·论　著·

P16 与 Ki67 在乳腺癌中的多维度表达谱分析及临床意义

夏作利，潘丹，陈慧慧，项文君

【摘要】目的　探讨 P16 和 Ki67 在乳腺癌中的表达模式及临床意义。方法　利用 UALCAN 分析 TCGA 数据库中 P16 和 Ki67 mRNA 在乳腺癌与正常组织间的表达差异，并评估其与临床病理参数的关系及预后价值。基于 GSE248288 数据集进行单细胞 RNA 测序分析，解析两者在乳腺癌微环境细胞中的表达特征。同时，收集 2024 年 1 月至 2025 年 6 月温州市人民医院收治的乳腺癌手术切除标本 59 例，通过免疫组织化学法检测正常/普通型导管增生（UDH）、非典型导管增生/导管原位癌（ADH/DCIS）及浸润性导管癌（IDC）区域中 P16 和 Ki67 蛋白的表达。结果　生物信息学分析显示，P16 与 Ki67 mRNA 在乳腺癌组织中均显著上调，且普遍存在于不同临床亚组。生存分析提示 P16 低表达与患者不良预后相关（$P < 0.05$）。临床样本验证显示，P16 与 Ki67 蛋白在正常/UDH 组与 ADH/DCIS 组、IDC 组间的表达均存在显著差异（均 $P < 0.05$），且在 ADH/DCIS 与 IDC 组中，两者表达呈线性正相关（$P < 0.05$）。结论　P16 与 Ki67 在乳腺癌中从基因到蛋白水平均呈现异常表达，两者表达的协同变化提示其在乳腺癌发生发展中可能存在关联。P16 与 Ki67 蛋白联合检测有助于正常/UDH 与 ADH/DCIS 及 IDC 病变的鉴别诊断。

【关键词】乳腺肿瘤；癌；P16；生物信息学分析；免疫组织化学
DOI:10.3969/j.issn.1671-0800.2026.05.005
【中图分类号】R737.9　　【文献标志码】A　　【文章编号】1671-0800(2026)05-0479-06

Multidimensional expression profiling and clinical significance of P16 and Ki67 in breast cancer

Xia Zuoli, Pan Dan, Chen Huihui, Xiang Wenjun (Wenzhou People's Hospital, 325000 Wenzhou, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective　To explore the expression patterns and clinical relevance of P16 and Ki67 in breast cancer. **Methods**　UALCAN database was utilized to analyze the expression differences of P16 and Ki67 mRNA between breast cancer and normal tissues in The Cancer Genome Atlas (TCGA), and evaluate the relationship between clinicopathological parameters and prognostic value. Single-cell RNA sequencing analysis was conducted based on the GSE248288 dataset to analyze the expression characteristics of P16 and Ki67 in breast cancer microenvironment cells. Fifty-nine surgical resection specimens of breast cancer admitted to Wenzhou People's Hospital from January 2024 to June 2025 were collected. The expressions of P16 and Ki67 protein in normal/ordinary ductal hyperplasia (UDH), atypical ductal hyperplasia/ductal carcinoma in situ (ADH/DCIS), and invasive ductal carcinoma (IDC) regions were detected by imunohistochemical. **Results**　Bioinformatics analysis revealed that both P16 and Ki67 mRNA were significantly upregulated in breast cancer tissues and were commonly present in different clinical subgroups. Survival analysis suggested that low expression of P16 was associated with poor prognosis in patients ($P < 0.05$). Clinical sample validation showed significant differences in the expressions of P16 and Ki67 protein between normal/UDH group and ADH/DCIS group, as well as IDC group, and a linear positive correlation was observed between their expressions in ADH/DCIS and IDC groups (all $P < 0.05$). **Conclusions**　P16 and Ki67 exhibit abnormal expression at both the gene and protein levels in breast cancer. The synergistic changes in their expression suggest a potential association between them in the development and progression of breast cancer. Combined detection of P16 and Ki67 proteins is helpful for the differential diagnosis between normal/UDH and ADH/DCIS as well as IDC lesions.

【Key words】 Breast neoplasm; Carcinoma; P16; Bioinformatics analysis; Imunohistochemical

[Modern Practical Medicine,2026,38(5):479-484]

基金项目： 温州市基础性科研项目（Y20220737）
作者单位： 325000 温州，温州市人民医院
通信作者： 夏作利，Email：1075706973@qq.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，早期精准诊断与分级对治疗方案的选择至关重要[1]。P16 基因编码一种重要的细胞周期调控抑癌蛋白，其异常表达与多种肿瘤的发生及预后相关[2]。Ki67 是一种核蛋白，广泛用于肿瘤的增殖活性评估 [3]。P16 与 Ki67 的联合检测在宫颈上皮内瘤变的诊断与分级中发挥重要作用[4]，两者在乳腺癌中的表达模式、相互关系及其临床意义尚需多维度系统阐述。本研究拟整合生物信息学分析与临床样本验证，从 mRNA 表达谱、生存预后、肿瘤微环境特征到蛋白表达水平，探讨 P16 与 Ki67 在乳腺癌中的表达特征及临床意义，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　生物信息学分析　(1)Ki67 在乳腺癌中的表达情况。利用 UALCAN 平台分析 Ki67 mRNA 在乳腺癌中的表达[5]。(2)P16 在乳腺癌中的表达情况。利用 UALCAN 平台，系统分析了 P16 基因在乳腺癌与正常乳腺组织中的表达差异。分析涵盖了广泛的临床病理学及人口统计学参数。(3)生存分析方法。基于 TCGA-BRCA（乳腺癌）数据集，利用基因表达数据评估 P16 与 Ki67 的表达水平对患者总体生存率的影响[6-7]。(4)单细胞 RNA 测序数据分析流程。采用系统性单细胞 RNA 测序数据分析流程，对 GSE248288 数据集中的 GSM7910989 和 GSM7910990 乳腺癌样本进行整合分析[8-9]。数据预处理使用 Seurat 包（版本 5.3.1），设置基因至少在 3 个细胞中表达且细胞至少检测到 200 个基因的质控标准，保留表达基因数在 200 ～ 6 000 且线粒体基因占比＜ 10%的高质量细胞。标准化采用 LogNormalize 方法（缩放因子 10 000），识别前 2 000 个高变基因（vst 方法）。主成分分析运行 50 个主成分，基于 JackStraw 算法选取 15 个显著主成分进行下游分析。细胞聚类使用 Louvain 算法（分辨率参数 0.5），通过 RunTSNE 降维得到 19 个细胞簇。细胞注释采用经典标记基因组合：T 细胞（CD3D、CD3E、TRAC）、NK 细胞（KLRD1、GNLY、NKG7）、浆细胞（MZB1、IGHG1）、单核细胞（CD68、CD163）、成纤维细胞（COL1A1、COL3A1）、内皮细胞（VWF、PECAM1）及上皮细胞（EPCAM、KRT18）。差异表达分析设定阈值为$|\log_2 FC| > 1$ 且 $P < 0.05$。细胞通讯分析使用 CellChat 包（版本 1.0.0），采用 truncatedMean 方法（修剪比例 0.1）计算通讯概率，过滤细胞数少于 10 的相互作用[10]。细胞轨迹分析通过 monocle3（版本 1.0.0）进行，使用 30 个维度预处理，通过 learn_graph 构建轨迹结构，按目标基因表达中位数将细胞分高/低表达组进行伪时序分析[11]。

1.2　临床资料　收集 2024 年 1 月至 2025 年 6 月温州市人民医院收治的乳腺癌手术切除标本 59 例，均为女性；年龄 15 ～ 90 岁，平均（51.9±13.5）岁。纳入标准：同一张石蜡组织切片上经 HE 染色证实，选同时存在形态学正常乳腺/普通型导管增生（usual ductal hyperplasia，UDH）、不典型导管增生（atypical ductal hyperplasia，ADH）/导管原位癌（ductal carcinoma in situ，DCIS）、以及浸润性导管癌（invasive ductal carcinoma，IDC）区域。根据此标准，将每个病例的不同区域划分为 3 组进行配对分析：A 组（正常乳腺/UDH）、B 组（ADH/DCIS）及 C 组（IDC）。排除标准：术前接受过新辅助化疗或放疗、病例资料不完整、合并其他类型乳腺癌（如小叶癌）患者。本研究经温州市人民医院伦理委员会审核批准（批件号：伦审 KY-2022-098 号），研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.3　主要试剂　所有组织标本均经 4%中性缓冲甲醛液固定 4 ～ 24 h，常规脱水、石蜡包埋。连续切片，厚度 4 μm。采用 EnVision 两步法进行免疫组化染色。主要试剂：鼠抗人 P16 单克隆抗体和鼠抗人 Ki67 单克隆抗体，均购自北京中杉生物技术有限公司。

1.4　方法

1.4.1　染色步骤　染色遵循试剂说明书：脱蜡、水化、抗原修复（EDTA 缓冲液，pH 9.0，微波加热）、内源性过氧化物酶阻断、一抗孵育（P16 和 Ki67 均按说明书推荐稀释度，4 ℃过夜）、二抗孵育、DAB 显色、苏木素复染、脱水、透明、封片。每批次实验均设立已知阳性和阴性对照[12]。

1.4.2　结果判读　由 2 位高年资病理医师在双盲法阅片，意见不一致时通过共同显微镜下讨论达成共识。P16 阳性定位于细胞核和/或胞浆，采用半定量双评分系统：染色强度评分为无着色 0 分，淡黄色 1 分，中黄色 2 分，深黄色或棕色 3 分；阳性细胞占比

评分≤5%为 0 分，6%～ 25%为 1 分，26%～ 50%为 2 分，＞ 50%为 3 分，两项评分相加总分 0 ～ 1 分为阴性（－），2 ～ 3 分为（1+），4 ～ 5 分为（2+），6 分为（3+）。Ki67 阳性定位于细胞核，观察阳性细胞所占百分比确定结果，在高倍视野（×400）下选择代表性区域计数至少 500 个肿瘤细胞，计算阳性细胞比例的平均值。

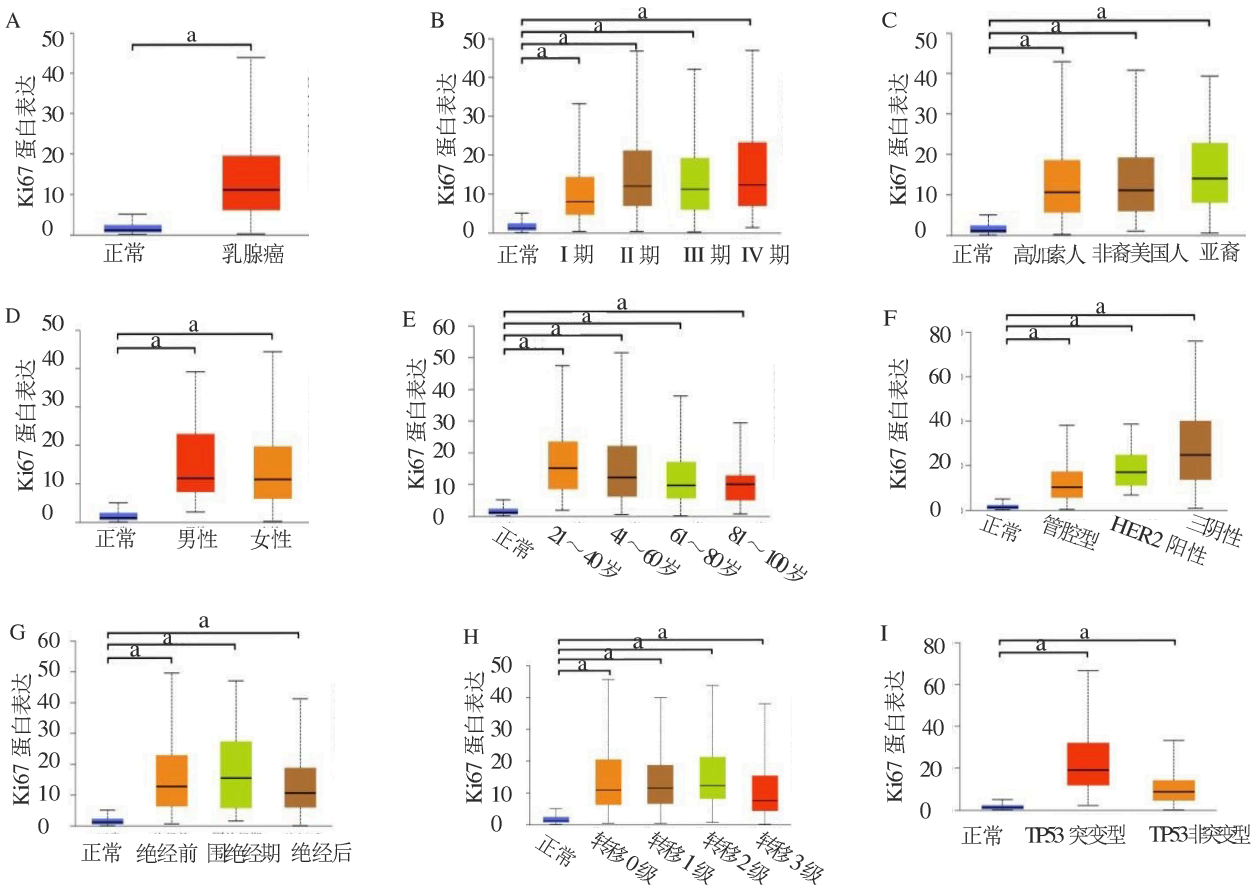
1.5　统计方法　数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件完成，计量资料以均数±标准差表示，采用 t 检验；计数资料采用例数表示，行 χ^2 检验。相关性分析采用简单线性回归，计算决定系数 R^2 并进行显著性检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　Ki67 基因在乳腺癌中表达上调　Ki67 在乳腺癌组织中的表达水平显著高于正常乳腺组织（均 $P < 0.05$），在乳腺癌的病理阶段、不同种族、性别及年龄段患者中均一致上调（均 $P < 0.05$），此外，在不同分子亚型、不同绝经状态以及存在淋巴结转移的乳腺癌组织中，Ki67 也均呈现显著高表达（均 $P < 0.05$）。在 TP53 非突变型乳腺癌中，Ki67 的表达同样显著高于正常组织（均 $P < 0.05$），见图 1。

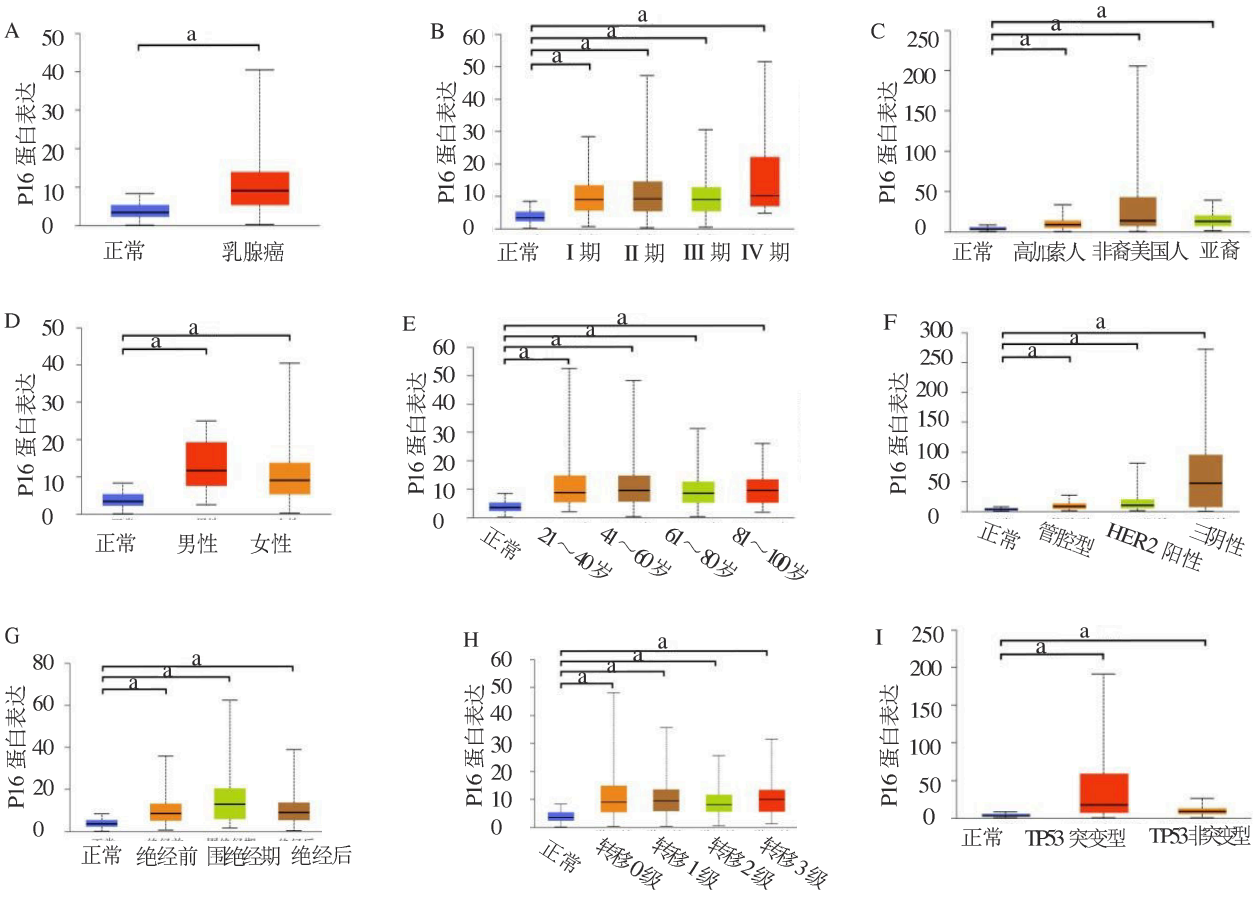
2.2　P16 基因在乳腺癌中表达上调　与正常乳腺组织相比，P16 基因在所有预设的乳腺癌临床病理学及人口统计学亚组中的表达水平均显著上调（均 $P < 0.05$），见图 2。上调趋势在不同癌症分期、人种、性别、年龄段、分子亚型（管腔型、HER2 阳性、三阴性）、绝经状态、淋巴结转移等级以及 TP53 突变与非突变型中均一致存在。

2.3　P16 与 Ki67 基因表达水平对生存预后的影响　P16 低表达患者表现出更差的生存预后，其生存曲线与高表达存在显著分离（$P < 0.05$）；Ki67 基因的高、低表达的生存曲线未观察到显著差异（$P > 0.05$），见图 3。



注：A 为乳腺癌组织与正常组织比较，B 为不同病理阶段比较，C 为不同种族比较，D 为不同性别比较，E 为不同年龄比较，F 为不同分子亚型比较，G 为不同绝经状态比较，H 为不同淋巴结转移比较，I 为 TP53 不同突变型比较；与正常组相比，a$P < 0.05$

图 1　Ki67 在乳腺癌中的表达情况



注：A 为乳腺癌组织与正常组织比较，B 为不同病理阶段比较，C 为不同种族比较，D 为不同性别比较，E 为不同年龄比较，F 为不同分子亚型比较，G 为不同绝经状态比较，H 为不同淋巴结转移比较，I 为 TP53 不同突变型比较；与正常组相比，a$P < 0.05$

图 2　P16 在乳腺癌中的表达情况

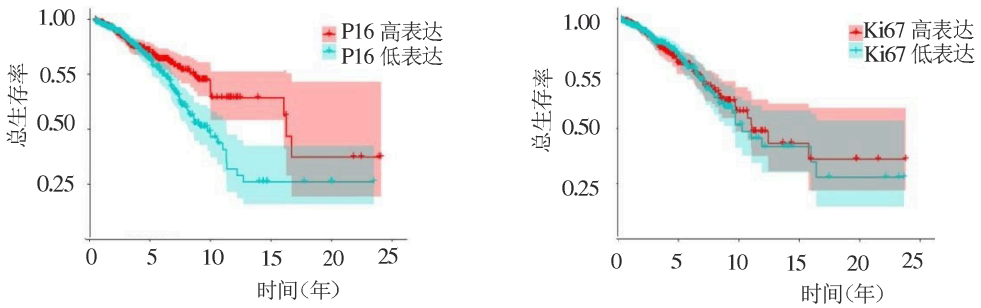


图 3　P16 与 Ki67 基因表达水平对生存预后的影响

2.4　乳腺癌微环境中 Ki67 与 P16 基因的表达特征及细胞动态　TSNE 降维分析鉴定出 19 个细胞簇。表达分析显示 Ki67 主要在单核细胞中高表达，而 P16 在成纤维细胞和上皮细胞中显著高表达。细胞通讯分析显示单核细胞、成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞在相互作用数量和强度上均表现出较强的通讯活性。

2.5　3 组 P16 及 Ki67 蛋白表达比较　3 组 P16 及 Ki67 蛋白表达差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$），其中 A 组与 C 组，A 组与 B 组 P16 蛋白表达差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$）；A 组与 C 组，A 组与 B 组，B 组与 C 组 Ki67 蛋白差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$），见表 1。

2.6　P16 与 Ki67 蛋白表达的相关性分析　B 组中 P16 与 Ki67 蛋白表达存在显著线性相关（$R^2 = 0.199$，$P < 0.05$），C 组也有明显线性关系（$R^2 = 0.188$，$P < 0.05$）。

2.7　P16 与 Ki67 蛋白表达情况　P16 可在乳腺 IDC 及 ADH 中表达，定位在瘤细胞核和/或细胞质，多呈弥漫性表达，偶尔也可呈斑驳状表达；P16 染色阴性、

表 1　3 组 P16 及 Ki67 蛋白表达比较　例

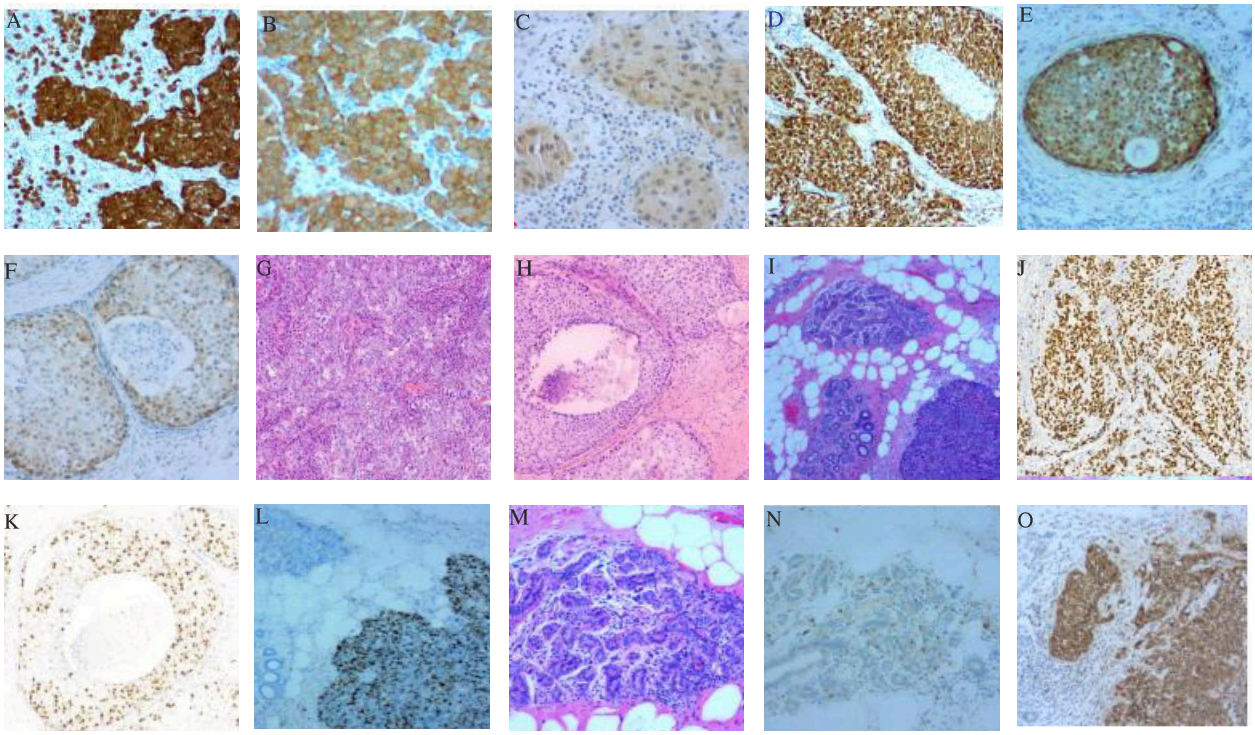
组别	例数	P16 蛋白表达(阳性/阴性)	Ki67 蛋白表达(阳性/阴性)
A 组	59	6/53	5/54
B 组	51	44/7	39/12
C 组	57	52/5	51/6
χ^2 值		99.74	89.04
P 值		＜0.05	＜0.05

(+)、(2+)及(3+)染色强度，见图 4A ～ F、O。Ki67 定位于肿瘤细胞核，根据瘤细胞核着色百分比判读，正常或 UDH 乳腺组织中仅散在个别细胞表达，见图 4G ～ N。

3　讨论

本研究通过整合多维度分析策略，系统地揭示了 P16 与 Ki67 在乳腺病变中的表达谱及其临床意义。在基因转录组水平，基于 TCGA 队列的生信分析证实，P16 和 Ki67 的 mRNA 在乳腺癌中相较于正常乳腺组织均呈现显著上调，且这一现象广泛存在于不同的临床与分子亚型中。生存预后分析则进一步区分了两者的潜在价值：P16 的低表达与患者不良的总生存期显著相关，而 Ki67 的表达水平则未显示出独立的预后预测能力。在单细胞分辨率下，发现 Ki67 与 P16 的表达具有细胞类型特异性：Ki67 主要在单核细胞中高表达，而 P16 则倾向于在成纤维细胞和上皮细胞中富集。本研究通过对 59 例包含连续病变谱系的临床样本进行免疫组化验证，在蛋白水平证实了 P16 与 Ki67 的表达从正常/良性增生(UDH)、到癌前病变(ADH/DCIS)、再到浸润性癌(IDC)的演进过程中逐步升高，其中 Ki67 在区分这三个阶段时均表现出显著差异。尤为关键的是，在 ADH/DCIS 和 IDC 区域内，P16 与 Ki67 的蛋白表达水平呈现出显著的正相关关系。上述结果表明，P16 与 Ki67 在乳腺癌的发生发展中均被异常激活，且两者的表达变化存在协同性。

上述结果提示，P16 与 Ki67 在乳腺癌中的共表达现象并非偶然，很可能反映了细胞周期调控紊乱的核心机制。P16 蛋白作为 CDK4/6 的抑制剂，是 RB



注：A 为浸润性导管癌(IDC)P16 表达(3+)(免疫组化，×100)；B 为 IDC P16(2+)(免疫组化，×200)；C 为 IDC P16(+)(免疫组化，×200)；D 为导管原位癌(DCIS)P16(3+)(免疫组化，×100)；E 为 DCIS P16(2+)(免疫组化，×100)；F 为 DCIS P16(+)(免疫组化，×100)；G 为 IDC HE 形态；H 为 DCIS HE 形态，Ki67(15%+)(免疫组化，×100)；I 示左边正常乳腺 HE 形态，右下角 IDC(免疫组化，×40)；J 为 IDC Ki67(80%+)(免疫组化，×100)；K 为 H 图同区域 DCIS Ki67(40%+)(免疫组化，×100)；L 为正常乳腺 P16(个别细胞+)，右下角 IDC 区域 Ki67(60%+)(免疫组化，×40)；M 为良性增生乳腺 HE 形态；N 为 M 图同区域 Ki67(个别细胞+)(免疫组化，×200)；O 示左边正常乳腺 P16(－)，右边 IDC P16(3+)(免疫组化，×40)

图 4　P16 与 Ki67 蛋白表达情况

抑癌通路的关键负调控因子，其表达上调通常被视为细胞衰老的标记或对异常增殖压力的应激反应[13]。在本研究中，无论是 mRNA 还是蛋白水平，P16 在乳腺癌中均显著高表达，这可能意味着在肿瘤发生过程中，尽管 P16 基因本身可能因启动子甲基化等因素而失活，但在许多情况下，其表达反而被激活，以试图遏制失控的细胞周期进程，这被称为致癌基因诱导的衰老。然而，这种防御机制最终被肿瘤细胞绕过。与此同时，Ki67 作为细胞进入增殖周期（G1、S、G2、M 期）的直接标志物，其表达升高直观反映了肿瘤细胞增殖活性的增强 [14-15]。在乳腺 ADH/DCIS 和 IDC 中观察到两者表达同步升高且存在正相关，这可能揭示了一个生物学过程：在癌变早期，异常增殖信号（如 HPV E7 蛋白类似的其他机制）同时诱导了 P16 的代偿性高表达和细胞增殖（Ki67+）的启动。随着病变进展，尽管 P16 持续高表达，但下游通路（如 RB 蛋白失活）的异常使得其抑制功能失效，细胞增殖得以持续。因此，两者的联合上调共同刻画了试图抑制但最终失败的细胞周期失控状态。

综上所述，本研究通过整合生物信息学、单细胞测序和临床病理验证，系统描绘了 P16 与 Ki67 在乳腺癌中的多维度表达谱。研究证实，两者从 mRNA 到蛋白水平在乳腺癌演进过程中均呈上调趋势且协同变化，提示其在乳腺癌发生发展中可能存在关联。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　夏作利：采集数据，分析/解释数据，起草文章，对文章的知识性内容作批评性审阅；潘丹：对文章的知识性内容作批评性审阅，行政、技术或材料支持，指导；陈慧慧：采集数据，分析/解释数据；项文君：实施研究，采集数据

参　考　文　献

[1] Xiong X, Zheng L W, Ding Y, et al. Breast cancer: Pathogenesis and treatments[J]. Sig Transduct Target Ther, 2025, 10(1): 49.

[2] Kumari S, Kumar P, Kumar M, et al. Expression of p27 and p16 and their clinical significance in gastric cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23(4): 856-865.

[3] Lashen A G, Toss M S, Ghannam S F, et al. Expression, assessment and significance of Ki67 expression in breast cancer: An update[J]. J Clin Pathol, 2023, 76(6): 357-364.

[4] Wu J L, Wang R, Chen W L, et al. Immunohistochemical markers Ki67 and P16 help predict prognosis in locally advanced cervical cancer[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2024, 294: 210-216.

[5] Chandrashekar D S, Karthikeyan S K, Korla P K, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform[J]. Neoplasia, 2022, 25: 18-27.

[6] Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2015, 19(1A): A68-A77.

[7] Gomes A P, Costa B, Marques R, et al. Kaplan-meier survival analysis: Practical insights for clinicians[J]. Acta Med Port, 2024, 37(4): 280-285.

[8] Clough E, Barrett T, Wilhite S E, et al. NCBI GEO archive for gene expression and epigenomics data sets: 23-year update[J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(D1): D138-D144.

[9] Lei Y L, Tang R, Xu J, et al. Applications of single-cell sequencing in cancer research: Progress and perspectives[J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 91.

[10] Jin S Q, Guerrero-Juarez C F, Zhang L H, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat[J]. Nat Commun, 2021, 12: 1088.

[11] Chen C M, Wang C, Pang R F, et al. Comprehensive single-cell transcriptomic and proteomic analysis reveals NK cell exhaustion and unique tumor cell evolutionary trajectory in non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 278.

[12] Shen T S, Zhao J, Zhao M, et al. Unusual staining of immunohistochemical markers PAX8 and CDX2 in breast carcinoma: A potential diagnostic pitfall[J]. Hum Pathol, 2022, 125: 35-47.

[13] Yan J Y, Chen S Y, Yi Z M, et al. The role of p21 in cellular senescence and aging-related diseases[J]. Mol Cells, 2024, 47(11): 100113.

[14] D'Amario M, Pizzolante T, Magnacca C, et al. Ki67 as a proliferation marker: A study on odontogenic keratocysts and radicular cysts [J]. J Stomatology Oral Maxillofacial Surg, 2025, 126(3): 102313.

[15] Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, et al. Ki-67 gene expression[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(12): 3357-3370.

收稿日期：2026-02-09

（本文编辑：钟美春）