

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.030

人乳头状瘤病毒感染与宫颈癌患者临床病理特征和 Ki-67、PCNA 的关系 *

徐 瑶 邓晓杨[△] 吴海燕 周 琴 邓 洁

(成都医学院第一附属医院妇科 四川 成都 610500)

摘要 目的:研究人乳头状瘤病毒(HPV)感染与宫颈癌患者临床病理特征和 Ki-67、细胞增殖抗原(PCNA)的相关性,从而为临床宫颈癌的诊治提供参考依据。**方法:**选取 2016 年 3 月~2018 年 6 月于我院接受手术治疗的宫颈病变患者 130 例为研究对象。其中宫颈癌患者 30 例记为宫颈癌组,宫颈上皮内瘤变患者 68 例记为宫颈上皮内瘤变组,慢性宫颈炎患者 32 例记为对照组。采用免疫组织化学法检测各组宫颈组织中 HPV 感染、Ki-67 以及 PCNA 阳性表达情况,并分析 HPV 与宫颈癌患者临床病理特征的关系及其与 Ki-67、PCNA 的相关性。**结果:**宫颈癌组、宫颈上皮内瘤变组患者 HPV、Ki-67 以及 PCNA 阳性率均高于对照组,宫颈癌组高于宫颈上皮内瘤变组(均 $P<0.05$)。临床分期 III~IV 期以及淋巴结转移宫颈癌患者 HPV 感染率均明显高于临床分期 I~II 期与无淋巴结转移患者(均 $P<0.05$)。经 Spearman 相关性分析可得:宫颈癌患者 HPV 感染与 Ki-67、PCNA 表达均呈正相关关系(均 $P<0.05$)。**结论:**宫颈癌患者存在明显的 HPV 感染,且 HPV 感染与宫颈癌患者临床分期、淋巴结转移、Ki-67、PCNA 表达存在一定相关性,临床可通过对 HPV、Ki-67、PCNA 进行联合检测,从而有助于宫颈癌的早期诊断。

关键词:宫颈癌;人乳头状瘤病毒;临床病理特征;Ki-67;细胞增殖抗原

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2743-04

Relationship between Human Papillomavirus Infection and Clinicopathological Features, Ki-67, PCNA in Patients with Cervical Cancer*

XU Yao, DENG Xiao-yang[△], WU Hai-yan, ZHOU Qin, DENG Jie

(Department of Gynaecology, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan, 610500, China)

ABSTRACT Objective: To study the correlation between human papillomavirus (HPV) infection and clinicopathological features and Ki-67 and Cell proliferation antigen (PCNA) in cervical cancer patients, so as to provide reference for clinical diagnosis and treatment of cervical cancer. **Methods:** A total of 130 patients with cervical lesions, who underwent surgical treatment in First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, from March 2016 to June 2018, were chosen as research subjects and divided into three groups: 30 cases of cervical cancer were recorded as cervical cancer group, 68 cases of cervical intraepithelial neoplasia were identified as cervical intraepithelial neoplasia group, and 32 cases of chronic cervicitis as control group. HPV infection, Ki-67 and PCNA positive expression in cervical tissues of each group were examined by immunohistochemistry. The relationship between HPV and clinicopathological characteristics of cervical cancer and its correlation with Ki-67 and PCNA were also analyzed. **Results:** The positive rates of HPV, Ki-67 and PCNA in the cervical cancer group and the cervical intraepithelial neoplasia group were higher than those in the control group, the above indexes in the cervical cancer group were higher than those in the cervical intraepithelial neoplasia group (all $P<0.05$). The incidence of HPV infection in patients with stage III to IV and lymph node metastasis of cervical cancer were significantly higher than those in stage I to II and no lymph node metastasis (all $P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that there was a positive correlation between HPV infection and the expression of Ki-67 and PCNA in cervical cancer patients ($P<0.05$). **Conclusion:** There is a significant HPV infection in patients with cervical cancer, and there is a certain correlation between HPV infection and the clinical stage, lymph node metastasis, Ki-67 and PCNA expression in the patients with cervical cancer. The combined detection of HPV, Ki-67 and PCNA can help the early diagnosis of cervical cancer.

Key words: Cervical cancer; Human papillomavirus; Clinicopathological features; Ki-67; Cell proliferation antigen

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)14-2743-04

前言

宫颈癌属于临床上最为常见的女性生殖系统恶性肿瘤,其

具体发病机制迄今为止尚未完全明确,且该病发病早期无典型症状,多数患者就诊时已发展至中晚期,错过了手术根治的时机,预后较差^[1-3]。因此,对宫颈癌进行早期有效地诊断具有重要

* 基金项目:四川省教育厅科研项目(17ZA0128)

作者简介:徐瑶(1982-),女,本科,主治医师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail: 44836493@qq.com

[△] 通讯作者:邓晓杨(1972-),女,本科,主任医师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail: 79813642@qq.com

(收稿日期:2018-12-08 接受日期:2018-12-30)

的临床意义,亦是目前国内外研究的热点。随着近年来相关研究的逐渐深入,越来越多的学者发现人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)可能在宫颈癌的发生、发展过程中起着至关重要的作用^[45]。另有研究报道显示,Ki-67与细胞增殖抗原(Cell proliferation antigen,PCNA)在宫颈癌中存在异常表达,可能参与了肿瘤的发生、发展过程^[67]。鉴于此,本文通过研究 HPV 感染与宫颈癌患者临床病理特征和 Ki-67、PCNA 的关系,以期对宫颈癌的早期诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取于 2016 年 3 月~2018 年 6 月我院收治的 130 例宫颈病变患者。纳入标准:(1)所有患者均经组织病理学检查确诊;(2)年龄>20 岁;(3)临床病历资料完整;(4)入院前未接受任何相关治疗者。排除标准:(1)术前接受放化疗治疗者;(2)合并急性妇科炎症或其他合并症者;(3)存在手术禁忌证者;(4)伴有神经系统性疾病或交流沟通障碍者;(5)研究中途因各种原因退出者;(6)合并其他恶性肿瘤者。其中宫颈癌患者 30 例记为宫颈癌组,年龄 20~72 岁,平均(50.32±10.32)岁;临床分期:I~II 期 19 例,III~IV 期 11 例;肿瘤直径 1.3~6.9cm,平均(4.32±1.32)cm;分化程度:低分化 10 例,中高分化 20 例;有淋巴结转移 14 例,无淋巴结转移 16 例。宫颈上皮内瘤变患者 68 例记为宫颈上皮内瘤变组,年龄 21~74 岁,平均(50.18±10.27)岁;宫颈上皮内瘤变 I 期 42 例,宫颈上皮内瘤变 II~III 期 26 例。慢性宫颈炎患者 32 例记为对照组,年龄 22~72 岁,平均(50.27±10.33)岁。三组年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明组间存在可比性。三组患者及其家属均签署了知情同意书,我院伦理委员会已批准。

1.2 研究方法

采用免疫组织化学法检测各组宫颈组织中 HPV 感染、Ki-67 以及 PCNA 表达情况。采用福尔马林液固定三组患者的宫颈组织标本,常规石蜡包埋,采用二甲苯脱蜡,乙醇水化。随后流水冲洗 10 min,蒸馏水反复冲洗 3 次,经由双氧水甲醇溶

液封闭处理 15 min,然后采用 PBS 缓冲液重复冲洗 3 次,每次冲洗时间为 15 min,采用浓度为 0.1%的胰酶处理 HPV 抗体,处理时间为 30 min,再次采用 PBS 缓冲液重复冲洗 3 次,每次冲洗时间为 3 min,放置于室温条件下加入山羊血封闭,静置 15 min 后向其加入一抗,放置于 37℃环境下保存 60 min。随后采用 PBS 缓冲液重复冲洗 3 次,每次冲洗时间 3 min,加入二抗,在同样温度下保存 15 min,再次采用 PBS 缓冲液重复冲洗 3 次,每次冲洗 3 min。最后以 DAB 显色,苏木精复染。待常规脱水处理完成后采用中性树脂胶予以封闭,加入 PBS,以明确的宫颈癌组织作阳性对照。Ki-67 与 PCNA 的免疫组织化学法检测方式与 HPV 感染相同。其中 HPV 抗体与 Ki-67、PCNA 均购自广州安必平医药科技公司。

1.3 评价标准

(1)HPV 阳性判定标准^[8]:①组织染色内部存在棕黄色颗粒;②随机选择 1000 个细胞进行观察,HPV 阳性细胞数占比超过 10.00%。(2)Ki-67 阳性判定标准^[9]:细胞核存在黄色颗粒,随机选择 5 个高倍视野,阳性细胞数占比低于 10%即为阴性,阳性细胞数在 10%以上即为阳性。(3)PCNA 阳性判定标准^[9]:细胞核中存在棕黄色颗粒记为 PCNA 阳性结果,随机选取 1000 个细胞进行观测,PCNA 阳性细胞数占比超过 10%记为阳性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件进行检测分析,计数资料用 "[n(%)]" 表示,采用 "χ²" 检验。计量资料用 "($\bar{x} \pm s$)" 表示,两组间比较实施 t 检验,多组间对比采用单因素方差分析。宫颈癌患者 HPV 感染与 Ki-67、PCNA 表达的关系采用 Spearman 相关性分析。 $P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三组患者 HPV、Ki-67 以及 PCNA 阳性率对比

宫颈癌组、宫颈上皮内瘤变组患者 HPV、Ki-67 以及 PCNA 阳性率均高于对照组,宫颈癌组高于宫颈上皮内瘤变组(均 $P<0.05$),见表 1。

表 1 三组患者 HPV、Ki-67 以及 PCNA 阳性率对比[n(%)]

Table 1 Comparison of HPV, Ki-67 and PCNA positive rates among three groups [n(%)]

Groups	n	HPV positive	Ki-67 positive	PCNA positive
Control group	32	7(21.88)	2(6.25)	6(18.75)
Cervical intraepithelial neoplasia group	68	36(52.94) [#]	40(58.82) [#]	45(66.18) [#]
Cervical cancer group	30	23(76.67) ^{**}	30(100.00) ^{**}	30(100.00) ^{**}
χ ² value	-	20.532	31.951	25.387
P value	-	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, [#] $P<0.05$, Compared with cervical intraepithelial neoplasia group, ^{*} $P<0.05$.

2.2 宫颈癌患者 HPV 感染与临床病理资料关系分析

临床分期 III~IV 期以及淋巴结转移的宫颈癌患者 HPV 感染率均明显高于临床分期 I~II 期与无淋巴结转移患者(均 $P<0.05$),见表 2。

2.3 宫颈癌患者 HPV 感染与 Ki-67、PCNA 表达的相关性分析

经 Spearman 相关性分析可得:宫颈癌患者 HPV 感染与

Ki-67、PCNA 表达均呈正相关(均 $P<0.05$),见表 3。

3 讨论

宫颈癌是临床上最为常见的女性生殖系统恶性肿瘤,发病率与死亡率均较高^[9-11]。患者早期临床表现包括不规则的阴道流血。随着病情的发展,患者可能会出现贫血或其他与肿瘤相

表 2 宫颈癌患者 HPV 感染与临床病理资料关系分析例

Table 2 Relationship between HPV infection and clinicopathological data in patients with cervical cancer

Clinicopathological data		n	HPV infection[n(%)]	χ^2 value	P value
Age (years)	≤ 35	8	6(75.00)	0.017	0.896
	>35	22	17(77.27)		
clinical stages	I ~ II 期	19	12(63.16)	5.286	0.021
	III ~ IV 期	11	11(100.00)		
Tumor diameter(cm)	<4	13	9(69.23)	0.709	0.400
	≥ 4	17	14(82.35)		
Degree of differentiation	Low differentiation	10	7(70.00)	0.373	0.542
	Moderate and highly differentiation	20	16(80.00)		
Lymph node metastasis	Yes	14	14(100.00)	7.989	0.005
	No	16	9(56.25)		

表 3 宫颈癌患者 HPV 感染与 Ki-67、PCNA 表达的相关性分析

Table 3 Correlation Analysis of HPV infection and expression of Ki-67 and PCNA in cervical cancer patients

Related indicators	HPV infection	
	r value	P value
Ki-67 positive	0.732	0.000
PCNA positive	0.693	0.000

关的表现,从而对生命健康安全造成威胁^[12-14]。宫颈癌的发病机制目前尚不十分明确,自 1999 年 Durst 等学者应用核酸杂交技术在宫颈癌组织中检测到 HPV 以来,诸多学者对此方面进行大量研究,认为宫颈癌的发生与 HPV 感染、阴道不规则出血、既往妇科疾病史、孕次数多和产次数多等多种因素有关,而 HPV 感染被认为是宫颈癌发生的首要原因^[15-18]。宫颈病变的发生与 HPV 感染介导的某些基因突变以及细胞增殖活跃有关。Ki-67、PCNA 是临床常用的评价细胞增殖状态的指标,研究表明^[19-21],与细胞增殖相关的标志物在肠癌、胃癌、乳腺癌等恶性肿瘤中均存在异常表达。新近有研究显示^[22],Ki-67 在宫颈癌中亦存在过量表达。以上研究均表明 Ki-67、PCNA 可能参与了宫颈癌的发生、发展,其具体机制仍需进一步研究。

本文结果发现:宫颈癌组患者 HPV、Ki-67 以及 PCNA 阳性率均明显高于宫颈上皮内瘤变组,而宫颈上皮内瘤变组又明显高于对照组,这说明了宫颈癌患者 HPV、Ki-67 以及 PCNA 均存在明显高表达,三者可能在宫颈癌的发生、发展过程中发挥着至关重要的作用。HPV 可能通过影响机体的内源性因素参与宫颈癌的发生、发展,其中 HPV 的 E6、E7 癌蛋白可促使原癌基因激活,抑制基因失活,从而会导致细胞增殖与凋亡的调节异常,最终导致组织癌变。Ki-67 属于临床上应用较为广泛的细胞增殖标志物之一^[23-25]。而 PCNA 属于真核细胞 DNA 复制与核苷酸剪切过程中所需要的一种辅助蛋白,可有效评价细胞增殖状态^[26]。此外,临床分期 III ~ IV 期以及淋巴结转移宫颈癌患者 HPV 感染率均明显高于临床分期 I ~ II 期与无淋巴结转移患者,这表明了 HPV 可能与宫颈癌患者病情严重程度以及预后存在密切相关。分析原因,可能是 HPV 感染的部分主要是患者的皮肤与黏膜上皮细胞,不会进入血液中扩散蔓延,但

会持续存在于染色体外部,处于游离状态,不会导致恶性病变的发生,然而临床分期较晚以及伴有淋巴结转移的患者机体免疫功能明显降低,因此会增加 HPV 感染风险^[27,28]。另外,经 Spearman 相关性分析可得:宫颈癌患者 HPV 感染与 Ki-67、PCNA 表达均呈正相关关系。HPV 感染导致宫颈癌发生、发展的主要机制可能与其通过 E6、E7 基因组整合于宿主细胞的 DNA 中,从而促使宿主细胞肿瘤抑制蛋白的产生与下调有关。Ki-67 主要表达于增殖细胞的细胞核中,且在静止期细胞中无表达,因此其不仅有效用于判断肿瘤的恶性程度,同时可有效评估细胞增殖活性、浸润、转移等生物学行为和预后的关系,由于 Ki-67 在正常宫颈、良性反应性增生等组织中均少量表达,故在鉴别宫颈癌病变时,需与其他标志物联合检测^[29]。而 PCNA 与肿瘤分化密切相关,高危的 HPV 的 E7 癌蛋白使 P21 介导的 CDK 活性与 PCNA 依赖性 DNA 复制产生紊乱,PCNA 表达呈现强阳性,而 PCNA 强阳性预测敏感性高,特异性差,在正常宫颈组织中亦存在表达,单独作为宫颈癌标志物预测效果一般^[30]。这提示了在临床工作中可通过对上述三项指标表达情况进行联合检测,从而有利于早期诊断宫颈癌。

综上所述,宫颈癌患者存在明显的 HPV 感染,且 HPV 感染与宫颈癌患者临床分期、淋巴结转移均有一定相关性。此外,HPV 感染与 Ki-67、PCNA 亦存在正相关关系,在临床工作中可能通过对 HPV、Ki-67、PCNA 进行联合检测,从而达到早期有效诊断宫颈癌的目的,进一步为临床诊治以及预后评估提供指导作用。

参考文献(References)

- [1] Verma J, Dhingra V, Srivastava S, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor expression by a new scoring system in

- head-and-neck squamous cell carcinoma and its association with various pathological prognostic factors [J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2018, 22(1): 11-17
- [2] Dahbi Z, Sbail A, Mezouar L. Sexuality of Moroccan Survivors of Cervical Cancer: A Prospective Data [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(11): 3077-3079
- [3] Hosseini MS, Khosravi D, Farzaneh F, et al. Evaluation of Anal Cytology in Women with History of Abnormal Pap Smear, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Cervical Cancer and High Risk HPV for Anogenital Dysplasia [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(11): 3071-3075
- [4] 洪宏, 孟媛媛, 李岩, 等. 人乳头状瘤病毒分型及病毒载量与宫颈病变的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(9): 1792-1794, 1787
- [5] 吴翠霞, 张艳红, 葛小花, 等. 高危型 HPV 感染与宫颈癌前病变与宫颈癌的相关性研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(11): 2568-2570
- [6] 马莉娟, 何金彩, 荣泽英, 等. 细胞分化抑制因子-1 与细胞增殖核抗原 Ki-67 在宫颈癌中的表达及相关性研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(8): 627-630
- [7] 周淑君, 周洪友, 杨惠芬, 等. 宫颈上皮内肿瘤患者人乳头状瘤病毒感染后增殖细胞核抗原及相关抗原指标变化的分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(14): 3288-3291
- [8] 刘琳, 沈攀, 张力忆, 等. 宫颈病变内高危型 HPV 感染与 Th 细胞分化、细胞异常增殖的相关性 [J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(3): 315-318
- [9] Husaiyin S, Han L, Wang L, et al. Factors associated with high-risk HPV infection and cervical cancer screening methods among rural Uyghur women aged >30 years in Xinjiang[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1162
- [10] 廖媛, 简颖, 罗克枢, 等. 增殖细胞核抗原 67 与胸腺激酶 1 在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌中的表达 [J]. *实用医院临床杂志*, 2017, 14(1): 55-58
- [11] Kaliff M, Sorbe B, Mordhorst LB, et al. Findings of multiple HPV genotypes in cervical carcinoma are associated with poor cancer-specific survival in a Swedish cohort of cervical cancer primarily treated with radiotherapy[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(27): 18786-18796
- [12] Liu H, Wu Y. Long non-coding RNA gastric carcinoma highly expressed transcript 1 promotes cell proliferation and invasion in human head and neck cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6941-6946
- [13] Musa J, Achenbach CJ, Evans CT, et al. Association between patient-reported HIV status and provider recommendation for screening in an opportunistic cervical Cancer screening setting in Jos, Nigeria [J]. *BMC Health Serv Res*, 2018, 18(1): 885
- [14] Costales A, Michener C, Escobar-Rodriguez PF. Radical Trachelectomy for Early Stage Cervical Cancer [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2018, 19(12): 75
- [15] Cheng JX, Yao LL, Xiang H, et al. Cervical cytology ASCUS patients with HPV detection and clinical value [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2016, 43(4): 592-596
- [16] Mapanga W, Girdler-Brown B, Feresu SA, et al. Prevention of cervical cancer in HIV-seropositive women from developing countries through cervical cancer screening: a systematic review [J]. *Syst Rev*, 2018, 7(1): 198
- [17] Jin Y, Choi JW, Kim HJ, et al. Profiling of serum antibodies against human papillomavirus antigens in Korean women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11): 5655-5664
- [18] Lei J, Ploner A, Lagheden C, et al. High-risk human papillomavirus status and prognosis in invasive cervical cancer: A nationwide cohort study[J]. *PLoS Med*, 2018, 15(10): e1002666
- [19] Oleynikova NA, Kharlova OA, Malkov PG, et al. Coexpression of CD44 and Ki-67 in colon's neoplast [J]. *Arkh Patol*, 2018, 80(1): 27-36
- [20] 谢莉莉, 王东林. 乳腺癌患者 HER-2、PCNA 和 E-cadherin 蛋白表达及临床病理特征与预后的相关性[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(18): 2929-2934
- [21] Tao M, Chen S, Zhang X, et al. Ki-67 abeling index is a predictive marker for a pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(51): e9384
- [22] Prigenzi KCK, Heinke T, Salim RC, et al. Dual p16 and Ki-67 Expression in Liquid-Based Cervical Cytological Samples Compared to Pap Cytology Findings, Biopsies, and HPV Testing in Cervical Cancer Screening: A Diagnostic Accuracy Study[J]. *Acta Cytol*, 2018, 62(2): 104-114
- [23] 赵建芳, 石芳. 宫颈癌组织 PCNA、Ki-67 的表达及其与 HPV 感染的相关性研究[J]. *实用癌症杂志*, 2017, 32(11): 1774-1776
- [24] Krtinic D, Zivadinovic R, Jovic Z, et al. Significance of the Ki-67 proliferation index in the assessment of the therapeutic response to cisplatin-based chemotherapy in patients with advanced cervical cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16): 5149-5155
- [25] Liu H, Zhang Y, Chang J, et al. Differential expression of neuroendocrine markers, TTF-1, p53, and Ki-67 in cervical and pulmonary small cell carcinoma[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(30): e11604
- [26] 韦明珠, 赵振华, 孙爱静, 等. 磁共振扩散加权成像与宫颈癌细胞增殖活性 PCNA、Ki-67 表达相关性的研究 [J]. *中华全科医学*, 2017, 15(3): 495-497
- [27] Odunyemi FT, Ndikom CM, Oluwatosin OA, et al. Effect of Nursing Intervention on Mothers' Knowledge of Cervical Cancer and Acceptance of Human Papillomavirus Vaccination for their Adolescent Daughters in Abuja - Nigeria [J]. *Asia Pac J Oncol Nurs*, 2018, 5(2): 223-230
- [28] Cotton S, Brown RE, Nugent EK, et al. Quality Improvement to Demonstrate the Lack of Reliability of the Human Papillomavirus mRNA Assay to Identify Women With Latent Human Papillomavirus Infections[J]. *Obstet Gynecol*, 2018, 131(4): 681-687
- [29] 刘玉艳, 单景军, 董丽, 等. p16/Ki-67 双染和高危型 HPV 检测在高级别鳞状上皮内病变的应用 [J]. *诊断病理学杂志*, 2017, 24(4): 278-280, 287
- [30] 吴英娟. 宫颈癌组织中 HMGB-1、PCNA 的表达变化及临床意义 [J]. *山东医药*, 2015, 55(23): 21-23