

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.05.012
文章编号: 1005-8982 (2023) 05-0074-05

临床研究·论著

P16/Ki-67 双染联合密封蛋白4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能分析*

程春, 杨玉

[华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院(武汉市妇幼保健院) 妇科一病区,
湖北 武汉 430019]

摘要: 目的 探讨P16/Ki-67双染联合密封蛋白4(CLDN4)检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断价值。
方法 回顾性分析2020年8月—2021年3月在华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院就诊并经宫颈切片病理诊断为低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变及慢性宫颈炎患者各32例, 所有患者均行阴道镜直视下活检, 且所有宫颈阻止标本均经P16/Ki-67双染和CLDN4检测。比较P16/Ki-67双染诊断结果与病理检查诊断结果; 比较CLDN4诊断结果与病理检查诊断结果; 比较P16/Ki-67双染、CLDN4联合诊断结果与病理检查诊断结果。绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能。
结果 P16/Ki67双染用于诊断宫颈高级别上皮内瘤变, 有27例阳性患者与病理检查诊断结果一致, 52例阴性患者与病理活检诊断结果一致, 经一致性检验, 两种诊断方法的一致性一般($\kappa=0.622, P=0.000$); CLDN4用于诊断宫颈高级别上皮内瘤变, 有25例阳性患者与病理检查诊断结果一致, 51例阴性患者与病理检查诊断结果一致, 经一致性检验, 两种诊断方法的一致性一般($\kappa=0.552, P=0.000$); P16/Ki-67双染、CLDN4联合诊断宫颈高级别上皮内瘤变, 有30例阳性患者与病理检查诊断结果一致, 62例阴性患者与病理检查诊断结果一致, 经一致性检验, 两种诊断方法的一致性较好($\kappa=0.906, P=0.000$)。ROC曲线分析结果显示, P16/Ki-67双染、CLDN4及两者联合对宫颈高级别上皮内瘤变诊断的敏感性分别为84.38%(95% CI:0.665,0.941)、78.13%(95% CI:0.596,0.901)、93.75%(95% CI:0.778,0.989), 特异性分别为81.25%(95% CI:0.692,0.895)、79.69%(95% CI:0.674,0.883)、96.88%(95% CI:0.882,0.995), 曲线下面积分别为0.828(95% CI:0.738,0.897)、0.789(95% CI:0.694,0.866)、0.953(95% CI:0.890,0.986)。
结论 P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能较高。

关键词: 宫颈上皮内瘤变; P16蛋白; Ki-67蛋白; 密封蛋白4; 诊断

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Diagnostic value of P16/Ki-67 double staining combined with CLDN4 detection in high grade cervical intraepithelial neoplasia*

Cheng Chun, Yang Yu

(The First Ward of Gynecology, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical college Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, Hubei 430019, China)

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value of P16/Ki-67 double staining combined with claudin 4 (CLDN4) detection in high grade cervical intraepithelial neoplasia (HSIL). **Methods** Retrospective analysis was made on 32 cervical tissue samples from patients with low grade intraepithelial neoplasia (LSIL), HSIL, and chronic cervicitis who were treated in our hospital from April 2020 to March 2021 and were pathologically

收稿日期: 2022-12-14

* 基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目(No:2019CFB112)

[通信作者] 杨玉, E-mail: 568196518@qq.com; Tel: 13163383996

diagnosed as low grade intraepithelial neoplasia (LSIL), HSIL, and chronic cervicitis. All patients underwent colposcopy biopsy under direct vision, and all cervical cut samples were detected by P16/Ki-67 double staining and CLDN4. The results of P16/Ki-67 double staining diagnosis and pathological examination were compared. The results of CLDN4 diagnosis and pathological examination were compared. The results of P16/Ki-67 double staining, CLDN4 combined diagnosis and pathological examination were compared. To analyze the diagnostic value of P16/Ki-67 double staining combined with CLDN4 in cervical HSIL. **Results** P16/Ki-67 double staining was used for the diagnosis of cervical HSIL. There were 27 positive patients and 52 negative patients who were consistent with the results of pathological biopsy. Through the consistency test, the two diagnostic methods were generally consistent ($\kappa = 0.622$, $P = 0.000$). CLDN4 is used for the diagnosis of cervical HSIL. There are 25 positive patients and 51 negative patients who are consistent with the results of pathological biopsy. Through the consistency test, the two diagnostic methods are generally consistent ($\kappa = 0.552$, $P = 0.000$). P16/Ki-67 double staining and CLDN4 combined to diagnose cervical HSIL, 30 positive patients were consistent with pathological biopsy results, and 62 negative patients were consistent with pathological biopsy results. Through consistency test, the two diagnostic methods were consistent ($\kappa = 0.906$, $P = 0.000$). The analysis of the receiver operating characteristic curve (ROC) of the subjects showed that the sensitivity of P16/Ki-67 double staining, CLDN4 and their combination to the diagnosis of cervical HSIL was 84.38% (95% CI: 0.665, 0.941), 78.13% (95% CI: 0.596, 0.901), 93.75% (95% CI: 0.778, 0.989), specificity was 81.25% (95% CI: 0.692, 0.895), 79.69% (95% CI: 0.674, 0.883), 96.88% (95% CI: 0.882, 0.995), and the area under the curve (AUC) was 0.828 (95% CI: 0.738, 0.897), 0.789 (95% CI: 0.694, 0.866), 0.953 (95% CI: 0.890, 0.986), respectively. **Conclusion** P16/Ki-67 double staining combined with CLDN4 detection has a high diagnostic efficiency for cervical HSIL.

Keywords: uterine cervical dysplasia; P16 protein; Ki-67 protein; claudin 4; diagnosis

宫颈癌为我国女性常见恶性肿瘤,其发病率和死亡率分别居妇科恶性肿瘤的第一和第二位^[1-2]。宫颈癌早期症状不明显,其发展过程存在着较长的、可逆的癌前病变期,其演变过程经过以下几个阶段:低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变、早期浸润性癌和浸润性癌。其中,低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变为宫颈癌的癌前病变,低级别上皮内瘤变、部分高级别上皮内瘤变具有一定的可逆性,早期治疗可终止癌症进展,故及早诊断宫颈上皮内瘤变,尤其是高级别上皮内瘤变在宫颈癌的防治中具有重要意义^[3-4]。目前亟需寻找对高级别上皮内瘤变诊断的理想方法。已有研究证实^[5],高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染与宫颈癌的发生、发展密切相关,但并非所有的高危型HPV感染都会发展为宫颈病变或宫颈癌,同时高危型HPV检测无法有效区分低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变、宫颈癌等不同病理阶段。

P16蛋白为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,其高表达提示细胞处于细胞周期的阻滞期。Ki-67蛋白可反映细胞周期进展、增殖活跃。有关研究表明^[6],P16/Ki-67双染有助于识别宫颈病变细胞。密封蛋白4(claudin 4, CLDN4)为紧密连接蛋白家族

的一员,其表达与鳞状细胞癌的发生密切相关,在癌组织中呈高表达^[7]。但目前P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断价值尚不清楚。鉴于此,本研究回顾性分析不同宫颈病变患者的病理标本,探讨P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析2020年8月—2021年3月在华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院就诊并经宫颈切片病理诊断为低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变及慢性宫颈炎患者各32例。患者年龄24~51岁,平均 (35.13 ± 5.95) 岁。纳入标准:组织标本诊断依据《肿瘤病理诊断规范》^[8]进行分类;年龄>20岁;取材前3个月未进行免疫等有关治疗;取材前3d无阴道冲洗、放药;临床资料完整。排除标准:有子宫切除史者;妊娠或哺乳期女性;合并凝血功能障碍或自身免疫系统疾病;合并其他恶性肿瘤;精神或认知功能障碍者。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者及家属签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 P16/Ki67 双染 将所收集患者宫颈组织标本在中性甲醛(4%)中固定,并经脱水、石蜡包埋后切片,使用全自动免疫组织化学分析仪(型号: Benchmark GX, 辽宁汇明国际贸易有限公司)染色,试剂盒购于瑞士 Roche 公司,操作严格依据试剂盒说明书进行,封片、晾干后置于显微镜下观察;P16 定位于细胞质,显棕色;Ki67 定位于细胞核,显红色;当细胞质显棕色且胞核显红色,则判定 P16/Ki-67 双染阳性,单独显色或不显色则判定为阴性。

1.2.2 免疫组织化学法检测 CLDN4 蛋白表达 宫颈病变组织标本用甲醛溶液(10%)固定 24 h,并经石蜡包埋后用切片机(厚度为 4 μm)连续切片后 72℃加热 2 h,依次二甲苯 I、II、III 各脱蜡 10 min;再依次经 100% 乙醇 I、100% 乙醇 II、95% 乙醇及 80% 乙醇水化;3% 过氧化氢 37℃孵育 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 min,重复 3 次;5% 牛血清 37℃封闭 1 h 后倾去血清;加入一抗后 4℃过夜,转至室温 35 min 后 PBS 清洗 3 min,重复 3 次;加入兔二抗 37℃孵育 2 h 后 PBS 清洗 3 min,重复 3 次;加入二氨基联苯胺(DAB)显色液后显微镜下观察反应进度,待合适后自来水终止;苏木精复染细胞核,自来水冲洗,37℃反蓝后干燥过夜,树脂封片;使用荧光显微镜拍照;CLDN4 阳性染色呈棕黄色,表达于细胞膜;依据染色深度进行半定量分析:无色为阴性,淡黄色、棕黄色及棕褐色均判定为阳性。

1.2.3 P16/Ki-67 双染、CLDN4 检测 P16/Ki-67 双染或 CLDN4 检测任一诊断为高级别上皮内瘤变,即为联合诊断为高级别上皮内瘤变。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计数资料以例表示,比较采用 χ^2 检验;采用 Kappa 检验评定诊断方法的一致性, $\kappa > 0.75$ 为一致性较好, κ 为 0.40 ~ 0.75 为一致性一般, $\kappa < 0.40$ 为一致性差;绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P16/Ki-67 双染诊断结果与病理检查结果比较

96 例 P16/Ki67 双染诊断宫颈高级别上皮内瘤变阳性患者 27 例,与病理检查诊断结果一致,52 例

阴性患者与病理检查诊断结果一致,经一致性检验,两种诊断方法的一致性一般($\kappa = 0.622$, $P = 0.000$)。见表 1。

表 1 P16/Ki-67 双染诊断结果与病理检查诊断结果比较

P16/Ki-67 双染诊断	病理检查诊断		总计
	阳性	阴性	
阳性	27	12	39
阴性	5	52	57
总计	32	64	96

2.2 CLDN4 诊断结果与病理检查诊断结果比较

CLDN4 检测用于诊断宫颈高级别上皮内瘤变,96 例患者中,25 例阳性患者与病理检查诊断结果一致,51 例阴性患者与病理检查诊断结果一致,经一致性检验,两种诊断方法的一致性一般($\kappa = 0.552$, $P = 0.000$)。见表 2。

表 2 CLDN4 检测诊断结果与病理检查诊断结果比较

CLDN4 检测 诊断	病理检查诊断		总计
	阳性	阴性	
阳性	25	13	38
阴性	7	51	58
总计	32	64	96

2.3 P16/Ki-67 双染联合 CLDN4 检测诊断结果与病理检查诊断结果比较

96 例患者中,P16/Ki-67 双染、CLDN4 检测联合诊断 30 例宫颈高级别上皮内瘤变,与病理检查诊断结果一致,62 例阴性患者与病理检查诊断结果一致,经一致性检验,两种诊断方法的一致性较好($\kappa = 0.906$, $P = 0.000$)。见表 3。

表 3 P16/Ki-67 双染、CLDN4 检测联合诊断结果与病理检查诊断结果比较

P16/Ki-67 双染、CLDN4 检测联合诊断	病理检查诊断		总计
	阳性	阴性	
阳性	30	2	32
阴性	2	62	64
总计	32	64	96

2.4 P16/Ki-67 双染联合 CLDN4 检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能分析

ROC 曲线分析结果显示,P16/Ki-67 双染、

CLDN4检测及两者联合对宫颈高级别上皮内瘤变诊断的敏感性分别为84.38% (95% CI: 0.665, 0.941)、78.13% (95% CI: 0.596, 0.901)、93.75% (95% CI: 0.778, 0.989), 特异性分别为81.25%

(95% CI: 0.692, 0.895)、79.69% (95% CI: 0.674, 0.883)、96.88% (95% CI: 0.882, 0.995), AUC分别为0.828 (95% CI: 0.738, 0.897)、0.789 (95% CI: 0.694, 0.866)、0.953 (95% CI: 0.890, 0.986)。见表4和图1。

表4 P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能分析

检测方法	敏感性/ %	95% CI		特异性/ %	95% CI		AUC	95% CI	
		下限	上限		下限	上限		下限	上限
P16/Ki-67双染	84.38(27/32)	0.665	0.941	81.25(52/64)	0.692	0.895	0.828	0.738	0.897
CLDN4检测	78.13(25/32)	0.596	0.901	79.69(51/64)	0.674	0.883	0.789	0.694	0.866
联合	93.75(30/32)	0.778	0.989	96.88(62/64)	0.882	0.995	0.953	0.890	0.986

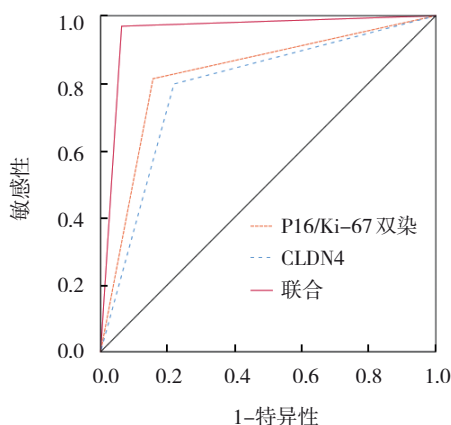


图1 P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变诊断的ROC曲线

3 讨论

宫颈癌为女性生殖道常见恶性肿瘤,主要是由高危型HPV持续感染导致。近年来宫颈癌的发病率有所提高,且有年轻化趋势,故及早对宫颈病变,尤其是高级别上皮内瘤变进行准确诊断,有助于改善患者预后^[9-12]。液基细胞学检查(TCT)是目前临床中筛查宫颈病变的主要手段,但TCT诊断高级别上皮内瘤变的准确性容易受采样等因素的影响,同时TCT检测主要基于细胞形态特征,缺乏组织学特征评估,易受主观因素的影响,故正确率较低^[13]。探讨P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能,对临床宫颈癌的防治具有重要的指导价值。

本研究结果显示,P16/Ki67双染、CLDN4检测单独用于诊断宫颈高级别上皮内瘤变与病理检查诊断结果一致性一般;而P16/Ki-67双染、CLDN4

检测联合诊断宫颈高级别上皮内瘤变与病理检查诊断结果一致性较好。分析可能是由于单一方法对宫颈高级别上皮内瘤变诊断的效能相对较低,P16/Ki-67双染、CLDN4检测两种方法联合诊断可充分发挥各自的优势,弥补不足,故而与病理诊断结果一致性较好。ROC曲线分析结果显示,P16/Ki-67双染、CLDN4两者联合诊断宫颈高级别上皮内瘤变的AUC大于P16/Ki-67双染、CLDN4检测单独诊断的AUC,提示P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能较高。其原因可能为,机体正常生理状态下,P16和Ki-67表达互相制约,处于一种动态平衡状态,不会出现在同一细胞中,两者同时表达表明细胞周期调控失调。其中,P16能够阻止细胞由G₁期进入S期,是一种参与细胞周期调控的抑癌基因,并可通过抑制多种生长调节蛋白的磷酸化过程抑制细胞增殖,P16表达异常为肿瘤发生的早期事件;Ki-67表达与细胞增殖活性有关,其参与肿瘤细胞的发生、发展及浸润转移等过程^[14-17]。此外,P16/Ki-67双染操作简单,无内源生物素干扰,易于观察,有利于对病变组织细胞进行识别。杨旋等^[18]报道,P16/Ki-67双染可提高2级以上宫颈上皮内瘤变的诊断效能,有助于降低误诊率,避免过度治疗,在辅助宫颈病变中的诊断效能较高。CLDN4为上皮细胞之间的一种重要连接复合体,主要由膜周蛋白家族、跨膜蛋白家族等构成,具有维持细胞极性和细胞旁通透屏障等作用^[19];相关研究表明^[20-21],CLDN4在前列腺癌、食管癌组织中高表达,推测CLDN4高表达可能会促进宫颈病变

的发生。狄晨红等^[22]研究也表明, CLDN4与宫颈鳞癌及癌前病变的发生、发展密切相关, 可用于指导宫颈鳞癌、宫颈高级别上皮内瘤变的诊断。故而P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能较高。

综上所述, P16/Ki-67双染联合CLDN4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能较高, 值得在临床中进行推广应用。本研究的不足之处为所纳入样本数量较少, 在后续的研究中还需扩充样本数量, 进一步深入研究。

参考文献:

- [1] LEBRETON M, CARTON I, BROUSSE S, et al. Vulvar intraepithelial neoplasia: classification, epidemiology, diagnosis, and management[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2020, 49(9): 101801.
- [2] 韦玲华, 凌冰, 肖艳菊. 二维超声联合超微血管成像技术在宫颈瘤术前分期诊断中的价值[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(18): 13-17.
- [3] HANADA K, SHIMIZU A, KURIHARA K, et al. Endoscopic approach in the diagnosis of high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia[J]. Dig Endosc, 2022, 34(5): 927-937.
- [4] JENKINS T M, SHOJAEI H, SONG S J, et al. Role of ancillary techniques in cervical biopsy and endocervical curettage specimens as follow-up to papanicolaou test results indicating a diagnosis of atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, or high-grade squamous intraepithelial lesion[J]. Acta Cytol, 2020, 64(1-2): 155-165.
- [5] SAGAMI R, YAMAO K, NAKAHODO J, et al. Pre-operative imaging and pathological diagnosis of localized high-grade pancreatic intra-epithelial neoplasia without invasive carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(5): 945.
- [6] 李健, 刘景旺, 张亚杰, 等. DWI与宫颈癌Ki-67表达的相关性研究[J]. 临床放射学杂志, 2021, 40(1): 97-100.
- [7] OLMOS Y. The ESCRT machinery: remodeling, repairing, and sealing membranes[J]. Membranes (Basel), 2022, 12(6): 633.
- [8] «肿瘤病理诊断规范»项目组. 肿瘤病理诊断规范(卵巢癌及交界性上皮性肿瘤)[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(5): 324-327.
- [9] ROA J C, BASTURK O, ADSAY V. Dysplasia and carcinoma of the gallbladder: pathological evaluation, sampling, differential diagnosis and clinical implications[J]. Histopathology, 2021, 79(1): 2-19.
- [10] 刘欣, 陈少敏, 高冠峰. TERC与p16/Ki-67检测诊断宫颈高级别上皮内瘤变效能比较[J]. 山东医药, 2021, 61(22): 70-73.
- [11] VYAS M, GONZALEZ R S. Anal intraepithelial neoplasia: a review of terminology, differential diagnoses, and patient management[J]. Hum Pathol, 2023, 132: 56-64.
- [12] ZANG L J, HU Y. Risk factors associated with HPV persistence after conization in high-grade squamous intraepithelial lesion[J]. Arch Gynecol Obstet, 2021, 304(6): 1409-1416.
- [13] ALBUQUERQUE A. Cytology in anal cancer screening: practical review for clinicians[J]. Acta Cytol, 2020, 64(4): 281-287.
- [14] VOIDĂZAN S T, DIANZANI C, HUSARIU M A, et al. The role of p16/Ki-67 immunostaining, hTERT amplification and fibronectin in predicting cervical cancer progression: a systematic review[J]. Biology (Basel), 2022, 11(7): 956.
- [15] 金红, 刘圆圆, 张念, 等. p16/Ki-67联合检测对TCT阴性高危型HPV感染者子宫颈病变的诊断价值[J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(9): 1071-1075.
- [16] CANETE-PORTILLO S, VELAZQUEZ E F, KRISTIANSEN G, et al. Report from the International Society of Urological Pathology (ISUP) consultation conference on molecular pathology of urogenital cancers V: recommendations on the use of immunohistochemical and molecular biomarkers in penile cancer[J]. Am J Surg Pathol, 2020, 44(7): e80-e86.
- [17] BARAQUIN A, PÉPIN L, FLOERCHINGER P, et al. New recommendations for cervical cancer screening in France[J]. Ann Pharm Fr, 2022: S0003-4509(22)00120. DOI: 10.1016/j.pharma.2022.09.006. Epub ahead of print.
- [18] 杨旒, 陈飞, 孔令华, 等. p16/Ki-67双染在高级别宫颈上皮内瘤变诊断中的应用价值[J]. 现代妇产科进展, 2021, 30(6): 407-410.
- [19] MEOLI L, GÜNZEL D. Channel functions of claudins in the organization of biological systems[J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020, 1862(9): 183344.
- [20] SINGH R, RATHOD G, MELETHARAYIL G H, et al. Invited review: shelf-stable dairy protein beverages-Scientific and technological aspects[J]. J Dairy Sci, 2022, 105(12): 9327-9346.
- [21] HE S, SINGH D, HELFIELD B. An overview of cell membrane perforation and resealing mechanisms for localized drug delivery[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(4): 886.
- [22] 狄晨红, 金帆. 密封蛋白4与高危型人乳头瘤病毒联合检测对于高级别鳞状上皮内病变及宫颈鳞癌的诊断价值[J]. 浙江大学学报(医学版), 2018, 47(4): 344-350.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 程春, 杨玉. P16/Ki-67双染联合密封蛋白4检测对宫颈高级别上皮内瘤变的诊断效能分析[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(5): 74-78.

Cite this article as: CHENG C, YANG Y. Diagnostic value of P16/Ki-67 double staining combined with CLDN4 detection in high grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(5): 74-78.