p16 类似, 其表达水平与 CIN 级别进展相关^[9]。p21 表达在高级别 CIN 中也明显增强^[10]。我们的前期研究也发现, p16、p21 及 Ki67 表达水平升高与宫颈病变进展密切相关^[11-12]。

本研究发现,高级别 CIN 患者宫颈组织均有高危型 HPV 感染,< 35 岁年轻患者与 ≥ 35 岁年长患者病变局部高危型 HPV DNA 负荷量无显著差异,并且高危型 HPV DNA 负荷量与年龄无相关性,宿主年龄不影响病毒增殖。然而,在相似病毒感染状态下,受染细胞病变情况却随年龄变化有所不同:虽然 pRb 通道分子 p16 活性无明显差异,但年轻患者 p53 途径分子 p21 表达率有升高趋势、细胞增殖标志 Ki-67 表达频率也较年长患者升高,表明年轻患者受染细胞周期进程中 p53 调控途径受损更严重,进而细胞增殖也更加活跃。提示在相同致癌病毒负荷下,甚至在相同病变程度下,年轻患者宫颈细胞病变进展情况较年长患者严重。分析其产生原因,年轻患者以感染 HPV16 最常见^[13],随 CIN 级别进展,HPV16 基因整合型所占比例升高,由 CIN I 27.8%升至 CIN II-III 73.5%^[14],HPV16 基因整合状态极可能是 CIN 进展的风险标志^[15];我们考虑,年轻患者由于前述之生殖道免疫因素等使得相同病毒负荷压力下整合入宿主基因 HPV DNA 量增多,而随整合量增多,病变程度加重^[16]。但本研究人群中,p21 和 Ki-67 蛋白表达率仅与年龄呈低度关联性,需要进一步大样本人群研究。

宫颈癌发病年轻化提示应重视 CIN 年轻患者,其细胞病变特点值得深入研究。本研究结果表明,CIN 年轻患者 p21 和 Ki-67 表达率升高,宫颈细胞病变状态有加速趋势,对这一患者群,特别是合并有高危型 HPV DNA 高负荷量者可增加 p21 和 Ki-67 检测,结果阳性预示病变活跃进展,应积极给予相应临床处理。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80:827-841.
- [2] Frega A, Stentella P, De LA, et al. Young women cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus risk factors for persistence and recurrence [J]. *Cancer Letters*, 2003, 196(2):127-134.
- [3] Free K, Roberts S, Boume R, et al. Cancer of the cervix old and young, now and then[J]. *Gynecol Oncol*, 1991, 43(2): 129-136.
- [4] 石一复. 子宫颈疾病[M].北京:人民卫生出版社, 2000:134.
- [5] 郎景和. 子宫颈上皮内瘤变的诊断和治疗[J]. *中华妇产科杂志*, 2001, 36(5):261-263.
- [6] 黄文林,朱孝峰. 信号转导 [M].北京:人民卫生出版社, 2005:366-374.
- [7] Follen M, Schottenfeld D. Surrogate endpoint biomarkers and their modulation in cervical chemoprevention trials [M]. *Cancer*, 2001, 91(9):1758-1776.
- [8] Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, et al. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens [M]. *Diagn Pathol*, 2009, 9(4):22.
- [9] Nam EJ, Kim JW, Hong JW, et al. Expression of the p16 and Ki-67 in the relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection [M]. *J Gynecol Oncol*, 2008, 19(3):162-168.
- [10] Santopietro R, Shabalova I, Petrovichev N, et al. Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4, p21CIP1/WAF1, cyclin A in predicting cervical intraepithelial neoplasia, high-risk human papillomavirus infections and their outcome in women screened in three new independent states of the former Soviet Union [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15 (7): 1250-1256.
- [11] 岑坚敏,钱德英,骆新兰,等. p16 和 Ki-67 在宫颈上皮内瘤变组织中的表达及意义 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2008, 24(10):749-751.
- [12] 赵杨,钱德英,岑坚敏,等. p21WAF1/Cip1 和 p27Kip1 在宫颈癌及癌前病变的表达及临床意义 [J]. *现代妇产科进展*, 2008, 17(8):602-604.
- [13] Ciaran BJ, Stuart C, Heather W, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: A longitudinal cohort study [J]. *Lancet*, 2001, 6:1831-1836.
- [14] Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 106(3): 549-557.
- [15] Guo M, Sneige N, Silva EG, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(2):256-266.
- [16] Briolat J, Dalstein V, Saunier M, et al. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(10):2198-2204.