

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.01.06

◆ 论著 ◆

# Musashi-2/Ki-67 双染在预测宫颈高度上皮内病变中的价值

周星<sup>1</sup>, 陈雪<sup>1</sup>, 崔磊<sup>2</sup>, 孙吉瑞<sup>1</sup>, 张丙信<sup>1</sup>, 李艺莹<sup>1</sup>, 张金库<sup>1</sup>

(1. 保定市第一中心医院病理科; 2. 保定市第二医院心内科, 河北保定 071000)

**【摘要】目的:** 探讨 Musashi-2/Ki-67 双染在宫颈癌细胞学筛查工作的临床应用价值。**方法:** 选取 277 例行宫颈脱落细胞学检查的患者, 采用免疫组化方法对细胞学制片行 Musashi-2/Ki-67 双染, 统计 Musashi-2/Ki-67 双染在各级别宫颈病变中的表达差异, 及双染辅助细胞学结果与组织学诊断的符合率。**结果:** Musashi-2/Ki-67 双染辅助细胞学诊断结果的灵敏性高于单独使用细胞学筛查诊断结果 ( $P < 0.05$ ); 但两者特异性比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 随着病变程度增加, 双染阳性率也随之增加。**结论:** Musashi-2/Ki-67 双染阳性可提示高度上皮内病变的存在, 可能成为辅助宫颈细胞学筛查的新指标。

**【关键词】** Musashi-2/Ki-67 双染; 宫颈癌; 筛查; 液基细胞学

**【中图分类号】** R737.33 **【文献标志码】** A

## The value of Musashi-2/Ki-67 dual-staining in predicting high grade cervical intraepithelial lesions

ZHOU Xing<sup>1</sup>, CHEN Xue<sup>1</sup>, CUI Lei<sup>2</sup>, SUN Ji-rui<sup>1</sup>, ZHANG Bing-xin<sup>1</sup>, LI Yi-xuan<sup>1</sup>, ZHANG Jin-ku<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Baoding First Central Hospital; 2. Department of Cardiology, Baoding Second Hospital, Baoding 071000, Hebei, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the clinical value of Musashi-2/Ki-67 dual-staining in cervical cancer screening. **Methods:** A total of 277 patients with cervical exfoliation cytology examination were selected. Immunohistochemical method was used to perform dual-staining of Musashi 2/Ki-67 on cytology sections, and the coincidence rate between the results of Musashi-2/Ki-67 dual-staining and the results of histologic diagnosis was analyzed. **Results:** The sensitivity of Musashi-2/ Ki-67 dual-staining assisted cytology was higher than that of cytology alone ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in their specificity ( $P > 0.05$ ), and the positive rate increased with the degree of lesion. **Conclusion:** The positive rate of Musashi-2/ Ki-67 dual-staining may indicate the existence of high intraepithelial lesions and may be a new index to assist cervical cytology screening.

**【Key words】** Musashi-2/Ki-67 Dual-staining; Cervical neoplasms; Screen; Liquid based cytology

宫颈癌是全世界妇女癌症死亡率排名第四的恶性肿瘤, 其中超过 85% 的患者发生在欠发达国家<sup>[1]</sup>, 因此迫切需要更好地了解宫颈癌进展的分子机制。研究<sup>[2]</sup>显示, Musashi-2 的过表达促进多种恶性肿瘤的发生、发展, 并可通过多种信号通路促进癌细胞的侵袭和转移。在慢性粒细胞白血病急性变时, Musashi-2 表达显著升高, 且越高者提示患者预后越差。通过上调转化生长因子  $\beta$  受体 1 及下调紧密连接蛋白, 可促进非小细胞肺癌的侵袭和转移<sup>[3]</sup>。通过 p53 诱导的下调肿瘤抑制因子 miR-143 和 miR-107, 可促进宫颈癌细胞的生长和侵袭<sup>[4]</sup>。Ki67 是一种已知细胞增殖的标记物。本研究设想具有迁移能力的细胞也有较强的增殖能力, 并使用免疫组

化技术在宫颈癌、癌前病变及正常宫颈中进行 Musashi-2/Ki67 双重染色, 观察不同病变之间的表达差异, 评价 Musashi-2/Ki67 双染预测高度鳞状上皮内病变及宫颈癌的价值。

### 1 资料与方法

#### 1.1 病理资料

选取保定市第一中心医院 2017 年 3 月至 2019 年 3 月因 HR-HPV (高危型人乳头瘤病毒) 阳性而取样宫颈细胞学样本并经活检行组织学检查的 277 例患者。患者年龄 21 ~ 73 岁, 中位年龄 43 岁。

#### 1.2 试验方法

宫颈液基细胞学检查剩余标本经泰普液基细胞

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题 (20181490)。

作者简介: 周星 (1989 -), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: 501164885@qq.com

通讯作者: 张金库。E-mail: zjkb@sohu.com

制片仪制片,所制细胞玻片行 Musashi-2/Ki-67 双重染色。采用 SP 法对细胞学制片行免疫细胞化学染色。本试验试剂 Musashi-2 单克隆抗体购自美国 ProMab biotechnologies 公司,工作浓度 1:800, Ki67 单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司,工作浓度 1:100,预先稀释后混合为鸡尾酒抗体。宫颈细胞玻片经乙醇固定,抗原修复,置于 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中阻断内源性过氧化物酶,阴性对照用 PBS 代替一抗,进行一抗孵育及二抗孵育、DAB 显色、苏木精复染,中性树胶封片后在显微镜下阅片。

### 1.3 诊断标准

1.3.1 免疫组织化学结果判断 细胞质和/或细胞核棕色染色表示 Musashi-2 呈阳性表达,细胞核红色染色表示 Ki-67 呈阳性表达。带有两种抗原染色的细胞表现为明显棕色的胞质染色和红色的胞核染色。若无同一个细胞内胞浆和胞核同时着色,而仅存在 Musashi-2 的棕色染色或仅存在 Ki-67 的红色染色,结果为阴性;若 1 个或多个鳞状细胞在同一细胞中同时存在棕色胞质染色和红色胞核染色,结果为阳性。

1.3.2 细胞学诊断 分为低度鳞状上皮内病变 (LSIL)33 例;高度鳞状上皮内病变 (HSIL)35 例;不典型鳞状细胞 - 倾向高度鳞状上皮内病变 (ASC-H) 10 例;不典型鳞状上皮 (ASC-US) 19 例;未见鳞状上皮内病变 121 例 (NILM)。活检样本经由 3 位高年资病理医师在不知原活检诊断、无免疫组织化学结果的情况下,在多头显微镜下共同讨论并确认有无鳞状上皮内病变,并分级。至少两位医师意见相同则确定为“标准诊断”,若 3 位医师意见均不一致,则结合组织学免疫组化结果确定“标准诊断”(组织学分组例数见表 2)。由做出原液基细胞学诊断的医师在不知“标准诊断”的情况下,结合液基细胞玻片及 Musashi-2/Ki-67 双染结果作出“Musashi-2/Ki-67 辅助细胞学诊断”。

### 1.4 统计学分析

采用 spss23.0 统计软件,计数资料用率 [n (%)] 表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,若不符合  $\chi^2$  检验条件,采用 Fisher 确切概率法进行统计分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Musashi-2 和 Ki-67 双染在宫颈病变中的表达

Musashi-2 和 Ki-67 双染在宫颈高度病变中呈阳性表达,阳性细胞呈红色细胞核与棕色细胞质染色。见图 1 及图 2。

### 2.2 灵敏度及特异度分析

将细胞学结果为 HSIL、ASC-H、ASC-US 定为阳性细胞学诊断,以组织学诊断 CIN2+ 作为阳性金标准,原细胞学对诊断的灵敏度低于 Musashi-2/Ki-67 辅助细胞学诊断 ( $P < 0.05$ );特异度比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。Musashi-2/Ki-67 辅助细胞学

诊断及原细胞学诊断的灵敏度、特异度见表 1。

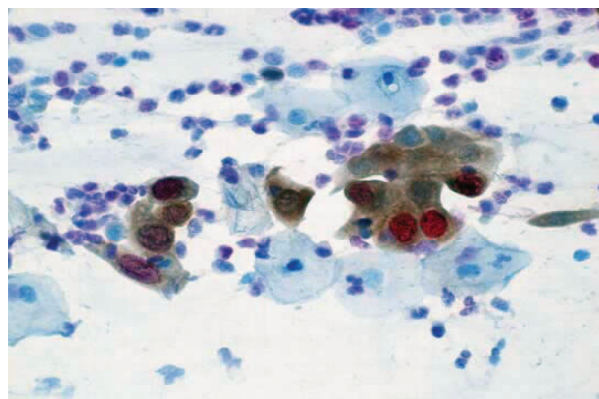


图 1 Musashi-2/Ki-67 双染阳性细胞 (×10)



图 2 Musashi-2/Ki-67 双染阳性细胞 (×20)

表 1 Musashi-2/Ki-67 辅助细胞学诊断及原细胞学诊断的灵敏度、特异度比较 [% (n)]

检测指标	灵敏度	特异度
Musashi-2/ Ki-67 辅助细胞学诊断	77.8 (98/126)	94.7 (143/151)
原细胞学诊断	53.2 (67/126)	91.4 (138/151)
$\chi^2$ 值	16.870	1.279
P 值	<0.001	0.258

### 2.3 不同病变程度受检者 Musashi-2/Ki-67 双染的阳性率

不同病变程度受检者 Musashi-2/Ki-67 双染的阳性率比较,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 25.434, P < 0.001$ );其中 Musashi-2/Ki-67 双染的阳性率在宫颈浸润癌组最高 (94.44%), CIN2/CIN3 (宫颈高度上皮内病变 II/III 级) 组患者次之 (69.00%), 无病变/CIN1 (宫颈低度上皮内病变 I 级) 组患者阳性率最低 (8.33%), 双染阳性率随着病变级别的升高而升高。见表 2。

表 2 不同病变程度受检者 Musashi-2/Ki-67 双染的阳性率比较 [n (%)]

组织学结果	例数	Musashi-2/ Ki-67 双染阳性率	$\chi^2$ 值	P 值
无病变/CIN1	151	5.30 (8/151)	25.434	<0.001
CIN2/CIN3	108	75.00 (81/108) *		
宫颈浸润癌	18	94.44 (17/18) **		

\*  $P < 0.05$ , 与宫颈炎/CIN1 组比较; #  $P < 0.05$ , 与 CIN2/CIN3 组比较。

### 3 讨论

Musashi-2 是一类进化高度保守的 RNA 结合蛋白,是 Musashi 家族中的一员,通过介导蛋白质之间相互作用,进而促进或抑制蛋白质翻译来调控基因表达,可选择性地表达于祖细胞或神经系统干细胞。Musashi-2 可激活 notch 通路,维持细胞的自我更新能力和干细胞的未分化状态,促进细胞的自我复制<sup>[5]</sup>。Musashi-2 在上皮间质转化、迁移、侵袭、增殖过程中起着重要作用,肿瘤干细胞特征和耐药性存在于各种类型的癌症患者<sup>[6]</sup>。多项研究<sup>[7-10]</sup>报道,Musashi-2 蛋白在脑、乳腺、胰腺、结肠、肺、卵巢和膀胱癌等肿瘤中表达升高,其过表达与胰腺癌和慢性髓系白血病患者侵袭性及预后不良密切相关。Musashi-2 通过促进癌细胞增殖、侵袭和迁移,导致宫颈癌恶性程度增加<sup>[4-5]</sup>。

Ki-67 是一种已知的细胞增殖标记物,只能在细胞增殖期中检出,在反应性改变、正常宫颈上皮基底部分及宫颈癌前病变都可呈不同程度的阳性表达。本研究假设同时具有迁移能力(Musashi-2 阳性)和增殖能力(Ki 67 阳性)的宫颈细胞是具有发展为宫颈癌的潜能的细胞,观察两种指标其在宫颈癌及癌前病变中的表达情况。

高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)DNA 分型检测已常规应用于宫颈癌筛查。但 HR-HPV 感染后引起的细胞学异常大部分为低度上皮内病变,在进一步的过程中可能消退、持续或进展,且大部分感染者可自行消退<sup>[11-12]</sup>。因此,HR-HPV DNA 分型并不能特异地筛检出有病变进展趋势的人群,本研究迫切地需要一种高度特异性的检测指标来辅助宫颈癌及癌前病变的诊断。本试验是对 Musashi-2/Ki-67 双染的初步探索,结果显示随着病变级别增加,双染的阳性率随之增加,在高度上皮内病变及宫颈癌中的阳性表达率分别为 75.00% 和 94.44%,差异有统计学意义。这符合我们最初的假设,即具有迁移、侵犯能力和增殖能力的细胞存在于高级别病变中,并可能发展为宫颈癌。大部分双染阳性者证实为 CIN2+ (高度上皮内病变)病变,提示其参与了宫颈癌的发生、发展,可能成为宫颈癌筛查的辅助诊断指标。Musashi-2/Ki-67 双染辅助细胞学诊断的特异性较原细胞学诊断无统计学差异,但灵敏度提高了 24.6%,说明结合 Musashi-2/Ki-67 染色可增加宫颈细胞学样本筛查的效率。效率的提升是因为双染辅助细胞学诊断降低了漏诊率。病理医师的诊断水平参差不齐,或在细胞学形态不典型且不易分辨的情况下,病理医师可能漏诊或将不典型病变细胞误判为阴性,双染辅助病理医师的诊断工作可有效的避免此种情况。其判读不依赖于形态学,基层医院细

胞学诊断水平相对薄弱的病理医师也容易掌握,可减轻其工作强度及压力。Musashi-2/Ki-67 染色阳性高度提示存在高级别上皮内病变,可辅助分流在宫颈癌的筛查中发现的 HR-HPV 阳性的女性。

综上所述,通过检测是否存在 Musashi-2/Ki-67 双阳性染色的宫颈上皮细胞,能够以高灵敏度和特异性辅助筛查宫颈癌前病变和宫颈癌,减少漏诊率并帮助识别并分拣存在 HSIL 的女性,有助于宫颈癌及相关宫颈病变诊断及预测病变进展。Musashi-2 在宫颈癌及多种恶性肿瘤中呈现明显高表达,且多项研究提示其高表达能够促进恶性肿瘤的发生、发展,针对 Musashi-2 分子的靶向治疗可能对相关疾病的治疗提供一定的参考。

### 参考文献

- [1] Colombo N, Carinelli S, Colombo A, et al. ESMO Guidelines Working Group: Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23 (Suppl 7): 27 - 32.
- [2] Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi [J]. *NATURE*, 2010, 466 (7307): 765 - 768.
- [3] Kudinov AE, Deneka A, Nikonova AS, et al. Musashi-2 (Msl2) supports TGF- $\beta$  signaling and inhibits claudins to promote non-small cell lung cancer (NSCLC) metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (25): 6955 - 6960.
- [4] Dong P, Xiong Y, Hanley SJB, et al. Musashi-2 a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced miR-143 and miR-107 activation [J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36 (1): 150.
- [5] 张彦, 王琳, 张梅, 等. Musashi-2 在宫颈癌中高表达并促进宫颈癌细胞恶性生物学行为 [J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34 (4): 918 - 921.
- [6] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Brca1 breast tumors contain distinct CD44 + /CD24 and CD133 + cells with cancer stem cell characteristics [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10 (1): R10.
- [7] Wang S, Li N, Yousefi M, et al. Transformation of the intestinal epithelium by the MSI2 RNA-binding protein [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6517.
- [8] Choi YM, Kim KB, Lee JH, et al. DBC2/RhoBTB2 functions as a tumor suppressor protein via Musashi-2 ubiquitination in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36 (20): 2802 - 2812.
- [9] Park SM, Gonen M, Vu L, et al. Musashi2 sustains the mixed-lineage leukemia-driven stem cell regulatory program [J]. *Clin Invest*, 2015, 125 (3): 1286 - 1298.
- [10] Liu Y, Fan Y, Wang X, et al. Musashi-2 is a prognostic marker for the survival of patients with cervical cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (4): 5425 - 5432.
- [11] Fader AN, Alward EK, Niederhauser A, et al. Cervical dysplasia in pregnancy: a multi-institutional evaluation [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 203 (2): 113. e1 - 113. e16.
- [12] 韩玲, 薛月珍. 子宫颈上皮内瘤变自然转归的免疫机制研究进展 [J]. *中华妇产科杂志*, 2007, 42 (5): 356 - 358.

(收稿日期: 2019-09-03)

学术编辑: 张科荣)