

论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1556-04

I级宫颈上皮内瘤变中HPV病毒载量与P16蛋白表达的相关性及预后意义

杨君¹,王彬²,周德平¹,张轩珍²,刘玉明¹,王敏¹ (400013 重庆,重庆市妇幼保健院:妇产科¹,病理科,重庆市宫颈癌特色专科²)

[摘要] **目的** 探讨宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I级组织中HPV病毒载量与P16蛋白表达的相关性及二者用于预测CIN I转归的可行性。**方法** 选择2008年5月至2010年1月,重庆市妇幼保健院宫颈专科门诊,经组织学确诊为CIN I患者103例,确诊CIN I同时以第二代杂交捕获法(hybrid capture II, HC-2)检测高危型HPV(HR-HPV)病毒载量,采用免疫组化S-P法检测其相应宫颈组织中P16蛋白表达,分析二者相关性。分别于随访6、12、18、24个月复查细胞学、阴道镜,必要时重复宫颈活检。以随访第24个月组织学检查结果为病变转归结局,分析HPV病毒载量及P16蛋白表达作为CIN I病变转归预测指标的可行性。**结果** ①CIN I组织中HPV阳性率为69.90%(72/103),P16蛋白阳性表达率为38.83%(40/103),P16蛋白表达与HPV病毒载量二者之间呈正相关($r_s = 0.5688, P < 0.01$);②随访24个月,CIN I病变总进展率为11.65%(12/103);③以P16蛋白表达评分 ≥ 6 分作为CIN I进展的预测指标,其敏感性、特异性及阴性预测值分别为91.67%、96.70%、98.88% ($P < 0.01$);以HR-HPV病毒载量 ≥ 100 RLU/CO为预测指标,其敏感性、特异性和阴性预测值分别为58.33%、81.32%、93.67% ($P < 0.01$)。**结论** P16蛋白表达强度及HR-HPV病毒载量与CIN I病变转归密切相关,可以作为CIN I进展风险的预测指标。

[关键词] 人乳头瘤病毒;P16;宫颈上皮内瘤变;宫颈癌

[中图分类号] R363.23; R373; R711.74

[文献标志码] A

Correlation of high-risk HPV quantitation and P16 expression in cervical intraepithelial neoplasia I and its prognostic value: a prospective controlled study

Yang Jun¹, Wang Bin², Zhou Deping¹, Zhang Xuanzhen², Liu Yuming¹, Wang Min¹ (¹Department of Obstetrics and Gynecology, ²Department of Pathology, Chongqing Special Department of Cervical Diseases, Chongqing Health Center for Women and Children, Chongqing, 400013, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation of the viral load quantitation of high-risk HPV and P16 expression in cervical intraepithelial neoplasia(CIN) I patients and its prognosis value. **Methods** A total of 103 inpatients with CIN I diagnosed by immunohistochemistry analysis in our health center from May 2008 to Jan. 2010 were enrolled in this study. All of the patients were analyzed the viral load quantitation of high-risk HPV by hybrid capture II (HC-2). The expression of P16 in the cervix tissue were detected by immunohistochemistry at the same time. All of the patients were followed up for 6, 12, 18 and 24 months after first diagnosis for the examination of cytology, colposcopy, and cervical re-biopsy if necessary. The final histological results obtained at the last follow-up were considered as the sequel of CIN I. The correlation of the quantitation of high-risk HPV and P16 expression was evaluated for prediction of the evolvement of CIN I. **Results** The positive rate of high-risk HPV and P16 expression in CIN I were 69.90% (72/103) and 38.83% (40/103) respectively. The expression of P16 was positively correlated with the quantitation of HR-HPV in CIN I ($r_s = 0.5688, P < 0.01$). In the last follow-up (24 months), 12 cases (11.65%, 12/103) were deteriorated into lesions over CIN II. When P16 expression with the grade ≥ 6 was regarded as predicting indicator for the deterioration of CIN I, the sensitivity, specificity and negative predictive value (NPV) were 91.67%, 96.70%, and 98.88%, respectively ($P < 0.01$). Whereas these values were 58.33%, 81.32%,

[基金项目] 重庆市卫生局面上项目(2010-2-326)

[通信作者] 杨君, E-mail: keppleyang@sina.com

and 93.67%, respectively ($P < 0.01$) when the quantitation of HR-HPV ≥ 100 RLU/CO regard as cut-off value. **Conclusion** Both of the expression of P16 and the quantitation of HR-HPV are closely correlation with the prognosis of CIN I, and they can be considered as predict indictors for CIN deterioration.

[**Key words**] HPV; P16; cervical intraepithelial neoplasia; cervical cancer

Supported by General Program of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-326). Corresponding author: Yang Jun, E-mail: keppleyang@sina.com

宫颈癌是女性生殖系统最常见恶性肿瘤,宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是宫颈癌前病变,合理干预 CIN 可以有效阻断宫颈癌的发生和发展。CIN 具有进展、退化或保持不变 3 种生物学行为,尤其是轻度 CIN(I 级)具有较高的自然转阴率^[1]。目前尚缺乏确切的方法用于判断 CIN 的预后转归,临床上对 CIN I 的治疗存在过度与不足^[2]。P16 基因又称多肿瘤抑制基因,其编码产生的 P16 蛋白通过抑制细胞周期 cyclinD-CDK4/6-pRb-E2F 途径,负调控细胞周期。研究表明,P16 的表达异常与高危型人乳头瘤病毒(high-risk human papillomavirus, HR-HPV)感染所致的宫颈癌密切相关^[3],并认为 HR-HPV 病毒载量与宫颈病变的程度呈正相关^[4],本课题通过前瞻性队列研究,分析 CIN I 中 P16 蛋白表达与 HPV 病毒载量的相关性,及二者分别与 CIN I 病变发展方向的关系,评价其用于预测 CIN I 转归的可行性,为临床上采用合理的干预措施提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2008 年 5 月至 2010 年 1 月,重庆市妇幼保健院宫颈专科门诊患者中,参照文献^[5]纳入标准的 CIN I 患者,患者充分知情同意,愿意选择以单纯随访为临床治疗方案,并具备随访条件。入选并全部完成 2 年随访病例共 103 例,年龄 18 ~ 48 (32.02 ± 15.76) 岁,确诊 CIN I 同时以 HC-2 法检测 HR-HPV 病毒载量,采用免疫组化(S-P)法检测其相应宫颈组织中 P16 蛋白表达。分别于随访 6、12、18 个月复查 TCT、阴道镜,必要时重复宫颈活检或行宫颈锥切手术,未行宫颈锥切手术者于随访第 24 个月再次行阴道镜下宫颈多点活检及宫颈管搔刮术,确定其组织学转归。研究期间皆使用安全套避孕。

1.2 仪器与方法

1.2.1 HR-HPV 病毒载量检测 标本采集:于研究对象月经干净 3 ~ 7 d,无性生活,以专用宫颈脱落细胞采集器进行采样。窥阴器充分暴露宫颈后,轻轻擦拭去除宫颈表面分泌物,将专用宫颈刷紧贴宫颈口,顺时针旋转 3 圈以获取足量的上皮细胞样本,然后将宫颈刷头部放入洗脱管中,沿刷柄固定折痕处折断,旋紧洗脱管盖,做好样本标识,直立放置,1 周内检测。病毒载量检测方法:采用 HC-2 法(美国 Digene 公司),检测样本中 HPV-DNA 含量(以此表示 HPV 载量)^[6]。HC-2 采用 96 孔平板法,可 1 次检测 13 种 HR-HPV(即 HPV16、18、31、33、35、

39、45、51、52、56、58、59 和 68 型)。

1.2.2 P16 蛋白表达检测 采用免疫组化 S-P 法,取宫颈组织石蜡标本行 4 μ m 厚连续切片,主要染色步骤参照试剂盒说明书进行。兔抗人 P16 多克隆抗体及阳性对照切片均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 结果判定标准

1.3.1 HR-HPV 病毒载量 HPV-DNA 含量为检测样本的相对光单位(relative light unit, RLU)与标准阳性对照平均值(CO)的比值,相当于标本中检出的 HPV 载量(pg/ml),检测值 ≥ 1 RLU/CO 为阳性,参照文献^[7]将 HPV 载量分级(RLU/CO):阴性: < 1 ; 低载量 $1 \sim < 10$; 中低载量 $10 \sim < 100$; 中高载量 $100 \sim < 1000$; 高载量 ≥ 1000 。

1.3.2 P16 蛋白表达 细胞核和细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。采用显微摄像计算机图像分析系统计算蛋白表达强度(排除间质细胞阳性)。

判定标准:采用 Gatalica 等^[8]半定量方法,将染色强度(intensity, I)分为 4 级:无染色为 0,低度染色为 1,中度染色为 2,强染色为 3。计算阳性细胞百分率(percentage, P), $0\% = 0$ 分; $< 10\% = 1$ 分; $10\% \sim 50\% = 2$ 分; $51\% \sim 80\% = 3$ 分; $> 80\% = 4$ 分。评分 = $I \times P$, 在 0 ~ 12 分之间。按评分分级:(-) < 4 分; (+) 4 ~ 5 分; (++) 6 ~ 8 分; (+++) 9 ~ 12 分。

1.3.3 组织学转归 组织学诊断标准:CIN I 为轻度宫颈上皮内不典型增生; CIN II 为中度宫颈上皮内不典型增生; CIN III 为重度宫颈上皮内不典型增生及宫颈原位癌。以随访第 24 个月组织学检查结果为本研究病变转归结局,随访期间因病变进展行宫颈锥切手术者以锥切术后病检结果为病变转归结局。转归结局包括:未发现 CIN 病变存在判为消退; CIN I 病变持续存在判为持续;发现 CIN II 及以上病变判为进展^[9]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验或四格表确切概率检验,两者相关性用非参数 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 P16 蛋白在 CIN I 组织中的表达及与 HR-HPV 病毒载量的关系

CIN I 组织中 P16 阳性细胞主要分布于宫颈鳞状上皮 1/3,少数分布于基底层和旁基底细胞层,染色均匀,着色较浅, P16 阳性表达率为 38.83% (40/103)。其中 6 例(5.83%, 6/103)阳性细胞分布区域较宽,出现粗大深染颗粒,为(+++) 表达,其对应的 HPV-DNA 载量较高。HPV 阳性率为 69.90%

(72/103), HPV 阳性者病毒载量数据呈正态分布, 主要集中于中低载量(43.06%, 31/72)及中高载量(26.39%, 19/72)组。见表1。经 Spearman 等级相关分析, 在 CIN I 组织中, P16 蛋白表达与 HPV 病毒载量二者之间呈正相关性($r_s = 0.5688, P < 0.01$)。

表1 103例 CIN I 组织中 HPV 载量与 P16 蛋白表达

HPV 载量 (RLU/CO)	n	HPV	P16 蛋白表达(n)			
			-	+	++	+++
<1	31	0.32 ± 0.46	28	3	0	0
1 ~ <10	17	4.72 ± 3.59	14	1	2	0
10 ~ <100	31	44.89 ± 40.58	18	9	3	1
100 ~ <1 000	19	546.53 ± 594.11	3	13	1	2
≥1 000	5	2 258.73 ± 1 610.16	0	0	2	3

2.2 P16 蛋白表达及 HR-HPV 病毒载量与 CIN I 病变转归的关系

本组 103 例病例皆按时完成 24 个月随访, 随访过程中暂未发现病变进展后再自然逆转现象, 其中 1 例于随访第 12 个月、3 例于随访第 18 个月发现病变进展为 CIN III、3 例于随访第 18 个月发现病变进展为 CIN II 行宫颈 LEEP 或锥切治疗; 4 例于随访第 12 个月、1 例于随访第 24 个月发现病变进展为 CIN II, 因患者拒绝宫颈手术, 目前仍在随访中。总病变进展率为 11.65% (12/103)。见表 2。

表2 P16 蛋白表达及 HR-HPV 载量与 CIN I 病变转归的关系(n)

病变转归	n	P16 蛋白表达				HPV 载量				
		-	+	++	+++	阴性	低	中低	中高	高
消退	59	40	17	2	0	29	12	8	9	1
持续	32	23	8	0	1	2	3	20	5	2
进展	12	0	1	6	5	0	2	3	5	2
合计	103	63	26	8	6	31	17	31	19	5

2.3 不同临界值预测 CIN I 病变转归的可行性分析

经统计学分析, 上述指标对 CIN I 病变消退及持续存在的预测皆无统计学意义($P > 0.05$), 但对于 CIN I 病变进展表现出良好的预测能力, 除 HPV 载量 1 000 RLU/CO 以外, 以其余分界点为预测指标, 皆有统计学意义, 其中, 以 P16 蛋白表达评分 ≥ 6 分及 HR-HPV 病毒载量 ≥ 100 RLU/CO 为预测指标, 具有较高的敏感性、特异性和阴性预测值。见表 3。

表3 以不同临界值作为 CIN I 病变进展预测指标的可行性(%)

统计学指标	P16 蛋白表达评分			HPV 载量(RLU/CO)		
	4	6	9	1	10	100
敏感性	100.00	91.67	41.67	100.00	83.33	58.33
特异性	69.23	96.70	98.90	34.07	50.55	81.32
阳性预测值	30.00	78.57	83.33	16.67	18.18	29.17
阴性预测值	100.00	98.88	92.78	100.00	95.83	93.67
χ^2	18.58	63.17	31.81	4.34	4.89	7.24
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.05	<0.01

3 讨论

从宫颈上皮不典型增生、原位癌到宫颈浸润癌是一个多因素、多步骤的过程, 宫颈癌病因学的确立^[10], 使子宫颈癌的预防成为可能。CIN 的早诊早治是现阶段预防宫颈癌的主要手段^[11], 但 CIN 并非单向的病理生理学发展过程, 不同程度的 CIN 进展成为浸润癌的风险率不同, 应该采用不同的临床处理方式。CIN I 属于 HPV 感染致宫颈上皮细胞异常的低度病变, 其自然逆转率较高, 本组病例中, 随访 24 个月, 进展为 CIN II 以上者仅占 11.65% (12/103)。

CIN I 的诊断和治疗是临床上的难点, 美国阴道镜与子宫颈病理协会 (ASCCP) 2006 处理指南推荐: 对于阴道镜检查结果满意的 CIN I, 采用细胞学随诊, 强调单纯随访。但 CIN I 的随访在临床实践中有一定困难, 尤其在发展中国家, 初始筛查方法、宫颈活检组织取材、病理科医师经验等多因素导致诊断不足或过度诊断^[2], 随访过程中缺乏预测 CIN I 转归结局的可靠生物学指标, 患者精神负担重, 极易出现过度治疗或失访。所以, 寻找一种简便有效的检测手段, 协助医生作出判断, 实现对 CIN I 的合理分类管理, 成为研究热点。

P16 基因定位于人染色体 9p21, 编码产生 P16 蛋白抑制 CDK4/CDK6 活性, 阻止细胞进入 S 期和 DNA 合成启动, 是直接参与细胞周期调控的抑癌基因, P16 蛋白表达异常与多种人类肿瘤的发生密切相关。文献^[3]报道, P16 在 HR-HPV 阳性的宫颈癌及 CIN 中过表达, 可作为 CIN 病变的早期诊断指标。本研究结果显示 CIN I 组织中, P16 蛋白表达与 HPV 病毒载量之间呈现正相关关系, 说明 HPV 病毒载量高是宿主细胞抑癌基因变异的基础, P16 表达异常是 HR-HPV 感染并引致宿主细胞变异的客观表现, 其用于预测病变转归更具有临床意义。国外学者研究表明, P16 弥漫阳性的 CIN 进展为 CIN III 的风险显著高于 P16 阴性者^[12], 认为 P16 可用于预测 CIN 的进展。我们通过 2 年的临床随访研究, 认为以 P16 蛋白表达评分 ≥ 6 分作为临界值, 预测 CIN I 进展风险, 其敏感性(91.67%)和特异性(96.70%)较高, 与 Negri 等^[12]的研究结果相似。

目前对 HPV 病毒载量与宫颈癌前病变严重程度关系尚存在争议, HC-2 检测方法亦存在一定局限性, 如高危型与低危型探针有交叉反应、检测值受样本中脱落细胞量影响等, 但多数研究仍认为 HPV 病毒载量越高, 宫颈病变加重的风险越大^[13-14]。我们的研究认为, 以 HPV 检测值 100 RLU/CO 作为分界点, 对 CIN I 进展的预测具有较高特异性(81.32%)及阴性预测值

(93.67%),但其阳性预测值较低(29.17%)。

综上所述,对于初筛患者,HC-2检测无创伤,具有高度敏感性、客观性、简单易操作,已广泛应用于临床。对于组织学检查为CIN I患者,采用P16蛋白免疫组化检查进行分流,尤其是对于HPV检测值 ≥ 100 RLU/CO, P16蛋白表达评分 ≥ 6 分患者,宜早期给予临床干预,预防病变进展。随着临床样本量的增大,及随访时间的延长,我们将逐步探讨更加科学、合理化的临床干预方案。

参考文献:

[1] 刘从容. HPV感染的宫颈病理学进展[J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(5): 337-339.

[2] 钱德英. 宫颈上皮内瘤变治疗过度与不足得失分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2011, 27(7): 515-519.

[3] Eleuterio J Jr, Giraldo P C, Goncalves A K, et al. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions; the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2007, 86(1): 94-98.

[4] 黄锐, 李有恒, 黄碧青. 高危型HPV病毒负荷在宫颈癌前病变中的临床意义[J]. 中国医药指南, 2011, 9(23): 88-89.

[5] 杨君, 王彬, 周德平, 等. P16蛋白检测在预测I级宫颈上皮内瘤变进展风险中的应用价值评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(5): 524-525, 527.

[6] 易为, 王建六, 李杏红, 等. 高危型HPV负荷量与宫颈上皮内瘤

样变级别、Ki-67和P16^{ink4a}表达的关系及随访观察[J]. 癌症, 2008, 27(5): 520-524.

[7] Lorincz A T, Castle P E, Sherman M E, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer[J]. Lancet, 2002, 360(9328): 228-229.

[8] Gatalica Z, Lele S M, Rampy B A, et al. The expression of Fhit protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma [J]. Cancer, 2000, 88(6): 1378-1383.

[9] 郎景和, 沈铿, 刘继红, 等. 宫颈病变的诊治[J]. 现代妇产科进展, 2005, 14(5): 341-352.

[10] Alam M S, Ali A, Mehdi S J, et al. HPV typing and its relation with apoptosis in cervical carcinoma from Indian population [J]. Tumour Biol, 2012, 33(1): 17-22.

[11] 郎景和. 子宫颈癌预防的现代策略[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(5): 575-578.

[12] Negri G, Vittalde F, Romano F, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri [J]. Virchows Arch, 2004, 445(6): 616-620.

[13] 杨焯, 谢毅, 孙廷慰, 等. 高危型人乳头瘤病毒载量与宫颈上皮内瘤变程度相关性[J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(2): 131-133.

[14] 冯燕, 王新宇, 程易凡, 等. 高危型HPV负荷量与宫颈癌及其前期病变关系的研究[J]. 现代妇产科进展, 2008, 17(10): 730-732.

(收稿:2012-02-06;修回:2012-03-15)

(编辑 吴培红)

(上接 1542 页)

体内叶激素和肿瘤标志物未见异常,自身免疫性相关抗体均为阴性,艾滋病毒和梅毒(-)。胸部、腹部CT和头颅MRI未见异常。超声心动图显示左心室功能轻度降低(LVEF 35%~40%)。反复追问病史,患者回忆夏天到云南旅游曾在野外露营,上臂出现过一过性的皮疹。遂查血清和脑脊液伯氏疏螺旋体IgG抗体,结果强阳性,提示神经型莱姆病,予以头孢曲松钠治疗,3周后患者虽然仍有疲劳,但直立性低血压明显改善,射血分数提高到50%。

2 讨论

糖尿病患者出现直立性低血压往往会首先考虑是糖尿病引起的自主神经损害^[1],其发病机制考虑为血压调节反射弧中传出神经损害所致,患者从卧位站立时,由于交感神经病变,去甲肾上腺素的释放量减少,未能代偿性地引起周围血管收缩;并且肾上腺素的分泌量也不足以使心搏出量减少,导致收缩压与舒张压均降低。直立性低血压病因还包括药物导致、肾上腺皮质功能不全、Shy-Drager综合征等。而神经型莱姆病引起的直立性低血压比较罕见,莱姆病是一种由蜱传播的伯氏疏螺旋体引起的疾病,在我国主要流行于东北林区和云南^[2],主要表现为慢性游走性红斑和关节炎,约15%和8%的患者分别出现明显的神经系统症状和心脏受累的表现^[3]。神经系统以脑膜炎、

脑神经炎及神经根炎多见,出现自主神经并发症比较罕见,除了直立性低血压,还可以造成假性肠梗阻^[4]和反射性交感神经营养不良综合征(reflex sympathetic dystrophy syndrome, RSDS)^[5]。本例患者主要表现为糖尿病和直立性低血压,但是考虑到糖尿病的病程较短,糖化血红蛋白不高,未发现其他糖尿病微血管病变的表现,所以按糖尿病和糖尿病心血管自主神经病治疗而直立性低血压控制不佳后,考虑到可能存在其他原因,否则极易漏诊或误诊。

参考文献:

[1] 许春华. 88例糖尿病患者伴高血压及直立性低血压临床意义探讨[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(11): 96-98.

[2] 牛庆丽, 殷宏, 罗建勋. 国内莱姆病研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(10): 89-93.

[3] 种晓琴, 许宏冰, 张琦. 莱姆病的临床表现与治疗[J]. 医学动物防制, 2010, 26(4): 319-320.

[4] Chan J, Ahmed A, Stacey B. Acute abdominal pain: An unusual medical cause [J]. Acute Med, 2009, 8(1): 26-28.

[5] Gila L, Guerrero A, Astarloa R, et al. Reflex sympathetic dystrophy. A new manifestation of Lyme disease? [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 1990, 8(1): 32-35.

(收稿:2012-05-21;修回:2012-06-08)

(编辑 栾嘉)