

自动化 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色在宫颈癌筛查中的价值

李欢欢 李肖甫 智艳芳 荣守华 李雅 樊婷婷 杜沛霖

作者单位: 450052 河南郑州, 郑州大学第三附属医院检验科

通信作者: 李肖甫, Email: lixiaofu1964@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.02.015

【摘要】 目的 探讨 p16^{INK4a} 免疫细胞化学自动化染色在宫颈癌筛查中的价值。方法 选择 2017 年 9 月—2018 年 11 月在郑州大学第三附属医院同时行高危型人乳头瘤病毒 (HR-HPV) 检测和液基薄层细胞学 (TCT) 检查的 970 例 20~65 岁参加宫颈癌筛查的妇女, 利用留存细胞学标本进一步进行自动化 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色, 以组织学为“金标准”, 对其检测结果进行分析。结果 HPV16/18 阳性组和其他 12 种 HR-HPV 阳性组 p16^{INK4a} 的表达风险均高于 HR-HPV 阴性组 [优势比 (OR) = 16.67, 95% 可信区间 (95%CI) = 10.88~25.56; OR = 5.36, 95%CI = 3.60~7.98; 均 $P < 0.01$]。p16^{INK4a} 阳性率随着细胞学和病理诊断级别的升高而升高, 且低度鳞状上皮内病变 (LSIL) 组, 高度鳞状上皮内病变 (HSIL) 组 p16^{INK4a} 阳性率均明显高于阴性组 (54.05%、96.89% 比 11.37%, 均 $P < 0.05$)。p16^{INK4a} 染色检测 HSIL+ 的敏感度和特异度分别为 96.99% 和 86.74%, 均优于 HR-HPV (90.98%、62.60%) 和细胞学 (86.47%、72.52%)。结论 与细胞学和 HR-HPV 比较, p16^{INK4a} 染色在诊断 HSIL+ 时具有更高的敏感度和特异度, 对宫颈高级别病变的识别和宫颈低级别病变的分流, 具有一定的辅助作用。

【关键词】 p16^{INK4a}; 液基薄层细胞学; 人乳头瘤病毒; 宫颈上皮内病变; 宫颈癌筛查

The value of automated p16^{INK4a} immunocytochemical staining in the screening of cervical cancer

Li Huanhuan, Li Xiaofu, Zhi Yanfang, Rong Shouhua, Li Ya, Fan Tingting, Du Peipei. Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

Corresponding author: Li Xiaofu, Email: lixiaofu1964@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the value of automated p16^{INK4a} immunocytochemical staining in clinical specimens during the cervical cancer screening. **Methods** A total of 970 women aged 20–65 years who participated in cervical cancer screening performed at the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, including high-risk type of human papilloma virus (HR-HPV) test and thinprep (thin liquid layer) cytological test (TCT) at the same time, were enrolled in the study from September 2017 to November 2018. The residual cytological specimens were used to further carry out automated p16^{INK4a} immunocytochemical staining, the examination results were analyzed and the histological results were used as the "gold standard". **Results** The expression risks of p16^{INK4a} in HPV 16/18 group and other 12 HR-HPV groups were higher than that in HR-HPV negative group [odds ratio (OR) = 16.67, 95% confidence interval (95%CI) = 10.88–25.56; OR = 5.36, 95%CI = 3.60–7.98, all $P < 0.01$]. The positive rate of p16^{INK4a} staining increased with the increase of grades of cytological and pathological diagnoses, and the positive rates of p16^{INK4a} staining in the low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) group and the high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) group were all significantly higher than the rate in the group with negative SIL (54.05%, 96.89% vs. 11.37%, all $P < 0.05$). The sensitivity and specificity of p16^{INK4a} staining to detect HSIL+ lesions were 96.99% and 86.74%, respectively, which were all superior to HR-HPV (90.98%, 62.60%) and cytology (86.47%, 72.52%) examinations. **Conclusion** Compared with cytology and HR-HPV, p16^{INK4a} staining has higher sensitivity and specificity in the diagnosis of HSIL+, and has a certain auxiliary effect on the recognition of the difference between the high-grade cervical lesions from the low-grade cervical lesions as a shunt.

【Key words】 p16^{INK4a}; Thinprep cytologic test; Human papilloma virus; Cervical intraepithelial neoplasia; Cervical cancer screening

宫颈癌是女性癌症患者死亡的第二大原因, 尤其在 20~39 岁年龄段表现更为突出, 仅次于乳

腺癌。因此, 多数学者强调提高该年龄段人群筛查率, 同时增加人乳头瘤病毒 (human papilloma virus,

HPV) 疫苗接种率^[1]。宫颈癌是目前唯一能够经早期筛查被发现,并通过医学干预使发病率和病死率降低的妇科恶性肿瘤,其中手术治疗是早期宫颈癌的最佳选择,临床分期、肿瘤分化程度、盆腔淋巴结转移情况是影响手术治疗预后的重要因素^[2]。目前有研究已证实,高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)持续感染是导致宫颈上皮内病变和宫颈癌的主要原因^[3],而早期发现和治疗宫颈癌前病变的关键在于进行宫颈癌筛查。然而细胞学检查的敏感度较低,HPV 检测的特异度较低,导致临床不必要的转诊和治疗,增加了患者的心理负担和医疗保健的成本。

目前已发现,在宫颈癌的形成过程中伴随着 p16^{INK4a} 表达上调,宫颈癌前病变与 p16^{INK4a} 蛋白过度表达密切相关。2012 年下生殖道相关鳞状上皮病变命名标准化项目(the lower anogenital squamous terminology standardization, LAST) 和 2014 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO) 均建议将 p16^{INK4a} 过度表达作为判断高度鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) 或宫颈癌的重要指标^[4-5]。对于宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 2 级病例,应用 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色区分 HSIL 和低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL),而不能仅以形态学进行鉴别。目前, p16^{INK4a} 染色在组织学中应用较普遍,而细胞学的相关报道较少,且大多采用手工染色,技术方法和结果判读无固定标准,研究结果相差较大。本研究选择 2017 年 9 月—2018 年 11 月在本院参加宫颈癌筛查的 970 例妇女作为研究对象,利用统一细胞免疫标记染色全自动仪器进行检测,旨在通过大样本临床试验验证 p16^{INK4a} 染色可提高宫颈癌前病变诊断的准确性,降低误诊率和漏诊率,从而提高临床治疗效果。

1 资料与方法

1.1 观察对象 选择 2017 年 9 月—2018 年 11 月在郑州大学第三附属医院妇科门诊和病房参加宫颈癌筛查,并同时行细胞学和 HR-HPV 检测的 1 100 例妇女作为观察对象,年龄 20~65 岁,中位年龄 44 岁;均为受试时未怀孕、无骨盆放射治疗史的已婚妇女;细胞病理和组织病理两项检查时间间隔在 1 个月内。本研究符合医学伦理学标准,所有参与者均被告知详细研究细节并知情同意。所有数据均经处理,以保护患者隐私。

1.2 分组 将细胞学〔无明确诊断意义的不典

型鳞状细胞(atypical squamous cell of undetermined significance, ASC-US) 及以上〕和 HR-HPV(14 种高危型至少 1 种阳性)至少一项异常的妇女作为实验组,再根据细胞学及 HR-HPV 检测结果分为 A、B、C 组, A 组宫颈细胞学和 HR-HPV 均为阳性, B 组宫颈细胞学阳性、HR-HPV 阴性, C 组宫颈细胞学阴性、HR-HPV 阳性。细胞学和 HR-HPV 均为阴性,因其他妇科良性子宫疾病(如无生育要求而症状严重的子宫肌瘤、子宫内膜异位症、子宫腺肌病等)行子宫切除术的妇女作为对照组。

1.3 方法 受检者均参加宫颈癌筛查,同时行细胞学和 HR-HPV 检测,并留存细胞学标本进一步行自动化 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色,追踪组织学结果。

1.3.1 p16^{INK4a} 免疫细胞化学自动化染色 检测 p16^{INK4a} 蛋白在宫颈细胞学中的表达情况,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.3.1.1 仪器与试剂 自动化统一细胞免疫标记染色机、振荡器、显微镜, p16 试剂(Anti-CDKN2A/p16^{INK4a}),均购自广州江元医疗科技有限公司;抗体购自 Abcam(Cambridge, MA, USA);清洗液(分为 A、B、C),缓冲液 PBS-X(10 s)、缓冲液 PBS-T(10 s),免疫显色试剂(封闭液、P1 液、P2 液、抗体稀释液、DAB 显色液、DAB 稀释液、质控片),苏木素染液。

1.3.1.2 结果判定 由两位细胞诊断医师评估认定 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色结果。p16^{INK4a} 着色部位为细胞核或细胞质,染色呈黄色或棕黄色者为阳性,与背景几乎相同者为弱阳性,细胞质局限染色者为阴性。根据 Wentzensen 等^[6]提出的 4 项核评分标准(细胞核/细胞质比增加、染色质颗粒增多、核形态不规则、无核状态)对 p16^{INK4a} 阳性细胞进行详细评价,核评分 > 2 分为阳性。其中无 p16 阳性细胞者,评分 0 分; p16 阳性细胞无任何核改变迹象,评分 1 分;仅表现上述标准之一的轻度核异常细胞,评分 2 分;细胞核/细胞质比增加(>50%),加另外 1 项阳性标准,评分 3 分;所有细胞的细胞核/细胞质比均增加,加另外至少 2 项阳性标准,评分 4 分。根据 p16 阳性细胞的分布模式,将其进一步分为片状、斑片状和单细胞 3 种类型。片状细胞组由分布为片状团簇的细胞组成,大部分细胞呈阳性;斑片状组由分布为交替簇的染色呈阳性或阴性的少数阳性细胞组成;单细胞组由单个阳性细胞组成^[7]。

1.3.2 细胞学检查 细胞学检查采用 ThinPrep 2000(美国 Cytoc 公司)液基薄层细胞自动制片机制片,

利用细胞学诊断后剩余标本进一步行细胞免疫标记染色法检测并另外制片。对细胞学诊断不一致的病例进行回顾性诊断分析,排除人为因素;由两位高年资细胞病理医师采用双盲法诊断,两者诊断结果一致方可纳入统计分析。根据 2014 年修订的 TBS 系统进行结果判读,分为 ASC-US、LSIL、不能排除 HSIL 不典型鳞状细胞(atypical squamous cells-cannot exclude HIS, ASC-H)、HSIL、鳞状细胞癌(squamous cell cancer, SCC)、未见上皮内病变细胞和恶性细胞(negative for intraepithelial lesion or malignancy, NILM,包括霉菌、滴虫感染)。

1.3.3 HR-HPV 检测 采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)+ 导流杂交法,试剂盒由 PCR 试剂、杂交试剂两部分组成,应用基因扩增技术及导流杂交原理,以凯普医用核酸分子快速杂交仪为平台,通过反向点杂交检测扩增产物与包被有型特异性探针膜杂交结果。该方法可以检测 14 种最常见高危型 HPV (HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66 和 68 型)。试剂购自凯普生物科技有限公司,严格按说明书操作。根据 HR-HPV 感染类型分为 HR-HPV 阴性、其他 12 种 HR-HPV 阳性和 HPV16/18 阳性(HPV16 型或 HPV18 型任一阳性)。

1.3.4 阴道镜及组织病理学检查 细胞学筛查异常者(如细胞学 ASC-US 伴 HPV 检测阳性、两次细胞学连续常规筛查均为 ASC-US、细胞学为 LSIL 及以上、HPV 16/18 阳性),均行阴道镜检查 and 宫颈活检。组织学诊断由本院 3 位经验丰富的病理学专家进行显微镜下组织学诊断,组织学活检结果按 2014 年世界卫生组织出版的《女性生殖器官肿瘤组织学分类(第 4 版)》^[5]标准分为良性(无病理改变和良性或反应性改变)、LSIL(CIN1 和 p16 阴性的 CIN2)、HSIL(p16 阳性的 CIN2、CIN3、原位癌或腺鳞癌)和 SCC。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, p16^{INK4a} 染色与 HR-HPV 感染的关系采用非条件 Logistic 回归分析,不同 HR-HPV 感染型和病理诊断的 p16^{INK4a} 阳性率比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。对 p16^{INK4a} 染色结果进行诊断试验评价,计算敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况 由于 130 例未追踪到病理结果(部分细胞学 ASC-US 或为 LSIL, HR-HPV 阴性者未做

阴道镜下活检,部分失访),最终 970 例妇女纳入研究。其中 625 例细胞学检查阴性, 345 例细胞学检查阳性(ASC-US 及以上级别); 434 例 HR-HPV 阳性(14 种高危型任一型阳性), 536 例 HR-HPV 阴性。

2.2 p16^{INK4a} 染色与 HR-HPV 感染的关系 HR-HPV 总阳性率为 44.74% (434/970), p16^{INK4a} 染色总阳性率为 24.74% (240/970)。实验组 HR-HPV 阳性率为 80.37% (434/540), 其中 A、B、C 组 p16^{INK4a} 染色阳性率分别为 63.18% (151/239)、26.42% (28/106)、22.05% (43/195), A 组较 B、C 组明显升高(均 P<0.01), B 组与 C 组比较差异无统计学意义(P>0.05)。p16^{INK4a} 染色阳性时,实验组和对照组的 p16^{INK4a} 染色阳性率分别为 92.50% (222/240)和 7.50% (18/240), 差异有统计学意义(P<0.01)。见表 1。

表 1 对照组以及不同 TCT、HR-HPV 检测结果实验组各组的 p16^{INK4a} 染色阳性率

组别	例数(例)	p16 ^{INK4a} 染色		
		阴性数(例)	阳性数(例)	阳性率(%)
实验组	540	318	222	41.11
A 组(TCT+, HR-HPV+)	239	88	151	63.18
B 组(TCT+, HR-HPV-)	106	78	28	26.42
C 组(TCT-, HR-HPV+)	195	152	43	22.05
对照组	430	412	18	4.19

HR-HPV 阴性组、其他 12 种 HR-HPV 阳性组和 HPV16/18 阳性组的 p16^{INK4a} 阳性率依次为 8.58% (46/536)、33.46% (86/257)、61.02% (108/177), 呈递增趋势($\chi^2=210.37, P<0.01$)。非条件 Logistic 回归分析显示, p16^{INK4a} 在其他 12 种 HR-HPV 阳性组和 HPV16/18 阳性组中的表达风险均明显高于 HPV 阴性组[OR 值分别为 5.36(95%CI=3.60~7.98)、16.67(95%CI=10.88~25.56), 均 P<0.01]。见表 2。

表 2 不同 HR-HPV 感染类型各组的 p16^{INK4a} 染色阳性率

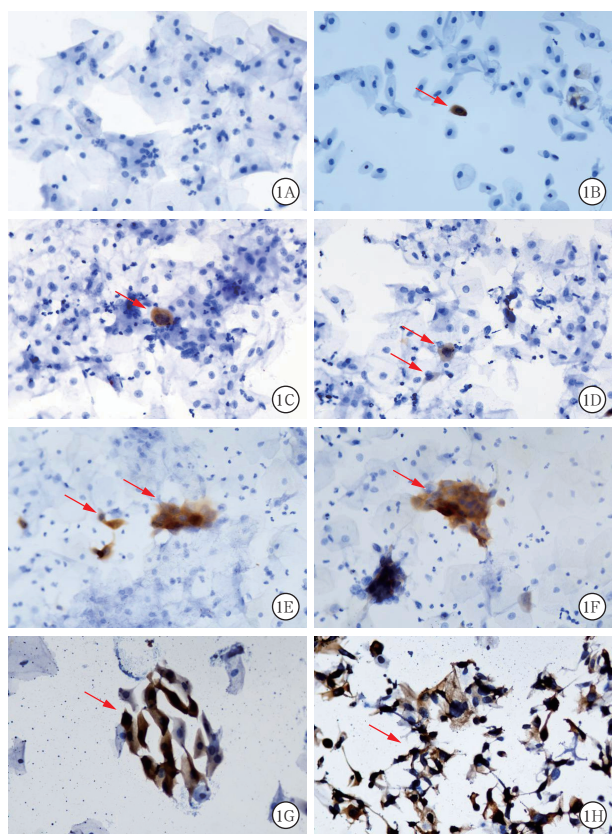
组别	例数(例)	p16 ^{INK4a} 染色		
		阴性数(例)	阳性数(例)	阳性率(%)
HR-HPV 阴性	536	490	46	8.58
其它 12 种 HR-HPV 阳性	257	171	86	33.46
HPV16/18 阳性	177	69	108	61.02
合计	970	730	240	24.74
χ^2 值				210.37
P 值				< 0.01

2.3 p16^{INK4a} 染色在不同细胞学诊断分级中的表达 实验组和对照组的 p16^{INK4a} 染色阳性率分别为 41.11% (222/540)、4.19% (18/430)。970 例受检

者中, NILM 625 例(64.43%), ASC 201 例(20.72%), ASC-US 120 例和 ASC-H 81 例), LSIL 59 例(6.08%), HSIL 及以上 85 例(8.76%, HSIL 83 例和 SCC 2 例), p16^{INK4a} 染色阳性率分别为 9.76%、35.59%、43.28%、83.53%; 细胞学异常组的 p16^{INK4a} 染色阳性率为 51.88% (179/345)。随细胞学诊断级别升高, p16^{INK4a} 染色阳性率逐渐升高 ($\chi^2=260.02, P<0.01$), 且染色强度逐渐增强。见表 3, 图 1。

表 3 p16^{INK4a} 染色与细胞学之间的关系

TCT	例数 (例)	p16 ^{INK4a} 染色		
		阴性数 (例)	阳性数 (例)	阳性率 (%)
NILM	625	564	61	9.76
LSIL	59	38	21	35.59
ASC	201	114	87	43.28
HSIL 及以上	85	14	71	83.53
χ^2 值				260.02
P 值				< 0.01



注: A 得分为 0 分, B ~ D 得分为 1 ~ 2 分, E ~ H 得分为 3 ~ 4 分
图 1 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色细胞 (高倍放大)

2.4 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色与对应细胞学及病理组织学的关系 对照组共纳入 430 例, p16^{INK4a} 染色阳性率为 4.19% (18/430)。良性组织病理组 428 例 (包括湿疣样变、慢性宫颈炎、宫颈息肉等), CIN2 2 例; 良性组织病理组和异常组织病理组 p16^{INK4a}

染色阳性率分别为 3.74% (16/428)、100% (2/2)。实验组共纳入 540 例, 良性 372 例, p16^{INK4a} 染色阳性率为 20.16% (75/372); LSIL 37 例 (包括 CIN1 33 例, p16 阴性 CIN2 4 例), p16^{INK4a} 染色阳性率为 54.05% (20/37); HSIL 组 127 例 (包括 p16 阳性 CIN2 39 例, CIN3 88 例), p16^{INK4a} 染色阳性率为 96.85% (123/127); SCC 4 例, p16^{INK4a} 染色阳性率为 100% (4/4)。

以组织学为金标准, 良性组 p16^{INK4a} 染色阳性率为 11.38% (91/800), 病理异常组 p16^{INK4a} 染色阳性率为 87.65% (149/170), 随宫颈病变程度加重 p16^{INK4a} 染色阳性率逐渐升高, 差异有统计学意义 ($\chi^2=428.20, P<0.01$)。HSIL 组、SCC 组的 p16^{INK4a} 染色阳性率均明显高于良性组和 LSIL 组 (均 $P<0.05$); HSIL 组与 SCC 组之间的 p16^{INK4a} 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。4 例 SCC 中, 1 例细胞学诊断为 ASC-H, p16^{INK4a} 染色阳性; 129 例 HSIL 中, 60 例细胞学诊断与组织学诊断一致, p16^{INK4a} 染色阳性率为 96.90% (125/129); 在诊断宫颈 SCC 和 HSIL 时, p16^{INK4a} 染色与细胞学比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); 在 LSIL 和良性组中, p16^{INK4a} 染色与细胞学诊断差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 4。

表 4 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色与对应细胞学及病理组织学的关系

组织病理分型	例数 (例)	细胞学 (例)		p16 ^{INK4a} (例)	
		诊断	例数	阳性	阴性
SCC	4	SCC	2	2	0
		HSIL	1	1	0
		ASC-H	1	1	0
HSIL	129	HSIL	60	59	1
		ASC-H	24	24	0
		LSIL	12	11	1
		ASC-US	15	15	0
		NILM	18	16	2
LSIL	37	HSIL	5	5	0
		ASC-H	4	2	2
		LSIL	6	3	3
		ASC-US	7	3	4
		NILM	15	7	8
良性	800	HSIL	17	4	13
		ASC-H	52	20	32
		LSIL	41	7	34
		ASC-US	98	22	76
		NILM	592	38	554
合计	970	970	240	730	

2.5 p16^{INK4a}、细胞学和 HR-HPV 检测在宫颈 HSIL+ 中的筛查价值 以组织学为金标准, p16^{INK4a} 染色诊断 HSIL+ 的敏感度和特异度分别为 96.99% 和 86.74%, 均优于 HR-HPV 检测 (90.98%、62.60%) 和细胞学 (86.47%、72.52%)。见表 5。

表 5 p16^{INK4a}、细胞学和 HR-HPV 对 HSIL+ 筛查的敏感度、特异度、阳性预测值及阴性预测值

检测方法	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
p16 ^{INK4a}	96.99	86.74	53.75	99.45
细胞学	86.47	72.52	33.33	97.12
HR-HPV	90.98	62.60	27.88	97.76

3 讨论

宫颈癌是妇科恶性肿瘤的常见癌症之一,其产生原因为 HR-HPV 持续感染,尤其以 HPV 16 型和 18 型最常见且风险最高。目前,宫颈癌筛查主要依赖宫颈脱落细胞学和 HPV-DNA 检测,但上述两种筛查方法均有局限性。细胞学检查的敏感度较低、假阴性率较高,且细胞学医师的培养过程漫长;而 HPV-DNA 检测虽敏感度有所提高,但特异性较差,不能确定 HPV 感染者的宫颈病变情况是否有进一步发展的风险。因此,当务之急是寻找能够预测宫颈病变发展趋势的早期指标或辅助诊断指标,从而在病毒持续感染者中准确找出宫颈癌高危患者,达到精准防治肿瘤的目的,减轻患者心理及经济负担。

p16^{INK4a} 是位于染色体 9p21 上的 CDKN2a 肿瘤抑制基因编码的蛋白质, p16^{INK4a} 蛋白与 CDK4/6 结合并维持 pRb 处于低磷酸化状态,后者又与 E2F 转录因子结合并阻止细胞增殖周期由 G1 期向 S 期转化和 DNA 合成的启动^[8]。宫颈癌的发生是一个复杂的过程, HR-HPV 持续感染是主要致病因素,可能的机制为当宿主持续感染 HR-HPV 后, HR-HPV 的 DNA 整合进入宿主细胞基因组,导致 E6 和 E7 病毒基因产生癌蛋白。E6 降解 p53, E7 结合 pRb 并使其失活,导致 pRb 丧失对 p16^{INK4a} 基因的负反馈抑制作用, p16^{INK4a} 蛋白呈过表达^[9-12],最终驱动细胞死亡和细胞凋亡。上述现象也可在一些正常细胞中观察到,如衰老细胞、鳞状化生细胞及萎缩细胞。

研究表明^[13-14], p16^{INK4a} 基因及其表达产物在大部分肿瘤组织中缺失或低表达,而在宫颈上皮内病变及宫颈癌组织中的表达量和范围则随宫颈级别的升高而逐渐增加。p16^{INK4a} 被认为是 HR-HPV 感染转化的生物标记物, p16^{INK4a} 阳性表达程度也可用于判断 HR-HPV 感染程度, p16^{INK4a} 阴性表明病变处于非异型增生状态,而 p16^{INK4a} 阳性则表明病变处于异型增生相。考虑到仅少数 LSIL 病例可进展为更高级的病变, p16^{INK4a} 阳性可能对指导低风险的绝经妇女和青少年患者进行更密切的随访或进一步评估有一定实用价值。迄今为止,已有研究提示 p16^{INK4a}

作为一种生物标志物在宫颈细胞学涂片中发现异常细胞的可行性^[15-19]。目前 p16^{INK4a} 染色在组织学中应用较普遍,而在细胞学中报道较少,且几乎均为手工染色,染色时间长短不一,操作人员水平良莠不齐,技术方法和结果判读无固定标准,报道结果相差较大。本研究采用自动化统一免疫标记染色机,制片及染色步骤更标准化,避免了操作者差异对实验结果的影响,具有较好的可重复性和诊断准确性。

本研究结果表明, p16^{INK4a} 在 HR-HPV 阳性人群中中的表达高于 HR-HPV 阴性人群,且 p16^{INK4a} 在 HPV16/18 阳性组中的表达风险是其他 12 种 HR-HPV 阳性组的 3 倍,与既往研究结果一致^[20],提示 p16^{INK4a} 表达与 HR-HPV 感染有关。

Bergeron 等^[21]研究发现, p16^{INK4a} 诊断筛查人群 HSIL+ 的敏感度为 86%; Carozzi 等^[22]研究显示,筛查人群中 p16^{INK4a} 免疫染色的横断面敏感度为 88%; 本研究中 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色诊断 HSIL+ 的敏感度为 96.99%, 特异度为 86.74% (可能与具有良好形态学基础的细胞学专家阅片有关),均高于 HR-HPV 和细胞学检测。

本研究中,实验组和对照组的 p16^{INK4a} 染色阳性率比较差异有统计学意义,虽然对照组出现少量 p16^{INK4a} 染色阳性,但其核评分多集中在 1~2 分,而实验组则集中在 3 分及以上。细胞学和组织学结果均显示,随宫颈病变程度加重, p16^{INK4a} 染色阳性率及核评分均明显升高,说明 p16^{INK4a} 染色程度与宫颈高级别病变的发生密切相关, p16^{INK4a} 染色评分越高,进展为宫颈癌的风险越大。临床工作中,由于 HSIL 的细胞形态和萎缩细胞有时非常相似,仅根据形态学进行细胞诊断可能是一个挑战,尤其当萎缩细胞出现深色拥挤群 (Hyperchromatic crowded groups, HCGs) 细胞时很容易被误认为是 HSIL。本研究 800 例良性病变中, 69 例仅通过细胞学检查被误认为是 HSIL (13 例) 和 ASC-H (32 例),但其中有 45 例通过 p16^{INK4a} 染色结合细胞学检查被正确识别,因此 p16^{INK4a} 免疫染色不仅可作为宫颈 HSIL 或更严重病变的辅助诊断工具,也有助于判断 LSIL 和良性病变,从而减少不必要的阴道镜转诊。

本研究显示, p16^{INK4a} 染色具有以下几个优点: ① 阴性预测值和特异度高; ② 经济实惠, p16^{INK4a} 染色阳性即可提示早期宫颈上皮内病变,相比于 p16^{INK4a}/Ki-67 双染经济实惠,且实验人员更好把控; ③ 自动化染色标准快速,易于操作。本研究利用全

自动免疫细胞化学染色仪器,每批可同时检测 24 例样本,两批样本间隔时间仅为 3.5 h(手工免疫细胞化学染色加一抗后需 4 ℃过夜)。另外,细胞学阅片主要依据细胞形态学,由于经验不足和任务量大,细胞学检查医师常易漏诊一些可能发展为癌前病变甚至宫颈癌的患者,导致假阴性率升高;而 p16^{INK4a} 染色在显微镜下根据颜色差异即可快速识别异常细胞,非专业技术人员可以在短期内掌握,比较适用于诊断水平和异常结果检出率低的经济欠发达地区大样本量的宫颈癌筛查。

本研究局限性:①与国外研究相比,入组的研究对象样本量偏少,研究结果可能存在偶然性因素;②对细胞学异常和 HR-HPV 阳性者阴道镜依从率较高,两种检查结果正常而仅 p16^{INK4a} 阳性者大部分无随访病理结果,可能会使 p16^{INK4a} 的特异度升高。因此,为全面筛查目标人群的宫颈情况以及精确评估 p16^{INK4a} 的临床价值,应加强对单纯 p16^{INK4a} 阳性者的随访管理,以早期发现潜在宫颈病变;此外,应通过媒体广泛宣传宫颈健康知识,提高宫颈癌疫苗的接种率,使目标人群自觉接受并重视宫颈癌筛查,以提高阴道镜依从率,降低宫颈癌发病率;最后,当细胞学、HR-HPV 检测和 p16^{INK4a} 染色任一结果阳性时均建议进一步行阴道镜检查,从而避免诊断偏倚,更加客观、准确地比较其单独的敏感度和特异度。

综上所述,自动化 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色可在一定程度上提高宫颈癌筛查的敏感度和特异度,减少漏诊和过度诊断,对临床诊疗有较好的辅助分流价值,能够降低早期宫颈癌及癌前病变的发生率,减轻患者的经济负担,有较好的应用前景。

参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21387.
- 顾彩珑,王玉萍. 宫颈癌病理特征与预后的关系探讨[J]. *实用检验医师杂志*, 2012, 4(3):153-156. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.03.006.
- Rantshabeng P, Kasvosve I, Ndlovu A, et al. Prevalence of high-risk human papilloma virus in women with high-grade squamous cell intraepithelial lesions in Botswana using Abbott RealTime HPV assay [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1):e0211260. DOI: 10.1371/journal.pone.0211260.
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology [J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2012, 16(3):205-42. DOI: 10.1097/LGT.0b013e31825c31dd.
- 石一复.《第 4 版 WHO 女性生殖器官肿瘤组织学分类》解读[J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(6):697-704.
- Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, et al. Evaluation of a nuclear score for p16^{INK4a}-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples [J]. *Cancer*, 2005, 105(6):461-467. DOI: 10.1002/encr.21378.
- Wu MZ, Wang S, Zheng M, et al. The diagnostic utility of p16 immunostaining in differentiating cancer and HSIL from LSIL and benign in cervical cells [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(2):195-200. DOI: 10.1177/0963689718817478.
- Mahajan A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology [J]. *Hum Pathol*, 2016, 51:64-74. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.12.021.
- Kishore V, Patil AG. Expression of p16^{INK4A} Protein in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of uterine Cervix [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(9):EC17-EC20. DOI: 10.7860/JCDR/2017/29394.10644.
- Xing Y, Wang C, Wu J. Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(26):e7302. DOI: 10.1097/MD.0000000000007302.
- Sarma U, Biswas I, Das A, et al. p16^{INK4a} Expression in cervical lesions correlates with histologic grading—a tertiary level medical facility based retrospective study [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(10):2643-2647. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.10.2643.
- Sarwath H, Bansal D, Husain NE, et al. Introduction of p16INK4a as a surrogate biomarker for HPV in women with invasive cervical cancer in Sudan [J]. *Infect Agent Cancer*, 2017, 12:50. DOI:10.1186/s13027-017-0159-0.
- Pandey A, Chandra S, Nautiyal R, et al. Expression of p16INK4a and human papillomavirus 16 with associated risk factors in cervical premalignant and malignant lesions [J]. *South Asian J Cancer*, 2018, 7(4):236-239. DOI: 10.4103/sajc.sajc_118_17.
- Stoler MH, Wright TC Jr, Ferenczy A, et al. Routine use of adjunctive p16 immunohistochemistry improves diagnostic agreement of cervical biopsy interpretation: results from the CERTAIN study [J]. *Am J Surg Pathol*, 2018, 42(8):1001-1009. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001072.
- Savone D, Carrone A, Riganelli L, et al. Management of HPV-related cervical disease: role of p16^{INK4a} immunochemistry. Review of the literature [J]. *Tumori*, 2016, 102(5):450-458. DOI: 10.5301/tj.5000524.
- Khazaei S, Izadi B, Mirbahari SG, et al. Comparison between two detection methods for HPV16, HPV18 and p16^{INK4a} biomarkers in diagnosis of abnormal cervical cytology [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(12):5223-5227. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.12.5223.
- Wong YP, Abdul Raub SH, Mohd Dali AZ, et al. P16^{INK4a}: a potential diagnostic adjunct for prediction of high-grade cervical lesions in liquid-based cytology: with HPV testing and histological correlation. [J]. *Malays J Pathol*, 2016, 38(2):93-101.
- 栾中华. P16 免疫细胞化学联合高危型 HPV 检测在 ASCUS 患者分流中作用的研究 [J]. *中国药物与临床*, 2018, 18(5):814-815. DOI: 10.11655/zgywylc2018.05.077.
- Ebisch RM, van der Horst J, Hermsen M, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women [J]. *Mod Pathol*, 2017, 30(7):1021-1031. DOI: 10.1038/modpathol.2017.16.
- 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. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.05.004.
- Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, et al. The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(12):2741-51. DOI: 10.1002/ijc.28900.
- 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):168-76. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70529-6.

(收稿日期:2019-04-28)

(本文编辑:张耘菲)