

Evaluation of p16^{INK4a}/Ki-67 Dual Immunostaining in Liquid-based Cytology for Diagnosis of Uterine Cervical Dysplasia and Cancer

Mi Hee Sung¹, Hoon Taek Lee³, Min Shik Shin¹, Seo Young Oh¹, and Wook Youn Kim^{1,2}

¹Department of Pathology, Konkuk University Medical Center, Seoul 05030, Korea

²Department of Pathology, Konkuk University School of Medicine, Seoul 05029, Korea

³Department of Animal Biotechnology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

자궁경부 이형성증과 암의 진단을 위한 액상세포 검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 평가

성미희¹, 이훈택³, 신민식¹, 오서영¹, 김욱연^{1,2}

¹건국대학교병원 병리과, ²건국대학교 의학전문대학원 병리학교실, ³건국대학교 동물생명공학과

Recently, p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining has been introduced as a new biomarker protocol for early detection of uterine cervical dysplasia and cancer in liquid-based cytology (LBC). We performed the p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining using a CINtec[®] PLUS kit in a total of 109 LBC cases of cervicovaginal smear and compared its results with those from LBC, HPV hybrid capture II (HC II) test and histological diagnosis. Expression of p16^{INK4a} and Ki-67 was significantly associated with cases of LSIL or higher in cytological diagnosis and cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 or higher in histological diagnosis ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). Among forty-six cases of atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) in LBC, p16^{INK4a} and Ki-67 was expressed in 31 (67.4%), which were positively associated with cases of CIN I lesion or higher in histology. The sensitivity of p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining for finding lesions of CIN 1 or higher was 89.0%, which was higher than LBC. The specificity was 73.5%, which was higher than that of the HC II test. Based on these results, the p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining method can be a useful diagnostic marker for improving the sensitivity of LBC and the specificity of HC II test.

Keywords: Liquid-based cytology, p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining, CINtec plus kit, HPV, Cervical cancer, Cervical dysplasia

Corresponding author: Wook Youn Kim
 Department of Pathology, Konkuk University
 School of Medicine, Seoul 05029, Korea
 Tel: 82-2-2030-5646
 E-mail: 20100182@kuh.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2015 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: June 9, 2015
 Revised 1st: June 15, 2015
 Revised 2nd: July 17, 2015
 Accepted: July 20, 2015

서론

자궁경부암은 국내 여성에서 발생하는 생식기암 중 가장 빈도가 높은 암으로(National Cancer Center, 2011), 전암단계를 거치기 때문에 조기에 진단될 경우 치료 효과가 매우 양호하다(Lim 등,

2010). 자궁경부암의 조기 진단에 대한 방법으로는 고식적 도말검사와 액상세포검사법이 보편적으로 사용되고 있고, 자궁경부암의 원인인 인유두종바이러스(human papilloma virus, HPV)를 검출하는 분자진단법(HPV DNA test)이 보조적으로 사용되고 있다. 그러나 세포검사법들은 관찰자 간에 주관적인 이견으로 재현성이 낮

다고 하였고(Stoler 등, 2001), 특히 위축성 상피세포와 미성숙 화생상피세포는 고등급 편평상피내 병변세포와 감별이 어려울 수 있다고 보고하였다(Nucci 등, 2003). 이처럼 세포학적으로 감별이 어려운 경우에는 세포주기 조절과 세포증식의 표지자수와 관계되는 Ki-67 및 세포주기 조절에 관련된 p16 유전자 면역조직화학 염색법이 정확한 진단에 도움이 된다고 하였다(Keating 등, 2001; Kim 등, 2003). 그리고 HPV DNA test는 일시적인 감염과 종양형 감염 사이를 구별할 수 없다는 제한점이 있어(Waldstrom 등, 2013), 자궁경부암 조기 진단의 정확성, 민감도의 증가를 위해 세포 검체에 p16과 Ki-67이라는 새로운 표지자에 대한 면역세포염색법 연구가 진행되었다(Keating 등, 2001).

p16 유전자는 CDK (cyclin-dependent kinase)를 불활성화시켜 세포주기를 조절한다고 밝혀져 있다(Sano 등, 1998). 또한 자궁경부암 주요 원인인 HPV의 E7 종양 단백질이 종양 억제 단백질 pRb (phosphorylated retinoblastoma)를 불활성화시켜 세포주기가 활성화 되는데(Zappacosta 등, 2013), 이것은 E7 단백질에 의해 pRb가 불활성화 됨으로써 음성되먹임 기전으로 조절되던 p16 단백질의 발현이 상대적으로 증가한다고 하였다(Klaes 등, 2001). Ki-67은 비 히스톤 핵 단백질로 세포주기에서 발현되는 세포의 증식능을 반영하는 대표적인 단백질로 알려져 있으며(Dona 등, 2012), 자궁경부 상피내종양의 이형성 정도와 연관성이 있어 상피내종양의 등급결정 및 진행에 대한 예측인자로 밝혀졌다(Kruse 등, 2004).

이에 본 연구에서는 자궁경부 액상세포와 조직 검체를 대상으로 p16^{INK4a}/Ki-67 (INK4a: Inhibitor of CDK 4, a type) 이중면역염색을 시행하여 자궁경부 액상세포 검체를 이용한 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색법이 자궁경부암을 조기 진단하는 선별검사로서 유용한 검사법이라는 것을 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구는 건국대학교병원 임상연구심의위원회(Institutional Review Board, IRB)에서 승인을 얻은 액상세포와 조직 검체를 이용하여 시행하였다(승인번호 KUH1210026). 검체는 2013년 8월부터 2014년 5월까지 건국대학교병원에서 자궁경부 액상세포검사를 받고, 세포검사 후 시행한 조직학적 검사로 확진을 받은 환자의 액상세포, 조직 검체 각각 109례를 대상으로 실험하였다.

2. 자궁경부 액상세포 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색 및 평가

자궁경부 액상세포는 Surepath (TriPath imaging, USA)의 잔

류 검체로 새로운 슬라이드를 제작하였고, p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색은 CINtec[®] PLUS kit (Roche mtm laboratories, Germany)를 사용하였으며 polymer법으로 시행하였다. 항원을 복구하기 위해서 구연산 완충액에 슬라이드를 넣고, water bath 내에서 97°C (95~99°C)의 온도로 15분간 유지하였다. 다음 단계로는 실온에서 20분간 방치한 후, 비특이적 반응을 차단하기 위해 peroxidase blocking solution을 5분간 처리하였다. 1차 항체로 RTU (ready to use)인 p16^{INK4a} (clone E6H4, mouse monoclonal antibody), Ki-67 (clone 274-11 AC3, rabbit monoclonal antibody)을 30분 동안 반응을 시킨 후, 1차 항체의 반응을 가시화하기 위해서 horseradish peroxidase와 alkaline phosphatase를 각각 15분 동안 염색하였다. 발색은 3,3'-diaminobenzidine substrate를 10분 동안 그리고 fast red substrate에서 15분간씩 2회 반응시켰다. Mayer hematoxylin (DAKO, Denmark)으로 대조 염색하고 봉입하여 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였다. p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 판정은 동일 세포내에서 세포질은 p16에 의해 갈색으로 염색되고 핵은 Ki-67에 의해 적색으로 염색된 세포가 최소 하나 또는 그 이상일 때를 양성으로 판정하였고, 슬라이드에 이중 염색된 세포가 하나도 없거나 세포질과 핵 어느 한 곳에만 염색되면 음성으로 판정하였다(Wentzensen 등, 2012; Edgerton 등, 2013).

3. 자궁경부 조직 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색

자궁경부 조직검체 대상은 대표 파라핀 블록을 선정하여 3 µm 로 절편하였고, p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색에 사용하였다. 표본 슬라이드는 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 구연산 완충액(epitope retrieval solution)에 담가 water bath 내에서 97°C (95~99°C)의 온도로 15분간 처리하였다. 1차 항체로 반응 후 3,3'-diaminobenzidine substrate를 10분 그리고 fast red substrate에서 15분 동안 발색하였다. Mayer hematoxylin (DAKO, Denmark)으로 대조 염색하고 광학현미경(Olympus)에서 검경하였다.

4. Hybrid capture II high-risk HPV DNA test

Hybrid capture II (HC II)검사는 고위험군(HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68)의 탐침자를 사용하여 실시하였다. 검체의 채취는 자궁경부 액상세포와 동일한 부위에서 동시에 cervical sampler (QUIAGENE, USA)를 이용하여 세포를 채취하였다. 채취된 세포는 denaturation buffer를 넣고 66°C에서 1시간 반응시킨 후, 고위험군 HPV RNA 탐침자 혼합액과 66°C에서 1시간 교잡반응을 시행하였다. 검체는 RNA/DNA 교잡에 대한 특이항체로 도포된 microplate에 옮겨 담아 1시간 동안 반응시킨 후,

detection reagent 1을 이용하여 alkaline phosphatase-conjugated antibody와 30분 반응하였다. 세척 후, detection reagent 2를 이용하여 형광반응(CDP-Star with Emerald II)시켜, 검체에 존재하는 HPV DAN의 양을 luminometer를 사용하여 측정하였다 (DML2000, Digene, UK). 양성대조군(HPV 16 DNA, 1 pg/ml)은 키트에 있는 3개의 평균값을 cut off 값으로 정하고, 검체 측정값을 cut off 값으로 나눈 값이 1.0미만이면 음성, 1.0이상이면 양성으로 판독하였다.

5. 통계

통계학적 분석은 SPSS Windows version 18.0 프로그램을 이용하였고, χ^2 검정법으로 분석하였다. *p* 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의성이 있다고 평가하였다.

결 과

1. 자궁경부 액상세포 검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 발현

액상세포 검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 발현은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 NILM (Negative for intraepithelial lesion or malignancy)은 일부 세포에서 p16이 세포질에 갈색으로 염색되었지만, 동일 세포에 p16과 Ki-67이 동시에 염색된 세포는 관찰되지 않았으며(Fig. 1A), LSIL (Low grade squamous intraepithelial lesion), HSIL (High grade squamous intraepithelial

lesion), squamous cell carcinoma로 갈수록 강한 양성발현을 보였다(Fig. 1B, C, D). Table 1에서 제시한 대로 NILM은 세포면역염색 결과 10례(100%) 모두에서 음성이었고, 반면에, ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance)는 46례 중 31례(67.4%), LSIL은 33례 중 25례(75.8%), HSIL과 carcinoma에서는 16례, 4례 모두(100%)에서 양성이었다. 또한 조직 검사 결과에 따른 세포면역염색 양성율은 NILM 34례 중 9례(26.5%), CIN I (Cervical intraepithelial neoplasia I) 37례 중 31례(83.8%), CIN II/CIN III 29례 중 27례(93.1%), carcinoma 7례 중 7례(100%)에서 양성소견을 보였다. 액상세포 잔유검체를 이용한 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색검사는 세포학적 및 조직학적 이상소견의 중증도에 따라 양성율이 증가하였고, *p* < 0.001로 유의한 차이를 확인하였다.

2. 자궁경부 조직검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 발현

자궁경부 조직검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 적용한 결과, Fig. 1을 보면 NILM은 동일세포에 p16과 Ki-67이 동시에 발현되지 않았고(Fig. 1E), CIN I, CIN III, squamous cell carcinoma에서는 강한 양성반응을 확인하였다(Fig. 1F, G, H). Table 2에서 제시한 대로 NILM 34례 중 1례(2.9%), atypical cells 2례 중 1례(50%), CIN I 37례 중 27례(73%), CIN II/CIN III 29례 중 29례(100%) 그리고 carcinoma 7례 중 7례(100%)에서 양성소견을 보였다. 또한 자궁경부 조직검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면

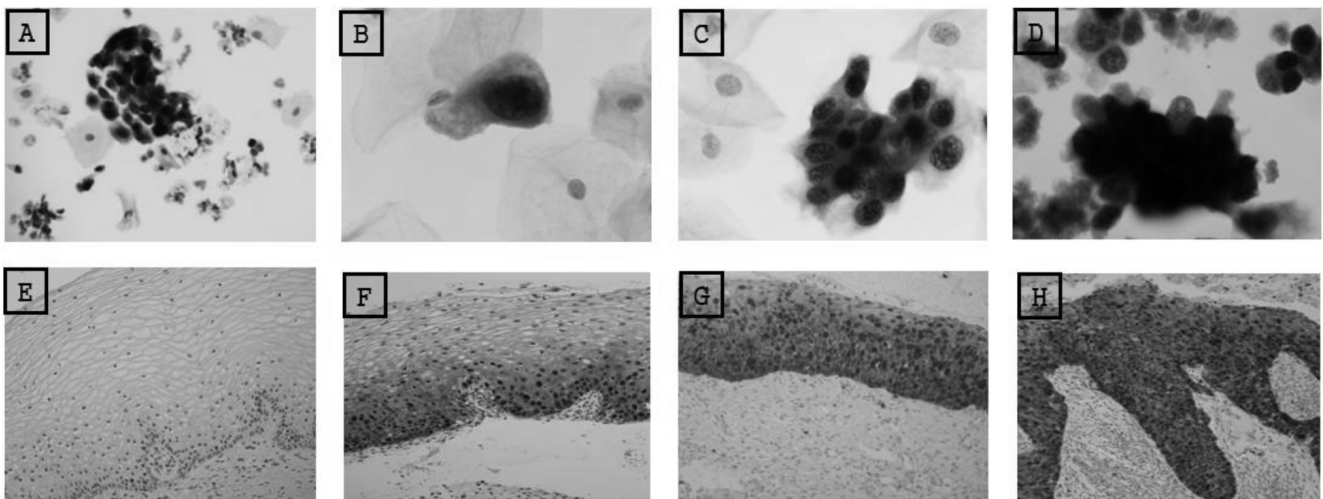


Fig. 1. Results of p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining for liquid-based cytology (A, B, C, D) and tissue (E, F, G, H). (A) Metaplastic cells cytoplasm staining for p16 interpreted as negative (×400). (B) LSIL showing positivity for p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining (×1000). (C) HSIL, p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining in positive cells showed strongly staining (×1000). (D) Squamous cell carcinoma, p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining in positive cells showed strongly staining (×1000). (E) Negative, nuclear of basal layer in Ki-67 staining interpreted as negative (×200). (F) CIN I in p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining showed positive in focal lesion (×200). (G) CIN III in p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining showed positive (×200). (H) Squamous cell carcinoma in p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining showed positive (×200).

Table 1. Correlation between cytologic diagnosis, histologic diagnosis and p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunocytochemistry

	p16 ^{INK4a} /Ki-67 dual immunocytochemistry No. (%)			p-value
	Negative	Positive	Total	
Cytologic Dx				p<0.001
NILM	10 (100.0)	0 (0.0)	10 (100.0)	
ASCUS	15 (32.6)	31 (67.4)	46 (100.0)	
LSIL	8 (24.2)	25 (75.8)	33 (100.0)	
HSIL	0 (0.0)	16 (100.0)	16 (100.0)	
Carcinoma	0 (0.0)	4 (100.0)	4 (100.0)	
Total	33 (30.3)	76 (69.7)	109 (100.0)	
Histologic Dx				p<0.001
Negative	25 (73.5)	9 (26.5)	34 (100.0)	
Atypical cells	0 (0.0)	2 (100.0)	2 (100.0)	
CIN I	6 (16.2)	31 (83.8)	37 (100.0)	
CIN II/CIN III	2 (6.9)	27 (93.1)	29 (100.0)	
Carcinoma	0 (0.0)	7 (100.0)	7 (100.0)	
Total	33 (30.3)	76 (69.7)	109 (100.0)	

Dx, diagnosis; NILM, Negative for intraepithelial lesion or malignancy; ASCUS, Atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL, Low grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, High grade squamous intraepithelial lesion.

Table 2. Results of p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunohistochemistry according to histologic diagnosis

	p16 ^{INK4a} /Ki-67 dual immunohistochemistry No. (%)			p-value
	Negative	Positive	Total	
Histologic Dx				p<0.001
Negative	33 (97.1)	1 (2.9)	34 (100.0)	
Atypical cells	1 (50.0)	1 (50.0)	2 (100.0)	
CIN I	10 (27.0)	27 (73.0)	37 (100.0)	
CIN II/CIN III	0 (0.0)	29 (100.0)	29 (100.0)	
Carcinoma	0 (0.0)	7 (100.0)	7 (100.0)	
p16 ^{INK4a} /Ki-67 immunocytochemistry				p<0.001
Negative	29 (87.9)	4 (12.1)	33 (100.0)	
Positive	15 (19.7)	61 (80.3)	76 (100.0)	

Dx, diagnosis; CIN I, Cervical intraepithelial neoplasia I; CIN II, Cervical intraepithelial neoplasia II; CIN III, Cervical intraepithelial neoplasia III.

역염색과 액상세포 검체의 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색 간의 일치율은 총 109례 중 90례(82.3%)이었다. 따라서 조직학적 이상 소견의 정도에 따라 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역조직염색의 양성율이 증가하였으며 조직과 세포검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 일치율은 p<0.001로 통계학적으로 유의성이 높은 것으로 나타났다.

3. 자궁경부 액상세포 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색과 Hybrid capture II 결과 비교

자궁경부 액상세포 검체 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 양성 은 총 76례로 HC II의 양성률이 69례(90.8%) 이었고, HC II viral load 는 RLU (relative light unit) 1~50에서 16례(55.2%), RLU 51-100 에서 5례(83.3%), RLU>100에서 48례(82.8%)로 나타내었다. 따라서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역세포염색은 HC II 검사 결과가 양성

이고, HC II viral load 값이 클 때 양성율이 증가하였으며, 통계학 적으로 유의한 결과를 보였다(p<0.05).

4. 자궁경부 액상세포 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 임상적 유용성

자궁경부 액상세포 검체에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 임상적 유용성은 민감도, 특이도, 예측도로 확인하였다(Table 5). 그 결과, CIN I 이상의 병변에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역세포염 색은 89.0%의 민감도, 73.5%의 특이도를 보여 액상세포검사서 57.5%의 민감도와 HC II 검사에서 29.4%의 특이도보다 높았으며 통계적으로 유의한 상관관계를 나타내었다(p<0.001).

5. 경계성 진단에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역세포염색의 발현

경계성 진단인 ASCUS로 진단된 자궁경부병변은 생검으로 조직

Table 3. Correlation between p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunocytochemistry and Hybrid capture II test

	p16 ^{INK4a} /Ki-67 dual immunocytochemistry No. (%)			<i>p</i> -value
	Negative	Positive	Total	
HC II				
Negative	9 (56.3)	7 (43.8)	16 (100.0)	<i>p</i> =0.012*
Positive	24 (25.8)	69 (74.1)	93 (100.0)	
HC II viral load (RLU)				
1~50	13 (44.8)	16 (55.2)	29 (100.0)	<i>p</i> =0.019*
51~100	1 (16.7)	5 (83.3)	6 (100.0)	
>100	10 (17.2)	48 (82.8)	58 (100.0)	

HC II, Hybrid capture II High-Risk HPV DNA test; RLU, Relative light unit.

Table 4. Sensitivity, specificity and predictive values of p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunocytochemistry in CIN I+, CIN II+

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	<i>p</i> -value
CIN I+					
LBC	57.5	67.7	79.3	42.6	<i>p</i> <0.001
p16 ^{INK4a} /Ki-67	89.0	73.5	87.8	75.8	
HC II	93.2	29.4	73.9	66.7	
CIN II+					
LBC	55.6	100.0	100.0	68.0	<i>p</i> <0.001
p16 ^{INK4a} /Ki-67	94.4	73.4	79.1	92.6	
HC II	91.7	29.4	57.9	76.9	

LBC, Liquid-based cytology; PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value; CIN I+, Cervical intraepithelial neoplasia of grade I or higher; CIN II+, Cervical intraepithelial neoplasia of grade II or higher; HC II, see table 3.

Table 5. Detection rate of p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunocytochemistry for ASCUS in liquid-based cytology

	p16/Ki-67 dual immunocytochemistry			<i>p</i> -value
	Total No.	Negative %	Positive %	
Negative	14	2	14.3	<i>p</i> <0.001
Atypical	2	2	100.0	
CIN I	18	13	72.2	
CIN II/CIN III	11	11	100.0	
Carcinoma	1	1	100.0	

See Table 2.

을 절제하여 조직학적으로 확진하였다(Table 5). 자궁경부 액상세 포검사에서 ASCUS로 분류된 46례는 조직학적 검사 결과 NILM 14례, atypical 2례, CIN I 18례, CIN II/CIN III 11례, carcinoma 1례로 분류되었다. 그리고 ASCUS로 진단된 세포검체에 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 적용해본 결과, CIN I에서는 18례 중 13례에서 양성반응을 보여 72.2%의 양성율이 확인되었고, CIN II/CIN III 11례, carcinoma 1례가 모두 100%의 양성율을 보여 유의한 결과를 확인하였다(*p*<0.001).

고 찰

본 연구에서는 자궁경부 액상세포 검체에 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 시행하여 자궁경부암의 조기 발견과 세포검사의 불확실한 진단을 보완하기 위한 검사법으로 유용성을 확인하였다. p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색검사에 대한 선행연구 결과를 보면 Yoshida 등(2011), Dona 등(2012) 그리고 Byun 등(2013)은 세포학적 및 조직학적 이상 소견의 중증도에 따라 양성율이 증가하여 자궁경부병변을 평가하는 검사방법으로 유용하다고 보고하였다. Lee 등(2006)은 HPV 고위험군이 자궁경부암의 원인으로 99% 이상을 차지한다고 하였고, Klaes 등(2001)과 Keating 등(2001)은

HPV에 감염된 자궁경부병변에서 p16이 과발현 된다고 하였으며, Stanley 등(2002)은 p16의 과발현은 HPV가 단순히 감염된 상태를 넘어 활동적인 상태에 있다는 것을 의미한다고 하였다. 또한 Choi 등(2004)은 Ki-67이 이형성증의 정도가 진행될수록 발현율이 증가한다고 하였다. 본 연구에서도 액상세포 검체와 세포검사 후에 조직생검, 자궁경부 원추형 절제술 및 자궁적출술 등을 통해 얻어진 조직검체에 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 동시에 적용해 본 결과, 양성율은 NILM 0%, HSIL과 carcinoma 100%로 분석되어 세포와 조직에서 병변의 중증도에 따라 증가하였고, LSIL 또는 CIN I 이상의 병변과 관련이 있었다(Table 1, 2). 또한 HC II가 양성일 때 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 양성율이 높아 자궁경부암의 주요 원인인 HPV 감염과 관련이 있는 검사법으로 확인되었고, 선행연구와 유사한 결과가 관찰되었다(Table 3). 따라서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색은 자궁경부병변을 검출할 수 있는 검사방법이며, 자궁경부암을 조기에 발견하기 위해 액상세포 검체에 적용하는 것이 유용하다고 사료된다.

경계성 진단인 ASCUS는 Yeو 등(2005)의 연구에서 세포학적 진단 기준의 모호성으로 임상적 치료에 있어 논란이 된다고 하였다. Kwon 등(2005)은 반복적인 세포진 검사로 인한 비용의 과다가 발생할 수 있으며 과도한 조직검사로 인한 불안을 야기한다는 문제점을 제시하였다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 ASCUS로 진단된 세포검체로 분자검사법과 면역화학적 검사법에 대한 연구가 선행되어졌고, 액상세포 검체에 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 적용한 결과, Wentzensen 등(2012)은 40.2%, Dona 등(2012)은 43.7%의 양성율을 보고하였다. 또한 Schmidt 등(2011)은 ASCUS 병변 중 조직검사 결과, CIN II 이상으로 확진된 경우에 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 적용하면 민감도와 특이도가 높다고 보고하였다. 본 연구의 결과에서는 ASCUS의 증례에서 67.4%의 양성율을 보여(Table 2) 선행연구보다 높은 양성율을 관찰하였다. 그 이유는 대상군의 차이, 관찰자 간의 이견, 액상세포 검체의 차이라고 본다. 또한 총 46례 중에서 31례가 CIN I 이상의 병변으로 확진되었으며, CIN II 이상의 병변에서는 100%의 양성율을 보여(Table 5) 선행된 연구결과와 유사하였다. 따라서 세포학적으로 판단이 어려운 ASCUS의 증례에서는 액상세포검사와 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 병행해서 검사하는 것이 미확정 비정형세포로 인한 세포진단의 문제점을 보완하고, 불필요한 조직검사와 재검을 줄이기 위하여 필요하다고 생각된다.

조직학적 진단인 CIN II 이상의 병변을 발견하기 위해서는 세포 검사만 시행했을 때 보다 HPV 분자검사를 같이 시행했을 때 민감도가 높다고 하였다(Reuschenbach 등, 2010; Petry 등, 2011; Overstad 등, 2011; Szarewski 등, 2012). 그러나 HPV 분자검사

법은 낮은 특이도가 한계로 지적되고 있어(Ikenberg 등, 2013) p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 적용한 결과, HPV 분자검사보다 특이도가 높다고 보고하였다(Waldstrom 등, 2013). 본 연구에서도 CIN I 이상의 병변에서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색은 89.0%의 민감도, 73.5%의 특이도를 보였다(Table 4). 액상세포검사만 진행했을 경우는 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 시행했을 때보다 민감도와 특이도가 낮게 나타나 재현성이 낮은 검사로 생각되었고, HC II 검사는 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색 보다 민감도가 높지만 특이도가 낮아 위양성의 가능성이 높기 때문에 정확한 진단을 내리기 위해서는 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 시행하는 것이 유용하다고 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 양성율은 세포학적 및 조직학적 이상 소견의 중증도에 따라 의미 있게 증가하였고, 경계성 진단, 상피내 병변 및 자궁경부암에 적용한 결과 유용성이 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 그리고 자궁경부암의 선별검사로서 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색법이 세포검사의 낮은 민감도와 HC II의 낮은 특이도를 보완하여 세포검사의 정확도를 높이는 검사방법으로 확인되었다. 따라서 자궁경부암을 조기에 발견하여 치료하기 위해서는 액상세포검사와 민감도가 높은 HC II 검사뿐만 아니라 특이도가 높은 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색법을 병행하는 것이 정확한 결과를 판정하는데 유용하다고 생각한다. 향후 연구과제로 더 정확한 진단을 내리기 위해서는 많은 증례를 대상으로 세포진단의 정확성을 향상시키는 연구가 필요하다고 사료된다.

요 약

최근 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색은 액상세포검사에서 자궁경부 이형성증과 암을 조기에 발견하기 위한 새로운 생체 표지자로 대두되고 있다. 저자들은 자궁경부질도말의 액상세포검체 총 109례에서 CINtec[®] PLUS kit를 사용하여 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색을 시행하였고, 그 결과를 액상세포검사, HPV hybrid capture II (HC II) 검사 그리고 조직학적 진단과 서로 비교하였다. p16^{INK4a}/Ki-67 양성 발현은 세포학적 진단에서 저등급 편평상피내병변 이상의 증례 그리고 조직학적 진단에서 자궁경부 상피내종양 1등급 이상의 증례에서 유의미하게 높았다. 액상세포검사상 비정형 편평상피세포 소견을 보이는 46례 중, 31례(67.4%)가 p16^{INK4a}과 Ki-67 양성 소견을 보였고, 이러한 양성 증례들은 조직검사에서도 대부분 자궁경부 상피내종양 1등급 이상의 병변에 해당하였다. 자궁경부 상피내종양 1등급 이상의 병변을 발견하기 위한 p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색의 민감도는 액상세포검사보다 높은 89.0%였고,

특이도는 73.5%로 HC II 검사보다 높게 분석되었다. 따라서, p16^{INK4a}/Ki-67 이중면역염색 방법은 액상세포검사법의 민감도와 HC II 검사법의 특이도를 보완하기 위한 진단적 검사로 유용하다고 할 수 있다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

References

- Byun SW, Lee A, Kim S, Choi YJ, Lee YS, Park JS. Immunostaining of p16^{INK4a}/Ki-67 and L1 capsid protein on liquid-based cytology specimens obtained from ASC-H and LSIL-H cases. *Int J Med Sci.* 2013, 10:1602-1607.
- Choi SK, Kim TJ, Hong SB, Lee HT. Expression of p53 and Ki-67 in cervical dysplasia with human papilloma virus infection or non-infection. *Korean J Clin Lab Sci.* 2004, 36(2):178-184.
- Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012, 126:198-202.
- Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT. Evaluation of CINtec PLUS Testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed Surepath preparations. *Diagn Cytopathol.* 2013, 41: 35-40.
- Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst.* 2013, 105:1550-1557.
- Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2001, 8:83-92.
- Keating JT, Cviko A, Riethdorf, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E, and p16^{INK4} are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001, 25:884-891.
- Kim MY, Cho SH, Park MH. Analysis of expression of p63 in cervical neoplasia comparing with other immunohistochemical markers. *Korean J Pathol.* 2003, 37:333-341.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4a) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001, 92:276-284.
- Kruse AJ, Jansen EA, Kjellevoid KH, Lovesiett K, Bergh J, Bergh J, et al. Ki-67 predicts progression in early CIN. Validation of a multivariate progression risk mode. *Cell Oncol.* 2004, 26: 13-20.
- Kwon MJ, Song EJ, Kim CW, Hong SN, Eum ST. The significance of Human Papilloma viral load by using hybrid capture II assay in diagnosis of CIN II or above in women with PAP smear showing only ASCUS/LSIL. *Obstet Gynecol Sci.* 2005, 12: 2867-2876.
- Lee KO, Seong HS, Chung SJ, Jung NY, Lee HJ, Kim KT. Genotype Frequency of Human Papillomavirus Determined by PCR and DNA Sequencing in Korean Women. *Korean J Clin Lab Sci.* 2006, 27(2):99-105.
- Lim HS, Kim MJ, Park KE, Chung HH, Park NH, Song YS, et al. The efficacy of a real-time optoelectronic device as a diagnostic tool of over cervical intraepithelial neoplasia 1 lesion. *Obstet Gynecol Sci.* 2010, 10:888-89.
- National cancer center. Annual report of cancer statistics in Korea in 2011 [Internet]. Available from: <http://www.cancer.go.kr/cms/statics/incidence/index.html>, last visited on 2014 January 26.
- Nucci MR, Castrillon DH, Bai H, Quade BJ, Ince TA, Genest DR, et al. Biomarkers in diagnostic obstetric and gynecologic pathology: A review. *Adv Anat Pathol.* 2003, 10: 55-68.
- Overstad IT, Vennestrom U, Andersen L, Gudlaugsson E, Munk AC, Malpica A, et al. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow upbiopsies and spontaneous regression of CIN 2-3. *Gynecol Oncol.* 2011, 123:278-283.
- Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Luthge A, Bergeron C, et al. Triaging pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol.* 2011, 121:505-509.
- Reuschenbach M, Clad A, von Knebel Doeberitz C, Wentzensen N, Rahmsdorf J, Schaffrath F, et al. Performance of p16^{INK4a}-cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high grade cervical dysplasia I women with abnormal screening results. *Gynecol Oncol.* 2010, 119: 98-105.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998, 153:1741-1748.
- Schmidt D, Beraeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol.* 2011, 119:158-166.
- Stanley MA. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res.* 2002, 89:241-248.
- Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL triage study. *JAMA.* 2001, 285:1500-1505.
- Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparison of seven test for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *J Clin Microbiol.* 2012, 50:1867-1873.
- Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012, 18:4154-4162.
- Waldstrom M, Christensen RK, Omskov D. Evaluation of p16^{INK4a}/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol.* 2013, 121:136-145.
- Yeo SJ, Nam KH, Shim IK, Kim TH, Lee KH, Kim HM, et al. Overexpression of p16^{INK4a} as a biomarker for ASCUS in Thin-

- PrepTM smear. *J Gynecol Oncol.* 2005, 16(2):141-147.
27. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, et al. Usefulness of CINtec[®] PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta cytol.* 2011, 55(5): 413-420.
28. Zappacosta R, Colasante A, Viola P, D' Antuono T, Lattanzio G, Capanna S, et al. Chromogenic in situ hybridization and p16/Ki-67 dual staining on formalin-fixed paraffin-embedded cervical specimens: Correlation with HPV-DNA test, E6/E7 mRNA test, and potential clinical applications. *Biomed Res Int.* 2013, 2013:453-606.