

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.03.003

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.03.003

P16 及 Ki67 在宫颈病变病理诊断中的应用

刘镜文¹, 和月生¹, 胡慧珍¹, 刘文科¹, 吴彬¹, 吴秋良²

(1. 惠州市妇幼保健计划生育服务中心病理科, 广东 惠州 516211; 2. 中山大学肿瘤防治中心病理科, 广州 510060)

[摘要] 目的: 评价P16^{INK4a}与Ki67两个辅助指标对提高基层病理医师在宫颈上皮病变诊断准确性中的作用。方法: 选取207个宫颈活检病例行HE染色及P16^{INK4a}, Ki67免疫组织化学染色, 分2次邀请5名县市级医院病理医师进行诊断。第一次每位病理医师只阅读常规HE染色切片进行诊断, 对比5名病理医师之间诊断的一致性; 半年后再次邀请这5名病理医师结合P16^{INK4a}, Ki67免疫组织化学切片进行诊断, 对比病理医师之间诊断的一致性, 并计算前后2次阅片Kappa值及符合率, 最后对比5名病理医师的诊断与参考标准之间的一致性及符合率, 分析其统计学意义。结果: 单独依靠常规HE切片进行诊断时, 病理医师之间的诊断一致性及病理医师与“参考标准”之间的诊断一致性为弱至中度(Kappa值分别为0.344±0.072, 0.385±0.053), 符合率较低(55%~70%, 60%~65%)。但联合P16^{INK4a}及Ki67结果进行诊断, 病理医师之间的诊断一致性及病理医师与“参考标准”之间的诊断的一致性可达到高度或极强(Kappa值分别为0.700±0.051, 0.792±0.043), 符合率分别提高到78%~88%与85%~91%, 两组指标差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论: 联合应用P16^{INK4a}及Ki67免疫组织化学检测结果, 可明显提高临床上宫颈活检病变诊断的准确性。

[关键词] 宫颈病变; 诊断; 准确性; P16; Ki67

Application of P16 and Ki67 in the pathological diagnosis of cervical lesions

LIU Jingwen¹, HE Yuesheng¹, HU Huizhen¹, LIU Wenke¹, WU Bin¹, WU Qiuliang²

(1. Department of Pathology, First Maternal and Child Health Care Hospital, Huizhou Guangdong 516211; 2. Department of Pathology, Cancer Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the role of P16^{INK4a} and Ki67 in improving the accuracy of the cervical intraepithelial neoplasia pathology diagnosis. **Methods:** A total of 207 cases of cervical biopsy were selected by routine HE staining and P16^{INK4a}, Ki67 immunohistochemical staining. We invited five pathologists, first each pathologist reading routine HE staining for diagnosis; after half a year, invited the same five pathologists reading routine HE sections and P16^{INK4a}, Ki67 for diagnosis again, and compared the interobserver agreement, calculated the coincidence rate. Finally, we compared the five pathologists diagnosis with the reference standard and calculated

收稿日期 (Date of reception): 2017-12-20

通信作者 (Corresponding author): 刘镜文, Email: 6615151@qq.com

基金项目 (Foundation item): 广东省惠州市科技局项目 (2016Y051). This work was supported by Huizhou Science and Technology Bureau of Guangdong Province, China (2016Y051).

the coincidence rate. **Results:** The diagnosis relied solely on conventional HE slides, the interobserver agreement was weak to moderate and the coincidence rate was low. The agreement between pathological diagnosis and the reference standard, and coincidence rate were the same (the Kappa values were 0.344 ± 0.072 , 0.385 ± 0.053 , and the coincidence rate were 55%–70%, 60%–65%, respectively). But combination with P16^{INK4a} and Ki67 for diagnosis, the interobserver agreement reached high or extremely strong level, and the coincidence rate were significantly increased (the Kappa values were 0.700 ± 0.051 , 0.792 ± 0.043 , and the coincidence rate were 78%–88%, 85%–91% respectively). The difference between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Combined with P16^{INK4a} and Ki67 immunohistochemical staining, pathologists can significantly improve the accuracy of the diagnosis of cervical biopsy.

Keywords cervical intraepithelial neoplasia; diagnosis; accuracy; P16; Ki67

宫颈癌严重危害女性身体健康,在宫颈癌筛查中,宫颈活检组织病理诊断直接指导细胞学筛查结果异常的女性的后续管理。低级别鳞状上皮病变(low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL; CIN I)以下患者进行定期复查,而高级别鳞状上皮病变(high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL; \geq CIN II)以上患者需要进行宫颈锥切。组织学假阳性的结果会导致患者的过度治疗,而组织学假阴性的结果也会延误患者的治疗,因此准确识别宫颈病变的组织学本质有至关重要的意义。

然而国外多个研究^[1-2]表明:在只有宫颈活检组织常规HE切片的情况下,不同病理医师对宫颈病变的诊断有着很大的差异,其重复性为低至中度(Kappa: 0.2~0.5)。临床上诊断困难的病例往往会让多个病理医师共同讨论得出一致的意见。但县市级等基层医院缺乏病理医师,往往只有1~2名,因此迫切需要客观、可靠的指标来协助病理医师进行精确诊断。

研究^[3-4]表明:P16^{INK4a}及Ki67的强表达与HSIL关系密切。本研究拟探讨P16^{INK4a}及Ki67对提高基层病理医师在宫颈上皮病变诊断准确性的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

收集惠州市妇幼保健计划生育服务中心2016年3月至2017年2月宫颈活检病例,所有活检组织经过中性甲醛固定,在ASP200脱水机(德国Leica公司)里进行脱水、透明、浸蜡处理,石蜡包埋,切成3 μ m厚的常规石蜡HE及免疫组织化学切片。纳入标准:1)采用阴道镜下宫颈活检标本;2)均由中性甲醛及时充分固定;3)不包括浸

润性鳞癌及腺上皮病变;4)不合并其他肿瘤。排除标准:1)活检组织病灶太小,不能重新连续切片的病例;2)活检组织中无鳞状上皮的病例;3)活检组织常规HE切片经过2名市级以上三甲医院高级职称(副主任医师以上)的病理医师应用双人共览显微镜一起阅片不能形成统一意见的病例。经过筛选最终选取病例207例,其中正常114例,LSIL37例,HSIL56例。本研究经惠州市妇幼保健计划生育服务中心伦理委员会审核批准。

1.2 方法

对选取的207个病例进行连续切片,行常规HE染色及P16^{INK4a}, Ki67免疫组织化学染色,分2次邀请5名县市级医院病理医师阅片并按照TBS诊断系统进行诊断,将诊断分为3类:1)正常;2)LSIL;3)HSIL。第1次阅片时,每位病理医师只阅读常规HE染色切片进行诊断、记录及统计结果,计算5名病理医师之间诊断的可一致性(用Kappa值表示)及符合率;半年后再次邀请这5名病理医师阅读常规HE切片及P16^{INK4a}, Ki67免疫组织化学切片进行诊断、记录及统计结果,再次对比5名病理医师之间诊断的一致性及符合率。最后计算5名病理医师的诊断与参考标准之间的一致性及符合率,分析其统计学意义。

1.2.1 P16INK4a及Ki67免疫组织化学染色

P16INK4a及Ki67抗体均购自福州迈新公司。将P16INK4a(克隆号:6H12)及Ki67(克隆号:MIB1)置于Bond-MAX免疫组织化学仪(德国Leica公司)上染色。抗原修复液选择ER2, DAB显色,苏木精复染,每批免疫组织化学染色均设置阳性对照及阴性对照。

P16INK4a免疫组织化学结果判读:阳性(病变上皮大于中下1/2范围弥漫连续棕黄色表达),表达

部位为胞浆及细胞核。Ki67免疫组织化学结果判读: 阳性(病变上皮中表层弥漫棕黄色表达), 表达部位细胞核。

1.2.2 参考标准

参考标准为2名市级以上三甲医院高级职称(副主任医师以上)的病理医师应用双人共览显微镜一起阅片得到一致的诊断。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件对所得数据进行统计分析。Kappa检验是分析诊断一致性的主要方法, 参考Malpica等^[5]对Kappa值的解释, 计算Kappa值, Kappa值的大小分为4个级别: 弱($Kappa \leq 0.4$)、中度($0.4 < Kappa \leq 0.6$)、高度($0.6 < Kappa \leq 0.8$)、极强($0.8 < Kappa \leq 1$)。符合率=诊断符合例数/总例数 $\times 100\%$ 。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计数资料以百分比(%)表示, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理医师之间诊断一致性的比较

在只有宫颈活检组织常规HE切片的情况下, 不同病理医师之间对宫颈病变的诊断有很大的差异(Kappa值: $0.259 \sim 0.480$, 0.344 ± 0.072), 一致性为弱至中等, 符合率较低($55\% \sim 70\%$)。

半年后进行第2次阅片, 在常规HE切片的基础上增加P16及Ki67免疫组织化学染色进行辅助诊断, 病理医师之间诊断的一致性均明显提高(Kappa值: $0.651 \sim 0.804$, 0.700 ± 0.051), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 且符合率也有明显提高($78\% \sim 88\%$), 两两相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$; 表1)。

2.2 病理医师诊断与参考标准一致性的比较

在只有宫颈活检组织常规HE切片的情况下, 每位病理医师的诊断与参考标准之间有很大的差异(Kappa值: $0.325 \sim 0.458$, 0.385 ± 0.053), 一致性为弱至中等, 符合率较低($60\% \sim 65\%$)。增加P16及Ki67免疫组织化学染色进行辅助诊断, 病理医师诊断与参考标准之间的一致性均明显提高(Kappa值: $0.739 \sim 0.853$, 0.792 ± 0.043), 与之前数据比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 同时符合率也明显提高($85\% \sim 91\%$), 两两相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$; 表2)。

2.3 典型病例

图1所示病例左侧为正常鳞状上皮, 右侧为HSIL。在只阅读HE切片的情况下, 5名病理医师中只有1名诊断为HSIL, 但在同时阅读HE切片、P16及Ki67免疫组织化学切片的情况下, 5名病理医师均能正确诊断为HSIL。

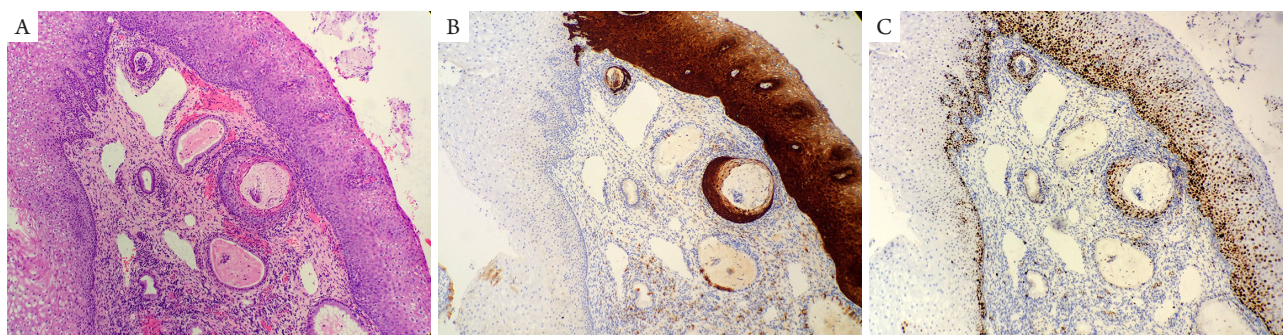
表1 病理医师之间诊断一致性的比较($n=207$)

Table 1 Comparison of interobserver agreement among pathologists ($n=207$)

观察者	HE切片		HE+P16及Ki67	
	Kappa	符合/[例(%)]	Kappa	符合/[例(%)]
1 vs 2	0.330	121 (58)	0.804	182 (88)
1 vs 3	0.259	114 (55)	0.648	162 (78)
1 vs 4	0.262	113 (55)	0.697	169 (82)
1 vs 5	0.345	124 (60)	0.651	163 (79)
2 vs 3	0.352	129 (62)	0.657	165 (80)
2 vs 4	0.480	144 (70)	0.688	170 (82)
2 vs 5	0.322	126 (61)	0.715	174 (84)
3 vs 4	0.373	135 (65)	0.748	177 (86)
3 vs 5	0.434	143 (69)	0.658	167 (81)
4 vs 5	0.281	129 (62)	0.730	177 (86)
$\bar{x} \pm s$	0.344 ± 0.072	—	0.700 ± 0.051	—

表2 病理医师诊断与参考标准一致性的比较($n=207$)Table 2 Comparison of pathologists' diagnosis and reference standard ($n=207$)

参考标准与观察者	HE切片		HE+P16及Ki67	
	Kappa	符合/[例(%)]	Kappa	符合/[例(%)]
参考标准vs 1	0.458	134 (65)	0.812	183 (88)
参考标准vs 2	0.407	130 (63)	0.853	189 (91)
参考标准vs 3	0.344	124 (60)	0.739	175 (85)
参考标准vs 4	0.392	134 (65)	0.790	182 (88)
参考标准vs 5	0.325	127 (61)	0.767	180 (87)
$\bar{x} \pm s$	0.385 ± 0.053	—	0.792 ± 0.043	—

图1 正常鳞状上皮及HSIL的形态和P16, Ki67的表达情况($\times 100$)Figure 1 Morphology of normal squamous epithelium and HSIL and expression of P16 and Ki67 ($\times 100$)

(A)常规HE切片示:左侧鳞状上皮为正常上皮,右侧为HSIL;(B)P16免疫组织化学示:左侧正常鳞状上皮呈阴性,右侧HSIL病变区域呈弥漫强阳性;(C)Ki67免疫组织化学示:左侧正常鳞状上皮基底层呈阳性,右侧HSIL病变区域中下2/3呈弥漫阳性。

(A) Conventional HE section showed that normal squamous epithelium on the left side, HSIL on the right side; (B) P16 immunohistochemistry showed that the normal squamous epithelium was negative, and HSIL lesions diffused strong positive; (C) Ki67 immunohistochemistry showed that the normal squamous epithelium basal layer was positive, and the lower 2/3 diffused positive in the HSIL lesion.

3 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率在女性恶性肿瘤中居第2位,仅次于乳腺癌^[6]。在宫颈癌防治过程中宫颈活检病理诊断起重要作用,精确的活检结果可正确指导临床进一步诊疗方案制定,而病理结果作为最后诊断被称为“金标准”,但其准确性却少有人关注。

近几年国外相关研究^[7-8]表明:病理医师单独依靠常规HE切片进行诊断时,可重复性只有中度,但联合P16^{INK4a}及Ki67免疫组织化学结果进行诊断,诊断的一致性可达到高度或者极强。宋建明等^[9]对宫颈非典型性不成熟化生

及其类似病变诊断的一致性进行探讨,发现不同评估者对不成熟化生和CIN III的诊断具有较高的一致性,而对非典型性不成熟化生、湿疣、CIN I和CIN II的诊断一致性均较差,但该研究未提及相应的解决方案。由于我国医疗体系建制的问题,基层医院病理科技术力量十分薄弱,多数县市级医院病理科只有1~2名病理医师,病理诊断的准确性得不到保障。因此迫切需要了解基层医院病理医师对宫颈病变诊断的一致性,寻找合适客观的指标辅助诊断,以提高基层医院病理医师对宫颈病变诊断的准确性。

P16^{INK4a}是一种细胞周期依赖激酶抑制因

子, 其过表达与高危型人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染密切相关。癌基因蛋白E7灭活细胞周期调控Rb蛋白, 导致P16^{INK4a}过表达。研究^[10-11]表明: P16的过表达与HSIL(\geq CIN II)关系密切, 是较为理想的预后观察指标。Ki67表达于除G0期外的细胞增殖周期, 正常宫颈上皮Ki67只表达于基层及副基层细胞, 而在宫颈病变中Ki67可表现为全层鳞状上皮弥漫阳性表达^[8]。但罕有研究报道这两个免疫组织化学指标的应用对于提高我国病理医师在宫颈病变诊断的一致性的意义。

综上所述, 单独依靠常规HE切片进行诊断时病理医师之间的诊断一致性及病理医师与参考标准之间的诊断一致性为弱至中度, 符合率低; 但联合P16^{INK4a}及Ki67免疫组织化学结果进行诊断, 诊断的一致性能达到高度或者极强, 符合率也大幅提高。因此联合应用P16^{INK4a}及Ki67免疫组织化学检测结果, 病理医师可明显提高宫颈活检病变诊断的准确性, 特别是在基层医院缺乏病理科人才的情况下, 这两个指标能很好地辅助病理医师对宫颈病变做出准确诊断, 提高病理结果的可靠性。

参考文献

1. Stoler MH, Schiffman M, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study[J]. *JAMA*, 2001, 285(11): 1500-1505.
2. Horn LC, Reichert A, Oster A, et al. Immunostaining for p16INK4a used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(4): 502-512.
3. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35(3): 210-220.
4. Calil LN, Edelweiss MI, Meurer L, et al. p16 INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection[J]. *Pathol Res Pract*, 2014, 210(8): 482-487.
5. Malpica A, Matisic JP, Niekirk DV, et al. Kappa statistics to measure interrater and intrarater agreement for 1790 cervical biopsy specimens among twelve pathologists: qualitative histopathologic analysis and methodologic issues[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 99(3 Suppl 1): S38-S52.
6. 乔友林, 李静. 子宫颈癌筛查方法新进展[J]. *医学研究杂志*, 2009, 38(11): 3-4.
QIAO Youlin, LI Jing. New progress in screening methods for cervical cancer[J]. *Journal of Medical Research*, 2009, 38(11): 3-4.
7. Kanthiya K, Khunrarong J, Tangjitgamol S, et al. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(7): 3201-3206.
8. Yang QC, Zhu Y, Liou HB, et al. A cocktail of MCM2 and TOP2A, p16INK4a and Ki-67 as biomarkers for the improved diagnosis of cervical intraepithelial lesion[J]. *Pol J Pathol*, 2013, 64(1): 21-27.
9. 宋建明, 周平, 孙艳花, 等. 对宫颈病变病理诊断结果变异性的评估[J]. *中国妇幼健康研究*, 2010, 21(5): 593-596.
SONG Jianming, ZHOU Ping, SUN Yanhua, et al. Evaluation of the variability of pathological diagnosis of cervical lesions[J]. *Chinese Journal of Maternal and Child Health Research*, 2010, 21(5): 593-596.
10. Fujii T, Saito M, Hasegawa T, et al. Performance of p16INK4aKi-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study[J]. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20(1): 134-142.
11. Pacchiarotti A, Ferrari F, Bellardini P, et al. Prognostic value of p16-INK4A protein in women with negative or CIN1 histology result: A follow-up study[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(4): 897-904.

本文引用: 刘镜文, 和月生, 胡慧珍, 刘文科, 吴彬, 吴秋良. P16及Ki67在宫颈病变病理诊断中的应用[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(3): 480-484. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.03.003

Cite this article as: LIU Jingwen, HE Yuesheng, HU Huizhen, LIU Wenke, WU Bin, WU Qiuliang. Application of P16 and Ki67 in the pathological diagnosis of cervical lesions[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(3): 480-484. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.03.003