

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.004>

MCM2 与 P16 在子宫颈病变细胞蜡块与活检标本中的表达

左元元, 徐洪明, 黄建达, 毛海峰, 孙岳军

(江阴市人民医院病理科, 江苏 江阴 214400)

[摘要] 目的: 探讨微型染色体维持蛋白2(minichromosome maintenance protein 2, MCM2)及P16在子宫颈病变细胞蜡块及组织学标本中的表达。方法: 采用免疫组织化学染色EnVision法检测118例宫颈液基细胞学细胞蜡块, 126例宫颈活检组织中MCM2及P16的表达。结果: 在无上皮内病变或恶性病变(no intraepithelial or malignant lesions, NILM), 意义不明的非典型鳞状细胞(atypical squamous cells with unclear significance, ACS-US), 低度鳞状上皮内病变(low degree squamous intraepithelial lesion, LSIL), 非典型鳞状细胞, 不能排除高度鳞状上皮内病变(atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, ASC-H)及高度鳞状上皮内病变(high degree squamous intraepithelial lesion, HSIL)的细胞蜡块样本中, MCM2的阳性率分别为0%, 22%, 55%, 86%和92%, P16的阳性率分别为0%, 9%, 27%, 68%和100%, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 在宫颈上皮内瘤变1级(cervical intraepithelial neoplasia grade 1, CIN1), CIN2, CIN3和宫颈癌组织样本中, MCM2的阳性率分别为0%, 50%, 81%, 97%和100%, P16阳性率分别为0%, 18%, 77%, 100%和100%, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 在人乳头瘤状病毒(human papillomavirus, HPV)16/18感染, 其他高危型HPV感染以及无HPV感染的病例中, MCM2的阳性率分别为86%, 36%和8%, P16的阳性率分别为89%, 14%和0%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论: MCM2和P16与宫颈病变程度高度相关, 可用于非典型鳞状上皮细胞及低度鳞状上皮内病变人群的分流管理。

[关键词] 微型染色体维持蛋白2; P16; 宫颈病变; 细胞蜡块

Expression of MCM2 and P16 in cell block and biopsy samples of cervical lesion

ZUO Yuanyuan, XU Hongming, HUANG Jianda, MAO Haifeng, SUN Yuejun

(Department of Pathology, Jiangyin People's Hospital, Jiangyin Jiangsu 214400, China)

Abstract **Objective:** To determine the expression of minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) and P16 protein in cell block and tissue samples of cervical lesion. **Methods:** Immunohistochemical EnVision method was employed to investigate the expression of MCM2 and P16 in 118 cell blocks of liquid-based cytology of cervical screening

收稿日期 (Date of reception): 2018-04-11

通信作者 (Corresponding author): 孙岳军, Email: syj996633@126.com

基金项目 (Foundation item): 江阴市科技局社会发展科技示范项目 (JYKJ3308)。This work was supported by the Jiangyin Municipal Transformation of Scientific and Technological Achievements Project, China (JYKJ3308).

and 126 cervical biopsy tissue samples. **Results:** Positive rates of immunostaining for MCM2 on no intraepithelial or malignant lesions (NILM), atypical squamous cells with unclear significance (ACS-US), low degree squamous intraepithelial lesion (LSIL), atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H), high degree squamous intraepithelial lesion (HSIL) in cell block samples were 0%, 22%, 55%, 86%, and 92%, while positive rates of P16 were 0%, 9%, 27%, 68%, and 100%, with significant difference ($P < 0.001$). Positive rates of MCM2 in the normal cervical epithelia, cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1) group, CIN2 group, CIN3 group and cervical carcinoma were 0%, 50%, 81%, 97%, and 100% respectively; while positive rates of P16 were 0%, 18%, 77%, 100%, and 100%, with significant difference ($P < 0.001$). Positive rate of MCM2 were 86%, 36% and 8% in human papillomavirus (HPV) 16/18 group, other high-risk HPV group and HPV negative group, while positive rates of P16 were 89%, 14%, and 0%, with significant difference ($P < 0.001$). **Conclusion:** The expression of MCM2 and P16 is correlated with increased dysplasia and lesion severity and could triage effectively in patients with atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) and low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL).

Keywords minichromosome maintenance protein 2; P16; cervical lesion; cell block

宫颈癌是威胁女性健康和生命的常见恶性肿瘤之一。目前, 宫颈癌的筛查通常采用宫颈搔刮, 再使用薄层液基细胞学检测(thinprep cytologic test, TCT)制备细胞学压片, 对结果进行人工判读。如果发现病变细胞, 则要进行阴道镜检查。因此, TCT结果判读至关重要。但在常规工作中常见到难以明确诊断的细胞学形态, 而宫颈组织病变的免疫染色可以辅助诊断。微小染色体维持蛋白2(minichromosome maintenance protein 2, MCM2)与P16表达的检测结果可能有助于对患者进行分流管理。本实验采用免疫组织化学EnVision法, 拟探讨MCM2及P16在子宫颈病变细胞蜡块及组织学标本中的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2015年1月至2017年8月江阴市人民医院病理科的宫颈液基细胞学样本118例, 并制备细胞蜡块, 同时选取归档的宫颈组织活检样本126例。样本均有明确的病理诊断结果。本研究经过江阴市人民医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞蜡块制备

TCT样品倒入50 mL离心管, 2 000 r/min,

5 min离心; 弃上清, 加入10%中性缓冲甲醛溶液, 2 000 r/min, 5 min离心; 静置过夜; 吸管将细胞沉淀轻轻吸起, 移入包埋纸, 打包, 放入包埋盒, 脱水过夜, 常规包埋切片。

1.2.2 免疫组织化学染色

采用EnVision免疫组织化学两步法染色: 4 μ m厚切片经脱蜡, 水化后, 行高温高压抗原修复(10%柠檬酸盐抗原修复缓冲液, pH 6.0; 每张切片滴加50 μ L一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS冲洗; 每张切片滴加50 μ L EnVision试剂, 室温下孵育30 min; PBS冲洗, DAB显色, 苏木精衬染, 脱水透明后中性树脂封片, 镜检。

一抗: 小鼠抗人MCM2单克隆抗体(克隆号: UMAB238, 稀释度: 1:200)、即用型小鼠抗人p16INK4a(克隆号: ABM51100-10)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。二抗: HRP标记的鼠兔通用型二抗购自美国Roche公司, DAB显色液购自丹麦DAKO公司。

1.2.3 高危人乳头状瘤病毒检测

采集宫颈分泌物样本, 通过实时荧光定量PCR法, 采用针对13种人高危乳头状瘤病毒(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)的特异性引物及荧光探针, 对13种特异性DNA片段进行定性检测。

1.3 判读标准

MCM2阳性定位于细胞核, P16阳性定

位于细胞核伴或不伴细胞质阳性。计数10个高倍视野, 计算平均阳性细胞数, 按阳性细胞所占比例分为: <1%(-), 1%~25%(1+), 26%~50%(2+), 51%~100%(3+), 1+及其以上判读为阳性。

1.4 统计学处理

采用Stata 14.0统计软件进行数据分析。采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法分析MCM2及P16免疫组织化学染色在各临床病理参数之间的表达差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCM2 与 P16 在宫颈病变细胞蜡块中的表达

MCM2和P16在无宫颈上皮内瘤变细胞蜡块中不表达, 在非典型鳞状上皮细胞中的阳性率分别为22%和9%; 在鳞状上皮内低度病变中的阳性率分别为55%和27%; 在非典型鳞状上皮细胞不除外鳞状上皮内高度病变中阳性率分别为86%和68%; 在鳞状上皮内高度病变中的阳性率为92%和100%, 差异有统计学意义($P<0.01$, 表1, 图1)。

表1 MCM2和P16在细胞蜡块中的表达

Table 1 Expression of MCM2 and P16 in cell blocks

组别	n	MCM2		χ^2	P	P16		χ^2	P
		阴性	阳性			阴性	阳性		
NILM	21	21	0			21	0		
ACS-US	23	18	5			21	2		
LSIL	22	10	12	59.2118	<0.01	16	6	67.8913	<0.01
ASC-H	28	4	24			9	19		
HSIL	24	2	22			0	24		

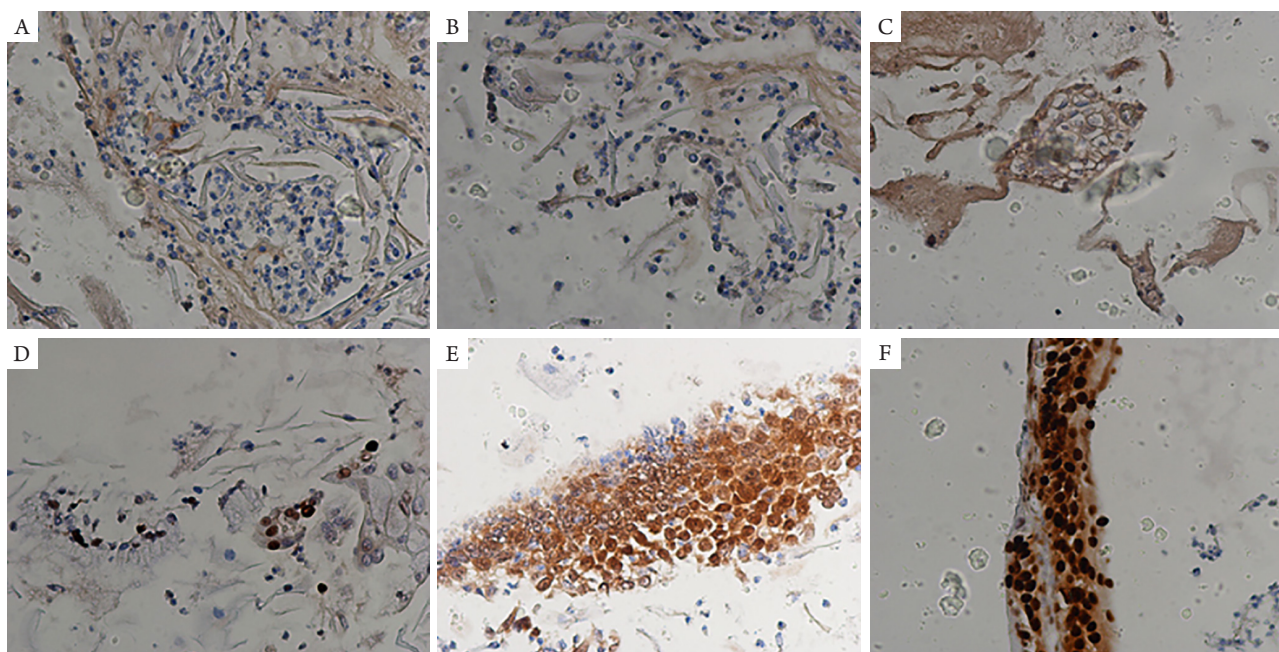


图1 P16与MCM2在细胞蜡块中的表达(EnVision, $\times 400$)

Figure 1 Expression of MCM2 and P16 in cell blocks (EnVision, $\times 400$)

(A) NILM中的P16; (B) NILM中的MCM2; (C) LSIL中的P16; (D) LSIL中的MCM2; (E) HSIL中的P16; (F) HSIL中的MCM2。

(A) P16 in NILM; (B) MCM2 in NILM; (C) P16 in LSIL; (D) MCM2 in LSIL; (E) P16 in HSIL; (F) MCM2 in HSIL.

2.2 MCM2 与 P16 在宫颈组织学中的表达

MCM2和P16在炎性病变的宫颈组织中不表达, 在宫颈上皮内瘤变1级(cervical intraepithelial neoplasia grade 1, CIN1)中的阳性率分别为50%和

18%, 在CIN2中的阳性率分别为81%和77%, 在CIN3中阳性率分别为97%和100%, 在宫颈癌中全部阳性表达, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 表2, 图2)。

表2 MCM2和P16在宫颈组织学样本中的表达

Table 2 Expression of MCM2 and P16 in cervical tissue sample

组别	n	MCM2		χ^2	P	P16		χ^2	P
		阴性	阳性			阴性	阳性		
炎症	17	17	0			17	0		
低度病变	28	14	14	63.1125	<0.01	23	5	81.7315	<0.01
高度病变	65	7	58			7	58		
宫颈癌	16	0	16			0	16		

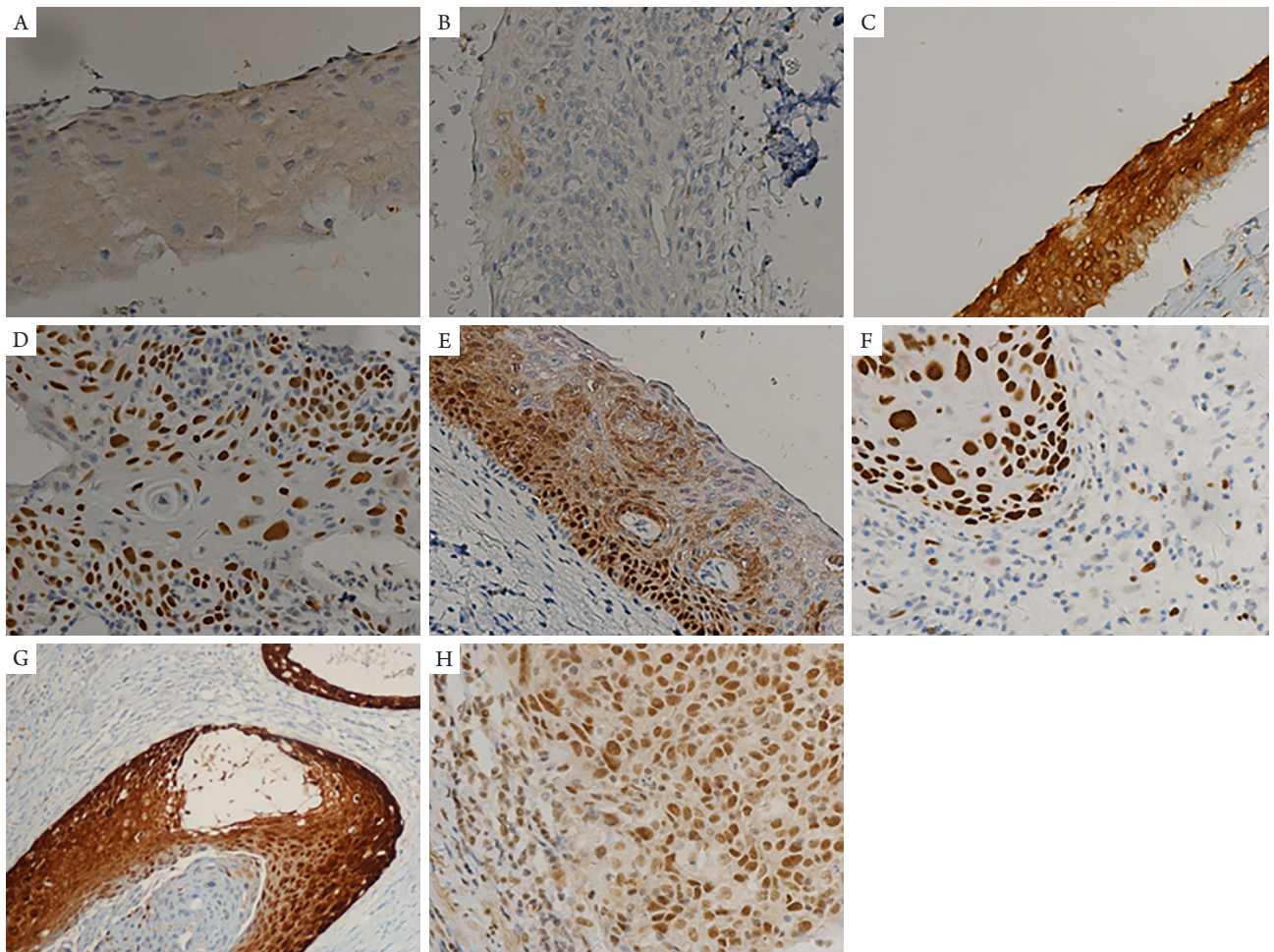


图2 P16与MCM2在宫颈组织样本中的表达(EnVision, $\times 400$)

Figure 2 Expression of MCM2 and P16 in cervical tissue samples (EnVision, $\times 400$)

(A) 宫颈炎症中的P16; (B) 宫颈炎症中的MCM2; (C) 宫颈LSIL中的P16; (D) 宫颈LSIL中的MCM2; (E) 宫颈HSIL中的P16; (F) 宫颈HSIL中的MCM2; (G) 宫颈浸润性鳞癌中的P16; (H) 宫颈浸润性鳞癌中的P16。
 (A) P16 in cervical inflammation; (B) MCM2 in cervical inflammation; (C) P16 in LSIL; (D) MCM2 in LSIL; (E) P16 in HSIL; (F) MCM2 in HSIL; (G) P16 in cervical invasive squamous cell carcinoma; (H) MCM2 in cervical invasive squamous cell carcinoma.

2.3 MCM2 与 P16 的表达与 HPV 感染的相关性

MCM2和P16在HPV16和HPV18阳性的标本中阳性率分别为86%和89%；在其他类型的HPV感染样本中阳性率为36%和14%；在无HPV感染的样本中阳性率分别为8%和0%，差异有统计学

意义($P<0.01$ ，表3)。

2.4 MCM2 与 P16 表达的相关性

MCM2与P16在细胞蜡块($r=0.6437$ ， $P<0.01$)和组织学样本($r=0.7447$ ， $P<0.01$)中均有显著相关性。

表3 MCM2和P16的表达与HPV感染的相关性

Table 3 Correlation of the expression of MCM2 and P16 with HPV infection

组别	n	MCM2		χ^2	P	P16		χ^2	P
		阴性	阳性			阴性	阳性		
HPV16/18	35	5	30			4	31		
HPV其他高危型	28	18	10	36.7498	<0.01	24	4	58.0073	<0.01
无HPV感染	24	22	2			24	0		

3 讨论

宫颈TCT是一种十分有效的宫颈癌筛查方法。尽管如此，在某些病例，如非典型鳞状上皮或者鳞状上皮内低度病变中，仍有一定的局限性^[1]。最近，国外一些检测指南^[2-4]推荐采用HPV检测及细胞学分流作为宫颈癌筛查的首选方案：如果检测HPV16或HPV18阳性，无论是否有细胞学阳性结果均需要做阴道镜检查；如果出现其他型HPV感染且细胞学阴性，则需在1年后复查。这种筛查方法避免了检测结果为非典型鳞状上皮细胞的人群做阴道镜检查的必要。但如何对鳞状上皮内低度病变的人群进行分流，目前尚未有明确的结论。有研究^[5]采用免疫组织化学染色检测CK7的表达，以分流鳞状上皮内低度病变人群。但CK7的阳性判读标准较难掌握，且国内缺乏相关数据。有研究^[6]认为：在HPV阴性的病例中，P16能有效明确是否存在鳞状上皮内高度病变。国内一项研究^[7]表明：P16/MCM2双染色比细胞学更为敏感，且比HPV检测更具特异性。因此，本研究单独采用MCM2及P16染色，检测在宫颈病变标本中的表达差异，并探讨与HPV检测结果的相关性。

MCM在细胞周期中形成DNA复制前复合物，启动DNA复制，是所有真核细胞DNA复制所必须的。MCM家族蛋白中共6个成员，分别为MCM2~7。Osaki等^[8]研究发现：与常用的细胞增殖标记Ki-67和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)相比，MCM2能更准确地反映细胞增殖情况。由于MCM2与拓扑异构酶IIa(topoisomerase II α , TOP2A)均可在HPV感

染的异常S期细胞中表达，有研究^[9-10]将MCM2与TOP2A制作成鸡尾酒抗体——ProEx C，用于检测宫颈上皮病变。Ge等^[9]通过检测25例细胞蜡块发现：在ProEx C宫颈高度病变及小细胞癌中呈弥漫强阳性，在宫颈低度病变中不表达。也有研究^[10]显示：在CIN2以上的病变中，随着病变程度的加重，ProEx C的阳性率增加；且在CIN3以上的病例中，ProEx C的敏感性优于P16。Zheng^[11]对183例液基细胞学样本直接进行MCM2染色，发现MCM2阳性率随宫颈病变程度加重而增加，并与HPV类型有关。本研究对118例宫颈液基细胞蜡块及126例宫颈活检样本进行MCM2免疫染色发现：MCM2在无宫颈上皮内瘤变细胞蜡块及正常宫颈组织中不表达，在宫颈癌中全部表达，并随着病变程度的加重，其阳性率增加。MCM2更易在HPV16和HPV18感染的样本中表达。与既往研究^[1]的结论一致。提示MCM2单独染色可作为宫颈病变分级的参考标志物之一。

P16是一种细胞周期依赖性激酶抑制性蛋白，在HPV感染的细胞中过表达。在视网膜母细胞瘤蛋白失活的情况下，P16可下调CDK4和CDK6的活性，组织细胞由G1期进入S期。研究^[12-13]显示：P16是对宫颈癌前病变进行分级以及低级别上皮内瘤变患者分流的一个有效标志物。Wong等^[14]对57例液基细胞样本进行P16染色发现：P16总阳性率为63.2%，在CIN2及以上的病变中敏感性和特异性分别为93.5%和60%。Kanthiya等^[15]通过检测234例宫颈组织发现：P16在侵袭性癌中的阳性率为91.3%，在CIN2/3中阳性率为78.7%，在CIN1中阳性率为10.4%。同时本研究结果显示：在宫颈癌

中, P16均呈阳性表达, 并随着宫颈病变程度的加重, 其阳性率增加; P16的表达与高危型HPV感染, 尤其是HPV16/18的感染具有相关性。

综上所述, MCM2与P16高表达于CIN2以上的病变中, 其阳性率随宫颈癌前病变程度加重而增加, 并与HPV感染相关。因此, MCM2和P16在宫颈病变的鉴别诊断中具有一定的应用价值。

参考文献

1. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities[J]. *JAMA*, 2002, 287(16): 2120-2129.
2. 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.
3. Rossi PG, Ferroni E, Barca A, et al. Quality appraisal of documents producing recommendations for breast, colorectal and cervical cancer screening[J]. *Epidemiol Biostat Public Health*, 2014, 11(3): e9062.
4. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, et al. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 136(2): 189-197.
5. Mills AM, Paquette C, Terzic T, et al. CK7 immunohistochemistry as a predictor of CIN1 progression: a retrospective study of patients from the quadrivalent HPV vaccine trials[J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(2): 143-152.
6. Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. p16 immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2015, 34(2): 180-186.
7. 王海瑞, 廖光东, 江宇, 等. p16/mcm2双染在宫颈上皮内瘤变的诊断价值及其与高危型HPV感染的关系[J]. *中华流行病学杂志*, 2017, 38(9): 1241-1245.
8. WANG Hairui, LIAO Guangdong, JIANG Yu, et al. Diagnostic value of p16/mcm2 dual staining in cervical intraepithelial neoplasia and its association with high-risk HPV infection[J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2017, 38(9): 1241-1245.
9. Osaki M, Osaki M, Yamashita H, et al. Expression of minichromosome maintenance-2 in human malignant fibrous histiocytomas: correlations with Ki-67 and P53 expression, and apoptosis[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 10(2): 161-168.
10. Ge Y, Mody DR, Smith D, et al. p16(INK4a) and ProEx C immunostains facilitate differential diagnosis of hyperchromatic crowded groups in liquid-based Papanicolaou tests with menstrual contamination[J]. *Acta Cytol*, 2012, 56(1): 55-61.
11. Guo M, Baruch AC, Silva EG, et al. Efficacy of p16 and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma[J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 135(2): 212-220.
12. Zheng J. Diagnostic value of MCM2 immunocytochemical staining in cervical lesions and its relationship with HPV infection[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 875-880.
13. 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.
14. Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, et al. p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Cytopathol*, 2012, 120(5): 294-307.
15. Wong YP, Abdul Raub SH, Mohd Dali AZ, et al. P16INK4a: 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.
16. Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, et al. Expression of the p16 and Ki-67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(7): 3201-3206.

本文引用: 左元元, 徐洪明, 黄建达, 毛海峰, 孙岳军. MCM2与P16在子宫颈病变细胞蜡块与活检标本中的表达[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(7): 1399-1404. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.004
Cite this article as: ZUO Yuanyuan, XU hongming, HUANG Jianda, MAO Haifeng, SUN Yuejun. Expression of MCM2 and P16 in cell block and biopsy samples of cervical lesion[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(7): 1399-1404. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.004