

高危型 HPV 负荷量和 p16^{INK4A} 蛋白监测 评估宫颈锥切术治疗 CIN

王 华¹, 蔡红兵², 郭广林¹

(1. 湖北医药学院附属襄阳医院, 襄阳市第一人民医院, 湖北 襄阳 441100;

2. 武汉大学中南医院, 湖北省肿瘤生物学行为重要实验室, 湖北省肿瘤临床医学
研究中心, 湖北 武汉 430071)

摘要: [目的] 评价高危型人乳头状瘤病毒 HPV 负荷量的检测和 p16^{INK4A} 蛋白的表达在预测宫颈上皮内瘤变 (CIN) 宫颈锥切术后残存病变或复发中的意义。[方法] 回顾性分析 142 例 2008 年 10 月至 2010 年 12 月因 CIN 行宫颈锥形切除术治疗患者的临床资料。所有患者均于宫颈锥形切除术前 6 个月以内和术后 6~12 个月进行 HPV 负荷量检测, 并采用免疫组化方法检测 HPV DNA 阳性患者宫颈细胞中 p16^{INK4A} 蛋白表达。[结果] 宫颈锥切术前, 随着 CIN 级别的上升, HPV 负荷量以及 p16^{INK4A} 蛋白表达均明显增强 ($P < 0.05$)。但在宫颈锥切术后, HPV 负荷量和 p16^{INK4A} 蛋白表达明显降低, 宫颈锥切术前和术后两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] HPV 负荷量持续增高和 p16^{INK4A} 蛋白持续呈强阳性是宫颈锥切术后发生残存病变或复发的高危因素, 在监测 HPV 负荷量的同时检测 p16^{INK4A} 蛋白的表达, 对判断宫颈锥切术后发生残存病变或复发有重要意义。

主题词: 宫颈上皮内瘤变; 人乳头状瘤病毒; p16^{INK4A} 蛋白; 宫颈锥切

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)09-700-04

Significance of High-risk Human Papillomavirus(HPV) Detection and p16^{INK4A} Protein Expression in Predicting Residual Disease or Recurrence After Cervical Conization for Cervical Intraepithelial Neoplasia

WANG Hua¹, CAI Hong-bing², GUO Guang-Lin¹

(1. Xiangyang Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441100, China;

2. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: [Purpose] To evaluate the significance of high-risk HPV detection and p16^{INK4A} protein expression in predicting residual disease or recurrence after cervical conization for cervical intraepithelial neoplasia (CIN). [Methods] A retrospective study was performed in 142 patients who underwent conization from October 2008 to December 2010. All patients accepted high-risk HPV loading detection within six months before cervical conization and six to twelve months after cervical conization. In addition, p16^{INK4A} were measured by immunohistochemistry staining in 88 positive samples with HPV infection. [Results] The high-risk HPV loading increased along with CIN grades became higher before cervical conization, and the same situation existed between the expression of p16^{INK4A} and CIN grades. However, the high-risk HPV loading and the expression of p16^{INK4A} markedly decreased after cervical conization. There were statistical differences before and after cervical conization ($P < 0.05$). [Conclusion] The increase of high-risk HPV loading and the strengthened expression of p16^{INK4A} are high risk factor for residual disease or recurrence after cervical conization for CIN. Detection of high-risk HPV and p16^{INK4A} expression at one time might be an effective method to predict residual disease or recurrence.

Subject words: cervical intraepithelial neoplasia; human papillomavirus; p16^{INK4A}; cervical conization

近年来, 宫颈上皮内瘤变 (CIN) 年轻化趋势明显, 临床上通常采用宫颈锥切术, 但是术后存在着病变残存、复发的可能, 多年后可能进展为浸润性

宫颈癌。虽然大量的流行病学调查和分子生物学研究结果表明^[1], 大多数 CIN 和宫颈癌的发生与高危型 HPV 感染相关, 以往的 HPV DNA 检测虽可预测其切缘是否阳性、复发及发展到浸润癌的危险, 但不能判断某一个体何时会复发或进展为癌及什么

王华和蔡红兵为并列第一作者。

收稿日期: 2012-04-12; 修回日期: 2012-07-08

时候需要进一步处理。若能在 CIN 患者中找到预示疾病进展的标志物,对防治宫颈癌意义重大。

研究显示^[2],抑癌基因 $p16^{INK4A}$ 的过表达和 HPV 持续感染与宫颈癌的发生发展过程密切相关,且 $p16^{INK4A}$ 是作为宫颈鳞状细胞癌和大部分宫颈腺癌程序启动的标志物。本研究分别采用第二代杂交捕获法(hybrid capture- II, HC- II)检测 CIN 患者行宫颈锥形切除术术前术后的高危型 HPV DNA 负荷量,并对 DNA 阳性的患者采用免疫组化 SP 法了解 $p16^{INK4A}$ 在宫颈锥形切除术术前术后的表达,从而为临床寻找更为客观可靠的指标用以监测病变的进展,并为揭示 HPV 致癌机制及协同作用因素提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2008 年 10 月至 2010 年 12 月在湖北医药学院附属襄阳医院行宫颈锥切治疗的 142 例 CIN 患者(CIN II 47 例、CIN II~III 33 例、CIN III 62 例),以上 3 组患者中位年龄 28 岁(25~61 岁),各组患者年龄经方差检验,差异无统计学意义($P=0.307$)。所有患者均于宫颈锥形切除术前 6 个月和术后 12 个月进行了高危型 HPV DNA 负荷量检查,并采用免疫组化的方法检测高危型 HPV DNA 阳性患者宫颈细胞中 $p16^{INK4A}$ 蛋白表达。病理诊断均以术前宫颈活检和术后宫颈锥形切除中较高级别为准,残存病变或复发定义为再次活检或再次手术后病理报告存在任何级别的 CIN 或者严重程度更高的病变。

宫颈细胞学标本采用专用收集器收集,所有标本分两部分,一部分进行细胞涂片,另一部分液氮处理后立即保存于 -70°C 低温冰箱中。

1.2 实验方法

1.2.1 高危型 HPV 负荷量的检测方法

应用第 2 代杂交捕获法(hybrid capture- II, HC- II)方法对宫颈脱落细胞的 HPV DNA 进行定量检测(试剂由亚能生物公司提供)。检测 13 种高危型 HPV (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68)DNA,并同时检测样本中 HPV 的负荷量。

1.2.2 $p16^{INK4A}$ 的检测方法

将 HPV DNA 阳性的 88 例上述细胞涂片标本

用 S-100 免疫细胞化学方法检测 $p16^{INK4A}$,实验步骤严格按照 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)说明书进行。

1.3 结果判定

1.3.1 高危型 HPV 负荷量的判定标准

以每份样本的检测值相对发光单位(relative luminous unit, RLU)与专用试剂盒(Digene 公司,美国)中 HPV DNA 阳性对照临界值(positive control, PC)的比值(RLU/PC)表示子宫颈组织细胞 HPV DNA 的负荷量,如 $\text{RLU/PC}>1.0$,则表示每毫升标本中 HPV DNA 的含量 $>1.0\text{pg}$,结果为阳性,将 HPV 负荷量分为 $<1\sim 9\text{pg/ml}$ 、 $10\sim 99\text{pg/ml}$ 、 $\geq 100\text{pg/ml}$ 3 个等级。

1.3.2 $p16^{INK4A}$ 的判定标准

$p16^{INK4A}$ 定位于细胞质和细胞核内,染色呈黄色或棕黄色者为阳性细胞。以已知的阳性组织切片(北京中杉金桥生物技术有限公司提供)作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。每张切片随机选取 10 个 500 倍视野,阳性细胞数 $<10\%$ 或染色强度与背景颜色无明显差别为(-);阳性细胞数 $10\%\sim 15\%$ 或染色强度较背景颜色明显加深为(+); $16\%\sim 25\%$ 为(++); $\geq 25\%$ 为(+++)。

对宫颈锥切术后宫颈脱落细胞 $p16^{INK4A}$ 的表达持续阳性以及高危型 HPV 负荷量持续不降的患者在阴道镜下对可疑宫颈病变部位再次行活检术,术后送病理检查。

1.4 统计学处理

用 SPSS13.0 软件行 χ^2 检验或 Fisher 精确检验统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高危型 HPV 负荷量在宫颈锥切术前和术后的表达

由表 1 可见,在宫颈锥切术前,随着 CIN 级别的上升,高危型 HPV 负荷量增加,但在宫颈锥切术后 12 个月复诊,高危型 HPV 负荷量明显减低,术前和术后差异有统计学意义($P=0.041$)。

2.2 $p16^{INK4A}$ 蛋白在宫颈锥切术前和术后的表达

由表 2 可见,随 CIN 级别的上升,宫颈上皮细胞中 $p16^{INK4A}$ 蛋白的表达水平逐渐增强(图 1、2),但在宫颈锥切术后 12 个月复诊, $p16^{INK4A}$ 蛋白与宫颈

表 1 CIN 锥切术术前及术后 HPV 负荷量情况(例)

级别	锥切术前 (pg/ml)			锥切术后 (pg/ml)			χ^2	P
	1~9	10~99	≥ 100	≤ 1	1~99	≥ 100		
CIN II	2	4	17	18	4	1	4.2	0.041
CIN II ~ III	4	6	11	12	8	1		
CIN III	7	12	25	29	11	4		

表 2 CIN 锥切术术前及术后 p16^{INK4A} 蛋白的表达

级别	锥切术前				锥切术后				χ^2	P
	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
CIN II	3	2	4	3	9	2	1	0	6.0	0.014
CIN II ~ III	2	4	4	11	15	3	2	1	16.7	0.000
CIN III	2	5	9	28	33	7	3	1	45.6	0.000

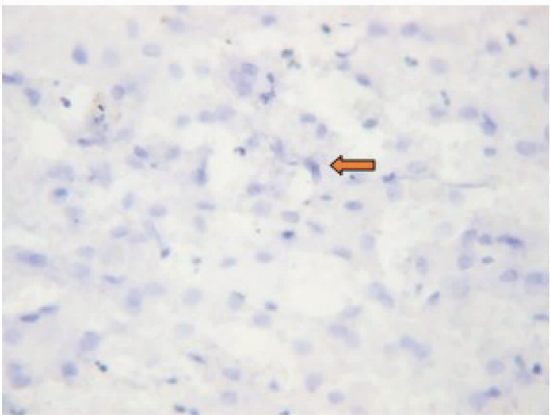


图 1 p16^{INK4A} 蛋白在 CINII 的宫颈脱落细胞中呈阴性表达 (SP×400)

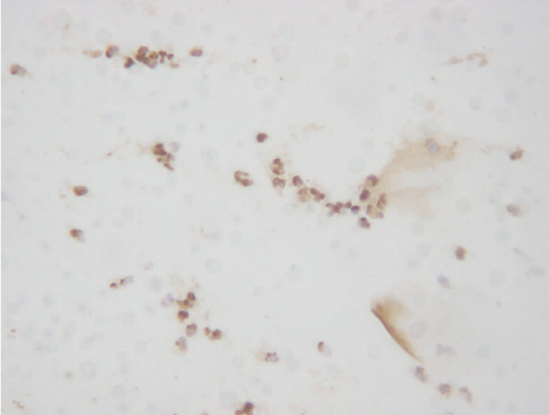


图 2 p16^{INK4A} 蛋白在 CINII 的宫颈脱落细胞中呈阳性表达 (SP×400)

锥切术前和术后差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.3 p16^{INK4A} 蛋白持续阳性和 HPV 负荷量持续不降患者阴道镜下病理诊断结果

对于宫颈锥切术后宫颈脱落细胞 p16^{INK4A} 的表达持续阳性和 HPV 负荷量持续不降的患者,在阴道镜下对可疑宫颈病变部位取活检,病理诊断结果详见表 3。

3 讨 论

CIN I、CIN II、CIN III 发展为浸润癌的危险性分别为 15%、30%、45%，宫颈锥形切除术是最常见的治疗方法,总的有效率为 90%~95%^[3],治疗成功率虽较高,但这些患者发生宫颈癌的风险仍比正常人群高 4~5 倍。治疗失败主要发生在术后 2 年内,

表 3 阴道下宫颈活检病理诊断结果

病理诊断	p16 ^{INK4A}		HPV 负荷量 (pg/ml)	
	+~++	+++	1~99	≥ 100
正常	6	0	13	0
CIN II	10	1	8	4
CIN III 及以上	2	1	2	2

主要原因是病变残留、复发、甚至进展至浸润癌。Soutter 等^[4]报道,2 116 例 CIN 锥切者,随访 8 年有 33 例(1.6%)发展为浸润癌,其中 14 例(0.7%)为微小浸润癌,故 CIN 治疗后的管理尤为重要和复杂,探索更有效的治疗后随访方案在宫颈癌的防治工作中越来越受到人们关注。

联合应用高危型 HPV 负荷量和 p16^{INK4A} 蛋白作为监测 CIN 的生物学标志有其理论依据。Hernández 等^[5]在 CIN 随访中运用杂交捕获(HC-II)方法观察

HPV DNA 的病毒载量发现, HPV 病毒载量高的妇女, 比 HPV DNA 阴性妇女发生 CIN 和宫颈癌的风险高。但是研究也发现^[6], 高危型 HPV 感染是暂时的, 无临床症状, 且通常在 8~13 个月内自然清除, 尤其是在首次发现的 2 年内清除率最高, 只有少数感染持续存在并进展为宫颈癌。因此, 能否找到一种和 HPV 感染相关性好、实用性强的方法是实际工作中迫切需要解决的问题。另外, 研究发现^[2], HPV 感染能导致 CIN 中 p16^{INK4A} 的表达增加, p16^{INK4A} 的强阳性表达往往提示 HPV 病毒在细胞中的整合, 只有在高危型 HPV 致癌基因已经整合到细胞基因组, 并破坏了 G₁ 期的调节后, p16^{INK4A} 才会过表达, 即 p16^{INK4A} 的阳性表达即意味着细胞已被启动了癌变程序, p16^{INK4A} 表达量和表达方式与 HPV 感染的状态和感染量都存在着一定的相关性^[7]。故在本实验中我们将病毒以及细胞的分子标志物联合起来, 以此来评估宫颈病变进展的风险, 从而为患者制定个体化的治疗方案。

本研究采用 HC-II 检测方法检测 13 种高危型 HPV DNA, 并同时检测样本中 HPV 的负荷量, 研究中我们发现, 在宫颈锥切术前, 随着 CIN 的级别加重, 高危型 HPV 负荷量增加, 在宫颈锥切术后 12 个月复诊时, 高危型 HPV 负荷量与术前相比显著改善 ($P < 0.05$), 可见宫颈锥切术对宫颈 HPV DNA 的清除率满意。但是在研究中我们也发现, 在宫颈锥切术后, 高危型 HPV 负荷量持续 12 个月不降的病例中有 55% (16/29) 再次发生 CIN, 可见在 CIN 的随访中, 高危型 HPV 负荷量持续不降是 CIN 复发的危险因素, 与文献报道相近^[5]。另外本研究结果表明, 高危型 HPV 负荷量检测有较高的阴性预测值。因此, 我们应辨证地看待高危型 HPV 病毒载量, 不能用单次的病毒载量预测 CIN 的转归, 更不能作为再次手术的指征。

研究发现, p16^{INK4A} 免疫组化诊断 HSIL 及以上病变的敏感性、特异性分别为 95%、96%, 而且 p16^{INK4A} 免疫组化染色检查方法也成功地应用于宫颈细胞学^[8]。本实验通过免疫组化对宫颈上皮内瘤变的高危型 HPV DNA 阳性患者进行 p16^{INK4A} 蛋白的检测, 结果显示, p16^{INK4A} 蛋白在宫颈癌前病变中的表达随着 CIN 的级别上升而不断增强, 提示 p16^{INK4A} 表达上调在宫颈癌前病变的发展过程中

起重要作用, 且在本研究中还发现宫颈锥切术后宫颈脱落细胞 p16^{INK4A} 的表达持续强阳性(+++)和 HPV 负荷量持续不降的患者在阴道镜下对可疑病变取活检后发现, 病检结果均提示异常, 可见 p16^{INK4A} 和高危型 HPV 负荷量与宫颈病变持续或复发有很好的相关性。

鉴于 CIN 治疗后 HPV 的消退需要一定的时限, HPV 在术后半年的消退最明显, 随着术后时间的延长, HPV 消退率逐渐增加, 故治疗后不必急于复查 HPV, 一般认为, 6 个月后开始复查 HPV, 若高危型 HPV 负荷量持续不降和 p16^{INK4A} 检查持续阳性, 需在阴道镜行宫颈活检排除病变的残留和复发。

参考文献:

- [1] Cai HB, Ding XH, Chen CC. Prevalence of single and multiple human papillomavirus types in cervical cancer and precursor lesions in Hubei, China [J]. Am J Pediatr Hematol Oncol, 2009, 76 (3): 157-161.
- [2] Samir R, Asplund A, Tot T, et al. High-risk HPV infection and CIN grade correlates to the expression of c-myc, CD4⁺, FHIT, E-cadherin, Ki-67, and p16^{ink4a} [J]. Low Genit Tract Dis, 2011, 15(4): 280-286.
- [3] Baloglu A, Uysal D, Bezircioglu I, et al. Residual and recurrent disease rates following LEEP treatment in high-grade cervical intraepithelial lesions [J]. Arch Gynecol Obstet, 2010, 282(1): 69-73.
- [4] Soutter WP, De BA, Fletcher A, et al. Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia [J]. Lancet, 1997, 349(2): 978-980.
- [5] Hernández-Hernández DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, et al. Association between high risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women [J]. Gynecol Oncol, 2003, 90(2): 310-317.
- [6] Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, et al. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women [J]. Obstet Gynecol, 2010, 116(6): 1373-1380.
- [7] Murphy N, Ring M, Heffron CC, et al. p16^{ink4a}, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(2): 525-534.
- [8] Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingoes B, et al. Combined p16^{INK4a} and human papillomavirus testing improves the prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN II-III) in Thai patients with low-grade cytological abnormalities [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(7): 1777-1783.