

· 临床研究 ·

p16/Ki-67在ASCUS合并HPV阳性患者中对宫颈高级别鳞状上皮内病变的检测意义

方 钦¹, Soule Hassanati¹, 房园园¹, 戎 荣², 邢 燕^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院妇产科, ²病理科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨p16/Ki-67双染检测在不能明确意义的非典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cell of undetermined significance/high risk human papillomavirus, ASCUS)合并高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)阳性者中对宫颈高级别鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)的诊断价值。方法:回顾性分析2017年9月—2018年12月在南京医科大学第一附属医院妇科就诊的283例ASCUS合并高危型HPV阳性者阴道镜下的宫颈活检组织病理结果,探讨HSIL的危险因素,比较p16/Ki-67双染检测和HPV分型检测的诊断效能。结果:283例患者中88例被诊断为HSIL。单因素分析显示,不同HPV型别、p16/Ki-67双染检测结果间HSIL发生率差异有统计学意义($P < 0.01$),不同年龄患者HSIL发生率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。多因素Logistic回归分析显示,HPV16/18阳性、p16/Ki-67双染检测阳性是HSIL的高危因素($P < 0.001$)。p16/Ki-67双染检测较HPV分型检测有更高的灵敏度(62.03% vs. 51.14%)、阴性预测值(81.6% vs. 78.9%)及受试者工作特征(ROC)曲线下面积(0.794 vs. 0.669, $P < 0.05$)。结论:p16/Ki-67双染检测阳性是ASCUS合并HPV阳性者中发现HSIL的预警因素,其筛查效能优于HPV分型检测,为宫颈病变初筛提供了一种新选择。

[关键词] p16/Ki-67;不能明确意义的非典型鳞状上皮细胞;人乳头瘤病毒分型;宫颈高级别鳞状上皮内病变

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)10-1459-05

doi:10.7655/NYDXBNS20191010

p16/Ki-67 dual stain cytology for detection of high-grade squamous intraepithelial lesion in ASCUS/HPV positive women

Fang Qin¹, Soule Hassanati¹, Fang Yuanyuan¹, Rong Rong², Xing Yan^{1*}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, ²Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objectives:** To explore the diagnostic value of p16/Ki-67 dual stain cytology for high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) in patients with positive atypical squamous cell of undetermined significance/high risk human papillomavirus (ASCUS/HPV). **Methods:** A total of 283 cases diagnosed as HSIL with positive ASCUS/HPV were selected between September, 2017 and December, 2018 from the Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University. Colposcopy and biopsy were performed on all patients to analyze the risk factors of HSIL. And the diagnostic value of p16/Ki-67 dual stain cytology was compared with that of HPV genotype. **Results:** In total, 88 of the 283 ASCUS/HPV positive cases were diagnosed with HSIL. Univariate logistic analysis indicated that different results of p16/Ki-67 dual stain cytology and HPV genotype test showed different HSIL rates, which were statistically significant ($P < 0.01$). Ages of the patients did not contribute to the variation of HSIL incidences ($P > 0.05$). Multivariable logistic analysis showed that both HPV genotype and p16/Ki-67 positives were risk factors for HSIL ($P < 0.001$). The sensitivity, negative predictive value and area under ROC of p16/Ki-67 dual stain cytology were higher than those of HPV genotype test ($P < 0.05$). **Conclusion:** p16/Ki-67 dual stain cytology positive is a warning sign of HSIL for patients with positive ASCUS/HPV, the screening efficacy of which is better than that of HPV genotype test. It provides a new option for cervical lesion screening.

[Key words] p16/Ki-67; atypical squamous cell of undetermined significance; viral genotype of human papillomavirus; high-grade squamous intraepithelial lesion

[基金项目] 江苏省妇幼健康科研项目重点课题(F201718)

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(10): 1459-1463]

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 13951891712@163.com

子宫颈癌是全世界女性第4大最常见恶性肿瘤,2012年全球宫颈癌新发病例和死亡病例的85%集中于发展中国家^[1]。目前我国每年宫颈癌新发病例约10万,居我国女性生殖系统恶性肿瘤第1位^[2]。因此子宫颈癌的防治是推进女性健康的重要部分。

目前,宫颈脱落细胞检查和高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)检测被美国子宫颈癌筛查指南推荐为主要筛查选择^[3]。不能明确意义的非典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cell of undetermined significance, ASCUS)的诊断标准首次由美国癌症协会于1988年制定的关于宫颈细胞学诊断标准中提出^[4],是描述宫颈鳞状上皮细胞异常的一种常见类型,在子宫颈细胞学筛查中所占比例(2.8%~5.2%)仅次于未见上皮内病变或恶性病变^[5]。2006年美国阴道镜与宫颈病理学会(ASCCP)提出ASCUS患者可行高危型HPV检测,若高危型HPV检测结果为阴性,可随访12个月后再行细胞学检查,若为阳性,建议转诊阴道镜。但转诊阴道镜患者中不乏未发生宫颈病变以及仅为低级别鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL),因此分层管理ASCUS合并高危型HPV阳性患者十分必要。

p16/Ki-67双染检测是近年出现的宫颈病变辅助诊断方法,若细胞中出现p16过表达,则提示处于细胞周期阻滞期,若出现Ki-67过表达,则提示细胞周期处于增殖期,若二者同时表达,则提示细胞周期失调^[6]。那么p16/Ki-67双染检测阳性的患者,是否发生高级别鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)的风险会增加呢?本研究回顾分析了283例ASCUS/HPV阳性者,以宫颈活检病理结果作为诊断标准,探讨HSIL的风险因素,评价p16/Ki-67双染检测在宫颈癌筛查中的可靠性及临床应用的可行性。

1 对象和方法

1.1 对象

回顾性分析2017年9月—2018年12月在南京医科大学第一附属医院妇科就诊的283例ASCUS合并高危型HPV阳性患者的临床资料。纳入研究的患者均为非妊娠状态,既往宫颈脱落细胞检查正常且高危型HPV检测阴性,无宫颈手术史,无任何其他恶性肿瘤史,无自身免疫性疾病或正在接受免疫抑制治疗。患者年龄22~70岁,平均年龄为(40±9)岁。本

研究已通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会审查,参与患者均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 宫颈脱落细胞检查

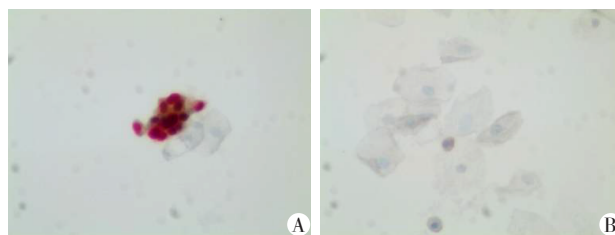
按薄层液基细胞学检查(thinprep cytologic test, TCT)要求取样、固定、制片和染色宫颈脱落上皮细胞,依据2001年子宫颈细胞学Bethesda分类系统(TBS)进行细胞学诊断^[7]。

1.2.2 Cobas HPV检测

采集患者宫颈脱落细胞,保存于细胞培养液中,使用罗氏Cobas 4800 HPV检测仪对细胞标本中HPV DNA的含量进行测定。Cobas 4800可检测14种高危型HPV并分为16、18及其他12种型别3类,任一类阳性即为HPV阳性。本研究纳入的所有患者Cobas HPV检验结果共5种类型,包括HPV16阳性、HPV18阳性、其他12种HPV阳性、HPV16合并其他12种HPV阳性以及HPV18合并其他12种HPV阳性。

1.2.3 p16/Ki-67双染检测

p16/Ki-67双染检测采用CINtec PLUS细胞学试剂盒(罗氏公司,德国)。利用宫颈脱落细胞检查后剩余的子宫颈细胞,进行处理后立即BS SurePath样本制备,经过95%酒精固定、清洗、封固等过程,最终镜下观察并记录。双染检测结果判读:若在同一焦距下观察到至少1个细胞的细胞质为棕色染色(p16)且细胞核为红色染色(Ki-67),无论细胞学形态如何,即判读为p16/Ki-67双染检测阳性(图1)。



A:p16/Ki-67双染阳性;B:p16/Ki-67双染检测阴性(×400)。

图1 p16/Ki-67双染检测结果

Figure 1 Results of p16/Ki-67 dual stain cytology

1.2.4 阴道镜下宫颈组织活检

依据阴道镜操作规范,参照2017年国际子宫颈病理与阴道镜联盟的阴道镜术语描述并诊断阴道镜图像^[8]。对阴道镜下可疑病变部位活检,不满意阴道镜图像者行宫颈管搔刮术,标本以10%福尔马林固定送至病理科检查。

1.2.5 病理检查

子宫颈活检、宫颈管搔刮组织均进行常规固

定、包埋和制片,依据2014年WHO《女性生殖器官肿瘤分类》(4版)^[9],将宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial lesion, CIN) 1级、相关HPV感染归为LSIL,将CIN2、CIN2-3、CIN3归为HSIL。

1.3 统计学方法

应用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析。单因素分析采用 χ^2 检验和Fisher确切概率法,多因素分析应用二元Logistic回归分析,纳入多因素模型的变量检验水准为 $\alpha=0.10$,分析ASCUS合并HPV阳性患者中HSIL的危险因素。应用Medcalc软件计算p16/Ki-67双染检测和HR-HPV分型检测的灵敏度、特异度、阴性预测值、阳性预测值,绘出受试者工作特征(ROC)曲线,计算两种检验方法的ROC曲线下面积(area under curve, AUC),并采用Z检验比较。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

283例ASCUS合并HPV阳性患者阴道镜下宫颈活检病理的结果:115例正常;80例LSIL(CIN1);88例HSIL,其中47例CIN2,24例CIN2-3,17例CIN3。

2.2 ASCUS合并高危型HPV阳性者中HSIL危险因素分析

选择患者年龄、HPV型别、p16/Ki-67双染检测3个非特异性因素,分析与HSIL的相关性。单因素

分析提示不同年龄患者HSIL发生率的差异无明显统计学意义($P > 0.05$,表1)。

根据Cobas HPV检测结果,分为5种类型(表1),仅HPV16型、仅HPV18型、HPV16合并其他12种亚型和HPV18合并其他12种亚型感染的患者中HSIL发生率均高于仅其他12种亚型感染的患者,差异有统计学意义($P < 0.01$)。进一步分析研究提示:HPV16阳性与HPV16合并其他12型HPV阳性者HSIL发生率并无统计学差异($\chi^2=1.216$, $P=0.545$),HPV18阳性与HPV18合并其他12型HPV阳性者HSIL发生率也无统计学差异($P > 0.05$)。

p16/Ki-67双染检测阳性患者120例,其中HSIL为73例,p16/Ki-67双染检测阴性患者163例,其中HSIL为15例,两者比较,双染阳性者HSIL的发生率高于双染阴性者($P < 0.01$,表1)。

应用二元Logistic回归分析进行多因素分析,上述3个因素中,HPV型别、p16/Ki-67双染检测为入选模型。结果提示,HPV16/18型阳性、p16/Ki-67双染检测阳性是HSIL的危险因素($P < 0.001$,表2)。

2.3 p16/Ki-67双染细胞学、HPV分型检测预测HSIL的诊断价值

所有纳入病例诊断标准为宫颈活检病理为HSIL,应用Medcalc计算得p16/Ki-67双染细胞学的灵敏度为62.0%,特异度为65.2%,阴性预测值为81.6%,阳性预测值为40.8%,HPV分型检测的灵敏度为51.1%,特异度为82.6%,阴性预测值为78.9%,

表1 ASCUS合并HPV阳性者中HSIL的单因素分析
Table 1 Univariate analysis for HSIL in ASCUS/HPV positive women [n(%)]

影响因素	例数	正常宫颈组织	LSIL	HSIL	χ^2 值	P值
年龄					8.331	0.363
≤30岁	53	19(35.8)	16(30.2)	18(34.0)		
31~40岁	105	40(38.1)	29(27.6)	36(34.3)		
41~50岁	81	42(51.9)	21(25.9)	18(22.2)		
51~60岁	38	11(28.9)	13(34.2)	14(36.8)		
≥61岁	6	3(50.0)	1(16.7)	2(33.3)		
HPV分型					—	<0.01*
HPV16	33	10(30.3)	5(15.2)	18(54.5)		
HPV18	4	1(25.0)	1(25.0)	2(50.0)		
其他12型	204	94(46.1)	67(32.8)	43(21.1)		
HPV16+其他12型	32	6(18.8)	5(15.6)	21(65.6)		
HPV18+其他12型	10	4(40.0)	2(20.0)	4(40.0)		
P16/Ki-67双染检测					86.927	<0.01
阳性	120	31(25.8)	16(13.3)	73(60.8)		
阴性	163	84(51.5)	64(39.3)	15(9.2)		

*: Fisher确切概率法。

表2 ASCUS/HR-HPV阳性者中HSIL的多因素分析

Table 2 Multivariable Logistic analysis for HSIL in ASCUS/HPV positive women

影响因素	回归系数	标准误	χ^2 值	P值	OR值	95%CI
p16/Ki-67双染阳性	2.612	0.340	59.026	<0.001	13.628	6.999~26.537
HPV16/18阳性	1.371	0.339	16.364	<0.001	3.940	2.027~7.655

阳性预测值为57.0%。应用Medcalc绘出p16/Ki-67双染细胞学、HR-HPV分型检测的ROC曲线(图2), p16/Ki-67双染细胞学的AUC(0.794)大于HPV分型检测的AUC(0.669), 差异有统计学意义($P=0.001$, 表3)。

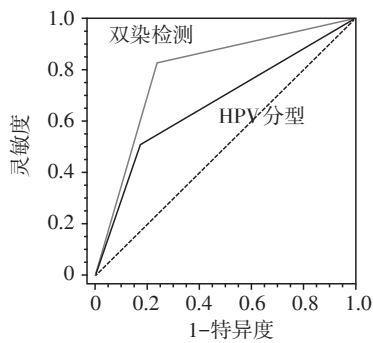


图2 p16/Ki-67双染检测、HPV分型检测的ROC曲线

Figure 2 ROC curve of p16/Ki-67 dual stain cytology and HPV genotype test

表3 p16/Ki-67双染检测、HPV分型检测的诊断价值

Table 3 Diagnostic value of p16/Ki-67 dual stain cytology and HPV genotype test

影响因素	AUC	标准误	AUC的95%CI	Z值	P值
双染检测	0.794	0.036	0.742~0.840	3.286	0.001
病毒分型	0.669	0.029	0.610~0.723		

3 讨论

ASCUS自1988年在Bethesda会议被提出后用于辨认宫颈细胞中具有一定异型性但达不到低级别病变的鳞状细胞不典型亚型, 炎症性病变、宫颈上皮内瘤变、少数宫颈癌患者的细胞学检测均可出现ASCUS的结果^[10]。如何高效检出ASCUS患者中的HSIL及宫颈癌, 同时避免过度检查以免增加患者的心理及经济负担是临床工作的一项难题。因此, 将目标人群依据不同风险分层管理十分必要, 对ASCUS合并HPV阳性患者依据发生HSIL的风险高低分层管理有重要的临床价值。

目前可确定绝大部分宫颈癌及癌前病变发生的原因是HPV的持续感染。Kim等^[11]发现HPV感染者的年龄呈“V”字型分布。但目前年龄是否是

HSIL发生的高危因素, 国内外文献的报道并不统一。Kim等^[12]回顾了韩国139例ASCUS合并HPV阳性者, 发现 ≥ 50 岁患者宫颈病变的发生率显著高于 < 50 岁患者。但Einstein等^[13]发现 < 30 岁与 ≥ 30 岁的ASCUS、HPV16/18阳性患者中HSIL发生率的差异并无统计学意义。马静等^[14]回顾了460例ASCUS/HR-HPV阳性者, 发现不同年龄组中HSIL发生率的差异并无统计学意义。本研究结果提示, 在不同年龄组患者中, HSIL发生率无统计学差异($P > 0.05$)。

目前已知的HPV中, HPV16亚型致癌风险最高, 约占全球宫颈癌病例的55%~60%, 其次是HPV18亚型, 约占10%~15%, 其余病例与另外12种HPV相关^[13,15]。Einstein等^[13]发现ASCUS伴HPV16/18阳性患者发生HSIL的风险为伴其他12种HR-HPV阳性患者的4.2倍。Stoler等^[15]在对ASCUS患者的前瞻性研究中发现HPV16阳性者发生HSIL的风险是其他12种HR-HPV阳性患者的3.7倍。本研究的结果与上述类似, HPV16/18阳性、HPV16/18合并其他12型HPV阳性患者与仅其他12型HPV阳性患者HSIL发生率的差异有统计学意义($P < 0.01$), HPV16/18阳性患者发生HSIL的风险约为其他12种HR-HPV阳性患者的3.9倍。

p16、Ki-67是近年出现的宫颈癌细胞学标志物。正常细胞周期进展中p16表达是一种抗增殖效应, 而Ki-67是一种反映细胞增殖的核抗原^[7], 同一细胞内的增殖标志物Ki-67和p16应当相互排斥。因此当宫颈上皮细胞内共表达Ki-67和p16时, 理论上可推断相应细胞出现细胞周期调控失常。Ikenberg等^[16]在对欧洲5个国家27 349例妇女的宫颈癌筛查研究中发现, p16/Ki-67双染检测对HSIL具有较细胞学更高的敏感性以及相差不大的特异性。Wentzensen等^[17]对1 509例HPV阳性女性进行的前瞻性观察研究发现p16/Ki-67双染检测对于HSIL的预测有与细胞学相似的敏感性, 更高的特异性、阳性预测值及阴性预测值, 显示了p16/Ki-67双染检测对HPV阳性患者有更优的风险分层。本研究显示, 在ASCUS合并高危型HPV感染的患者中, p16/Ki-67双染检测

阳性者HSIL的发生率明显高于双染阴性者,结果有统计学意义,p16/Ki-67双染检测阳性患者发生HSIL的风险约为阴性患者的13.6倍。

本研究发现p16/Ki-67双染检测阳性、HPV16/18阳性是ASCUS合并HPV阳性者发生HSIL的高危因素,同时比较了p16/Ki-67双染检测与HPV分型检测的检验效能。Possati-Resende等^[18]发现p16/Ki-67双染检测与HPV分型检测在ASCUS患者中预测HSIL具有相似的准确率。而本研究发现p16/Ki-67双染检测在ASCUS和LSIL中对CIN2及以上病变的灵敏度及阴性预测值与HPV分型检测类似^[19]。本研究结果显示p16/Ki-67双染检测较HPV分型检测具有较高的灵敏度、阴性预测值及准确性。

综上所述,p16/Ki-67双染检测阳性是ASCUS合并HPV阳性患者中发现HSIL的预警因素。p16/Ki-67双染检测较HPV分型检测有更高的准确性。因此对于p16/Ki-67双染检测阳性的ASCUS合并HPV阳性的患者,需谨慎评估宫颈是否存在高级别病变,该法为宫颈病变初筛提供了一种新选择。

[参考文献]

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108

[2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132

[3] Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 137(4): 516-542

[4] Hudson EA, Coleman DV, Brown CL. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses[J]. Acta Cytol, 1990, 34(6): 902-903

[5] 王荣敏, 尤志学. 2011年国际宫颈病理与阴道镜联盟阴道镜术语的解读与认知[J]. 现代妇产科进展, 2014, 23(3): 223-225

[6] Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening[J]. Dis Markers, 2007, 23(4): 315-330

[7] Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, et al. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology[J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(11): 1224-1229

[8] Khan MJ, Werner CL, Darragh TM, et al. ASCCP colpos-

copy standards: role of colposcopy, benefits, potential harms, and terminology for colposcopic practice[J]. J Low Genit Tract Dis, 2017, 21(4): 223-229

[9] Kurman RJ, Carcangui ML, Herrington GS, et al. WHO classification of tumours of female reproductive organs[M]. 4th ed. Lyon: LARC Press, 2014: 172-182

[10] 李 婷, 邢宝玲, 强 贤, 等. HPV基因分型检测对ASCUS分流管理的临床应用意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 33(9): 1299-1301

[11] Kim K, Kim JJ, Kim SM, et al. Prevalence and determinants of high-risk human papillomavirus infection in women with high socioeconomic status in Seoul, Republic of Korea[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(1): 269-273

[12] Kim YS, Lee S, Zong N, et al. Clinical progress of human papillomavirus genotypes and their persistent infection in subjects with atypical squamous cells of undetermined significance cytology: statistical and latent Dirichlet allocation analysis[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(6): 3032-3038

[13] Einstein MH, Garcia FA, Mitchell AL, et al. Age-stratified performance of the Cervista HPV16/18 genotyping test in women with ASC-US cytology[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(6): 1185-1189

[14] 马 静, 袁世发, 关丽云, 等. 高危型HPV检测分类作用及其与年龄的关系[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(26): 4223-4225

[15] Stoler MH, Wright TC, Sharma A, et al. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology results from the ATHENA HPV study[J]. Am J Clin Pathol, 2011, 135(3): 468-475

[16] Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study[J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105(20): 1550-1557

[17] Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, et al. P16/Ki-67 dual stain cytology for detection of cervical precancer in HPV-positive women[J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 107(12): 257-264

[18] Possati-Resende JC, Fregnani JH, Kerr LM, et al. The accuracy of p16/Ki-67 and HPV test in the detection of CIN2/3 in women diagnosed with ASCUS or LSIL[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0134445

[19] 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] 2019-05-29