

细胞块p16/Ki-67双染对子宫颈炎患者 宫颈上皮内瘤变的诊断价值

孙笑非 顾依群 王爱春 王荔 孟凡凡 王军 卢利娟

【摘要】目的 探讨基于细胞块技术p16/Ki-67双染对非典型鳞状上皮细胞(ASC-US)/低级别鳞状上皮内病变(LSIL)患者的宫颈上皮内瘤变(CIN)2级以上(\geq CIN2)的诊断价值。**方法** 收集2021年1月至2021年12月北京市海淀区妇幼保健院收治的222例子宫颈炎患者,均接受阴道镜活检、DNA倍体分析和高危人乳头瘤病毒(HR-HPV)检测,细胞学结果均为ASC-US/LSIL病例,对患者剩余的液基细胞学(LBC)标本进行基于细胞块技术的p16/Ki-67双染,绘制受试者操作者特征(ROC)曲线比较细胞块p16/Ki-67双染与DNA倍体分析和HR-HPV对 \geq CIN2病变的诊断价值。**结果** 细胞块p16/Ki-67双染Kappa值为0.835,与活检病理诊断结果高度一致。细胞块p16/Ki-67双染ROC曲线下面积(AUC)为0.900(特异性和敏感度分别为94.16%和85.45%),HR-HPV检测AUC为0.557(特异性和敏感度分别为13.17%和98.18%),DNA倍体分析AUC为0.583(特异性和敏感度分别为32.93%和83.64%);细胞块p16/Ki-67双染AUC显著高于HR-HPV检测($Z = 11.387$, $P < 0.001$)和DNA倍体分析($Z = 7.476$, $P < 0.001$),差异有统计学意义。与HR-HPV检测和DNA倍体分析相比,细胞块p16/Ki-67双染NRI值分别为1.470(95%CI: 1.246~1.470, $P < 0.001$)和1.278(95%CI: 1.049~1.278, $P < 0.001$);IDI值分别为0.609(95%CI: 0.525~0.692, $P < 0.001$)和0.633(95%CI: 0.554~0.713, $P < 0.001$)。**结论** 基于细胞块p16/Ki-67双染对于 \geq CIN2患者的正确分类有更好的预测,是ASC-US/LSIL患者分流的良好方法,可有效避免过度诊断和治疗。

【关键词】 宫颈癌筛查; p16/Ki-67双染; 不明的非典型鳞状上皮细胞; 低级别鳞状上皮内病变; 细胞块; 宫颈上皮内瘤变

Evaluation on cervical intraepithelial neoplasia for patients with cervicitis by p16/Ki-67 double staining

Sun Xiaofei, Gu Yiqun, Wang Aichun, Wang Li, Meng Fanfan, Wang Jun, Lu Lijuan. Department of Pathology, Haidian Maternal and Child Health Hospital, Beijing 100080, China

Corresponding author: Gu Yiqun, Email: gyqgyqgyq181818@126.com

【Abstract】Objective To investigate the diagnostic value of p16/Ki-67 double staining based on cell block technology for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) higher than grade 2 (\geq CIN2) for patients with atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US)/low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL). **Methods** From January 2021 to December 2021, a total of 222 patients with cervicitis who underwent colposcopy biopsy, DNA ploidy analysis and high risk human papillomavirus (HR-HPV) testing were selected from Beijing Haidian Maternal and Child Health Hospital. Cytological results of all cases were ASC-US/LSIL. The remaining liquid based cytology (LBC) specimens of patients were stained with p16/Ki-67 double staining based on cell block technology, and the diagnostic value of p16/Ki-67 double staining compared with DNA ploidy analysis and HR-HPV for \geq CIN2 lesions were analyzed by receiver operating characteristic curve (ROC). **Results** The Kappa value of p16/Ki-67 double staining in cell block was 0.835, which was highly consistent with the pathological diagnosis of biopsy. The area under ROC (AUC) of p16/Ki-67 double staining was 0.900 (the specificity and sensitivity were 94.16% and 85.45%, respectively), which was significantly higher than that of HR-HPV testing (AUC was 0.557, with the specificity and

sensitivity were 13.17% and 98.18%, respectively) ($Z = 11.387$, $P < 0.001$) and DNA ploidy analysis (AUC was 0.583, with the specificity and sensitivity were 32.93% and 83.64%, respectively) ($Z = 7.476$, $P < 0.001$), with significant differences. Compared with HR-HPV testing and DNA ploidy analysis, the NRI values of p16/Ki-67 double staining were 1.470 (95%CI: 1.246-1.470, $P < 0.001$) and 1.278 (95%CI: 1.049-1.278, $P < 0.001$), respectively. The IDI values were 0.609 (95%CI: 0.525-0.692, $P < 0.001$) and 0.633 (95%CI: 0.554-0.713, $P < 0.001$), respectively. **Conclusions** The p16/Ki-67 double staining based on cell block has a better predictive ability for the correct classification of patients \geq CIN2, and is a good method for the triage of patients with ASC-US/LSIL, which can effectively avoid the over-diagnosis and treatment.

【Key words】 Cervical cancer screening; p16/Ki-67 double staining; Atypical squamous cells of undetermined significance; Low-grade squamous intraepithelial lesion; Cell block; Cervical intraepithelial neoplasia

宫颈炎是妇科常见的生殖道炎症性病变,临床可以出现生殖道、外阴等部位瘙痒、灼烧感,可伴白带增多、脓性白带以及下腹坠痛等现象,有急性宫颈炎和慢性宫颈炎两种,超过一半的宫颈炎病例病因不明^[1]。宫颈癌发病前有较长的癌前病变阶段,即宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)^[2]。根据病变程度分为低级别鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)和高级别鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)。其中LSIL包括单纯人乳头瘤病毒感染、伴凹空细胞异型性及基底部鳞状上皮轻度不典型增生以及CIN1, HSIL指原来的CIN2和CIN3^[3]。宫颈癌的发生需要经历众多阶段,及时、准确发现宫颈癌前病变,对于预测其发展方向并选择恰当的诊疗策略具有重要的临床意义。准确预测HSIL病变(\geq CIN2)尤为重要。非典型鳞状细胞(atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US)是由The Bethesda System (TBS)系统分类首次引入^[4], ASC-US约占无症状妇女子宫颈筛查细胞学表现的3%~5%, ASC-US在子宫颈癌细胞学筛查结果中是最常见的异常类型^[5-8]。LSIL和ASC-US患者对于阴道镜分流有较大的负担,其中一大部分不能够诊断为CIN2或CIN3的患者,仍需进行广泛的随访^[9]。细胞块p16/Ki-67双染检测CIN2及以上病变具有良好的敏感性和特异性^[10-14]。p16/Ki-67双染能够在同一切片上同时显示两种抗原,弥补了单一染色技术的缺陷。本研究收集222例女性宫颈液基细胞学标本,同时进行组织学活检、DNA倍体分析、高危人乳头瘤病毒(high risk human papillomavirus, HR-HPV)检测和细胞块p16/Ki-67双染,比较细胞块p16/Ki-67双染与HR-HPV检测和DNA倍体分析对宫颈上皮内瘤变的诊

断价值,现报道如下。

资料和方法

一、研究对象

选取2021年1月至2021年12月于北京海淀区妇幼保健院就诊的细胞学结果为ASC-US/LSIL,同时行DNA倍体分析和HR-HPV检测的342例患者,均有完整临床资料及对应组织病理结果,排除因细胞量不足(反复多次离心获取细胞沉淀物直径 < 2 mm)及染色问题120例,最终选取222例宫颈炎患者为研究对象,平均年龄(39.63 ± 10.39)岁。

纳入标准:①年龄在20~79周岁女性;②签署患者知情同意书,同意采集用于本研究的宫颈上皮脱落细胞和宫颈组织;③没有临床怀孕的可疑症状,孕妇在妊娠结束后8周可参加研究;④无宫颈外科手术史(如子宫切除术)。

排除标准:①曾因其他疾病接受过宫颈手术的患者;②合并任何其他恶性肿瘤;③患者拒绝签署知情同意书。本研究获得北京市海淀区妇幼保健院伦理委员会的批准(审批号:2021-2)。

二、方法

1. 宫颈液基细胞学(liquid based cytology, LBC):用ThinPrep 2000制备薄片,制作成直径为13 mm的超薄涂片,然后用95%酒精固定,人工巴氏染色,密封,显微镜观察。实验消耗品和试剂由广州安比平制药技术公司提供。

2. HR-HPV检测:使用CobasHPV检测系统(罗氏诊断产品,美国)。采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)反应结合不同荧光染料探针检测HR-HPV,同时检测14种HR-HPV(16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68),其中HPV16/18结果单独报告。

3. DNA倍体分析: 采用中国武汉呵尔医疗科技发展有限公司研发的SPICM-DNA型全自动DNA定量分析系统及其所提供的试剂盒, 每例标本经液基细胞制片, 进行Feulgen染色通过全自动扫描系统对所有细胞核进行细胞核积分光密度值(intergrated optical density, IOD)及核面积的测定、DNA指数(DNA Index, DI)分析, DI值为被测细胞的IOD与正常细胞的IOD比值, 异常指DI值 ≥ 2.5 。凡是有DNA指数 ≥ 2.5 细胞的玻片, 均要排除分析系统将垃圾和重叠的细胞核误认为癌细胞或异常。

4. 细胞块制作: LBC制备后剩余宫颈脱落细胞样本倒入10 ml离心管(2 500 r/min、离心半径 $r = 20$ cm)离心10 min富集细胞, 擦镜纸置于包埋盒底部, 弃掉上清液, 用一次性塑料滴管将离心管底部细胞(获取细胞沉淀物直径 ≥ 2 mm), 同时加入融化的浓度为3%琼脂混合铸型成细胞块, 进行常规固定、脱水、透明、浸蜡程序(樱花组织脱水机), 完成蜡块包埋。

5. p16/Ki-67双染: p16/Ki-67检测试剂盒(购自中国中杉金桥公司)。将细胞蜡块切片进行固定和抗原修复, 加入过氧化物酶阻断, 进行一抗孵育、二抗孵育、二氨基联苯胺显色、苏木精对比染色和中性树胶封片, 在显微镜下进行判读。

6. 活检病理诊断: 对于子宫颈急性炎症, 行治疗后再进行阴道镜检查。阴道镜检查术中对患者病变部位进行宫颈多点活检, 经过常规固定、脱水、包埋及切片后进行苏木素-伊红(HE)染色。由两名资深病理医师独立阅片, 如有不同意见则重新评估后再次确定诊断。基于世界卫生组织(World Health Organization, WHO)乳腺和女性生殖器肿瘤的病理和遗传学分类标准(2003年)标准, 将CIN2、CIN3、鳞状细胞癌和腺癌归为CIN2级及以上病变(\geq CIN2), 其余CIN2以下病变为阴性。

三、病理组织学诊断标准

细胞学标本使用2001年TBS系统标准^[4]进行报告。病理组织学诊断标准参照WHO女性生殖器官肿瘤分类(2014年第4版)^[3]为分类标准分为: 正常及炎症反应、LSIL和HSIL、鳞状细胞癌及腺癌。LSIL包括CIN1级病变; HSIL包括CIN2级、CIN3以及原位癌。p16/Ki-67双染的细胞块诊断标准: p16定位于细胞质, 呈棕色; Ki-67定位于细胞核, 呈红色。若1个或多个子宫颈上皮细胞中同时出现细胞质呈棕色, 细胞核呈红色即诊断

p16/Ki-67双染阳性; 如果子宫颈细胞中未同时出现细胞质棕色和细胞核红色染色即诊断p16/Ki-67双染阴性^[15]。p16/Ki-67双染不需要对阳性细胞进行辅助形态学诊断, 评估标准以至少1个细胞显示P16、Ki-67共存为阳性^[16]。

四、统计学处理

应用Excel表录入数据, 以病理活检诊断为最终标准, 运用SPSS 23.0进行数据整理与分析, 采用Kappa值判断细胞块p16/Ki-67双染、HR-HPV和DNA倍体分析对 \geq CIN2的筛查效能的一致性。绘制受试者操作者特征(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线; ROC曲线下面积(area under the curve, AUC)的比较采用DeLong's test。DeLong's test、决策曲线分析(decision curve analysis, DCA)、净重新分类指数(net reclassification improvement, NRI)和综合评分综合判别改善指数(integrated discrimination improvement index, IDI)分别在R语言4.0.0版本的pROC、rmda、nricens和PredictABE包中实现^[17], 以 $\alpha = 0.01$ 检验, 以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、研究对象细胞标本病理组织学诊断

222例患者中, 62例为慢性宫颈炎(27.9%), 另160例患者(72.1%)最终组织病理学诊断为CIN, 其中58例 \geq CIN2(26.1%), 102例CIN1(45.9%)。168例ASC-US中, 47例 \geq CIN2(30.0%), 54例LSIL中11例 \geq CIN2(20.4%)。细胞块p16/Ki-67免疫组织化学双染以及LBC、活检病理均由两位高年资病理医师进行评估, 若有不同意见, 重新评估后再次确定诊断(图1)。

二、细胞块p16/Ki-67双染、HR-HPV检测和DNA倍体分析对 \geq CIN2的筛查效能

采用Kappa值判断细胞块中的p16/Ki-67双染、HR-HPV检测和DNA倍体分析对 \geq CIN2筛查效能的一致性, Kappa值为0~0.20: 一致性极低; Kappa值为0.21~0.40: 一致性一般; Kappa值为0.41~0.60: 一致性中等; Kappa值为0.61~0.80: 一致性较高; Kappa值为0.81~1.00: 几乎完全一致。本组病例中细胞块p16/Ki-67双染Kappa值为0.835, 与活检病理诊断结果高度一致, 见表1。

三、三种筛查方法的有效性评价

细胞块p16/Ki-67双染、HR-HPV检测和DNA倍体分析对 \geq CIN2病变筛查的ROC曲线如图2所示, 细胞块p16/Ki-67双染筛查 \geq CIN2病变特异度和敏感度分别为94.16%和85.45%, HR-HPV检测特异度和敏感度分别为13.17%和98.18%, DNA倍体分析特异度和敏感度分别为32.93%和83.64%。细胞块p16/Ki-67双染与HR-HPV检测和DNA倍体分析的AUC差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), 见表2。

四、细胞块p16/Ki-67双染、HR-HPV检测和DNA倍体分析的NRI和IDI指数

与HR-HPV检测和DNA倍体分析相比, 细胞块p16/Ki-67双染NRI值分别为1.470 (95%CI:

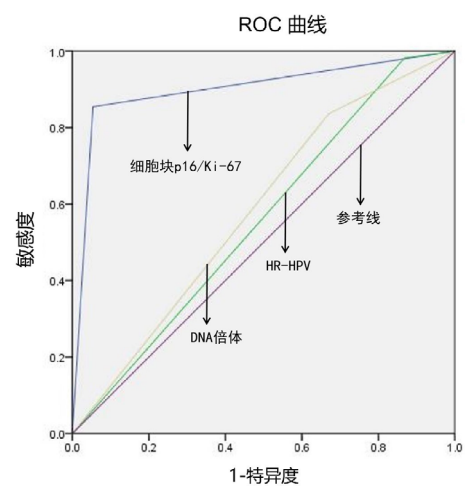
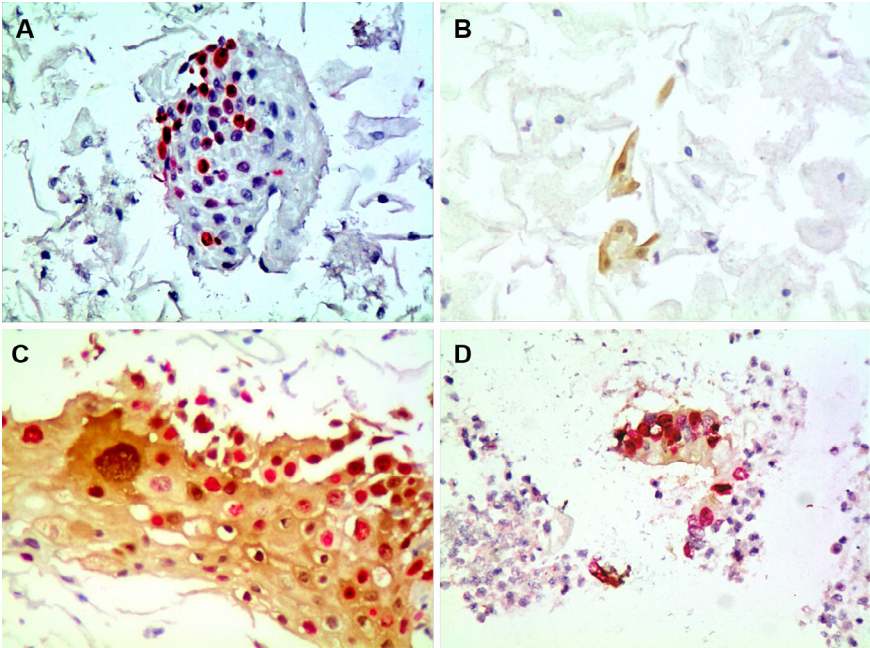


图2 细胞块p16/Ki-67双染、HR-HPV检测和DNA倍体分析对 \geq CIN2病变筛查的ROC曲线



注: A: 细胞块免疫组织化学双染色显示仅Ki-67染色, 细胞核为红色, p16/Ki-67双染色阴性, $\times 400$; B: 细胞块免疫组织化学双染色仅p16染色, 胞质和核均为棕色, p16Ki-67双染色阴性, $\times 400$; C: 活检结果为CIN3显示类似于组织学形态的片状鳞状上皮, p16Ki-67免疫组织化学双染色阳性, $\times 400$; D: 活检显示为子宫颈腺癌的细胞块显示腺样结构, 细胞质丰富, p16Ki-67双染色阳性, $\times 400$

图1 细胞块p16/Ki-67免疫组织化学双染色

表 1 细胞块 p16/Ki-67 双染、HR-HPV 检测和 DNA 倍体分析对 \geq CIN2 的筛查效能 [例 (%)]

筛查方法	病理诊断		Kappa值
	阳性 (\geq CIN2) (n = 58)	阴性 ($<$ CIN2) (n = 164)	
HR-HPV阳性	57 (98.28)	142 (86.59)	0.065
DNA倍体阳性	49 (84.48)	109 (66.46)	0.116
细胞块p16/Ki-67双染阳性	50 (86.21)	6 (3.66)	0.835

注: CIN: 宫颈上皮内瘤变, HR-HPV: 高危人乳头状瘤病毒

1.246~1.470, $P < 0.001$) 和1.278 (95%CI: 1.049~1.278, $P < 0.001$) ; 阳性患者 (\geq CIN2) 的细胞块p16/Ki-67双染NRI值分别为0.709 (95%CI: 0.500~0.709, $P < 0.001$) 和0.709 (95%CI: 0.510~0.889, $P < 0.001$) ; 阴性患者 ($<$ CIN2) 细胞块p16/Ki-67的NRI值分别为0.760 (95%CI: 0.673~0.760, $P < 0.001$) 和0.596 (95%CI: 0.485~0.657, $P < 0.001$) 。与HR-HPV检测和DNA倍体分析相比, 细胞块p16/Ki-67

双染IDI值分别为0.609 (95%CI: 0.525~0.692, $P < 0.001$) 和0.633% (95%CI: 0.554~0.713, $P < 0.001$) (表3)。NRI和IDI结果提示, 细胞块p16/Ki-67双染较HR-HPV检测和DNA倍体分析对于 \geq CIN2的正确分类有更好的预测能力。

五、三种诊断方法的决策曲线 (DCA)

DCA表明, 阈概率为0.10~0.84, 与HR-HPV检测和DNA倍体分析相比, 细胞块p16/Ki-67双染具有更好的净收益, 见图3。

表2 细胞块 p16/Ki-67 双染、HR-HPV 检测和 DNA 倍体分析对 \geq CIN2 病变筛查的 ROC 曲线

诊断方法	敏感度 (%)	特异度 (%)	AUC (95%CI)	DeLong's test ^a	
				Z值	P值
细胞块p16/Ki-67双染	85.45	94.61	0.900 (0.841~0.958)	—	—
HR-HPV检测	98.18	13.17	0.557 (0.474~0.640)	11.387	< 0.001
DNA倍体分析	83.64	32.93	0.583 (0.500~0.666)	7.476	< 0.001

注: 敏感度 (R 语言): 细胞块 p16/Ki-67 双染 vs. HR-HPV 检测: $P = 0.020$, 细胞块 p16/Ki-67 双染 vs. DNA 倍体分析: $P = 0.808$; 特异度 (R 语言): 细胞块 p16/Ki-67 双染 vs. HR-HPV 检测: $P < 0.001$, 细胞块 p16/Ki-67 双染 vs. DNA 倍体分析: $P < 0.001$; ^a: 与 p16/Ki-67 比较; “—”: 无相关数据

表3 细胞块 p16/Ki-67 双染、HR-HPV 检测和 DNA 倍体分析的 IDI 和 NRI 指数

方法比较	IDI (95%CI)	NRI (95%CI)	NRI (+) (95%CI)	NRI (—) (95%CI)
P16/Ki67 vs. HR-HPV	0.609 (0.525~0.692)	1.470 (1.246~1.470)	0.709 (0.500~0.709)	0.760 (0.673~0.760)
P16/Ki67 vs. DNA倍体	0.633 (0.554~0.713)	1.278 (1.049~1.278)	0.709 (0.510~0.889)	0.569 (0.485~0.657)

注: IDI: 综合判别改善指数, NRI: 净重分类改善指数; ^a: 应用 R 语言行统计学分析, 各组数据比较: P 均 < 0.001

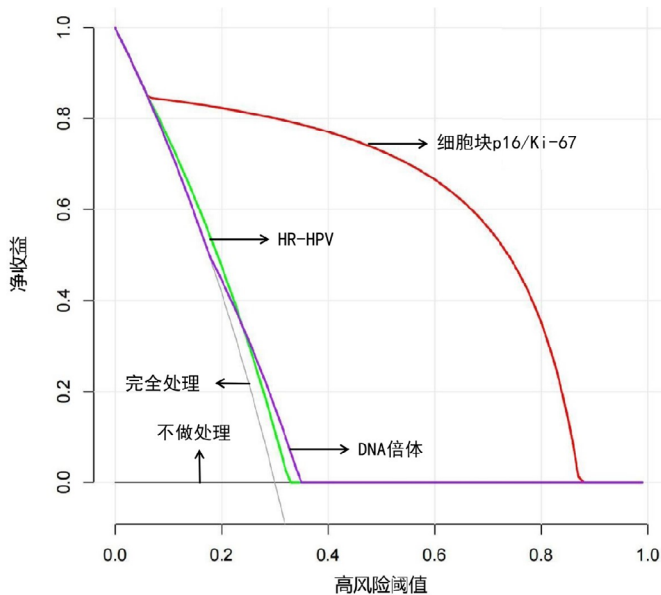


图3 细胞块p16/Ki-67双染、HR-HPV检测和DNA倍体分析的决策曲线

讨 论

子宫颈炎于妇科疾病中十分常见,包括宫颈阴道部位以及宫颈管黏膜炎症。宫颈炎除出现阴道分泌物增多、脓性白带等症状外,还可出现宫颈糜烂或宫颈赘生物,甚至发生月经间期以及接触性出血,此时易与CIN或宫颈癌等病变相混淆。剔除炎症性病变,寻找有效的标志物,精准筛选出 \geq CIN2病变尤为重要。目前宫颈癌初筛方法包括HPV初筛、LBC初筛以及二者联合初筛。其中实施HPV初筛的最大挑战是管理大量一过性HPV感染的妇女。HPV检测具有高敏感性,但其只能检测病毒是否存在,不能区分一过性感染和持续性感染,无法识别癌前体病变及癌症本身。众所周知,子宫颈癌的主要危险因素是持续性HPV感染,其促进受损的细胞生长和分化,导致CIN的发生^[18]。HPV阳性不能证明宫颈病变已经发生,而是表明未来罹患宫颈癌风险增加。LBC敏感性低,重复性差,染色差时可能导致误诊或过度诊断。LBC因其高度特异性,且判断较为主观,准确性取决于细胞学医师的诊断水平^[19]。ASC-US/LSIL是目前宫颈癌筛查阶段分层管理的关键。对于临床医生来说,诊断CIN重点是区分LSIL和HSIL。因此,许多目前正在进行的研究都在寻找可能简化诊断过程的新标记物^[20]。在阴道镜分流前对 \geq CIN2病变进行精准诊断是宫颈癌早期筛查的关键,从而鉴别炎症性病变或癌前病变。使用细胞块p16/Ki-67双染检测宫颈癌前病变,因其高灵敏度和特异性而受到研究者的关注^[14,21]。同时细胞块技术已广泛应用于非妇科病理,此项技术成熟、简单、易操作,可最大程度的富集细胞,还可以获得巢状、片状、乳头状和三维立体结构等相似于组织切片的形态学特征。细胞块不仅具有组织学优点,而且为后续的特殊染色、免疫组织化学、PCR和测序等分子病理学检查提供了充足材料。制成的细胞块可以长期保存,为宫颈癌筛查多中心建设中样本的运输、保存提供了方便和可能,但其在宫颈癌筛查中鲜有文献报道。本研究将LBC剩余标本的细胞块结合p16/Ki-67双染,比较HR-HPV检测和DNA倍体分析与p16/Ki-67双染在宫颈癌早期筛查中特别是在阴道镜分流前的作用。

p16又称p16^{INK4a},由染色体9p21基因编码,参与细胞周期调控;其与另一种肿瘤抑制蛋白pRb的相互作用,在G1-S期调节细胞增殖。HPV感染的细胞

中,E7通过负反馈回路干扰pRb-E2F1通路,诱导细胞中p16的过表达和积累^[22-23]。因此,p16被认为是HR-HPV持续性感染的替代标志物。由于E7致癌基因诱导所有HR-HPV类型的细胞转化,发育不良的细胞表现为p16过表达,这很容易通过免疫组织化学检测^[24]。近年来,p16免疫组织化学染色越来越多的被用于区分HSIL和非相关肿瘤疾病,研究表明p16免疫组织化学染色可作为预测CIN进展的特异性生物标志物^[25]。Ki-67是一种增殖细胞相关抗原,也被称为MIB-1,可在细胞周期所有阶段(G1、S、G2和M)的增殖细胞细胞核中检测到,但在大部分静止细胞(G0)中不表达^[26]。Ki-67作为肿瘤细胞增殖能力的标志物^[27],已被证明在调节细胞周期进程中发挥多种作用。当CIN发生时,Ki-67的表达逐渐从基底层延伸并扩散到中表层,与CIN延伸相一致。Ki-67检测已广泛应用于宫颈癌前病变和癌症的辅助诊断^[28]。Alshenawy等^[29]发现,Ki-67的表达量随着CIN分级的增加而逐渐增加,而在癌变组织中,Ki-67表达量达100%。p16和Ki-67分别作为肿瘤抑制因子和细胞增殖标志物,在正常状态下p16过表达和Ki-67表达相互排斥,通常不会发生于同一宫颈上皮细胞中。检测p16/Ki-67共表达可作为HR-HPV细胞转化和高级别CIN病变的预测因子^[10]。ASC-US可能是宫颈炎性病变,亦或其他恶性病变。Zhu等^[30]发现,CIN2+仅占ASC-US的18.0%,CIN3+仅占8.3%,如果所有ASC-US患者均行阴道镜分流检查,可能会导致医疗资源紧张以及对患者进行过度治疗。Zhu等^[30]报道300例ASC-US患者HPV DNA检测总阳性率为85.3%,p16/Ki67免疫细胞化学检测阳性率为32.0%。国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)宫颈癌筛查指南中LSIL病例的治疗是基于临床观察。在Vrdoljak-Mozetic等^[31]研究中,在LSIL患者中,p16/Ki-67阳性结果的进展率为30.8%,而p16/Ki-67阴性结果的进展率仅为4.3%,证实p16/Ki67双染检测对LSIL病变的预测作用。吴忱等^[15]报道,LSIL中p16/Ki-67的ROC曲线大于HC-II(0.799 vs. 0.696, 0.708 vs. 0.531; P 值均为0.05)。对于细胞学诊断为ASC-US和LSIL的患者,p16/Ki-67双染检测可作为高级别宫颈病变辅助诊断的有效方法,其筛查效率优于HR-HPV。一项研究观察到p16/Ki-67双染ROC曲线表达很好,特别是在30岁以下的女性中,ROC曲线下面积为0.762($P < 0.001$)^[32]。对

ASC-US和LSIL患者实施有效的分流,以识别潜在癌前病变和需要进一步随访的女性^[33]。如上所述,本研究中p16/Ki-67双染的AUC显著高于HR-HPV检测和DNA倍体分析;较HR-HPV检测和DNA倍体分析,p16/Ki-67双染结合细胞块技术显著提高对 \geq CIN2患者的正确分类,对于ASC-US/LSIL患者可以更好地分流。

宫颈癌筛查的挑战是难以区分是增生还是肿瘤的宫颈腺性病变。一项研究显示,40例宫颈腺癌中92.5%患者出现p16/Ki-67双染阳性,16例无腺性病变的宫颈组织中仅1例双染阳性,提示p16/Ki-67双染是诊断宫颈腺病变的潜在工具^[34]。本研究中,宫颈原位腺癌和鳞状细胞癌也呈阳性,但由于病例数量较少,今后将扩大病例数进一步分析。

p16/Ki-67双染结合细胞块技术可最大限度提高宫颈癌筛查的益处,明确病变性质,减少炎症类良性病变误诊,同时避免不必要的资源浪费和潜在危害造成的误诊,并有助于实现宫颈病变解释和预测,提高对于 \geq CIN2级病变的诊断效能。在临床实践中,其对ASC-US/LSIL患者的分层管理、病变检出率以及避免不必要的活检和过度治疗均有很好的效果,为宫颈癌筛查分诊管理提供了一种有效的检测方法。通过减少重复进行宫颈涂片和接受阴道镜检查所产生的社会心理影响使妇女获益,同时也减少相关阴道镜检查的检测成本;还具有易于重复、客观、高效的优点,与组织病理学符合率高。细胞块上的p16/Ki-67双染被认为是很好的分类工具,但还需要更多研究来支持这一观点。

本研究同时也存在一些局限性:①标本取样应尽可能标准化,以确保获得足够数量的细胞;②58例组织学证实为 \geq CIN2的患者中,有8例p16/Ki-67双染为阴性,复阅后组织学显示局灶CIN2级病变并累及腺体,所以对于小灶病变细胞块p16/Ki-67双染存在一定局限性;③宫颈管内的深部局灶病变,取样器探及不到导致深部病变取不到样本,宫颈内膜刮除术(endocervical curettage, ECC)可以排除这种假阴性;④临床医生在取样前尽量清除黏液和血液以获得高质量的细胞块;⑤常规取样不取阴道壁,易遗漏阴道壁的病变,是否对阴道区域进行补充取样还有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, et al. Mycoplasma genitalium

as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics[J]. Sex Transm Dis,2009,36(10):598-606.

- [2] Bhattacharyya AK, Nath JD, Deka H. Comparative study between pap smear and visual inspection with acetic acid (via) in screening of CIN and early cervical cancer[J]. J Midlife Health,2015,6(2):53-58.
- [3] 卢朝辉,陈杰. WHO女性生殖器官肿瘤学分类(第4版)解读[J]. 中华病理学杂志,2014,43(10):649-650.
- [4] Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology[J]. JAMA,2002,287(16):2114-2119.
- [5] Group A-LTS. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance[J]. Am J Obstet Gynecol,2003,188(6):1383-1392.
- [6] Katki HA, Schiffman M, Castle PE, et al. Five-year risks of CIN3+ and cervical cancer among women with HPV testing of ASC-US Pap results[J]. J Low Genit Tract Dis,2013,17(5 Suppl 1):S36-S42.
- [7] Cox JT, Schiffman M, Solomon D, et al. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy[J]. Am J Obstet Gynecol,2003,188(6):1406-1412.
- [8] Eltabbakh GH, Lipman JN, Mount SL, et al. Significance of atypical squamous cells of undetermined significance on ThinPrep papanicolaou smears[J]. Gynecol Oncol,2000,79(1):44-49.
- [9] White C, Bakhiet S, Bates M, et al. Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study[J]. Cytopathology,2016,27(4):269-276.
- [10] Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology[J]. Gynecol Oncol,2011,121(3):505-509.
- [11] Wright TC, Behrens CM, Ranger-Moore J, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial[J]. Gynecol Oncol,2017,144(1):51-56.
- [12] Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, et al. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study[J]. Cancer Cytopathol,2011,119(3):158-166.
- [13] Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results[J]. Cancer Cytopathol, 2015,123(6):373-381.
- [14] 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.
- [15] 吴忧,赵健,胡君,等. 免疫细胞化学p16/Ki-67双染法检测对于细胞学诊断为ASCUS, LSIL和ASC-H患者分流的意义的意义[J]. 中华妇产科杂志,2017,52(11):734-739.
- [16] 魏俊燕,邢雪,王菲,等. 免疫细胞化学P16/Ki-67双染,P16INK4a单染及高危型人乳头瘤病毒检测筛查高级别子宫颈病变价值比较[J]. 肿瘤研究与临床,2022,34(3):180-183.
- [17] 郑家梁,吴婷,苗逢霖,等. 基于SEER数据库构建并验证腹膜后肿瘤的预后评价预测模型[J]. 中华实验外科杂志,2022,39(8):1577-1581.
- [18] Moreno-Acosta P, Romero-Rojas A, Vial N, et al. Persistent high-risk HPV infection and molecular changes related to the development of

- cervical cancer[J]. Case Rep Obstet Gynecol,2020,2020:6806857.
- [19] Ebisch RM, Siebers AG, Bosgraaf RP, et al. Triage of high-risk HPV positive women in cervical cancer screening[J]. Expert Rev Anticancer Ther,2016,16(10):1073-1085.
- [20] Popiel A, Piotrowska A, Sputa-Grzegorzolka P, et al. Preliminary study on the expression of testin, p16 and Ki-67 in the cervical intraepithelial neoplasia[J]. Biomedicines,2021,9(8):1010.
- [21] Tjalma WAA. Diagnostic performance of dual-staining cytology for cervical cancer screening: A systematic literature review[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2017,210:275-280.
- [22] Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia[J]. Am J Surg Pathol,2002,26(11):1389-1399.
- [23] Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(9):4350-4354.
- [24] Izadi-Mood N, Asadi K, Shojaei H, et al. Potential diagnostic value of P16 expression in premalignant and malignant cervical lesions[J]. J Res Med Sci,2012,17(5):428-433.
- [25] Zhang X, Shen D. p16INK4a and Ki-67 measurement predict progression of cervical low-grade squamous intraepithelial lesion[J]. Int J Clin Exp Pathol,2018,11(8):4109-4116.
- [26] Arredondo-Galvez CG, Acuna-Gonzalez D, Cantu-de-Leon D, et al. Association of p16 and Ki-67 with risk of recurrence in previously treated cervical high-grade squamous intraepithelial lesions[J]. Gynecol Obstet Invest,2021,86(3):293-298.
- [27] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown[J]. J Cell Physiol,2000,182(3):311-322.
- [28] Yu L, Wang L, Zhong J, et al. Diagnostic value of p16INK4A, Ki-67, and human papillomavirus L1 capsid protein immunochemical staining on cell blocks from residual liquid-based gynecologic cytology specimens[J]. Cancer Cytopathol,2010,118(1):47-55.
- [29] Alshenawy HA. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: potential utility in diagnosis and prognosis[J]. Pathol Res Pract,2014,210(12):916-921.
- [30] Zhu Y, Ren C, Yang L, et al. Performance of p16/Ki67 immunostaining, HPV E6/E7 mRNA testing, and HPV DNA assay to detect high-grade cervical dysplasia in women with ASCUS[J]. BMC Cancer,2019,19(1):271.
- [31] Vrdoljak-Mozetic D, Krasevic M, Versa Ostojic D, et al. HPV16 genotype, p16/Ki-67 dual staining and koilocytic morphology as potential predictors of the clinical outcome for cervical low-grade squamous intraepithelial lesions[J]. Cytopathology,2015,26(1):10-18.
- [32] 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 ASC-US or LSIL[J]. PLoS One,2015,10(7):e0134445.
- [33] Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16 (INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results[J]. Am J Clin Pathol,2010,134(1):12-21.
- [34] Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, et al. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri[J]. Am J Clin Pathol,2012,138(5):652-656.

(收稿日期: 2022-08-10)

(本文编辑: 孙荣华)

孙笑非, 顾依群, 王爱春, 等. 细胞块 p16/Ki-67 双染对宫颈炎患者宫颈上皮内瘤变的诊断价值 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2022,16(6):418-425.