

分类号：
学 号：2014409120

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



Krt7 和 p16 在宫颈病变进展中的临床意义

学 位 申 请 人	美丽古丽·莫合买提
指 导 教 师	郭晓青 教授
申 请 学 位 类 别	临床医学硕士
专 业 名 称	妇产科学
研 究 领 域	妇科肿瘤及内镜
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2017年6月

分类号：
学 号：2014409120

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



Krt7 和 p16 在宫颈病变进展中的临床意义

学 位 申 请 人	美丽古丽·莫合买提
指 导 教 师	郭晓青 教授
申 请 学 位 类 别	临床医学硕士
专 业 名 称	妇产科学
研 究 领 域	妇科肿瘤及内镜
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2017 年 6 月

**The clinical significance of Krt7 and p16 in the progression of
cervical lesions**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Meiliguli Mohemaiti,

(Obstetrics and Gynecology)

Supervisor: Prof . Guo xiao-qing

June,2017

石河子大学学位论文独创声明及使用授权声明

学位论文独创声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：美丽丽娜·莫合买提 时间：2017.6.7

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：美丽丽娜·莫合买提 时间：2017.6.7

导师签名：郭映青 时间：2017.6.7

目录

中文摘要.....	I
Abstract	II
英文缩略表.....	III
前言.....	1
材料及方法.....	4
1. 研究材料.....	4
1.1 病例来源.....	4
1.2 研究试剂.....	4
2. 研究步骤:	5
2.1 采用免疫组织化学 EnVision 两步法染色	5
2.2 免疫组化步骤:	5
2.3 免疫组化结果判定	6
3. 统计学处理.....	7
结果.....	8
2.1 慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中 Krt7 的表达情况.....	8
2.2 慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中 p16 的表达情况.....	9
讨论.....	11
全文总结.....	14
参考文献.....	15
文献综述.....	17
作者介绍.....	22
致谢.....	23
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表.....	错误!未定义书签。

中文摘要

目的:探讨 Krt7 和 p16 在宫颈病变进展和临床诊治中的意义。方法:收集 41 例慢性宫颈炎、30 例宫颈低级别鳞状上皮内病变 (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL)、44 例宫颈高级别鳞状上皮内病变(High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL)和 25 例宫颈癌的石蜡标本及临床资料,免疫组织化学法检测石蜡组织中 Krt7 和 p16 的表达,统计分析 Krt7 和 p16 的表达与慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 和宫颈癌的相关性。结果:Krt7 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 和宫颈癌中的阳性表达率呈现逐渐递增的趋势,依次为 24%(10/41)、13%(4/30)、71%(31/44)、88%(22/25),差异具有统计学意义($P<0.05$);Krt7 阳性表达率在 LSIL 与 HSIL、LSIL 与宫颈癌、HSIL 与宫颈癌之间存在统计学差异($P<0.001$),但在慢性宫颈炎与 LSIL 之间没统计学差异($P=0.251$);p16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 和宫颈癌中的阳性表达率呈现逐渐递增的趋势,依次为 39%(16/41)、60%(18/30)、88.6%(39/44)、100%(25/25),差异具有统计学意义($P<0.05$);p16 阳性表达率在慢性宫颈炎与 LSIL, LSIL 与 HSIL, LSIL 与宫颈癌, HSIL 与宫颈癌之间均存在统计学差异($P<0.001$);Krt7 和 p16 均阳性表达者在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的比例分别为 2.44%(1/41)、10%(3/30)、68.18%(30/44)、88.00%(22/25),差异具有统计学意义($P<0.05$)。检测 Krt7、p16 及联合检测 Krt7 和 p16 诊断宫颈病变的 ROC 曲线下面积分别为 0.75、0.70、0.81($P<0.001$)。结论:Krt7 表达阴性的 LSIL,进展为 HSIL 或宫颈癌的风险可能较低,无需临床过多干预治疗;Krt7 表达阳性的 LSIL 进展成 HSIL 或宫颈癌的风险可能较高,应当引起临床重视;联合检测 Krt7 和 p16,可能在临床中能更有效的筛选出进展为 HSIL 的高危人群。

关键词: 宫颈病变; Krt7; p16

Abstract

Objective: To explore the significance of Krt7 and p16 in cervical lesions progression and clinical diagnosis and treatment.

Methods: Paraffin specimens and clinical data of 41 chronic cervicitis tissues, 30 cervical low grade squamous intraepithelial lesion(LSIL)tissues, 44 cervical high grade squamous intraepithelial lesion(HSIL) tissues and 25 cervical cancer tissues were collected, immunohistochemical staining (IHC) was used to detect the expression of Krt7 and p16 in these specimens. Statistical analysis was performed to evaluate the expression levels of Krt7 and p16, and their correlation with chronic cervicitis, LSIL, HSIL and cervical cancer.

Results: The positive expression rates of Krt7 in chronic cervicitis, LSIL, HSIL and cervical cancer were gradually increased by 24% (10/41), 13% (4/30), 71% (31/44), 88 % (22/25), the differences were statistically significant ($P < 0.05$); and the positive expression rate of Krt7 was statistically different between LSIL and HSIL, LSIL and cervical cancer, HSIL and cervical cancer ($P < 0.001$), however, there was no significant difference between cervicitis and LSIL ($P = 0.251$); The positive expression rates of p16 in chronic cervicitis, LSIL, HSIL and cervical cancer were gradually increased by 39% (16/41), 60% (18/30), 88.6% (39/44), 100 ($P < 0.05$), while the difference was statistically significant ($P < 0.05$); The positive rate of p16 in chronic cervicitis and LSIL, LSIL and HSIL, LSIL and cervical cancer, HSIL and cervical cancer were statistically different ($P < 0.001$); The positive rates of both Krt7 and p16 in chronic cervicitis, LSIL, HSIL and cervical cancer were 2.44% (1/41), 3% (3/30), 68.18% (30/44) and 88.00% with significant statistically difference ($P < 0.05$). The area under the ROC curve of Krt7, p16 and combined detection of Krt7 and p16 in the diagnosis of cervical lesions were 0.75, 0.70, 0.81 ($P < 0.001$).

Conclusion: The risk of Krt7-negative progressing to HISL or cervical cancer was low, which is no need for clinical intervention. Moreover, the risk of Krt7-positive developing to HISL or cervical cancer was high, which is need to pay more clinical attention. Compared with Krt7 or p16 respectively, the combined detection of Krt7 and p16 may helpful to patients for clinical screening in potential progressing to HSIL..

Key words: Cervical lesion; Krt7; p16;

英文缩略表

英文缩略词	英文全称	中文全称
ASCCP	American Society of Colposcopy & Cervical Pathology	美国阴道镜和宫颈病理协会
CKC	Cold knife conization	子宫颈冷刀锥切术
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	子宫颈上皮内瘤变
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion	高度鳞状上皮内病变
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
LEEP	loop electrosurgical excision procedure	宫颈环形电切术
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesion	低度鳞状上皮内病变
PIM	papillary immature metaplasia	乳头状不成熟化生

前言

(Preface)

在所有妇科恶性肿瘤中子宫颈癌的发病率高居第二，严重威胁着女性及其家庭的身心健康，子宫颈上皮内瘤变（cervical intraepithelial neoplasia, CIN）是与子宫颈癌密切相关的一组疾病，高危型人乳头瘤病毒（HR-HPV）持续感染是其病因^[1]。当机体长期感染 HPV 并持续长期存在该病毒时，加上长期服用避孕药、长期吸烟等负面因素的刺激，有助于诱导 CIN 疾病的发生及演变^[2]。子宫颈上皮内瘤变分为低度鳞状上皮内病变（Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL）和高度鳞状上皮内病变（High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL），其属于低级别和高级别两种病变，LSIL 主要是机体同时感染有几种 HPV 进而导致移行区域处乳头状不成熟化生（Papillary Immature Metaplasia, PIM）、隆起或扁平性湿疣样变化，或仅单独感染一种 HPV；HSIL 则包括 CIN II 级及 CIN III 级。其中低度病变中扁平湿疣病变是由约 40 多种不同型的 HPV 感染引起的，尖锐湿疣通常由 6, 11 型 HPV 感染引起，低度病变中 HPV 病毒处于复制阶段；而高度病变则伴有限的几种高危型 HPV（18, 16, 31, 45, 56 型）感染。低度病变代表着各种不同质的病变，其感染的 HPV 亚型、克隆性、DNA 倍体性等均不同，大多数可自然消退，很少有继续进展，而高度病变则代表同质性的病变，不易自发消退，更容易发展为浸润癌。故二者在临床上治疗方案是显著不同的。其中高级别病变被认为是子宫颈癌的癌前病变。对子宫颈上皮内瘤变的早期筛查、诊疗采用阴道镜检查、脱落细胞学及组织学测定，实施三阶梯规范化、系统性的诊治方案能够有效的预知细胞癌变。宫颈细胞学检查 TCT 有着较长的临床应用时间、较广的应用范围、花费适中、特异性检测高级别病变等优势。因此，一直以来在宫颈癌疾病的早期筛查中普遍选择细胞学测定法。但因为发展中国家长期缺乏高质量的临床质控及经验丰富的细胞病理学医师，进而严重影响了细胞学检测的效果。早期筛查子宫颈癌的出发点主要在疾病前病变时期（也就是 E6 及 E7 导致宿主细胞间丧失最初的稳态前）便能诊断疾病并采用适当的干预疗法，最终有助于早诊断、早治疗宫颈癌。基于以上背景可知，深入探讨 CIN 及宫颈癌疾病的病变机制、诊疗措施有助于人们更好的防治疾病。HPV 病毒在生育年龄期女性中具有很高的感染率，大约是 15%-40%^[3]。从病毒感染发生发展到宫颈癌前病变，再发展成宫颈浸润癌所需时间较长，很多病人感染 HPV 后并不损害机体健康，仅较少感染病人会演变为宫颈癌，但是当前尚未阐明并尚未研制相关技术去了解感染病毒后病人是否会演变为癌。虽然说诱发宫颈发生病变及甚至发生癌变的原因是感染 HPV，但这并不是唯一的原因，出现病变的关键因素是基因受损者出现不可逆的基因毒性反应，一般情况下，最开始发生的损伤将极易导致大量的基因受损，如果细胞中含有丰富的受损基因后将诱导其恶变，进而导致恶性肿瘤的发生及进一步的发展。提示若能够在发生癌症之前就找

到对应的、能够预测肿瘤出现的标记基因,有助于在临床上早期预防、早期诊断及治疗疾病。

随着子宫颈防癌筛查的规范和广泛应用,子宫颈癌发病率呈下降趋势,但近 10 年来子宫颈上皮内瘤变的检出率总体增加,在我国其发病率低级别病变为 3.1%,高级别病变为 2.5%^[1]。在临床上约 60%子宫颈低级别病变会自然消退,因此可以随访观察,但其中仍有约 13%的低级别病变可进展为高级别病变^[2-6]。宫颈上皮内瘤变作为宫颈癌的癌前病变,若不及时干预将在 5 年左右进展为宫颈癌。高级别病变通常采用子宫颈冷刀锥切术 (CKC) 或子宫颈环形电切除术 (LEEP) 治疗,但子宫颈锥切术后的病变残留率可高达 10.0%^[7],复发率可达 2.8%^[8]。子宫颈锥切术手术范围的大小将影响病变残留和复发的几率,但范围过大、过深将破坏宫颈的结构和机能,导致妊娠后的中晚期流产、早产和胎膜早破等并发症的发生^[9]。国内有学者在手术方式的改进方面取得了一定的进展,如“两刀法”^[10]和“牛仔帽法”^[11]等子宫颈锥切术,术式的改进虽然能够在一定程度上减少病变的残留和复发几率,但仍然不能预测术后病变进展的风险。当前研究数据显示:因为临床上过度治疗 CINI 级疾病导致了逐渐增多的不良反应,如早产、不孕、流产、产后出血、剖宫产率上升、宫颈机能异常等,特别是严重威胁了有生育计划年轻群体的身心健康,该领域成为了研究者们探讨的热点。当前,大部分的 CIN 患者治疗后需要定期门诊随访,消耗大量的医疗资源的同时严重影响患者的身心健康。宫颈疾病的演变过程基本上为由低级上皮内瘤变 LSIL 渐渐进展为子宫颈癌,对 CIN 进行有效的早期诊疗属于预防癌变的关键手段。因此,在临床治疗和随访工作中迫切需要一种有效的客观指标如某种生物标记物,能够预测哪些子宫颈上皮内瘤变更容易发生进展,需要进行手术干预和密切随访。因此判断病人疾病是否演变的主要指标为病理诊断结果。

但临床操作中下列因素极易对病理诊断阶段造成负面影响:送检标本小且受损,镜下观察上皮结构异常;鉴别病变和慢性炎症反应性改变、上皮良性增生和宫颈鳞状上皮化生。研究指出:宫颈鳞状上皮出现的良性增生现象主要类型为鳞状上皮乳头状增生和基底细胞增生,其中后者主要特征是基底层细胞呈规律性的大量复制且体积增大,累及部位主要是鳞状上皮三分之一旁基底及基底细胞,或观察到细胞呈轻微异型,而鳞状上皮化生属于宫颈细胞中的鳞状上皮逐渐将宫颈柱状上皮取代的过程,通常在早期化生时鳞化呈不成熟性,常观察到细胞核变并且染色较深,细胞呈轻微异型性,层次紊乱;因此临床上常混淆上述两者与 CIN 疾病。从病理学特征判断 CIN 级别:1 级中观察其异型细胞仅累及鳞状上皮三分之一;2 级表现为中度的核异型性,有着更多的核分裂多,可累及下三分之二上皮;3 级表现为重度的核异型性,可累及几乎整个上皮,但因为主观因素会影响镜下诊断结果,不同观察者不易取得一致性结果;临床上很难确诊早期阶段的浸润性鳞癌;CIN 疾病的分级及诊断类似于上皮内瘤变,同样依赖于细胞增生、核分裂及核异型性等情况进行判定,伴有的主观性较强^[12]。目前,临床病理医师常用于诊断子宫颈上皮内瘤变及子宫颈癌的生物标记物有 p16ink4^[8]、Ki-67,由于 p16ink4 是与 HPV 感染密切相关的指标,进行回顾性统计数据表明,p16 与 Ki-67 在宫颈组织中的表

达性强, 具有显著的正相关性, 不论是良性反应性改变、上皮内瘤变和癌均有表达, 两者在宫颈上皮的良性反应性改变中基本呈阴性表达, 在 CIN 病变与宫颈癌的组织中阳性强度也随着病变的严重程度而增加, 提示 p16 与 Ki-67 的高表达与宫颈癌的发生"发展有密切关系^[12]。但是 p16 除了在高级别病变和子宫颈癌中表达外, 在低级别病变中也有普遍表达, 因此其对宫颈上皮内瘤变的进展无显著的预测价值^[9-11]。此外, 有学者报道 HPV16 DNA 的甲基化可能是宫颈上皮内瘤变进展的潜在生物标记物^[13], 但该方法实验过程复杂, 其有效性有待进一步验证, 在短期内尚无法应用于临床实践。当前相关领域的研究者主要从免疫组化因子层面探讨该疾病, 希望通过免疫组化因子分层分流 CINI 疾病, 进而明确 CINI 病变是否会演变为 CINII 或者是 CINIII。

子宫颈癌和 CIN 的好发部位为宫颈鳞柱交界形成的转化区^[14, 15], 那么高危型 HPV 感染哪些类型的细胞, 最终导致 CIN 和宫颈癌? 有学者利用激光显微切割技术将宫颈转化区的鳞状上皮细胞、柱状上皮细胞、鳞柱交界细胞做基因表达谱分析, 发现有 77 个基因差异表达^[16], 研究发现宫颈上皮的胚胎发育进程, 发现在胚胎期 Krt7 (keratin 7) 蛋白表达遍布于整个宫颈上皮细胞, 到成人期其表达仅局限于宫颈鳞柱交界区内一些连续的单层立方样上皮细胞, 推测 Krt7 可能是宫颈表面上皮的胚胎起源标记物^[13]。进一步研究发现, 随着宫颈病变的加重 Krt7 的表达呈现递增趋势, 预示 Krt7 的表达与宫颈高级别病变和宫颈癌的发生、进展密切相关^[17]。宫颈病变和宫颈癌的发生与 HR-HPV 感染相关, 其主要通过干扰细胞的正常周期监测机制, 使细胞获得异常增殖能力而发生恶性转化^[11]。p16 基因位于人第 9 号染色体短臂第 2 区 1 带 (9p21), 属于 cyclin-CDK 复合物的特异性抑制剂, 可直接调控细胞周期^[14]。因此, p16 作为目前临床病理常用的诊断宫颈病变及宫颈癌的生物标记物。但是, p16 除了在 HSIL 和宫颈癌中表达外, 在 LSIL 中也有普遍表达, 因此其对其进展无显著的预测价值^[15, 18]。当前, 国内很少有研究者关注 krt7 是否能够表达于宫颈相关疾病中, 并尚无研究探讨子宫颈癌内 Krt7 的蛋白表达及临床意义, 基于此, 本研究拟通过检测慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 及宫颈癌中 Krt7 的表达情况, 检测 LSIL 中 p16 的表达情况, 为宫颈上皮内瘤变的诊疗和随访寻找可靠的生物标记物。为宫颈癌的早期诊断早期治疗给予新的研究方向。

材料及方法

1. 研究材料

1.1 病例来源

1.1.1 慢性宫颈炎组织组：取自石河子大学医学院第一附属医院自 2013 年 1 月至 2015 年 9 月因子宫肌瘤或子宫腺肌症行子宫全切术的住院病人共 41 例，术前常规行宫颈液基细胞学检查提示炎症反应性改变。患者年龄为 42~69 岁，平均 49.8 岁，上述病人均未伴有其他严重的恶性病变既往史，具有完整的病理学及临床资料。

1.1.2 低级别病变（LSIL）组：搜集石河子大学医学院第一附属医院自 2013 年 1 月至 2015 年 9 月因 CIN1 级行手术治疗，术后病理诊断为宫颈 CIN1 级共 30 例。患者年龄为 20~50 岁，平均 38 岁，上述病人均未伴有其他严重的恶性病变既往史，具有完整的病理学及临床资料。

1.1.3 高级别病变(HSIL)组：搜集石河子大学医学院第一附属医院自 2013 年 1 月至 2015 年 9 月因癌前病变行手术治疗，术后病理诊断为宫颈 CINII 级 14 例，CINIII 级 30 例。患者年龄为 21~59 岁，平均 42 岁，上述病人均未伴有其他严重的恶性病变既往史，具有完整的病理学及临床资料。

1.1.4 宫颈癌组：搜集石河子大学医学院第一附属医院自 2013 年 1 月至 2015 年 9 月因宫颈癌行活检或手术治疗的病人，病理回报均为宫颈癌组织，共 25 例，其中鳞癌 22 例，腺癌/腺鳞癌共 3 例。患者年龄为 28~76 岁，平均 48.8 岁，上述病人均未伴有其他严重的恶性病变既往史，具有完整的病理学及临床资料。

1.2 研究试剂

羊抗兔多克隆抗体 Krt7	购自 Abcam,工作浓度为 1:100 (美国)
羊抗兔单克隆抗体 P16	购自 Abcam,工作浓度为 1:100(美国)
抗体稀释液、TBST 及鼠兔通用二抗	购自基因科技(上海,)
DAB 显色剂	购自 Cell Signaling (美国)
稀盐酸、二甲苯、乙醇	均购自生工有限公司(上海)
APES	购自博士德生物技术有限公司
过氧化氢(30%)	购自展望化工试剂公司(无锡)
防脱片 PBS 缓冲液	购自时代生物科技有限公司(上海)
中性树胶	购自江莱生物科技有限公司(上海)
苏木素	购自科兴生化试剂有限公司(上海)

伊红	购自蓝基生物科技有限公司(上海)
1.3 主要仪器与设备	
莱卡 1512 切片机	购自莱卡公司 (德国)
OLYMPUS 光学显微镜	购自 Olympus optical (日本)
恒温孵育箱 (37~45°C)、 通风橱	均购自中大南海海洋生物技术工程公司 (广东)
染色缸	购自佳伦生物技术有限公司
NN-K653S 微波炉	购自松下 (日本)
-4°C、-20°C冰箱	购自均购自海尔 (上海)
HY-5A 回旋式振荡器	购自国旺实验仪器厂 (金坛市)
Labo Auto clave 压力蒸汽消毒锅	购自 JAPAN, HV-25
电热恒温水浴锅	购自安亭科学仪器厂 (上海)
玻片架	购自三和镇弘澄实验器材厂 (海门)
各规格的移液枪	购自 Eppendoff (德国)

2. 研究步骤:

2.1 采用免疫组织化学 EnVision 两步法染色

免疫组化操作原理如下: 基于免疫学的主要原理研制了免疫组织化学方法, 也称作抗原抗体反应, 通过特异性标记物对抗原或者抗体进行标记, 将两者相结合后产生一定的反应并观察到不同的颜色, 最后完成定量、定位检测。本文通过免疫组化 EnVision 两步法, 也就是把酶与二抗在多聚葡聚糖骨架的作用下形成多聚体, 放大的信号倍数高达 40~50 倍, 该方法可以直接孵育二抗, 从而省略孵育三抗, 且该方式能够同时实现不同抗体的孵育, 并体现出敏感高、操作省时、低背景等优点, 严格按说明操作步骤进行。

根据抗体说明书所写阳性片组织, Krt7 的阳性切片取前列腺癌作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。Krt7 工作液浓度按 1: 100 稀释。

根据抗体说明书所写阳性片组织, p16 的阳性切片取直肠癌作阳性对照用 PBS 代替一抗作阴性对照, p16 工作液浓度均按 1: 100 稀释。

2.2 免疫组化步骤:

(1) 常规脱蜡, 玻片入烤箱 62°C, 烤片 120 min。

(2) 石蜡切片入二甲苯I 5 min, 二甲苯II 5min, 二甲苯III 5min, 无水酒精、90% 酒精、80% 及 70% 酒精中分别处理 5min。经自来水重复洗涤 3 遍。

(3) 使用微波炉加热修复液（枸橼酸缓冲液，PH6.0 或 EDTA，PH9.0），高火处理 8min，高中火处理 5min。置于常温下液体冷却后，经自来水重复洗涤 3 遍。

(4) 切片放入 3%的 H₂O₂-蒸馏水溶液，（1:9）以阻断内源性过氧化物酶活性，室温下孵育 10 min。自来水冲洗三次。

(5) PBS 浸洗 3 次×5min，擦去多余的 PBS 液，每张切片上滴加 150 μl 一抗（空白对照组加 PBS），孵育（放入 4℃冰箱过夜）。放置室温 5 分钟。

(6) PBS 浸洗 3 次× 5min。

(7) 擦去多余的 PBS 液，每张切片滴加 150-200 μL 的鼠兔通用二抗（二抗 基因科技 公司，批号 GK600705A ），37℃温箱孵育 30 min。

(8) PBS 浸洗 3 次×5 min。

(9) 每张切片滴加 150-200μL 新鲜 DAB 溶液（现配现用），显微镜下观察，显微镜下控制显色 2-5min，自来水充分冲洗，当抗体能准确标记阳性处后将显色终止。

(10) 置于苏木素染液中复染处理 3 min，经自来水重复洗涤 3 遍

(11) 置于酸酒精内分化处理 6~10s，经自来水重复洗涤 3 遍。再浸泡至自来水内 3 min，70%酒精 5min、80%酒精 5min、90%酒精 5min、无水酒精 5 min，二甲苯 I 5 min，二甲苯II 5 min。置于通风的地方将其晾干。

(12) 中性树胶封片。

2.3 免疫组化结果判定

通过免疫组化 EnVision 两步法测定 Krt7 和 p16 的表达水平，在专业老师的帮助下完成实验的所有操作，并邀请对本病理学检测结果不知情的两位病理老师单独评估结果。Krt7 蛋白的显色部位定位为细胞浆，呈棕黄色或棕褐色，即为阳性。p16 蛋白的表达部位定位位于胞浆和（或）胞核，当呈棕黄色或棕褐色，即可判定为阳性。采用半定量积分判定结果，光镜下按每高倍镜（×400）视野阳性细胞百分比计分：0 分指的是阳性细胞数在 5%以下，1 分是指 5~25%，2 分是指 26~50%，3 分是指 51~75%为，4 分是指阳性细胞在 75%以上。依照细胞染色的不同强度将结果分为：淡黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分；两种计分的乘积表示具体的阳性强度：(-)记作 0 分，(+) 记作 1~4 分，(++)记作 5~8 分，(+++)记作 9~12 分，(++)及 (+++) 判定为阳性结果，其中 (-) 为阴性组，(+) 为 弱阳性组，而 (++)/(+++) 表示属于强阳性组。全部切片的评阅通过两位病理学老师完成，当其意见不统一时便邀请第三位评审专家，并明确评估结果。

3. 统计学处理

所有数据的统计分析使用 SPSS20.0, 计算各组阳性率, 计数资料用率、百分比表示, 两两比较的数据校正使用非参数检验分析, 进行各组间差异性比较, 筛检价值评价采用受试者工作特征曲线 (ROC)。数据用“均数±标准差”表示, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

结果

(Results)

2.1 慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中 Krt7 的表达情况

通过免疫组化 EnVision 两步法分别检测慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中 Krt7 的表达情况。Krt7 表达于胞浆，阳性表达呈浅棕、深棕色(图 1)，慢性宫颈炎组织共 41 例，阳性表达 10 例(弱阳性 10 例，中度阳性 0 例，强阳性 0 例)，阴性表达 31 例；LSIL 组织共 30 例，阳性表达 4 例(弱阳性 4 例，中度阳性 0 例，强阳性 0 例)，阴性表达 26 例；HSIL 组织共 44 例，阳性表达 31 例(弱阳性 14 例，中度阳性 7 例，强阳性 10 例)，阴性表达 13 例；宫颈癌共 25 例，阳性表达 22 例(弱阳性 2 例，中度阳性 2 例，强阳性 18 例)，阴性表达 3 例(均为宫颈腺癌)。在大多数宫颈炎及 LSIL 中不显色，随着病变的加重，胞浆中的显色表达逐渐加深，图 1 中的 HSIL 和宫颈癌中显色呈递增，说明 KRT7 在高级别病变中显色，亦在有可能进展为高级别病变的低级别病变中显阳。Krt7 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 和宫颈癌中的阳性表达率呈现逐渐递增的趋势，依次为 24%(10/41)、13%(4/30)、71%(31/44)、88%(22/25)，各组间具有统计学差异($P<0.05$)；Krt7 阳性表达率在 LSIL 与 HSIL，LSIL 与宫颈癌，HSIL 与宫颈癌之间存在统计学差异($P<0.001$)；慢性宫颈炎与 LSIL 的 Krt7 阳性率没有统计学差异($P=0.251$)(表 1)。

表 1: Krt7 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的表达情况

Tab.1 Expression of Krt7 in chronic cervicitis, LSIL, HSIL, cervical cancer

分组	效果				阳性率 (%)	U 值	P 值
	—	+	++	+++			
慢性宫颈炎	31	10	0	0	24.4	547.00 ^a	0.251 ^a
LSIL	26	4	0	0	13.3	249.00 ^b	<0.001 ^b
HSIL	13	14	7	10	70.5	277.50 ^c	<0.001 ^c
宫颈癌	3	2	2	18	88.0	550.00 ^a	<0.001 ^a

注: a:与 LSIL 相比, b: 与 HSIL 相比, c: 与宫颈癌相比

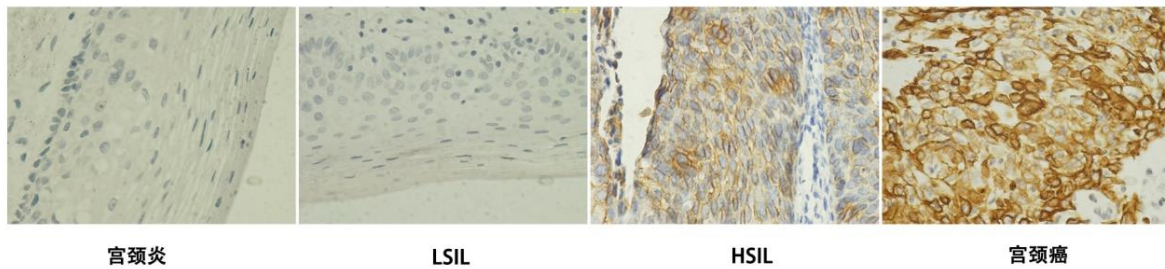


图 1 IHC 检测 Krt7 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的表达。×400

Figure 1 The expression of Krt7 was detected by IHC

2.2 慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中 p16 的表达情况

通过免疫组化 EnVision 两步法分别检测慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中 p16 的表达情况，镜下观察 p16 主要表达于胞核和（或）胞浆，呈浅棕、深棕色(图 2)。慢性宫颈炎组织共 41 例，阳性表达 16 例(弱阳性 13 例，中度阳性 3 例，强阳性 0 例)，阴性表达 25 例；LSIL 组织共 30 例，阳性表达 18 例(弱阳性 9 例，中度阳性 7 例，强阳性 2 例)，阴性表达 12 例；HSIL 组织共 44 例，阳性表达 39 例(弱阳性 8 例，中度阳性 3 例，强阳性 28 例)，阴性表达 5 例；宫颈癌共 25 例，阳性表达 25 例(弱阳性 0 例，中度阳性 0 例，强阳性 25 例)，阴性表达 0 例。在部分宫颈炎及大多数低级别病变中普遍有显色，随着病变的加重，胞核和(或)胞浆中的显色表达逐渐加深，图 2 中的慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 和宫颈癌中显色呈递增，说明 p16 在高级别病变级和癌中显色，在炎症及低级别病变中也有普遍显色。p16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 和宫颈癌中的阳性表达率呈现逐渐递增的趋势，依次为 39%(16/41)、60%(18/30)、88.6%(39/44)、100%(25/25)，各组间具有统计学差异($P<0.05$)；p16 阳性表达率在慢性宫颈炎与 LSIL，LSIL 与 HSIL，LSIL 与宫颈癌，HSIL 与宫颈癌之间均存在统计学差异($P<0.001$)(表 2)。

表 2: P16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的表达情况

Tab.2 Expression of p16 in chronic cervicitis, LSIL, HSIL, cervical cancer

分组	效果				阳性率 (%)	U 值	P 值
	—	+	++	+++			
慢性宫颈炎	25	13	3	0	39.0	438.00 ^a	0.023 ^a
LSIL	12	9	7	2	60.0	272.50 ^b	<0.001 ^b
HSIL	5	8	3	28	88.6	350.00 ^c	0.001 ^c
宫颈癌	0	0	0	25	100.0	25.00 ^a	<0.001 ^a

注：a: 与 LSIL 相比，b: 与 HSIL 相比，c: 与宫颈癌相比

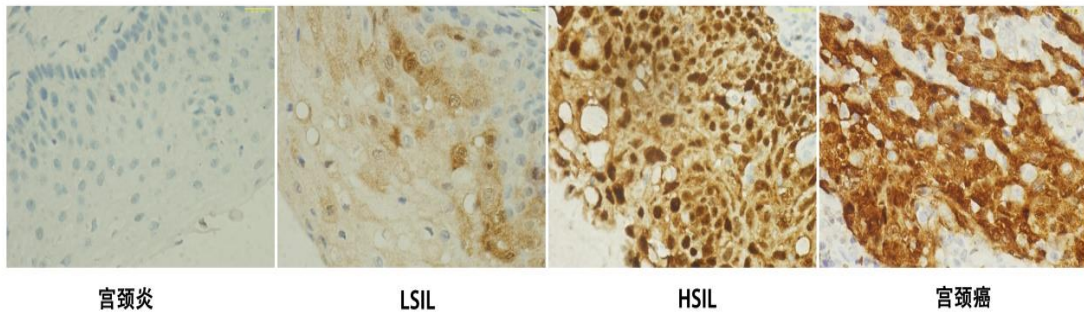


图 2: p16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的表达情况。×400

Figure 2 The expression of p16 was detected by IHC

表 3: Krt7 和 p16 均阳性在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的阳性表达率

Tab.3 The positive rates of both Krt7 and p16

分组	Krt7(+) p16(+)	例数	百分比 (%)	χ^2 值	P 值
慢性宫颈炎	1	41	2.44	73.91	<0.001
LSIL	3	30	10.00		
HSIL	30	44	68.18		
宫颈癌	22	25	88.00		

Krt7 阳性诊断宫颈病变的 ROC 曲线下面积为 0.75; p16 阳性诊断宫颈病变的 ROC 曲线下面积为 0.70; Krt7 和 p16 均阳性诊断宫颈病变的 ROC 曲线下面积为 0.81。

表 4: Krt7 和 p16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的 ROC 曲线

Tab.4 The positive rates of both Krt7 and p16

分组	ROC 面积	标准误	CI(95%)	P 值
Krt7	0.754	0.049	(0.658, 0.849)	<0.001
P16	0.704	0.049	(0.608, 0.799)	<0.001
Krt7+p16	0.813	0.046	(0.723, 0.903)	<0.001

讨论

(Discussion)

子宫颈癌是全球女性最常见的妇科恶性肿瘤之一，全球每年新发近 53 万宫颈癌患者，在全部的肿瘤疾病中所占比例高达 9.8%，其中死亡病例约 30 万人，大部分为亚洲人，该疾病对女性身心健康有着巨大的威胁，并且不同国家及地区其有着不一致的患病率、死亡率。据统计，发展中国家该病的病例数约为 78%，在所有新患肿瘤疾病中所占比例为 15%。全球各个国家发生的子宫颈癌病例数有着较大的差异，子宫颈癌成为了很多地区导致女性死亡的主要原因，如在非洲东部、中部及西部，南亚，中美洲，美拉尼西亚等^[1]。在我国子宫颈癌的发病率也较高，每年新发患者为 13 万左右，其中大概 5 万人因该病死亡。并且我国有些西部或中部地区该病的发生呈不断上升趋势。

至今，研究者们尚未明确子宫颈癌的确切病因，研究者表示可能与下列因素存在一定的关联：微生物感染（支原体或病毒等）、经济条件、分娩次数及性因素、人体免疫状况等，但其中感染 HPV 为诱导宫颈癌变的主要原因，但是感染 HPV 后并不是所有人都将演变为宫颈癌疾病，还需要其他因素的协同效应^[5]。子宫颈癌的发生还和遗传因素、生物学因素、营养因素及行为因素等密切相关。下列为主要的生物学因素：通过覃焯^[19]等研究者检测宫颈癌、CIN 病人的生殖道病原体，结果显示：相比于正常组，病人具有更高水平的单纯疱疹病毒 2 型（简称 HSV-2）、生殖道人乳头状瘤病毒、细菌性阴道病、沙眼衣原体及感染滴虫的比例，提示生殖道感染与宫颈病变间有着紧密的关联。行为因素：①首次性行为在 20 岁以下；②性伴侣数超过 2 个；③初次妊娠在 21 岁以下；④怀孕次数超过 3 次；⑤被动或者主动吸烟；⑥接受教育在年限 9 年以下；⑦绝经。从某种角度来看，若经济条件落后、过早年龄的性生活、不注重个人卫生、结婚早育、缺乏营养、防病意识淡薄等因素，以上因素相互作用可能为宫颈癌疾病在发展中国家经济落后区域发病率较高的关键因素。

子宫颈癌的发病机制错综复杂，当前普遍认为其病理学发展过程为正常宫颈组织→宫颈炎→宫颈上皮内瘤样变→子宫颈癌。宫颈上皮内瘤变是宫颈癌的癌前病变，如早期发现宫颈发生的病变并采取有效的治疗措施能预防宫颈癌的发生，可大幅度提高患者的治愈率及降低患者的死亡率，据相关统计分析：早期宫颈癌的治愈率在 90% 以上，晚期则疗效会明显下降。及时有效的合理的治疗可以降低宫颈癌的发病率。一般情况下，根据 CIN 具有不同的病变程度可分成下列 3 类：CINI、CINII 及 CINIII 型，且病变程度不同采取的治疗措施也具有差异。美国阴道镜病理协会（简称 ASCCP）与美国病理学会（简称 CAP）共同指出，将宫颈病变采用两级命名法分为低级别鳞状上皮内病变 (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) 和高级别鳞状上皮内病变 (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL)。LSIL 和 HSIL 的精准分级，对于临床治疗决策至关重要^[13]。前者包括 CINI 级，后者包括 CINII 级和 CINIII 级。当前 CIN 的

确诊依赖于组织学病理检测结果,对宫颈标本的诊断应该行 HE 染色,但值得注意的是,同样有很多标本无法经 HE 染色法给予确诊。其中最关键的原因因为病理科医师不同其评估结果通常具有差异性,统计数据表明:两个病理医师同时诊断 CIN1 级时仅达到 64% 的一致性,在诊断 CINII 级中取得了低于 50% 的一致性^[4]。临床上为了提升诊断 CIN 时的重复性及一致性,有关研究者提议应选择特异性的指标对结果进行补充,现临床常用 Ki67、P16 或两者联合反映宫颈上皮内瘤变的病变程度。

目前,随着子宫颈防癌筛查的规范和广泛应用,子宫颈癌发病率呈下降趋势,但近 10 年来 CIN 的检出率总体增加,几乎所有的子宫颈上皮内瘤变患者治疗后需要定期门诊随访,消耗大量的医疗资源的同时严重影响患者的身心健康。在宫颈病变中,CIN1 (LSIL) 的诊疗随访让妇产科医师陷入两难。首先,将 CIN1(LSIL)与 CIN2 (HSIL) 明确诊断对于疾病管理至关重要。其次,诊断后应如何随访。有研究表明 LSIL 两年或更长时间有 4-13% 发展为 HSIL 的风险^[3,4]。此外,研究表明,阴道镜不能准确评估 LSIL 进展为 HSIL 的风险。所以对 CIN 进行更准确的分级,对于临床治疗决策至关重要。在子宫颈癌、癌前病变内找到一类敏感性高、特异性强的肿瘤生物标志物,有助于临床上更好的对该病开展早期诊断、明确症状、评估预后等。很多研究指出 P16iNK4A 表达于宫颈病变内和机体感染 HPV 存在密切的联系,其能够充当宫颈癌变机制是否启动的基因标志物。P16ig4A 在不同的疾病中有着不一致的表达水平,并伴随着不断演变的癌前病变等级而变化,相关的研究指出 P16 基因在宫颈癌疾病中扮演了重要的角色,能够充当诊断宫颈癌前病变及早期宫颈癌的辅助生物分子标志物,有助于诊断 CIN。宫颈癌前病变演变为宫颈癌大概需要 3~5 年,CIN 阶段除了表现出宫颈细胞形态学的相应改变,并且细胞的分子生物学特征也发生一定的变化,提示可以从分子层面探讨高效的标志物进而更好的诊疗肿瘤疾病。该实验分析 Krt7、P16 基因在各类宫颈病变组织内的水平差异性、及两者充当生物标志物在临床上发挥的功效,为筛查及诊断癌前病变、子宫颈癌疾病提供充分的研究数据。

Krt7(角蛋白 7)是角蛋白基因家族的成员,由 II 型细胞角蛋白由碱基或中性蛋白组成,其在成熟的简单和分层上皮组织分化期间共表达的异型角蛋白链排列^[11]。这种 II 型细胞角蛋白在内脏器官腔和腺管和血管中的简单上皮中特异性表达。例如,肺和乳腺的上皮细胞均含有表达 Krt7,但是结肠和前列腺的上皮细胞不表达。Michael Herfs 等^[10,11]发现 Krt7 的表达与 HSIL 和宫颈癌的发生、进展密切相关。本研究发现 Krt7 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的阳性表达率呈逐渐递增趋势,这与 Michael Herfs 的研究结果相符。此外,统计分析发现 Krt7 在慢性宫颈炎与 LSIL 的阳性率没有统计学差异,在 LSIL 与 HSIL,LSIL 与宫颈癌、HSIL 与宫颈癌具有统计学差异。同时,在阅片过程中,Krt7 表达阳性的 LSIL 更倾向于诊断为 HSIL,Krt7 阴性 HSIL 的更容易被诊断为 LSIL。因此,本研究推测 Krt7 对宫颈病变的治疗随访具有指导意义。但是,结合临床资料统计发现 Krt7 在 3 例宫颈腺癌中均不表达,因此将该标记物用于预测宫颈腺癌病变进展的作用仍存在缺陷。

P16 属于抑癌基因的范畴, P16INK4 是其表达产物(简称 P16), 为一种抑制蛋白。如果机体内外致癌因子和细胞相互作用时, 有助于诱导 P16 基因出现缺失或突变等, 导致 P16 基因丧失活性, 促进细胞大量分裂, 细胞表现出异型改变特征, 最后生成大量的肿瘤细胞。大量的研究指出: 在人超过 50% 原发性肿瘤及细胞系内均能检测到异常表达的 P16 基因及其对应蛋白。机体感染 HPV 病毒为 CIN 及宫颈癌的关键致病因子, 其机制是病毒能够在宿主细胞 DNA 内进行重新整合, 进一步诱导基因突变, 引起疾病的出现及演变。高危型 HPV 有助于 pRb 结合于 E7 蛋白, 进而观察到 pRb 失活, 无法抑制 P16 的表达, P16 便大量表达, 对细胞增值产生刺激效应, 诱发宫颈病变。还有研究指出: P16 这种辅助诊断宫颈病变疾病的基因标志物, 其可信度较高, 但仅应用 P16 有助于对高级别 CIN 进行诊断, 但却不敏感低级别鳞状上皮内瘤变或者炎症性病变。

在实际临床工作中, 诊断为 LSIL 后需门诊定期随访 1 年, 若诊断为 HSIL 则需据患者年龄和具体情况而进行手术切除或严密随访, 但是切除手术 (宫颈冷刀锥形切除术或者环行电凝切除术) 将导致术后妊娠早产风险升高^[17]。在我国, LSIL 有 4-13% 发展为 HSIL 的风险^[2-6], 然而常用的阴道镜和 HE 染色并不能评估 LSIL 进展为 HSIL 的风险。目前, p16 作为临床病理常用的诊断宫颈病变及宫颈癌的生物标记物^[20], 但其除了在 HSIL 和宫颈癌中表达外, 在 LSIL 中也有普遍表达, 因此对其进展无显著的预测价值^[21, 22]。此外, 有学者报道 HPV16 DNA 的甲基化可能是宫颈病变进展的潜在生物标记物, 但该方法实验过程复杂, 其有效性有待进一步验证, 在短期内尚无法应用于临床实践。本研究通过应用免疫组织化学 EnVision 两步法对 41 例慢性宫颈炎、30 例 LSIL、44 例 HSIL、25 例宫颈癌组织中 Krt7 的表达情况进行检测, 发现 Krt7 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL、宫颈癌中的阳性表达率依次升高, 这与 Michael Herfs 的研究结果相符。结合本研究表明 p16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 及宫颈癌中表达率逐渐升高, 其可能与 HSIL 和宫颈癌的进展相关。

综上所述, Krt7 表达阴性的 LSIL, 进展为 HSIL 或宫颈癌的风险可能较低, 可能无需临床干预; Krt7 表达阳性的 LSIL 进展成 HSIL 或宫颈癌的风险可能较高, 应当引起临床重视; 但本研究中 Krt7 在 3 例宫颈腺癌中均不表达, 由于入组病例较少, 因此需进一步扩大样本量, 以判断该标记物在预测宫颈腺癌进展中的作用。而 p16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 及宫颈癌中表达率逐渐升高, 其可能与 HSIL 和宫颈癌的进展相关。

全文总结

在所有妇科恶性肿瘤中子宫颈癌的发病率高居第二，严重威胁着女性及其家庭的身心健康。如早期发现宫颈发生的病变并采取有效的治疗措施能预防宫颈癌的发生，可大幅度提高患者的治愈率及降低患者的死亡率。

Krt7 具有重要的生物学功能，包括细胞骨架重构、DNA 复制、细胞周期调控及基因表达的调节，国外有学者发现，Krt7 可能是宫颈表面上皮胚胎源性干细胞标记物，结合本研究结果，推测 Krt7 表达阳性的细胞一旦发生病变，最终进展为宫颈癌前病变甚至宫颈癌的可能性较高，但本研究中 Krt7 在 3 例宫颈腺癌中均不表达，由于入组病例较少，需进一步扩大样本量，以判断该标记物在预测宫颈腺癌进展中的作用。

本研究中发现，p16 在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 及宫颈癌中表达率逐渐升高，提示 p16 可能与 HSIL 和宫颈癌的进展密切相关。目前，p16 是临床病理诊断宫颈病变的常规检测指标，因此在本实验中，我们联合检测 Krt7 和 p16 在不同级别宫颈病变组织中的表达，结果显示相比单一检测，二者联合检测能更加明显地增加特异性，更有效的筛选预测进展为 HSIL 和宫颈癌的高危人群。

结论：

Krt7 和 p16 可能与 HSIL 和宫颈癌的进展密切相关；联合检测 Krt7 和 p16 可能有助于 HSIL 和宫颈癌的高危人群的预测筛选。

问题与展望：

1. 需要本课题根据病例组寻找合适的对照进行配对设计，减少混杂因素对研究的影响；
2. 继续对已收集病例进行随访，统计分析进展转归；
3. 扩大样本量，收集更全面的病例信息，便于了解 Krt7 和 p16 在宫颈病变进展转归中的预测作用，进一步提升高危人群的预测筛选。

参考文献

(References)

1. Zhao, F.H., et al., *Prevalence of human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia in China: a pooled analysis of 17 population-based studies*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(12): p. 2929-38.
2. Bansal, N., et al., *Natural history of established low grade cervical intraepithelial (CIN 1) lesions*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(3B): p. 1763-6.
3. Chen, E.Y., et al., *Histological 'progression' from low (LSIL) to high (HSIL) squamous intraepithelial lesion is an uncommon event and an indication for quality assurance review*. *Mod Pathol*, 2010. **23**(8): p. 1045-51.
4. Cox, J.T., et al., *Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy*. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. **188**(6): p. 1406-12.
5. Holowaty, P., et al., *Natural history of dysplasia of the uterine cervix*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(3): p. 252-8.
6. Schlecht, N.F., et al., *Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(17): p. 1336-43.
7. Marsh, M., *Original site of cervical carcinoma; topographical relationship of carcinoma of the cervix to the external os and to the squamocolumnar junction*. *Obstet Gynecol*, 1956. **7**(4): p. 444-52.
8. Richart, R.M., *Cervical intraepithelial neoplasia*. *Pathol Annu*, 1973. **8**: p. 301-28.
9. 钱德英, *子宫颈上皮内瘤变治疗过度与不足得失分析*. *中国实用妇科与产科杂志*, 2011(07): p. 515-519.
10. Herfs, M., et al., *A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(26): p. 10516-21.
11. Herfs, M., et al., *Cervical squamocolumnar junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of low-grade squamous intraepithelial lesions*. *Am J Surg Pathol*, 2013. **37**(9): p. 1311-8.
12. 张燕, et al., *p16、Ki-67 在 440 例宫颈病变中的表达及其病理诊断价值*. *诊断病理学杂志*, 2013(03): p. 171-175.
13. Keating, J.T., et al., *Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia*. *Am J Surg Pathol*, 2001. **25**(7): p. 884-91.
14. Negri, G., et al., *p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri*. *Virchows Arch*, 2004. **445**(6): p. 616-20.
15. Khoo, C.M., et al., *Ink4a/Arf tumor suppressor does not modulate the degenerative conditions or tumor spectrum of the telomerase-deficient mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(10): p. 3931-6.
16. Mirabello, L., et al., *Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(6): p. 1412-22.
17. Nasierowska-Guttmejer, A., et al., *Polish recommendations regarding diagnostics and treatment of cervical squamous intraepithelial lesions according to the CAP/ASCCP guidelines*. *Ginekol Pol*, 2016. **87**(9): p. 676-682.
18. Galgano, M.T., et al., *Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(8): p. 1077-87.

19. 覃焯, 王红丽, and 任彤, 宫颈癌及宫颈上皮内瘤病变与生殖道感染的相关性研究. 中华医院感染学杂志, 2014(04): p. 811-813.
20. 梁慧, et al., 高危型 HPV DNA 联合 TCT 在宫颈癌前病变筛查中的诊断价值. 中国妇幼保健, 2011(36): p. 5829-5830.
21. McAdam, M., et al., *Evaluation of a cervical cancer screening program based on HPV testing and LLETZ excision in a low resource setting*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13266.
22. Ogilvie, G.S., et al., *Primary cervical cancer screening with HPV testing compared with liquid-based cytology: results of round 1 of a randomised controlled trial -- the HPV FOCAL Study*. Br J Cancer, 2012. **107**(12): p. 1917-24.
- 19 谭焯, 王红丽, 任彤. 宫颈癌及宫颈上皮内瘤病变与生殖道感染的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, (3): 811-813.
- 20 吴迪. TCT 联合高危型 HPV DNA 检测在宫颈病变筛查中的临床价值[J]. 现代养生, 2015, 18(3): 40-41.
- 21 McAdam M, Sakita J, et al. Evaluation of a cervical cancer screening program based on HPV testing and LLETZ excision in a low resource setting [J]. PLoS One, 2015, 5(10): 145-146
- 22 Ogilvie GS, Niekerk DJ, et al. A randomized controlled trial of human papillomavirus (HPV) testing for cervical cancer screening: trial design and preliminary results (HPV FOCAL Trial). BMC Cancer, 2015, 10(4): 111-120.
- 23 马琛, 彭力, 袁蔓丽. TCT 联合 HPV-DNA 及端粒酶检测在宫颈癌前病变筛查中的应用[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(2): 196-197.

文献综述

(Review)

HPV-DNA 联合 TCT 检查在宫颈病变筛查中的作用及研究进展

美丽古丽·莫合买提（综述），郭晓青（审校）

（石河子大学，新疆 石河子 832000）

【摘要】 宫颈癌是临床治疗疾病中最为常见的女性妇科疾病之一，主要是有恶性肿瘤病变所造成，在全球范围内妇科肿瘤疾病中宫颈癌发病率极高，是仅次于乳腺癌的常见妇科疾病之一。其病变发展的原因呈现多样化因素导致。人类乳头状病毒简称 HPV，这是一种呈现环状结构的双链病毒。处于生育年龄段的女性感染 HPV 后容易引起宫颈发生病变，严重时甚至会诱发宫颈癌。近年来，全球各大医学研究机构研究发现，高危险性 HPV 的连续不断感染是诱发宫颈癌病变发展的主要因素疾病原因。它是宫颈癌发病变前的引发因素之一。对宫颈癌检测诊疗过程中，进行对高危险性 HPV 病毒检查，能最大程度检测出携带 HPV 病毒高危险性人群，HPV 病毒检查在宫颈癌 2 期及宫颈癌三期检查过程中，其检查中敏感和灵敏程度远远优于传统宫颈液基于细胞学检测方法^[2]。高危险性 HPV 病毒检查方法不但是在在宫颈癌疾病检查中有较大作用，在临床诊治宫颈癌，及预防中 HPV 的检查也有极大的作用。

【关键词】 HPV-DNA；TCT；检查；宫颈病变；筛查；研究

宫颈癌是一种因恶性肿瘤病变而引起女性生殖系统常见疾病，相关的医学案例资料证明，宫颈癌患病率呈上升趋势而且病例年轻化增加，引起广大女性朋友高度关注。以对宫颈癌及癌前病变的检查要求也普遍提高^[1-5]。宫颈癌发病前期时间段内，无明显异常症状，这就导致很多处于生育年龄段的女性不重视。使用多种技术方法对宫颈癌的病发前期预警，降低癌变死亡率有着极为重要作用，主要是对高风险性人权，多种检查技术方法可以有效做到互补作用，做到早期检查，早期治疗，提升疾病治愈率、提升广大女性朋友身体健康的目的。最近几年，全球学者对宫颈癌及癌变前期，检测病变的方法进行了详细广泛的分析研究，本文根据相关病例资料及分析研究结果进行综合整理，现报道如下。

1 宫颈病变的发病机制

1.1 宫颈病变基本情况介绍

宫颈癌致病因素及诱发过程到现在医学界也没确定其原因，现阶段，国内外普遍认为是恶性肿瘤产生癌变而引发病变^[6-7]。相关生物科学研究学科已经证明，有有9成以宫颈癌病变都是人类乳头状病毒引起，其中人类乳头状病毒16和18两型和宫颈癌病变关系

紧密相关^[8]。此外通过细胞DNA科学研究发现血管内皮生长因子、原癌基因、hMLH1 基因等病变发展也有紧密连接。在病理学中可以分为三类，单纯性鳞癌、单纯性鳞腺癌及综合性鳞腺癌^[9-10]。宫颈癌病变主要表现为癌变细胞径直蔓延与淋巴细胞迁移，血行迁移不常见。分批的根据是在诊疗确诊为宫颈癌后，根据原发病灶病变面积位置区域，宫颈壁感染程度来断定的^[11]。

2 宫颈病变 TCT 筛查

2.1 TCT 宫颈病变检查技术

TCT 检测方式即是宫颈癌检测中的采用液基薄层细胞检测系统检测宫颈细胞并进行细胞学分类诊断的方法，是一种最近几年比较可续先进技术方法，使用科学先进的液基细胞存放技术与计算机控制缜密的微孔过滤技术，把采集的病体细胞制造成清楚明晰的标本，提升子宫颈上皮组织细胞检测的准确率，使用最新制定描述性诊断方式进行上报，淘汰老旧的巴氏分级法^[12-13]。研究中通过对部分患有宫颈上表皮细胞病变的患者使用 TCT 检测方法，得出与传统巴氏检测法大部分监测点相同，但是传统巴氏检测难以检测到细胞病变，证明 TCT 检测法比巴氏检测法检出率更高^[14-15]。

2.2 与传统巴氏涂片对比优势

TCT 检测法比巴氏检测法更科学检验表现为：首先为液基薄层细胞检测够深入宫颈管深处采取脱落的细胞，所采集的细胞能够全部在保存液体中置放，防止细胞样本遗漏在取材器上，遗漏的细胞样本在取材器上，随着取材器丢弃，细胞样本干燥脱水后死亡^[16]其次采用先进效率高自动制片染色设备生产纸片，纸片质量高，不存在问题，不会出现因细胞样品带有血迹而从新制造采样^[17]。最后液基薄层细胞检测完成了细胞样本单层分割分布技术，杜绝了细胞多层重叠而发生的诊断不准确问题，所制造完成的涂片可以同时完成的细胞样本涂片通过电脑自备图像扫描仪器，实现计算机预览涂片及筛查工作及远程会诊工作^[18]。根据国外相关医学研究案例分析，TCT 检测与传统细胞学检查方式在宫颈癌病变筛查过程中。其检验敏感度及准确性普遍低于传统方式，并且费用昂贵，因此医学研究中极力探讨有效解决方式，以弥补改检测方式不足之处^[19]。

2.3 TCT 检查应用

液基薄层细胞检测作为诊断宫颈癌的主要检测方式，应用已经普遍及广发化，该项检测方式对宫颈癌疾病预测防止有很大帮助作用^[20]。液基薄层细胞检测技术在临床中应用在宫颈癌诊断中，比传统方法有很大优势，在制造涂片过中能有效去除样本细胞杂质，可以直接制造成比较清晰明了的薄层涂片，极大方便了医护人员的对涂片样本的直接观察，提升了细胞样本的清晰度和宫颈癌变细胞的检出率有相当大的帮助^[21]。

3 宫颈癌变筛查 HPV 技术

3.1 人类乳头状病毒基因染色体检测技术

发现使用高危型 HPV 基因染色体技术检测人类乳头状病毒是目前第一种可以确诊人类癌症病变发展的检测方法^[22]。简单明了解释，人体类没有人类乳头状病毒基因染色体，女性身体就不会发生宫颈癌等疾病，宫颈癌也不会得到发展^[23]。人类乳头状病毒和

宫颈癌之间紧密关系已经被普遍关注重视，人类乳头状病毒基因染色体检验技术检验宫颈癌变早期检验方式，是最近几年全球各大医学机构研究分析重点问题，也是最受推崇和极高关注度的新型检测方法之一^[24]。

3.2 诊断标准。

根绝全球医学科研机构及相关权威机构依据相关临床案例合格学术报告文献资料等文件，集合相关领域内专家学者所提出的观点，一致认为，对育龄妇女身体检查是，应当将人类乳头状病毒基因染色体检测到妇科疾病检查项目中，将常规检验方式和人类乳头状病毒基因染色体检验结合运用^[25]。：第一，如出现两种检测方式结果相同时，阴性检验结果，可3年后从新复查。第二，人类乳头状病毒基因染色体检验和常规检查结果不一致时，包括其中任何羡慕单独一项有差异，可以不用马上进行阴道活检。应到在半年到1年后复查，检查结果如果与上次相同，其中某项检查项目有差异，可以进行阴道活检，如此可以避免过度检查和治疗^[26]。

3.3 检测方法

现阶段聚合酶链式反应技术及人类乳头状病毒基因染色体检测技术等都是全球医学机构使用最普遍准确的对女性生殖器官疾病检验的检验方法。相关医学机构在临床诊疗患者采取细胞样本时分别使用聚合酶链式反应技术与杂交捕获2型技术检验，一致认为杂交捕获2型技术比人类乳头状病毒基因染色体检测技术的敏感度和差异性要高，但是，使用人类乳头状病毒基因染色体检验宫颈癌2期与3期时，细胞样本敏感度和差异性要比聚合酶链式反应技术高很多^[27]。所以两种检测方法应答结合补充运用。

3.4 HPV-DNA 诊断优点及其弊端分析

使用人类乳头状病毒基因染色体检验技术对育龄妇女进行检测，对比检测发现，比液基薄层细胞检测技术检测细胞样本敏感度能到60%，差异性97%，人类乳头状病毒基因染色体检验技术检验的敏感度97%，差异性92%。两种检测方法对比结果一目了然，使用是根据病患实际情况来结合使用^[28]。

4. HPV-DNA 联合 TCT 监测意义

人类乳头状病毒基因染色体检验技术在女性宫颈癌及癌变前期检验中检验效果，已经让全球很多医学科研机构发生争议，观点众多。将液基薄层细胞检测技术与人类乳头状病毒基因染色体检验联合使用方法在临床诊疗上被广泛推广和运用，两种检验方法可以有效进行互补，极大提高诊断精度和避免反复诊疗给患者带来的身心痛苦和漏检等问题，在一定程度内，降低较少宫颈癌漏诊几率，一定程度上提升诊断效率^[29]。

综上所述，人类乳头状病毒基因染色体检验技术和液基薄层细胞检测技术在很大程度上推动女性宫颈癌诊断技术发展。未来对人类乳头状病毒基因染色体检验技术深入研究分析，在临床诊疗工作中还需要大量细胞样本进行研究分析证实。此外，不同地区地域内情况不同，如何正确选择合理诊疗宫颈癌方法还需要大量进行研究工作^[30]。

【参考文献】

- [1]李建军,周海清.TCT联合 HPV-DNA 检测在宫颈癌前病变筛查中的价值[J].基层医学论坛,2015, 15(5):662-663.
- [2]Debbie Saslow PhD, et al. AmL III come society guide line for the early Det ectiono fcervi calneo piasiaand CAC ancer J Cain, 2015, 52(6): 342—362.
- [3]宗玫,蔡俊.HPV-DNA 联合 TCT 检查在宫颈病变筛查中的作用[J].中国实用医药,201512(11):69-70.
- [4]王江鱼.分析 HPV.TCT.联合阴道镜在早期宫颈病变筛查中的意义[J].医药卫生:文摘版,2016, 1(10):94-95.
- [5]吴迪.TCT 联合高危型 HPV DNA 检测在宫颈病变筛查中的临床价值[J].现代养生,2015, 18(3):40-41.
- [6]毕倩波.宫颈 TCT 和 HPV-DNA 联合检测在宫颈癌前病变中的诊断意义[J].吉林医学,2015, 12(14):3027-3028.
- [7]齐艳红.宫颈病变筛查中宫颈液基薄层细胞学检查与 HPV DNA 检测的联合应用观察[J].山东医药,2016,56(19):58-59.
- [8]Pimple S, Muwonge R, et al. Cytology versus HPV testing for the detection of high-grade cervical lesions in women from a developing country in Mumbai India [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2016, 108(3):236-239.
- [9]喻垚,郭变琴,罗光丽.液基细胞学与高危型 HPV-DNA 联合检测在宫颈病变筛查中的意义[J].检验医学与临床,2015,12(11):1550-1551.
- [10]罗丹霞,葛俊丽,赵丽莎.HPV 联合 TCT 在宫颈癌前病变筛查中的临床价值分析[J].中国生化药物杂志,2016(10).
- [11]Ogilvie GS, Niekerk DJ, et al. A randomized controlled trial of human papillomavirus (HPV) testing for cervical cancer screening: trial design and preliminary results (HPV FOCAL Trial). BMC Cancer, 2015, 10 (4) :111-120.
- [12]李建军,周海清.TCT 联合 HPV-DNA 检测在宫颈癌前病变筛查中的价值[J].基层医学论坛,2015(5):662-663.
- [13]刘洪波,乔星,王丽梅.TCT 和 HPV-DNA 检测在宫颈癌及癌前病变筛查中的检验结果对比[J].医药卫生:全文版,2016(12):00234-00234.
- [14]廖湘萍,张华冬,杨玉婷.HPV 分型检测联合 TCT 检测在宫颈防癌筛查中的应用[J].国际医药卫生导报,2014,20(9):1283-1285.
- [15]郭梅,肖林,王士磊.HPV-DNA 联合 TCT 检测在宫颈癌病变筛查中的应用价值[J].现代中西医结合杂志,2014,23(19):2146-2148.
- [16]熊炜,陈蓁.TCT 和 HPV-DNA 联合检测在宫颈癌及癌前病变筛查中的应用价值[J].中国计划生育和妇产科,2015(12):45-47.

- [17]宗玫,蔡俊.HPV-DNA 联合 TCT 检查在宫颈病变筛查中的作用[J].中国实用医药,2015, 12(11):69-70.
- [18]纪雪娇,苏红云,杨旸.TCT、HPV-DNA 分型联合阴道镜在宫颈病变筛查中的临床应用分析[J].中国妇幼卫生杂志,2015, 1(4):93-95.
- [19]聂琳,周肖如.探讨 TCT 联合 HPV-DNA 在筛查宫颈病变中的应用价值[J].齐齐哈尔医学院学报,2015(14):2065-2066.
- [20]王化春,徐恩文.662 名女性 TCT 联合 HPV-DNA 在宫颈疾病筛查检测结果探讨[J].医学信息,2015, 26(28):326-326.
- [21]郭延符,程金凤.HPV-DNA 检测与 TCT 及阴道镜联合检查 918 例临床分析[J].世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊,2015(5):129-130.
- [22]田春秀,雷美娜,王晓菊.HPV 基因分型、TCT 检测在社区妇女宫颈疾病筛查中的意义[J].新疆医学,2015, 12(7):855-857.
- [23]王凯,王新萍,管陈安.TCT、HPV-DNA 及阴道镜检查在宫颈病变中的意义[J].现代临床医学,2015, 3(4):276-277.
- [24]秦英明,张秀菊,王维.TCT、HPV-DNA 联合阴道镜检查在宫颈病变诊断中的应用价值[J].中国性科学,2016,25(7):45-47.
- [25]WangSY, YangHW, et al. A surface Plasmon resonance-based system to genotype human papillomavirus [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2015, 200(2):100-105.
- [26]McAdamM, SakitaJ, et al. Evaluation of cervical cancer screening program based on HPV testing and LLETZ excision in a low resource setting [J]. PLoS One, 2015, 5(10): 145-146
- [27]马琛,彭力,袁蔓丽.TCT 联合 HPV-DNA 及端粒酶检测在宫颈癌前病变筛查中的应用[J].检验医学与临床,2016,13(2):196-197.
- [28]Dahlström LA, Ylitalo N et al. Prospective study of human papillomavirus infection and cervical cancer [J]. Int J Cancer, 2015, 127(8):1923-1930.
- [29]Bello BD, Spinillo A, et al. Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: prevalence and impact on the risk of precancerous lesions [J]. J Med Virol, 2016, 81(4):703-712.
- [30]孙茂春,康晓琳.HPV-DNA 联合 TCT 检查对于诊断宫颈疾病的价值及其病理分型研究[J].中国妇幼健康研究,2016,27(5): 102-103.

作者介绍

(Author Biography)

美丽古丽·莫合买提，女，生于 1984 年 3 月，籍贯新疆。2008 年毕业于石河子大学医学院临床医学专业，获医学学士学位。毕业后至今在石河子大学医学院第一附属医院妇产科任职住院医师，2014 年考入石河子大学医学院攻读妇产学专业，主要研究方向为妇科肿瘤及内镜。

在校期间主要参与的研究项目

1. 参加了国家自然科学基金《“ β -hCG-ERK1/2-MMP-2”信号通路在卵巢癌侵袭、转移中的作用研究》(NO:81372305)的部分研究工作
2. 参加了石河子大学高层次人才科研启动项目《卵巢癌资源库的建立、组织芯片制作及相关研究资源库的建立》(NO:RCZX20111)的部分研究工作
3. 参加了教育部人文社科基金项目人力资源和社会保障部留学回国人员科技活动项目《人卵巢上皮性癌细胞及组织中 β -HCG 表达与上皮间质转化的相关性研究》的部分研究工作。

在读期间发表文章：

1. 美丽古丽·莫合买提，彭书敏等，Krt7 和 p16 在宫颈病变进展中的临床意义，石河子大学学报，录用待编
2. 詹光熙，彭书敏，美丽古丽·莫合买提等，人卵巢癌裸鼠卵巢原位移植瘤模型的构建，石河子大学学报，录用待编
3. 彭书敏，王凯，詹光熙，美丽古丽·莫合买提等，MTA3 通过 β -hCG 调控上皮性卵巢癌转移的机制研究，同济大学学报，录用待编

致谢

(Acknowledgements)

转眼间 3 年研究生学习生活即将要结束了，回想起来这三年是自己不断进步，不断学习，收获了很多。在这期间我一直也怀感激，我得到了许多人的关心、爱护和陪伴，才使我顺利完成了硕士学业，在此，我向关心、帮助过的所有老师和同学致以最诚挚的谢意和最美好的祝愿。首先感谢我的恩师郭晓青教授。在导师的严格要求、悉屯、指导巧亲切关怀下完成课题设计、实验实施和论文撰写，老师的为人师表，对事业执着追求的精神及严谨的科研作风给予我极大的鼓舞，将使我终生受益。领会了科研的思维方式，掌握了常用的实验技术，而且还明白了许多待人接物与为人处世的道理，成为学者，首先具有学者应有的道德品质。能成为他的学生是我永生的荣耀。感谢学位点负责人王英红教授及各位妇产科专家、统计学专家张景玉老师及学位点秘书曹文英在我开题、中期检查及毕业答辩过程中的指导与帮助，使我的学业得以顺利进行。感谢石河子大学第一附属医院病理科免疫组化教研室的各位老师，在实验准备及实验顺利进行方面给予的帮助！论文的顺利完成也离不开刘娜老师及彭书敏、詹光熙等同学的帮助，感谢石河子大学第一附属医院妇产科的临床工作的老师们在临床学习阶段及生活中给予的指导和帮助。能够跟大家相处在这样一个团结友爱的大家庭中让我倍感幸福！感谢研办张辉老师、陈洁婷老师、伊莉莎老师、张晓娇老师的关心和支持。感谢我的家人，感谢我的爱人、家人的支持鼓励，他们的支持和宽慰是我前进不竭的动力。

感谢石河子大学对我的悉心栽培，三年的风雨相伴，衷心地祝福他永远年轻而富有活力！感谢 2014 级研究生全体同学，难忘我们共同走过人生中短暂却不平凡的三年学习生活，再次向所有支持过我的老师、同学和朋友们致以衷心的感谢、崇高的敬意和深深的祝福。

美丽古丽·莫合买提

2017 年 3 月 10 日

石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表

研究生姓名	美丽古丽·莫合买提	学制	三年
专业	妇产科学	研究方向	妇科肿瘤
<p>学术评语:</p> <p>本课题研究目的明确,设计合理,研究方法科学。该论文反映了国内外本研究领域最新循证结果,对本学科前沿知识掌握比较全面深刻。论文撰写规范,结构清晰,结果可靠,结论明确。该论文达到硕士学位研究生培养目标的要求,同意参加毕业论文答辩。</p> <p style="text-align: right;">指导教师签字: 郭映青</p> <p style="text-align: right;">2017年6月7日</p>			