

HIV 感染妇女宫颈疾病中 P16INK4a 蛋白的表达

飞秋月¹⁾, 张红芸²⁾, 徐琳²⁾, 赵耀²⁾, 冯琳¹⁾, 蒋成芹³⁾, 乔友林⁴⁾

(1) 曲靖市妇幼保健院 妇一科, 云南 曲靖 655000; 2) 云南省昆明医科大学第一附属医院妇科, 云南 昆明 650032; 3) 德宏州芒市妇幼保健院, 云南 芒市 678400; 4) 中国医学科学院肿瘤医院流行病学研究室, 北京 100021)

[摘要] 目的 研究 P16INK4A 蛋白在云南省 HIV 感染妇女宫颈上皮内瘤病变的表达, 而探讨其对高度宫颈上皮内瘤病变的预测价值. **方法** 调取 67 例已确诊为艾滋病病毒感染妇女的宫颈组织活检的病理切片作为研究对象, 其中 13 例的病检结果提示无宫颈上皮内瘤病变的宫颈组织作为对照组. 检测各级别宫颈上皮内瘤组中 P16INK4A 蛋白的表达情况, 并分析 P16INK4A 蛋白对宫颈病变的预测价值. **结果** 低级别宫颈上皮内瘤变 (CIN1) 组与高级别宫颈上皮内瘤变 (\geq CIN2) 组 P16INK4A 蛋白的表达率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 20.053$; $P < 0.05$), 说明 P16INK4A 蛋白能辨别高级别的宫颈上皮内瘤变; 随着宫颈上皮内瘤变的级别升高, P16INK4A 蛋白的表达强度逐渐增强, 呈线性相关, 相关系数 $R = 0.397$ ($P < 0.05$). **结论** p16INK4A 蛋白免疫组化检测对宫颈上皮内瘤变 (高级别) 有预测价值, 能将高级别的宫颈上皮内瘤变区分出来, 对 HIV 感染妇女宫颈疾病的进展有预测价值, 同时具有较高的临床治疗指导作用.

[关键词] HIV; 宫颈上皮内瘤变; p16INK4A 蛋白

[中图分类号] R713 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 12-0134-05

Significance of p16INK4a Protein Expression in Cervical Disease in HIV-infected Women

FEI Qiu-yue¹⁾, ZHANG Hong-yun²⁾, XU Lin²⁾, ZHAO Yao²⁾, FENG Lin¹⁾, JIANG Cheng-qin³⁾, QIAO You-lin⁴⁾

(1) Dept. of Gynecology, Maternal and Child Care Service Centre of Qujing, Qujing Yunnan 655000; 2) Dept. of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 3) Maternal and Child Care Service Centre of Mang City, Dehong Yunnan 678400; 4) Dept. of Epidemiology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

[Abstract] Objective To study P16INK4A protein expression in intraepithelial neoplasia lesions and investigate its predictive value in the high-grade cervical intraepithelial neoplasia lesions among HIV-infected women in Yunnan Province, China. **Methods** 67 biopsies of cervical tissue from HIV-infection women were taken as study objects, including 13 cases of non-cervical intraepithelial neoplasia lesions as the control group. The P16INK4A protein expression in cervical intraepithelial neoplasia was detected and the predictive value of P16INK4A protein in cervical lesions was analyzed. **Results** The P16INK4A protein expression showed statistically significant difference between low-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN1) group and high-level cervical intraepithelial neoplasia (\geq CIN2) group ($\chi^2 = 20.053$, $P < 0.05$), which suggested P16INK4A protein could identify high-level cervical intraepithelial epithelium. With the increasing grade of cervical intraepithelial neoplasia, the protein expression intensity of P16INK4A was gradually increased with linear correlation coefficient $R = 0.397$ ($P <$

[基金项目] 昆明医科大学研究生创新基金资助项目 (2012S12)

[作者简介] 飞秋月 (1987~), 女, 四川合理县人, 硕士, 住院医师, 主要从事妇科肿瘤临床工作.

[通讯作者] 张红芸. E-mail:13888750195@163.com

0.05) . **Conclusion** P16INK4A immunohistochemical detection has predictive value in cervical intraepithelial neoplasia (high-grade) and cervical disease progress in HIV-infected women. It can distinguish the high-grade cervical intraepithelial neoplasia and provide guidance for clinical treatment.

[**Key words**] Human immunodeficiency virus ; Cervical intraepithelial neoplasia; P16INK4A protein

宫颈浸润癌是妇科常见的恶性肿瘤, 是严重威胁妇女健康的第三位恶性肿瘤. 持续高危型人乳头瘤病毒 (human papilloma virus; HPV) 感染是宫颈癌的独立危险因素^[1]. HIV 感染妇女较 HIV 阴性妇女重度宫颈上皮内瘤病变及宫颈癌发病率明显增高^[2-3]. 艾滋病由于获得性免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 对机体免疫系统的破坏, 免疫功能出现紊乱, 使得机体对外界的抵抗力明显降低, 对自身的免疫监视功能也有不同程度的影响, 从而能导致机体容易感染与肿瘤相关的病毒, 例如人乳头瘤病毒. 有研究提示, HIV 阳性的妇女的 HPV 感染率是 HIV 阴性妇女的 2~5 倍^[4]. 国外报道人类免疫缺陷病毒感染妇女 Human papillomavirus 感染及宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia CIN)、宫颈癌发病率、进展及复发率都显著增高^[5]. 目前我国非感染 HIV 妇女宫颈癌前病变研究较多, 但对于 HIV 阳性的妇女宫颈癌的筛查研究国内还很少有报道^[6].

宫颈癌是艾滋病定义恶性肿瘤^[7], 这意味着 HIV 阳性妇女宫颈浸润癌及死亡风险高. 目前中国 HIV 感染妇女多数接受国家免费的抗逆转录治疗, 她们的寿命得到延长, 然而由于 HIV 感染妇女她们免疫功能低下, 生活方式及大多数患者医疗资源缺乏及随访等因素. 很多 HIV 感染妇女没有得到有效规范宫颈癌筛查, 而导致宫颈浸润癌, 相关研究在中国甚少. 在全球宫颈癌是威胁 HIV 感染妇女的一个主要疾病^[8-10]. 宫颈癌是一个通过规范宫颈癌筛查而可防治的疾病. 目前国际上对医疗资源缺乏地区 HIV 感染妇女还没有宫颈癌筛查方法指南, 研究此课题成为国际焦点, 有学者提出结合生物标志物检查会增加宫颈癌前病变的敏感度, 增加检出率、预防过度治疗及治疗不足^[11]. 因此寻找一个既与高危型人乳头瘤病毒有关, 同时又能预测宫颈癌前病变的生物标志物极为重要. 在宫颈癌的研究中, P16INK4A 蛋白在宫颈癌中的表达与其抑癌基因形象并不相符, 在宫颈癌中呈高表达. 有研究认为 P16INK4A 蛋白呈现高度表达的原因可能是高危型 HPV 感染诱导所致的^[12]. 本课题就云南省 HIV 阳性妇女的宫颈组织行 P16INK4A 蛋白表达的研究, 以探讨 P16INK4A 的表达与 HIV 阳性妇女宫颈病变的关系, 探索一种

适合准确的研究方法, 为今后进一步研究 HIV 感染妇女宫颈癌前病变及宫颈癌的筛查方法研究提供参考.

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取由美国国家卫生研究所 (NIH) 等机构资助的云南省 HIV 感染妇女宫颈筛查研究项目中已取材的 67 例宫颈组织活检的病理切片作为研究对象, 其中 13 例病理结果提示无宫颈癌前病变的宫颈组织作为对照组.

1.2 方法

免疫组化检测试剂: 鼠抗人 P16INK4A 蛋白单克隆抗体工作液、通用二步法试剂盒 (3% H₂O₂、试剂 A: Polymer Helper、试剂 B: Polyperoxidase - anti - mouse/rabbit IgG)、DAB 显色试剂盒、苏木素染液均购于北京中山生物技术有限公司. 所有病检标本行 P16INK4A 免疫组化染色, 染色采用通用二步法. 阳性对照采用已知的 P16INK4A 蛋白阳性的宫颈癌标本切片, 阴性对照采用已知的 P16INK4A 蛋白阴性的宫颈癌标本切片.

1.3 结果的判定

P16INK4A 蛋白表达在光学显微镜下观察切片的显色反应, 对免疫组化染色结果行半定量分析. P16INK4A 蛋白的阳性判断标准为在细胞核或细胞浆中出现棕黄色颗粒. P16INK4A 阳性细胞在组织中所占的比例分 4 个等级: 阴性 (-), 即阳性细胞比率 < 5%, 显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色; 弱阳性 (+), 即阳性细胞比率为 5%~25%, 显色强度为淡黄色或者部分细胞至棕黄色染色; 中度阳性 (++) , 即阳性细胞比为 25%~50%, 显色强度介于弱阳性与强阳性之间; 强阳性 (+++) , 即阳性细胞数 > 50%, 多数细胞呈黄至棕黄色染色.

1.4 统计学方法

检查结果输入 Excel 电子表格, 转换成 SPSS 软件进行统计分析, 使用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 计数资料数据分析采用卡方检验以及相关分析, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 患者一般资料

患者收入普遍偏低, 每月收入大多集中在 0~500 元与 500~1 200 元这两个范围. 平均性伴侣个数为 3.0 个, 而性伴侣个数在 3 个以上的患者仅占 10.4%, 说明多数患者性伴侣个数不多. 民族分布情况, 汉族 27 人 (40.3%), 少数民族占筛查总人数的 59.7%, 见表 1.

表 1 患者一般资料
Tab. 1 The general data of patients

资 料	参加者 (n = 67)
平均年龄 (岁)	31.8(20 ~ 54)
配偶感染 HIV 者 [n (%)]	40(59.7)
平均首次性生活年龄 (岁)	20.1(1 ~ 35)
使用避孕套者 [n (%)]	44(65.7)
平均性伴侣个数 (n)	3.0
民族 [n (%)]	
汉族	27(40.3)
傣族	26(38.8)
景颇族	11(16.4)
其它 *	3(4.5)
曾经接受宫颈癌筛查情况 (n)	0
抽烟者与曾经抽烟者 [n (%)]	3(4.5)

*: 德昂族 1 人, 回族 1 人, 布依族 1 人.

2.2 HIV 阳性患者宫颈组织 P16INK4A 蛋白的表达与病理诊断

2.2.1 P16INK4A 蛋白在对照组、各级 CIN 组中表达情况的分析 67 例患者中宫颈炎 13 例, CIN1 级 26 例, CIN2 级 17 例, CIN3 级 11 例. P16INK4A 蛋白在对照组, CIN1 级, CIN2 级, CIN3 级中的表达率逐渐增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CIN1 组与 CIN2 组间 P16INK4A 蛋白的表达率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.983$, $P < 0.05$), 低级别宫颈上皮内瘤变 (CIN1 组) 与高级别宫颈上皮内瘤变 (CIN2 组 + CIN3 组) P16INK4A 蛋白的表达率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 20.053$, $P < 0.05$), 说明 P16INK4A 蛋白在低级别宫颈上皮内瘤变和高级别上皮内瘤变中的表达率有差别, 能将高级别的宫颈上皮内瘤变从宫颈上皮内瘤变中区分出来, 具有指导临床治疗的意义. 但 P16INK4A 蛋白的表达率在 CIN2 组与 CIN3 组之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.394$, $P > 0.05$), 说明

P16INK4A 蛋白对区分 CIN2 级与 CIN3 级意义不大. P16INK4A 蛋白在对照组与 CIN 组的表达情况见表 2.

2.2.2 P16INK4A 蛋白在宫颈上皮内瘤变中表达强度的结果分析 病检结果中诊断为宫颈上皮内瘤病变共 54 例, CIN1 级中 P16INK4A 蛋白的表达率为 34.6%, 主要以弱阳性 (+) 表达为主; CIN2 级 P16INK4A 蛋白的表达率为 88.2%, 以中度阳性 (++) 表达为主; CIN3 级 P16INK4A 蛋白的表达率为 100%, 以中度阳性 (++) 和强阳性 (+++) 为主. P16INK4A 蛋白在宫颈上皮内瘤变的 CIN1 组、CIN2 组、CIN3 组中的阳性表达强度差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 并随着宫颈上皮内瘤变的级别升高, P16INK4A 蛋白的表达强度逐渐增强, 呈线性相关 ($R = 0.397$, $P < 0.05$). P16INK4A 蛋白在宫颈上皮内瘤变, 各级别中的检测结果见表 3. P16INK4A 蛋白在 HIV 阳性患者的宫颈组织中的表达见图 1.

表 2 P16INK4A 蛋白在对照组与 CIN 组的表达情况
Tab. 2 The expressions of P16INK4A in the two groups

病理诊断	P16INK4A 蛋白		阳性率 (%)
	阴性	阳性	
对照组 (n = 13)	13	0	0
CIN1 (n = 26)	17	9	34.6
CIN2 (n = 17)	2	15	88.2
CIN3 (n = 11)	0	11	100.0

CIN1 组与 CIN2 组: $\chi^2 = 11.983$, $P = 0.01 < 0.05$;
CIN1 组与 CIN2 组 + CIN3 组: $\chi^2 = 20.053$, $P < 0.05$; CIN2 组与 CIN3 组: $\chi^2 = 1.394$, $P = 0.238 > 0.05$.

表 3 P16INK4A 蛋白在宫颈各级上皮内瘤变中的表达强度列表 (n)

Tab. 3 The expression intensities of P16INK4A in CIN1-3 (n)

病理诊断	P16INK4A 蛋白				合计
	阴性	+	++	+++	
CIN1	17	5	2	2	26
CIN2	2	0	9	6	17
CIN3	0	1	4	6	11
合计	19	6	15	14	54

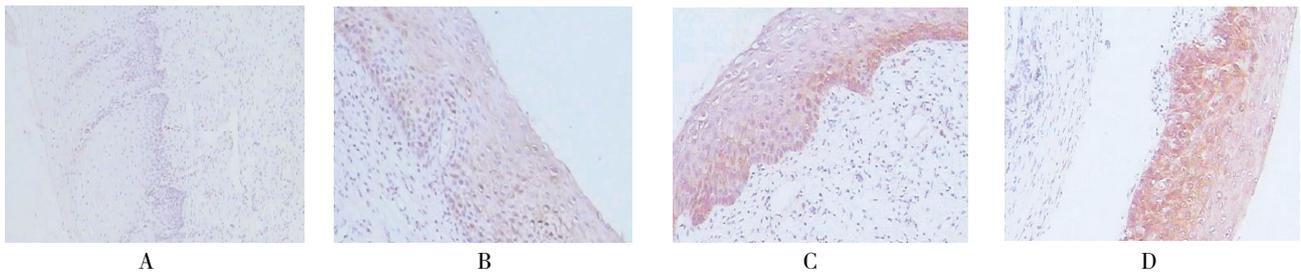


图 1 P16INK4A 蛋白在宫颈组织中的表达

Fig. 1 The expression of P16INK4A in cervical tissue

A:P16INK 蛋白在对照组的表达 (×10); B:P16INK 蛋白在 CIN I 的表达 (×10);
C:P16INK 蛋白在 CIN II 的表达 (×10); D:P16INK 蛋白在 CIN III 的表达 (×10) .

3 讨论

3.1 患者一般资料结果分析

从本研究的问卷调查资料中可以看出, 大多数 HIV 感染妇女文化程度和收入偏低, 其配偶通常是这些妇女感染 HIV 的感染源, 使用避孕套的情况不理想. 67 人中没有人曾经接受过宫颈癌前病变的筛查, 分析原因除了文化程度低和受经济条件限制有关外, 还与该类患者缺乏宫颈癌筛查相关知识, 以及医务人员及社会工作者对宫颈癌相关疾病的宣教工作欠缺等诸多因素.

3.2 艾滋病患者 P16INK4A 蛋白表达与宫颈病变的关系

目前 P16INK4A 蛋白与宫颈癌的关系研究, 已成为近年来宫颈癌的研究热点. P16INK4A 蛋白在宫颈上皮细胞恶性转化前已出现, P16INK4A 在正常宫颈或宫颈炎、CIN1、CIN2-3、宫颈癌组织之间表达水平有差异, 并随着宫颈癌前病变级别进展而增加. Branca 等研究认为 P16INK4A 可以作为高级别上皮内瘤变一个特异性标记物, 其阳性预测值可达到 100%^[13]. Bergeron 等报道, 在研究的 500 例病理切片中, 如将免疫组化 P16 染色与 HE 染色相结合诊断宫颈癌前病变, 诊断精确度将提高 13%^[14], 提示 P16INK4A 异常表达与宫颈癌前病变及宫颈癌的发生发展密切相关, 可作为宫颈上皮的非肿瘤性增生和肿瘤性增生鉴别诊断的标记物, 从而为宫颈癌前病变的诊断和治疗提供了新的研究方向.

尽管对于宫颈组织的 P16INK4A 蛋白的研究已经日趋成熟, 但关于 P16INK4A 蛋白在 HIV 患者中诊断意义的报道还很少, 特别是 HIV 感染妇女宫颈组织 P16INK4A 蛋白的研究国内尚无报道. Kreuter 等的研究评估了 P16INK4A 蛋白在 HIV 感染患者肛门上皮内病变的表达情况, 发现对于高

级别的肛门上皮内瘤变有 100% 的敏感性和 100% 的特异性^[15]. 本课题研究 67 例 HIV 感染患者的宫颈组织标本, P16INK4A 蛋白在对照组、CIN1 级、CIN2 级、CIN3 级的表达率逐渐增高, 在无宫颈上皮内瘤变的宫颈组织中不表达, 低级别宫颈上皮内瘤变 (CIN1 组) 与高级别宫颈上皮内瘤变 (CIN2 组 + CIN3 组) P16INK4A 蛋白的表达率差异有统计学意义, 提示 P16INK4A 蛋白的免疫组化染色能将高级别的宫颈上皮内瘤变从低级别宫颈上皮内瘤变区分出来. P16INK4A 蛋白的表达强度与宫颈病理诊断分级之间有相关性, 随着宫颈上皮内瘤变的级别升高, P16INK4A 蛋白的表达强度逐渐增强, 呈线性相关. 随着病变进展, p16INK4A 表达增强并由细胞浆的散在表达发展为 p16INK4A 细胞核及细胞质共同表达或以细胞核表达为主, 呈现过度表达. 提示 P16INK4A 染色越强宫颈上皮内瘤变的级别越高, 对 HIV 阳性患者的宫颈上皮内瘤变的诊断治疗有一定的价值.

综上所述, P16INK4A 蛋白免疫组化检测是一个与高危型乳头瘤病毒密切相关, 对 HIV 感染妇女宫颈上皮内瘤变仍然具有预测价值, 能将其高级别的宫颈上皮内瘤变区分出来, 对 HIV 感染患者宫颈疾病的进展有预测价值, 同时对临床医师的治疗具有指导作用, 避免过度治疗及治疗不足节约医疗资源.

[参考文献]

- [1] SCHIFFMAN M, CLIFFORD G, BUONAGURO F M. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline [J]. *Infect Agent Cancer*, 2009, 4:8.
- [2] PALEFSKY J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009, 4:52 - 56.

- [3] ADLER D H. The impact of HAART on HPV-related cervical disease[J]. *Curr HIV Res*, 2010, 8:493 – 497.
- [4] NUNES M G, AZEVEDO-E-SILVA M, GONCALVES C P. Human papillomavirus detection and typification in cutaneous and mucosal lesions of HIV-seropositive patients[J]. *Int J STD AIDS*, 2008, 19(9):611 – 616.
- [5] PALEFSKY J M, HOLLY E A. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003, (31):41 – 46.
- [6] ZHANG H Y, TIGGELAAR S M, SAHASRABUDDHE V V, et al. HPV prevalence and cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women in Yunnan Province, China: a pilot study [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(1):91 – 96.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among Adolescents and Adults[J]. *MMWR*, 1992, 41: 1 – 19.
- [8] HEARD I. Prevention of cervical cancer in women with HIV[J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009, 4:68 – 73.
- [9] DE VUYST H, LILLO F, BROUTET N, et al. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2008, 17:545 – 554.
- [10] PARHAM G P, SAHASRABUDDHE V V, MWANAHA – MUNTU M H, et al. Prevalence and predictors of squamous intraepithelial lesions of the cervix in HIV-infected women in Lusaka, Zambia [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 103(3):1 017 – 1 022.
- [11] REUSCHENBACH M, CLAD A, VON KDC, et al. Performance of p16INK4a-cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high grade cervical dysplasia in women with abnormal screening results [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 119(1):98 – 105.
- [12] SANO T, OYAMA T, KASHIWABARA K. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions[J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(6):1 741 – 1 748.
- [13] M, CIOTTI M, SANTINI D. p16(INK4A) expression is related to grade of cin and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2004, 23(4): 354 – 365.
- [14] C, ORDI J, SCHMIDT D. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Am J Clin Pathol*, 2010, 133(3): 395 – 406.
- [15] KREUTER A, JESSE M, POTTHOFF A, et al. Expression of proliferative biomarkers in anal intraepithelial neoplasia of HIV-positive men [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2010, 63(3): 490 – 498.

(2015 – 09 – 06 收稿)

版权声明

本刊已许可中国学术期刊（光盘版）电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文，作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意编辑部上述声明。

《昆明医科大学学报》编辑部