

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.001.html

· 免疫组化专家共识 ·

泌尿及男性生殖系统肿瘤病理诊断免疫组化标志物选择专家共识

贺慧颖,饶秋,赵明,滕晓东 整理

关键词:泌尿男性生殖系统肿瘤;免疫标志物;诊断;鉴别诊断**中图分类号:**R 737.1;R 737.2 **文献标志码:**A**文章编号:**1001-7399(2018)03-0237-07**doi:**10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.001

泌尿男性生殖系统肿瘤包含肾、膀胱、前列腺、睾丸等主要器官的肿瘤,2016年WHO出版了相关肿瘤的新分类^[1]。近年来,该系统的肿瘤发病率在我国呈明显上升趋势。尽管该系统大部分肿瘤可根据镜下形态结合临床特点做出诊断,但仍有部分肿瘤需进行免疫组化标记以判断具体的组织学类型,并做出正确的诊断^[2]。本共识简要总结免疫组化在肾肿瘤、膀胱肿瘤、前列腺肿瘤和睾丸肿瘤中的应用和注意事项。

1 肾肿瘤诊断和鉴别诊断的免疫组化标志物

1.1 有助于判断肾来源的免疫组化标志物 大多数肾肿瘤为恶性,其中肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)最常见。RCC常发生血行转移,并且可以转移至一些罕见部位,如头皮、腹壁、口唇等。加之转移性RCC的形态变化很大,因此肾来源的标志物在转移癌的鉴别诊断中很重要。其中最常用的是PAX8。

PAX8是一个由415个氨基酸组成的转录因子,在肾的发育和功能中起重要作用,是国际泌尿病理协会(ISUP)推荐应用于肾上皮性肿瘤诊断最有用的标志物之一^[3]。PAX8表达于几乎所有的RCC,包括原发性RCC和转移性RCC。在实际工作中需要注意的是:(1)PAX8在正常肾小管较好表达,可作为阳性内对照;(2)PAX8偶尔可以表达于肾盂的尿路黏膜;(3)约20%的上尿路高级别尿路上皮癌(urothelial carcinoma, UC)可有局灶或弥漫PAX8表达;(4)PAX8也表达于女性下生殖系统和甲状腺。

同源的另一个肾小管上皮标志物PAX2可以作为二线抗体应用,但敏感性较低。其他类似的肾上皮标志物如RC-Cma、CD10和Ksp-cadherin则特异性较低。

1.2 有助于原发性肾肿瘤分类的标志物 RCC的主要类型包括透明细胞RCC、乳头状RCC和嫌色性RCC,三种RCC占有RCC的90%以上。大多数RCC的组织学诊断可以在常规HE染色下做出,但对于疑难病例,当肿瘤形态不典型、组织学特征有重叠或是在活检标本时,免疫组化的应用对正确的组织学分型是必需的。RCC中有不少肿瘤类型都

可以具有透明细胞、嗜酸性细胞或乳头结构,给诊断带来困扰。下面分别叙述在这些鉴别诊断中可以应用的免疫组化标志物。

1.2.1 肾小管不同部位来源肿瘤的免疫组化标志物 肾小管不同部位的标志物在最常见的几种肾肿瘤鉴别中有一定的帮助。公认的近端小管标记包括CD10、RCCma和vimentin,表达于透明细胞RCC和乳头状RCC,而通常不表达于嫌色性RCC和嗜酸细胞瘤。需要注意得是,CD10在前两者中为细胞膜阳性,在后两者中一般为阴性,但偶尔会出现局灶胞质阳性。远端小管标记包括CD117和Ksp-cadherin,表达于嫌色性RCC和嗜酸细胞瘤,而透明细胞RCC和乳头状RCC为阴性。

1.2.2 具有透明细胞特征肾肿瘤诊断的免疫组化标志物 除了最常见的透明细胞RCC外,很多肾肿瘤都可以出现透明细胞,包括透明细胞RCC、乳头状RCC、嫌色性RCC、MiT家族易位性RCC和上皮样血管平滑肌脂肪瘤(angiomylipoma, AML)。推荐应用一组标志物:CA-IX、CK7、AMACR、CD117、TFE3/TFEB和HMB-45以及Melan-A进行鉴别诊断(表1)。

表1 具有透明胞质的肾肿瘤的免疫组化鉴别

标志物	透明细胞 RCC	透明细胞 乳头状RCC	嫌色性 RCC	MiT 易位性 RCC	上皮样 AML
	+	+	-	-	-
CA-IX	+(盒子状)	+(杯口状)	-	-/+	-
CK7	-/+	+	+	-	-
AMACR	-/+	-	-	-/+	-
CD117	-	-	+	-	-
TFE3/TFEB	-	-	-	+	-/少数TFE3+
HMB-45	-	-	-	+/-	+
CK(34βE12)	-	+	-	-	-
CD10	+	-/+局灶	-/胞质局灶	+	-
Cathepsin K	-	-	-	+/-	-/+

透明细胞RCC通常CA-IX呈盒状的细胞膜弥漫阳性模式。CK7和AMACR通常阴性或局灶阳性,CK7阳性主要见于低级别、囊性变区域。低度恶性潜能的多房囊性透明细胞肾肿瘤依据形态学诊断,CA-IX阳性,并且CK7常弥漫阳性。

透明细胞乳头状RCC是WHO(2016版)泌尿系统分类中收录的新类型,部分与终末期肾疾病有关^[4]。这是一个组织学和免疫组化都具有特征性的RCC类型。组织学上肿瘤常位于囊腔内呈乳头状结构,也可呈管状或腺泡状结构。肿瘤细胞胞质透明,核低级别,远离基膜,相似于琴键或分泌早

期子宫内膜。免疫组化标记肿瘤细胞弥漫表达 CA-IX,呈杯口状阳性模式,即腔缘不着色,不同于透明细胞 RCC 的盒状阳性模式。该肿瘤通常 CD10 阴性或局灶阳性,CK7 弥漫阳性,AMACR 阴性,CK(34βE12)阳性,部分病例还可表达 GATA3。需要注意的是少数透明细胞 RCC 具有和透明细胞乳头状 RCC 相重叠的形态学特征和免疫表型。

嫌色性 RCC 占 RCC 的 5%,其特征是细胞界限清晰,胞质多,核皱缩。有助于鉴别诊断的免疫组化标志物套餐包括 CA-IX、CD117 和 CK7。通常嫌色性 RCC 中 CK7 和 CD117 呈弥漫阳性,不表达 CA-IX。而透明细胞 RCC 和透明细胞乳头状 RCC 为 CD117 阴性。

MIT 家族易位性 RCC 是近年来研究较多的一类 RCC,其形态学谱系随着免疫组化和分子生物学技术的应用而不断拓宽和延伸^[5]。目前主要包括两类肿瘤:Xp11 易位性 RCC 和 t(6;11)易位性 RCC。Xp11 易位性 RCC 具有 TFE3 基因易位,最独特的组织学特征是出现被覆透明细胞的乳头结构,表达 TFE3 蛋白。t(6;11)易位性 RCC 具有 MALAT1-TFEB 基因融合,最常见的组织学特征是双相型形态,由周边体积大的上皮细胞,中心小的上皮样细胞和基膜物质相混合构成,表达 TFEB 蛋白。近年来发现这两类肿瘤的形态学可以重叠,可以相似于经典的透明细胞 RCC、乳头状 RCC 等肿瘤形态。TFE3 和 TFEB 是最敏感而特异地能将易位性 RCC 与其他类型 RCC 鉴别的免疫组化标志物。Cathepsin K 和 HMB-45、Melan-A 是 TFE3、TFEB 的下游正向调控指标。Cathepsin K 是近年来发现的提示易位性 RCC 的一个更敏感的标志物,表达于所有的 TFEB RCC、PRCC-TFE3 RCC、RBM10-TFE3 RCC、MED15-TFE3 RCC 和软组织 ASPS,但其表达情况取决于基因表型。部分易位性 RCC 可以表达黑色素标志物如 HMB45 和 Melan-A,而上皮性标志物如广谱角蛋白和 EMA 在易位性 RCC 中常低表达或丢失表达。对于易位性 RCC 的诊断,原则上应进一步行 TFE3 或 TFEB 的 FISH 检测以确诊。需要注意 FISH 检测并非 100% 特异,在一些少见情况下,如 TFE3 FISH 检测 X 染色体臂内易位时会出现假阴性;检测 NONO-TFE3 RCC 时会出现临界信号;检测 RBM10-TFE3 RCC 和 GRIPAP1-TFE3 RCC 时会出现完全阴性的信号,此时的诊断更依赖于形态及免疫组化的判读。

上皮样 AML 的肿瘤细胞呈多角形,具有颗粒性、致密的嗜酸性或透明胞质,有时也会与透明细胞 RCC 相混淆。其与透明细胞 RCC 不同的是,AML 不表达上皮标志物,同时 PAX8、CA-IX、CD10 和 AMACR 阴性,而表达黑色素标志物,包括 Melan-A、MiTF、HMB-45 和 Mart-1,以及平滑肌标记 SMA。需要注意的是黑色素标志物可以弥漫或仅有局灶阳性,因此应至少选择≥2 种标志物进行诊断。绝大多数 AML 的 TFE3 和 TFEB 完全阴性,也可以和易位性 RCC 鉴别。

1.2.3 嗜酸性肾肿瘤诊断的免疫组化标志物 许多肾肿瘤都可以表现出不同程度的嗜酸性胞质,组织形态多样。对嗜酸性肾肿瘤的进一步分型是肾肿瘤诊断的难点。包括具有低级别核的一组嗜酸性肿瘤:嗜酸细胞亚型的嫌色性 RCC、

嗜酸细胞瘤、嗜酸性实体型乳头状 RCC 和 SDH 缺陷型 RCC (表 2)以及具有高级别核的一组嗜酸性肿瘤:透明细胞 RCC 的嗜酸性变型、II 型乳头状 RCC 和上皮样 AML(表 3)。可以应用一组抗体包括 CD117、CK7、CA-IX、AMACR、HMB-45 和 SDHB 进行鉴别诊断。

表 2 具有嗜酸性胞质的低级别肾肿瘤的免疫组化鉴别

标志物	嫌色性 RCC	嗜酸	嗜酸型乳	SDHB
	嗜酸细胞型	细胞瘤	头状 RCC	缺陷性 RCC
CD117	+	+	-	-
CK7	+	-/散在局灶 +	局灶 +	-
AMACR	-	-	+	-
SDHB	+	+	+	-

表 3 具有嗜酸性胞质的高级别肾肿瘤的免疫组化鉴别

标志物	透明细胞	乳头状	上皮样
	RCC	RCC	AML
CK7	-/+	+/-	-
CA-IX	+	-	-
AMACR	-/+	+	-
HMB45	-	-	+

对肾嗜酸细胞瘤和嗜酸细胞亚型嫌色性 RCC 的鉴别是泌尿男性生殖系统常规诊断中经常遇到的难题。尽管多年来人们尽力地寻找能够鉴别两者更好的标志物,但目前为止最可靠的标志物仍然是 CK7。绝大多数嫌色性 RCC 弥漫表达 CK7,以细胞膜为主;而嗜酸细胞瘤通常 CK7 阴性或仅散在少数细胞局灶阳性。胶样铁组织化学特染有一定价值,其在嫌色性 RCC 中呈弥漫深蓝色反应,在嗜酸细胞瘤中多为阴性,但有时在嗜酸细胞瘤也可呈弥漫浅蓝色反应或局灶深蓝色反应,从而影响结果的判读。并且这项特染技术受操作的影响较大,因此在常规工作中的应用受限。近年来另一个被证实有助于两者鉴别的免疫组化标志物是 S100A1。S100A1 是一种钙结合蛋白,为 S-100 家族成员之一。S100A1 在嗜酸细胞瘤中的阳性率约为 95%,而在嫌色性 RCC 中的阳性率较低。需要注意的是应选择单克隆抗体进行鉴别。杂合性嗜酸性细胞/嫌色细胞肾肿瘤(hybrid oncocytic/chromophobe tumor, HOCT)是与嗜酸细胞瘤和嫌色细胞癌组织学形态相重叠的新的嗜酸性肿瘤类别,目前在 WHO(2016 版)肾脏肿瘤分类中归在嫌色性 RCC 目录下,与嗜酸细胞瘤病和 Birt-Hogg-Dube(BHD)综合征相关^[5]。在组织学上可见两种肿瘤形态混合或移行存在,以及散在分布的透明细胞,免疫表型上 CD117、CK7 灶状阳性,需结合临床以及必要时的 FLCN 胚系突变检测以助 BHD 综合征的诊断。

许多透明细胞 RCC,特别是高级别的肿瘤可以具有局灶或显著的嗜酸性颗粒性胞质,酷似嫌色性 RCC。区分两者最有价值的标志物是 CK7、CD117 和 CA-IX。嫌色性 RCC 通常 CK7 和 CD117 阳性,而 CA-IX 阴性。与之相反,透明细胞 RCC 通常 CK7 和 CD117 阴性,而 CA-IX 阳性。上皮性 AML 常常呈嗜酸性细胞形态,散在的脂肪细胞存在是有用的诊断

线索。免疫表型上黑色素标记如 HMB-45 和 Melan-A 阳性,平滑肌标记 SMA 阳性,肾小管标记 PAX8 阴性而有助于鉴别。

SDH 缺陷型 RCC 是 WHO(2016 版)肾肿瘤中的少见新类型,包括 SDHB、SDHC、SDHD 和 SDHA 缺陷型,其中 SDHB 缺陷型 RCC 最常见,后三种肿瘤罕见^[6]。SDH 各亚型的缺陷都会导致 SDHB 表达缺失,而 SDHA 表达缺失只代表 SDHA 亚基缺陷。SDHB 缺陷型 RCC 形态上与嗜酸细胞特征的肾肿瘤均有重叠,最显著的形态学特征是肿瘤细胞胞质丰富,轻度嗜酸性而不均匀,含有典型的胞质空泡或包涵体。肿瘤大部分为低核级,少部分为高核级。免疫组化标记肿瘤细胞 SDHB 阴性,而周围肾组织以及陷在肿瘤中的正常肾小管呈强的颗粒状胞质阳性。这种内对照的阳性对判断肿瘤的阴性表达非常重要。另外需要注意的是对于具有透明胞质的肿瘤,可能出现“非特异性”的胞质标志物阴性,包括 SDHB 阴性。此时需要在肿瘤多个区域全面评价。

1.2.4 乳头状肾肿瘤诊断及鉴别诊断的免疫组化标志物
除了乳头状 RCC 之外,乳头结构也可以见于透明细胞 RCC 伴假乳头状生长、透明细胞乳头状 RCC、MIT 家族易位性 RCC 以及少见的遗传性平滑肌瘤病和 RCC 综合征相关性 RCC(hereditary leiomyomatosis and RCC syndrome-associated RCC, HLRCC)。可以使用一组包括 CA-IX、CK7、CD10、AM-ACR、TFE3/TFEB、HMB-45 和 FH 在内的标志物进行鉴别^[7](表 4)。

表 4 具有明显乳头结构的肾肿瘤的免疫组化鉴别

标志物	乳头状 RCC	透明细胞 RCC 伴假乳头	透明细胞乳头状 RCC	MIT 家族易位性 RCC	HLRCC 综合征相关性 RCC
CA-IX	-	+(盒子状)	+(杯口状)	-/+	-
CK7	+/- 型可 -	-	+	-	+
CD10	+	+	-/局灶 +	+	-
AMACR	+	-/+	-	-/+	+
TFE3/TFEB	-	-	-	+	-
HMB-45	-	-	-	+/-	-
FH	+	+	+	+	-

AMACR 是乳头状 RCC 的敏感标记,呈弥漫的胞质颗粒状着色。CK7 在 I 型乳头状 RCC 中的敏感性要高于 II 型乳头状 RCC,呈细胞膜和胞质阳性。CD10 在乳头状 RCC 中常常阳性。透明细胞 RCC 有时由于细胞脱落形成假乳头结构,CA-IX 往往呈盒子状的细胞膜弥漫阳性,AMACR 可以有不同程度的阳性,而 CK7 通常阴性。MIT 家族易位性 RCC 容易出现明显的乳头结构,TFE3 或 TFEB 的抗体阳性具有高度特异性,可以进一步通过 TFE3 或 TFEB 的 FISH 检测确诊。HLRCC 是 WHO(2016 版)分类新增加的 RCC 罕见类型,常伴有皮肤或子宫的多发性平滑肌瘤或平滑肌肉瘤。相关的 RCC 多数由乳头状结构组成,瘤细胞具有丰富的嗜酸性胞质,明显突出的嗜酸性核仁以及核周空晕,类似于病毒包涵体。HLRCC 也可出现管状、管囊状和实性结构。由

于此种肿瘤进展迅速,患者预后差,因此对于形态学提示需要进行 FH 的免疫组化染色,肿瘤细胞阴性。最可靠的诊断标准是行 FH 基因突变检测。

1.2.5 一些少见肾肿瘤鉴别诊断的免疫组化标志物 (1) 密集小管状肾肿瘤鉴别诊断的免疫组化标志物:后肾腺瘤(metanephric adenoma, MA)是一种由原始的后肾肾小管细胞肿瘤性增生构成的罕见肾良性肿瘤。通常依靠常规 HE 切片即可诊断。当肿瘤富于细胞或形态学不典型时,需与上皮型肾母细胞瘤(epithelial-predominant Wilms tumor, e-WT)和实体型乳头状 RCC 鉴别,尤其是在有限的肾肿瘤穿刺标本中。MA 无包膜,细胞形态温和;e-WT 有包膜,往往异型性显著,细胞核多重叠,胞质少,核分裂象多见;实体型的乳头状 RCC 可见包膜,细胞异型性明显,胞质丰富,常有泡沫细胞。免疫组化上 MA 均表达 CD57,其定位于细胞膜或胞质,大部分表达 WT1。钙黏蛋白 17(Cadherin 17, CDH17)又称为肝肠钙黏蛋白,近年研究显示其是诊断 MA 高度敏感和特异的标志物,在其它的肾上皮性肿瘤中仅极个别阳性。此外新近研究证实约 90% 的 MA 存在 BRAF V600E 突变,检测这一特定位点突变的特异性抗体(VE1)有助于诊断,在 67% 的 MA 中 VE1 呈弥漫颗粒状胞质阳性,而 e-WT 仅少数病例表达,实体型的乳头状 RCC 不表达(表 5)。(2)形态学提示远端肾单位起源肿瘤的诊断免疫组化标志物:“远端肾单位样的癌”是一描述性术语,包括少见的集合管癌(collecting duct carcinoma, CDC)和罕见的肾髓质癌,两者组织学有重叠,均为高级别,具有实性、管状或乳头结构,伴有一定程度的间质反应和炎细胞浸润。同时需要鉴别的往往还包括高级别的乳头状 RCC 和发生在肾盂的 UC。据报道 100% 的肾髓质癌有 INI-1 缺失。SMARCB1/INI-1 基因是 SWI/SNF 染色质重塑复合物的成员,BAF47 抗体能够检测该基因的产物。有文献报道 15% 的 CDC 也可有 INI-1 的缺失。近来的研究显示肾髓质癌还可以有干细胞转录因子 OCT4 的过表达,而不见于 CDC。对于肾盂发生的上尿路癌的鉴别,可以应用 GATA3 和 p63。需要注意的是 PAX8 并不适用,其在多达 20% 的上尿路癌中可以阳性。高分子量角蛋白在绝大多数上尿路癌中阳性,在部分 CDC 中阳性,而不表达于肾髓质癌。

表 5 密集小管状肾肿瘤的免疫组化鉴别

标志物	MA	e-WT	实体型乳头状 RCC
CD57	+	-/少数 +	-/少数 +
CK7	-	-	+
AMACR	-/少数 +	-	+
WT-1	+	+	-
CDH17	+	-/个别 +	-
VE1	大多数 +	-/少数 +	-

2 膀胱肿瘤诊断及鉴别诊断的免疫组化标志物

2.1 判断尿路上皮来源的免疫组化标志物 传统的支持尿

路上皮分化的标志物包括 CK7、CK20、高分子量角蛋白 [HMWCK、CK(34βE12)]、p63 和 CK5/6。UC 是少有的几个 CK7 和 CK20 共同表达的肿瘤之一,可见于 50% ~ 62% 的 UC。需要注意的是有多达 14% 的高级别 UC 不表达 CK7 或 CK20。GATA3 是 ISUP 推荐的确定尿路分化的一线标志物。具有清晰的细胞核染色,80% 的高级别 UC 表达。GATA3 在绝大多数 RCC 中为阴性,有报道嫌色性 RCC 和嗜酸细胞瘤偶尔可阳性。除了尿路上皮外,GATA3 在乳腺癌亦为阳性,在绝大多数其他器官的癌中阴性,在皮肤基底细胞癌、滋养细胞肿瘤、卵黄囊瘤、鳞状细胞癌、间皮瘤、副神经节瘤可以表达。最近发现 GATA3 在具有放射性非典型性的良性前列腺组织中阳性,是一个可能被误诊为 UC 的免疫组化陷阱。S100P(placental)也是近年来出现的尿路上皮标志物,可见于近 80% 的 UC。uroplakin2 和 uroplakin3 特异性强,但敏感性较低^[8]。

2.2 鉴别反应性不典型增生和尿路上皮原位癌 (carcinoma in situ, CIS) 的免疫组化标志物 尿路上皮 CIS 是一种高级别的平坦型病变,细胞核深染,增大,多形,核分裂象多见。反应性不典型增生常常与膀胱腔内灌注治疗、结石、感染或创伤有关。由于形态学有交叉,两者的鉴别是尿路活检标本病理诊断的一个难点。同时鉴别又非常重要,因为治疗和预后完全不同。联合 CK20、p53 和 CD44 的免疫组化检测对鉴别诊断有一定帮助,但一定要以组织形态学为基础(表 6)。CK20 在反应性病变中仅伞细胞阳性,而大多数 CIS 可见 CK20 呈全层阳性。P53 在反应性病变中为阴性或局限于基底细胞局灶阳性,在多数 CIS 中为不同程度的全层阳性。CD44 是一种细胞黏附蛋白,其在反应性病变表达不等,可以是局灶的基底细胞阳性,也可以是弥漫的全层阳性;但在绝大多数 CIS 中为阴性。Ki-67 作用有限,其在 CIS 和反应性非典型增生的表达有明显重叠。此外,免疫组化对于区分异型增生和 CIS 没有帮助。

表 6 反应性不典型增生和 CIS 的免疫组化鉴别			
标志物	正常	反应性不典型增生	CIS
CK20	仅伞细胞阳性	仅伞细胞阳性	全层过表达
p53	-	-	强 +
CD44	基底细胞 +	所有细胞表达增加	-

2.3 鉴别膀胱腺样病变的免疫组化标志物 膀胱的腺样病变包括 UC 伴腺样分化、少见的膀胱原发性腺癌、继发性腺癌(邻近器官的腺癌直接蔓延累及膀胱和膀胱的转移性腺癌),此外还有一组容易误诊为腺癌或恶性腺样病变的良性病变。继发性腺癌可以来源于结直肠、前列腺、子宫颈和少见情况下的乳腺、胃、肺等。其中膀胱的肠型腺癌与转移性结直肠腺癌的鉴别较为多见。需要注意结直肠/阑尾起源的标志物 CDX2、villin 以及新近应用的 STAB2(special AT-rich sequence-binding protein 2)都可以在两者中表达,无鉴别意义。β-catenin 的着色定位有一定的价值:81% 的结肠腺癌累及膀胱可以出现 β-catenin 的核染色,而膀胱原发性腺癌为

胞膜和胞质阳性。但此种情况下诊断主要依靠临床病史和影像学发现,免疫组化标记只有辅助意义^[9]。

肾源性腺瘤是一种良性增生性病变,多见于膀胱,其次为尿道,输尿管和肾盂罕见。组织学上呈小管状、囊状、乳头状或小巢状结构,被覆单层立方或矮柱状上皮,细胞异型性轻微,可见鞋钉样细胞,有时胞质透明。间质水肿,有不同程度的炎细胞浸润。肾源性腺瘤需与前列腺腺癌、透明细胞腺癌等鉴别。肾源性腺瘤表达 PAX8 和 PAX2 这两个肾来源的特异性标志物,还表达 P504S,不表达高分子量角蛋白和 p63,当肿瘤累及前列腺尿道部时,需要特别注意这个免疫组化的陷阱。在与透明细胞腺癌的鉴别中,p53 和 Ki-67 有一定帮助。肾源性腺瘤仅有少量局灶 p53 着色,Ki-67 增殖指数低;而透明细胞腺癌 p53 强阳性,Ki-67 增殖指数高。HNF1β(hepatocyte nuclear factor 1β)是近年来应用于女性生殖道透明细胞腺癌诊断的标志物,细胞核表达,其在膀胱/尿道透明细胞腺癌中亦为阳性,有助于诊断,但不能区分原发还是转移(表 7)。

2.4 鉴别膀胱梭形细胞肿瘤的免疫组化标志物 膀胱的梭形细胞肿瘤包括肉瘤样 UC、炎症性肌纤维母细胞肿瘤(inflammatory myofibroblastic tumor, IMT)、假肉瘤样肌纤维母细胞增生、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤。在样本有限的情况下,需要进行免疫组化标记联合检测:广谱 CK、p63、高分子量角蛋白、CK5/6、SMA、ALK、desmin 等以辅助诊断(表 8)。

角蛋白在肉瘤样 UC 中的表达可以不同程度降低,需要同时应用几种角蛋白的标记,特别是高分子量角蛋白和 CK5/6,再加上 p63 阳性,则支持肉瘤样 UC 的诊断。IMT 的特征是 SMA 强阳性,经常表达广谱 CK[如 CK(AE1/AE3)]。ALK-1 蛋白阳性(80% 病例)或 FISH-ALK1 证实存在易位有助于区分 IMT 和其他的梭形细胞肿瘤。平滑肌肉瘤弥漫表达 actin 和(或)desmin,角蛋白通常阴性,也可有局灶或弱阳性,高分子量角蛋白和 p63 阴性。横纹肌肉瘤 myogenin 或 MyOD1 核阳性,组织学特征再结合多发于年轻人,一般不会误诊。

3 前列腺肿瘤诊断和鉴别诊断的免疫组化标志物

3.1 判断前列腺来源的免疫组化标志物 传统的前列腺标志物 PSA 和 PSAP 仍然广泛应用于在转移部位确定前列腺来源,两者敏感性和特异性均较好,但在高级别前列腺癌中阳性率较低。当 PSA 阴性或染色结果不明确时,可以选择另一种前列腺特异性标志物 P501S 来证实前列腺来源。NKX3.1 属于 homeobox 蛋白,在前列腺、睾丸和乳腺中具有特异性的核表达。有研究证实 NKX3.1 标记前列腺癌的敏感性类似于 PSA 和 P501S,识别转移性前列腺癌的敏感性类似于 PSA 和 PSAP。因此 NKX3.1 是近年来推荐应用证实前列腺起源的二线标志物。在不少单位应用的前列腺特异性膜抗原(PSMA)是一种跨膜的前列腺上皮细胞糖蛋白,在绝大多数前列腺癌及其转移灶中表达。尽管其在高级别前列腺癌中表达的比例高于 PSA,但 PSMA 可以表达于多种肿瘤

表 7 膀胱腺样病变的免疫组化鉴别

病变类型	CK7	CK20	CDX2	β-catenin	p63	HMWCK	AMACR	PAX8/PAX2	PSA	HNF1β
UC 伴腺样分化	+	+/-	-	/	+	+	-/+	-	-	-
原发性膀胱腺癌	+/-	+	+	胞膜、胞质 +	/	/	+/-	-	-	-
结直肠腺癌	-	+	+	胞核 +	/	/	+/-	-	-	/
肾源性腺瘤	+	-	/	/	-	-/+	+	+	-	-
前列腺腺癌	-	-	/	/	-	-	+	-	+	/
透明细胞腺癌	+	+/-	/	/	-	-/+	+	-	-	+

/:不适用

表 8 膀胱梭形细胞肿瘤的免疫组化鉴别

病变类型	SMA	ALK-1	desmin	CK (AE1/AE3)	p63	HMWCK
IMT	+	+/-	+/-	+	-	-
肉瘤样 UC	-/+	-	-	+	+/-	+/-
平滑肌肉瘤	+	-	+	-	-	-
横纹肌肉瘤	+	-/+	+	-	-	-

类型,包括 RCC、胃肠肿瘤和 UC,使得 PSMA 作为前列腺组织特异性标记的用途受限^[10]。需要注意上述的前列腺组织特异性标志物在良性前列腺组织和前列腺癌中均表达,不能用于区分前列腺的良恶性病变。

3.2 辅助诊断前列腺癌的免疫组化标志物

3.2.1 基底细胞标志物 基底细胞的缺失是诊断前列腺癌的一个关键指标。常用的基底细胞标志物有高分子量角蛋白 CK(34βE12)或 CK5/6 和 p63。前两者为胞质着色,p63 为核着色。需要注意的是并非所有的前列腺穿刺标本均需要进行基底细胞的标记。在组织学可疑为癌的病変中,如果基底细胞缺失则支持前列腺癌的诊断。需要警惕的是基底细胞的缺失亦可见于 5%~23% 的良性病变,包括部分性萎缩、腺病等。因此仅有基底细胞的缺失一个指标不足以诊断前列腺癌,必须以 HE 常规切片为基础,尤其是在穿刺标本中病灶很小的情况下。此外,个别前列腺癌病例会异常表达 p63,偶尔也有少数前列腺癌病例会表达高分子量角蛋白。与前列腺癌标志物联合应用可以提高诊断的准确性。

3.2.2 在前列腺癌中过表达的标志物 由基因 P504S 编码的 AMACR 是有价值的前列腺癌标志物。其过表达可见于 83%~100% 的前列腺癌,不论 Gleason 评分如何。因此 AMACR 阳性和基底细胞阴性可以提高诊断前列腺癌的准确性。但是 AMACR 并不特异,它在高级别前列腺上皮内瘤变(prostatic intraepithelial neoplasia, PIN)中阳性,并且在一些相似于癌的良性病变,如部分性萎缩、腺病和肾源性腺瘤中也可阳性。这一点在非典型性腺体数量少的穿刺样本诊断中需要尤为注意。推荐应用由 AMACR、高分子量角蛋白和 p63 联合构成的鸡尾酒套餐,其诊断价值要优于这几个标记的单独应用,并且能最大限度地 在穿刺标本中节省组织。

TMPRSS2-ERG 是前列腺癌中最常见的融合基因,可见于欧美人群约 50% 的前列腺癌,亚洲人群不到 20% 的前列腺癌和约 20% 的高级别 PIN 有表达。ERG 基因融合导致形成截短的 ERG 蛋白产物。商业化的抗 ERG 抗体能够检测到

过表达的 ERG 蛋白,可以作为 ERG 基因重排的替代性标志物,但其敏感性有所降低,在少数良性前列腺腺体中也可呈阳性。因此 ERG 的低敏感性,尤其是在亚洲人群中更低的敏感性,限制了其在前列腺癌诊断中的价值。另一方面,由于其高特异性,如果在穿刺标本中的非典型性小腺体阳性,则支持前列腺癌的诊断。

3.2.3 鉴别差异化的前列腺癌和 UC 的免疫组化标志物 差异化的前列腺癌和 UC 之间的鉴别是泌尿男性生殖系统病理中经常遇到的一个诊断问题,确诊具有重要的临床和治疗意义。应用一组标志物可以有效地对一些疑难病例做出诊断(表 9)。首选的标志物包括 PSA、高分子量角蛋白和 p63。如果一个肿瘤 PSA 强阳性,而后两个标志物阴性,支持为前列腺癌。如果一个肿瘤 PSA 阴性,而后两个标志物阳性,则支持为 UC。CK7 和 CK20 也有一定的价值,前列腺癌通常情况下不表达 CK7 和 CK20,而 UC 通常 CK7 阳性,CK20 大部分阳性。如果这几个标志物结果模棱两可,可以再应用 AR、P501S、NKX3.1 和 GATA3。AR、P501S 和(或)NKX3.1 阳性,而 GATA3 阴性支持为前列腺癌;GATA3 阳性,而 AR、P501 和(或)NKX3.1 阴性则诊断差异化的 UC。

表 9 低分化的前列腺癌和 UC 的免疫组化鉴别

病变类型	PSA	PSMA	NKX3.1	GATA3	HMWCK	p63	S100P	AR
前列腺腺癌	+	+	+	-	-	-	-	+
UC	-	-	-	+	+	+	+	-

3.2.4 鉴别前列腺小细胞癌和高级别的前列腺癌的免疫组化标志物 前列腺小细胞癌罕见,仅占前列腺恶性肿瘤的 0.5%~1%。典型的小细胞癌,可以单凭形态学做出诊断。但有时形态学不典型,难以在 HE 上与高级别的前列腺癌鉴别,需要进行免疫组化标记以确诊,具有重要的治疗和预后意义。前列腺小细胞癌通常会表达常用的神经内分泌标记:CgA、Syn 和 CD56。90% 的小细胞癌中会有至少一个上述标志物阳性。前列腺标志物如 PSA、P501S 在 17%~25% 的小细胞癌中阳性,通常为局灶阳性。如果 PSA 或 PSAP 强阳性,则倾向高级别前列腺癌而非小细胞癌。此外近 1/3 的前列腺小细胞癌可以表达 p63 和高分子量角蛋白,两者在前列腺癌中基本为阴性。

原发性小细胞癌和转移性小细胞癌,特别是来自膀胱或肺的小细胞癌的鉴别中免疫组化作用很有限。TTF1 的表达可见于 50% 以上的前列腺小细胞癌。TMPRSS2-ERG 的融合

基因可见于约 50% 的前列腺小细胞癌,进行相关的免疫组化或 FISH 检测,阳性则支持前列腺原发性小细胞癌。联系临床病史也很重要。

4 睾丸肿瘤诊断和鉴别诊断的免疫组化标志物

睾丸肿瘤少见,仅占人类恶性肿瘤的 1%,但在年轻男性和男孩中易发。大部分睾丸肿瘤可以在 HE 上做出诊断。但当形态不典型时,免疫组化可起到重要作用。并且评价混合性生殖细胞肿瘤(germ cell tumor, GCT)中的不同成分时,免疫组化非常有帮助。睾丸肿瘤分为 GCT、性索间质肿瘤、混合性生殖细胞性索间质肿瘤和杂类肿瘤。

4.1 睾丸 GCT 免疫组化标志物 SALL4 (spalt-like transcription factor 4) 是一种参与胚胎发育的锌指转录因子,是目前 GCT 最敏感的标志物,在绝大多数 GCT 细胞胞核阳性。OCT4 (也称为 OCT3/4) 是一种对于胚胎干细胞多潜能的维持至关重要的核蛋白。其在精原细胞瘤和胚胎性瘤中阳性,在生殖细胞原位肿瘤(germ cell neoplasia in situ, GCNIS)中亦为阳性,而在卵黄囊瘤、精母细胞性肿瘤和绒毛膜上皮瘤中阴性。如果是鉴别 GCNIS 和非肿瘤性的不典型的生殖细胞,推荐应用 OCT4 而并非 SALL4,因为 SALL4 可能在两者中均表达。卵黄囊瘤具有复杂和一些少见的生长模式,可能与其他的 GCT 相混淆。AFP 和 Glypican3 (GPC3) 是卵黄囊瘤特征性的免疫标记。GPC3 较 AFP 更为敏感,它是一个胚胎组织产生的胎儿蛋白,可以调节细胞的生长和增殖能力,在肝细胞癌、儿童的肝母细胞瘤和肾母细胞瘤中呈阳性。包括 CK(AE1/AE3)、CD30 和 CD117 在内的一组标志物可以有效地将精原细胞瘤和胚胎性癌鉴别。CD30 在胚胎性癌可为局灶阳性。GATA3 可以有效地在 GCT 中识别出合体滋养细胞的成分。GATA3 在部分卵黄囊瘤中可以阳性,而在精原细胞瘤和胚胎性癌中为阴性。GATA3 和 β -HCG 的阳性支持绒毛膜上皮癌的诊断^[11]。GATA3 在罕见的睾丸胎盘部位滋养细胞肿瘤和上皮样滋养细胞肿瘤中亦为阳性(表 10)。

4.2 鉴别 GCT 与性索间质肿瘤的免疫组化标志物 大多数性索间质肿瘤能够在常规 HE 切片上做出诊断,但有时性索间质肿瘤会与 GCT 有形态学交叉,这时需要行免疫组化检测。例如当 Sertoli 细胞瘤呈弥漫型结构,具有透明的胞质和突出的核仁,并伴有淋巴细胞浸润时,会非常相似于精原细胞瘤;反之具有明显小管状结构的精原细胞瘤会与性索间质肿瘤混淆。呈条索状和管状分布的 Sertoli 细胞瘤会与类癌混淆。具有显著囊腔的 Leydig 细胞瘤相似于卵黄囊瘤;以及具有陷入的生殖细胞的性索间质肿瘤会考虑到混合性生殖细胞-性索间质肿瘤的诊断。

SALL4 在性索间质肿瘤中阴性。对于睾丸的性索间质肿瘤,传统的标志物是 α -inhibin 和 calretinin。需要注意的是大多数 Leydig 细胞瘤会表达这两种标记,但仅有一小部分 Sertoli 细胞瘤有两者的表达。因此需要一些新型标志物来支持诊断,近年来推荐应用的 SF1(类固醇生成因子 steroidogenic factor 1),又称作肾上腺 4 结合蛋白(adrenal-4 binding

表 10 睾丸 GCT 的免疫组化鉴别

标志物	GCNIS	精原细胞瘤	胚胎性癌	卵黄囊瘤	绒毛膜上皮癌	畸胎瘤	精母细胞性肿瘤
SALL4	+	+	+	+	+	+/-	+
Oct4	+	+	+	-	-	-/+	-
CD117	+	+	-/+	-/+	-	-	-/+
CD30	-	-	+	-	-	-	-
Glypican3	-	-	-/+	+	+/-	-	-
D2-40	-	弥漫+	-/局灶+	-	-	-	-
CK(AE1/AE3)	-	-/个别局灶+	-/+	+	+	+	-
β -HCG	-	-	-	-	+	-	-
AFP	-	-	-	+	-/+	-	-
GATA3	-	-	-	+/-	+	-/+	-

畸胎瘤的免疫标记结果取决于其含有的成分;GCNIS:生殖细胞原位肿瘤

protein),是调控性腺和肾上腺类固醇生成的核受体转录因子,表达于睾丸、卵巢、肾上腺、垂体和胎盘。其在性索间质肿瘤中表达的敏感性和特异性都较高,而不表达于 GCT。 β -catenin 在 63% 的 Sertoli 细胞瘤中会有核阳性,对鉴别诊断有一定的帮助(表 11)。

表 11 睾丸 GCT 和性索间质肿瘤的免疫组化鉴别表

标志物	GCT	性索间质肿瘤
SALL4	+	-
Oct4	+	-
Glypican-3	+	-
α -inhibin, calretinin	-	+/-
SF-1	-	+

GCT 中可以有散在的合体滋养层细胞,可 β -HCG、Glypican3 和 GATA3 阳性

4.3 鉴别 GCT 与大细胞淋巴瘤的免疫组化标志物 睾丸原发性淋巴瘤占非霍奇金淋巴瘤的 1%~2%,占有睾丸肿瘤的 1%~9%。弥漫大 B 细胞淋巴瘤是睾丸淋巴瘤中最常见的类型。应用由 SALL4、CD45、CD20 和 CD30 组成的标志物可以有效地将 GCT 与大细胞淋巴瘤相鉴别。特别要注意的可能陷阱是 SALL4 可以在髓性白血病、淋巴瘤母细胞性淋巴瘤和间变性大 B 细胞淋巴瘤中出现阳性。可以补充应用 OCT4、CK(AE1/AE3)等标志物来确定诊断。

近年来敏感性和特异性更好的标志物不断出现,对于疑难病例的诊断,免疫组化检测已成为必备工具。部分泌尿男性生殖系统肿瘤的准确组织学分型依赖于免疫组化,仍需强调的是免疫组化的应用一定要以形态学为基础,结合患者的临床信息,有一定范围内的鉴别诊断考虑时再应用。希望本文会对病理医师的日常工作有帮助,同时也应该认识到,即使在完备的免疫组化标记下,仍有少部分肿瘤难以确诊或分型,需要依靠分子生物学和基因学的技术确诊或精准分型。随着分子生物学在泌尿男性生殖系统肿瘤中的飞速进展,我们也相信会有更多有价值的免疫组化标志物出现并得到应用。

参考文献:

- [1] Moch H, Humphrey P A, Ulbright T M, *et al.* WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organ[M]. Lyon: IARC Press, 2016;18-235.
- [2] Wilkerson M L, Lin F, Liu H, *et al.* The application of immunohistochemical biomarkers in urologic surgical pathology[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014,138(12):1643-1665.
- [3] Amin M B, Epstein J I, Ulbright T M, *et al.* Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in urologic pathology: report from the international society of urological pathology consensus conference[J]. Am J Surg Pathol, 2014,38(8):1017-1022.
- [4] Srigley J R, Delahunt B, Eble J N, *et al.* The international society of urological pathology (ISUP) vancouver classification of renal neoplasia[J]. Am J Surg Pathol, 2013,37(10):1469-1489.
- [5] 饶秋, 夏秋媛, 周晓军, 等. 2016 版 WHO 肾脏肿瘤新分类解读[J]. 中华病理学杂志, 2016,45(7):435-441.
- [6] 赵明, 何向蕾, 张大宏, 等. WHO(2016)泌尿男性生殖系统肿瘤组织学分类解读[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017,33(2):119-124.
- [7] Reuter V E, Argani P, Zhou M, *et al.* Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the kidney tumors; report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference[J]. Am J Surg Pathol, 2014,38(8):e35-e49.
- [8] Xiao X, Hu R, Deng F M, *et al.* Practical applications of immunohistochemistry in the diagnosis of genitourinary tumors[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017,141(9):1181-1194.
- [9] Williamson S R, Lopez-Beltran A, Montironi R, *et al.* Glandular lesions of the urinary bladder: clinical significance and differential diagnosis[J]. Histopathology, 2011,58(6):811-834.
- [10] Epstein J I, Egevad L, Humphrey P A, *et al.* Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the prostate: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference[J]. Am J Surg Pathol, 2014,38(8):e6-e19.
- [11] Ulbright T M, Tickoo S K, Berney D M, *et al.* Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in testicular tumors; report from the International Society of Urological Pathology consensus conference[J]. Am J Surg Pathol, 2014,38(8):e50-e59.

本版共识专家组成员(按姓氏拼音为序):曹登峰,美国圣路易斯华盛顿大学医学院病理学和免疫学系;曹云,中山大学附属肿瘤医院病理科;陈虹,福建医科大学附属第一医院病理科;陈锐,四川大学华西医院病理科;成志强,深圳市人民医院病理科;程亮,美国印第安纳大学医学院病理系;崔晓宾,石河子大学第一附属医院病理科;段光杰,陆军军医大学第一附属医院病理科;甘华磊,复旦大学附属肿瘤医院病理科;顾永耀,广西医科大学第一附属医院病理科;郭爱桃,中国人民解放军总医院病理科;郭艳萍,河南省人民医院病理科;韩博,山东大学齐鲁医院病理科;贺慧颖,北京大学医学部病理系/北京大学第三医院病理科;侯君,复旦大学附属中山医院病理科;李春辉,承德医学院附属医院病理科;李惠翔,郑州大学第一附属医院病理科;李静,空军军医大学西京医院病理科;李珀,贵阳医科大学附属医院病理科;李巧新,新疆医科大学第一附属医院病理科;李玉军,青岛大学附属医院病理科;刘强,上海交通大学附属仁济医院病理科;苗原,中国医科大学附属第一医院病理科;潘国庆,昆明医科大学第一附属医院病理科;饶秋,中国人民解放军南京总医院病理科;滕梁红,首都医科大学宣武医院病理科;滕晓东,浙江大学医学院附属第一医院病理科;田保玲,中国医科大学附属盛京医院病理科;涂露霞,南昌大学第一附属医院病理科;万婕,华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科;汪必成,武汉大学中南医院病理科;王爱香,天津医科大学第二医院/天津市泌尿外科研究所病理室;王晨,山西医科大学第二医院病理科;王功伟,北京大学人民医院病理科;王冠男,郑州大学第一附属医院病理科;王慧萍,浙江大学医学院附属第一医院病理科;王素英,宁波市临床病理诊断中心;王娅南,河北大学附属医院病理科;王英炜,哈尔滨医科大学附属第一医院病理科;吴春林,福建医科大学附属第二医院病理科;吴丽华,哈尔滨医科大学附属第二医院病理科;夏秋媛,中国人民解放军南京总医院病理科;肖立,复旦大学附属华东医院病理科;肖芹,江苏省苏北人民医院病理科;肖雨,北京协和医院病理科;徐海霞,海口市人民医院病理科;徐晓,九江学院临床医学院附属医院病理科;许传杰,吉林大学第二医院病理科;叶新青,广西医科大学附属肿瘤医院病理科;尹红玲,中南大学湘雅医院病理科;尹玉,安徽医科大学病理教研室;于文娟,青岛大学附属医院病理科;余英豪,中国人民解放军福州总医院病理科;余永伟,第二军医大学长海医院病理科;岳君秋,湖北省肿瘤医院病理科;张伟,解放军第401医院病理科;张志勇,河北省唐山市工人医院病理科;章宜芬,江苏省中医院病理科;赵焕芬,河北省人民医院病理科;赵明,浙江省人民医院病理科;钟国平,浙江省宁波市鄞州人民医院病理科;钟山,厦门大学附属第一医院病理科;周桥,四川大学华西医院病理科;周晓军,中国人民解放军南京总医院病理科。

本版共识执笔人:贺慧颖(E-mail: huiyinghe@bjmu.edu.cn)

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.002.html>

· 论 著 ·

EPCR 通过活化 PAR-1 促进人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及迁移

汤洋洋,徐炎炎,杨红丽,卓倩,王庆苓

摘要:目的 探讨内皮细胞蛋白 C 受体 (endothelial protein C receptor, EPCR) 对乳腺癌增殖、迁移的影响及机制研究。方法 采用 siRNA 技术降低人乳腺癌 MCF-7 细胞中 EPCR 的表达;添加抗 PAR-1 抗体阻断 PAR-1 作用,然后采用 CCK-8 检测细胞的增殖能力、Transwell 检测迁移能力、Cell-ELISA 检测 EPCR 对 PAR-1 活性的影响。结果 EPCR 干扰后,与空白对照组及无关序列组相比,EPCR 干扰组 MCF-7 细胞的增殖及迁移能力均明显降低 ($P < 0.05$)。抗 PAR-1 抗体处理后,与空白对照组相比,PAR-1 抗体处理组细胞的增殖迁移能力均明显降低 ($P < 0.05$)。并且 Cell-ELISA 结果显示 EPCR 干扰组未裂解活化的 PAR-1 抗体结合率明显升高 ($P < 0.05$)。结论 EPCR 可以通过活化 PAR-1 促进人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖迁移。

关键词:乳腺肿瘤;EPCR;PAR-1;增殖;迁移

中图分类号:R 73-3;R 737.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0244-04

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.002

内皮蛋白 C 受体 (endothelial protein C receptor, EPCR) 能与蛋白 C (protein C, PC) 特异性结合,使 PC 活化效率提高 4~20 倍,活化的蛋白 C (activated protein C, APC) 继而活化蛋白酶激活受体 1 (protease-activated receptor 1, PAR-1),并且 APC 与其辅因子蛋白 S 一起降解凝血因子 Va 和 VIIIa,从而干扰凝血酶产生并抑制凝血级联反应^[1-2]。最初研究认为 EPCR 主要定位在大血管的内皮细胞上。近年来研究发现 EPCR 在有些肿瘤组织中有表达,如卵巢癌^[3]、恶性胶质瘤^[4]、胸膜间皮瘤^[5]等。然而,EPCR 在乳腺癌中的进展和作用尚未阐明。本实验以 MCF-7 细胞株为研究对象,采用 RNAi 技术沉默人乳腺癌细胞 MCF-7 中 EPCR 的表达,或通过添加抗 PAR-1 抗体阻断 PAR-1 活化,然后采用 CCK-8、Transwell 小室实验检测乳腺癌细胞的增殖及迁移能力。采用 Cell-ELISA 技术检测 EPCR 表达改变对 PAR-1 裂解活化的影响,以探索 EPCR 是否可以通过调节 PAR-1 活化从而影响乳腺癌细胞增殖及迁移。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 人乳腺癌 MCF-7 细胞购自中国科

学院细胞所,EPCR siRNA 片段、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)^[6],DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司),胎牛血清 (杭州四季青公司),CCK-8 试剂盒 (日本株式会社同仁化学),TRIzol、qRT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司),鼠抗人 EPCR 单克隆抗体和兔抗人 GAPDH 单克隆抗体 (Abcam 公司),辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 隆抗体 (北京中杉金桥公司)。抗未裂解型 PAR-1 抗体委托 Abgent Biotechnology 公司设计并制备。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱内培养。EPCR siRNA 转染按照 Lipofectamine 2000 操作说明进行。

1.2.2 qRT-PCR 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,然后按照试剂盒说明书制备 cDNA 反应程序为:50 °C 15 min;85 °C 2 min。然后在 ABI StepOnePlus 运行定量 PCR 反应,反应程序为:95 °C 预变性 30 s,40 个扩增循环 (95 °C 10 s,60 °C 30 s)。EPCR 引物上游序列为:5'-ACCCTGCAG-CAGCTCAATG-3',下游序列为:5'-CAGGAATTC-CCGCAGTTCAT-3'。GAPDH 引物上游序列为:5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3';下游序列为:5'-TC-CACGACATACTCAGCAC-3'。

1.2.3 细胞增殖能力检测 取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 2.0×10^3 个/孔,接种至 96 孔板,培养 24、48、72 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 °C 孵

接受日期:2018-01-09

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81101493)

作者单位:徐州医科大学病理学教研室,徐州 221004

作者简介:汤洋洋,女,硕士研究生。E-mail: 714347662@qq.com

王庆苓,女,副教授,硕士生导师,通讯作者。E-mail:

yuyqing@hotmail.com

育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值(OD 值)。

1.2.4 细胞迁移能力检测 取对数生长期的细胞, 调整细胞密度为 3×10^3 个/孔, 接种在 Transwell 小室的上室, 下室加入完全培养液 600 μ L, 每组 3 复孔。培养 24 h 后取出 Transwell 小室, 用甲醇固定 30 min, 结晶紫染液染色 25 min。于倒置显微镜拍照计数($\times 200$), 每个小室随机取 10 个视野。

1.2.5 Cell-ELISA 调整细胞密度为 3×10^4 个细胞每孔, 接种至 96 孔板, 每组 6 复孔, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养过夜。PBS 洗 3 遍后 4% 多聚甲醛室温固定 10 min。1% BSA 室温封闭 1 h 后加入一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 洗 3 遍, 加入二抗室温孵育 1 h。加入 TMB 显色液显色 20 min。加入终止液终止反应, 然后检测 450 nm 的 OD 值。

1.2.6 Western blot 检测 提取总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转印到 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, 然后用 ECL 试剂检测目的条带。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计, 定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两个均数比较采用独立样本 t 检验; 多个均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 其中两两比较采用 q 检验; 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 EPCR 干扰效果鉴定 将 EPCR siRNA 转染乳腺癌 MCF-7 细胞后, 采用 Western blot 和 qRT-PCR 检测 EPCR 的表达。与空白对照组和无关序列组相比, EPCR 干扰组 EPCR mRNA 和蛋白表达水平均明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1); 空白对照组与无关序列组相比, EPCR 干扰组 EPCR mRNA 和蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 干扰 MCF-7 细胞 EPCR 表达对细胞增殖、迁移的影响

2.2.1 干扰 MCF-7 细胞 EPCR 表达对细胞增殖的影响 在 24、48、72 h EPCR 干扰组的细胞 OD₄₅₀ 值明显低于无关序列组及空白对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而无关序列组和空白对照组细胞 OD₄₅₀ 值差异无显著性(图 2)。结果说明干扰 EPCR 可以抑制 MCF-7 细胞增殖。

2.2.2 干扰 MCF-7 细胞 EPCR 表达对细胞迁移的影响 Transwell 实验结果表明, 3 组均检测到有不同数量的 MCF-7 细胞穿过 PET 膜上 8 μ m 小孔,

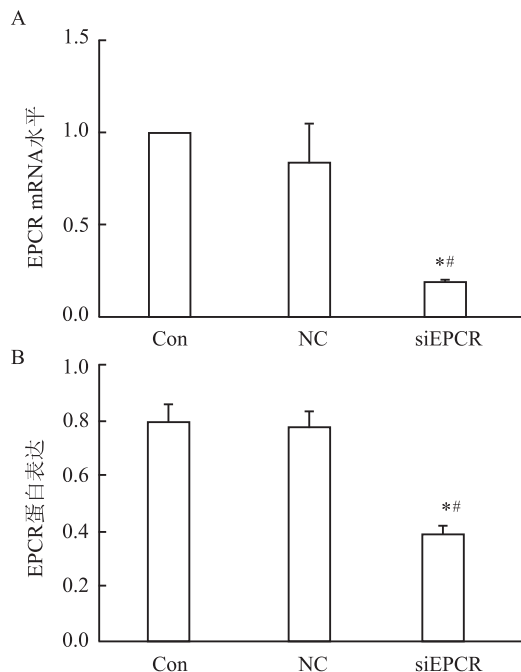


图1 乳腺癌 MCF-7 细胞中 EPCR 干扰效果鉴定

A. qRT-PCR 检测 MCF-7 细胞中 EPCR mRNA 的表达; B. Western blot 检测 MCF-7 细胞中 EPCR 蛋白的表达; Con. 空白对照组; NC. 无关序列转染组; siEPCR. EPCR siRNA 转染组; 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与无关序列相比, # $P < 0.05$

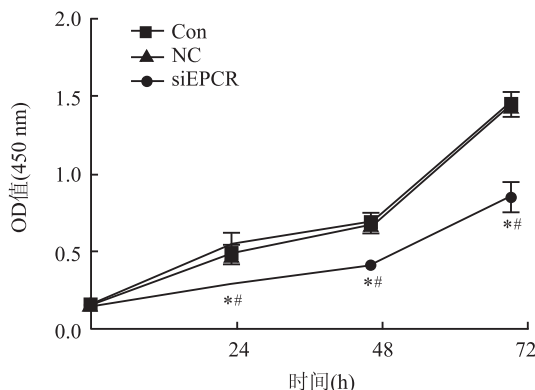


图2 不同处理组 MCF-7 细胞的增殖情况

Con. 空白对照组; NC. 无关序列转染组; siEPCR. EPCR siRNA 转染组; 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与无关序列组相比, # $P < 0.05$

EPCR 干扰组穿过 PET 膜上 8 μ m 小孔的细胞数量较无关序列转染组与空白对照组相比均明显减少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而无关序列转染组与空白对照组相比, 穿过 PET 膜上 8 μ m 小孔的细胞数量差异无显著性(图 3)。结果说明干扰 EPCR 表达可以抑制 MCF-7 细胞的迁移。

2.3 抗 PAR-1 抗体阻断 PAR-1 作用对 MCF-7 细胞增殖、迁移的影响

2.3.1 阻断 PAR-1 作用对 MCF-7 细胞增殖的影响

将 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 PAR-1 抗体处理 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后, OD₄₅₀ 值明显低于对照组(图 4), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

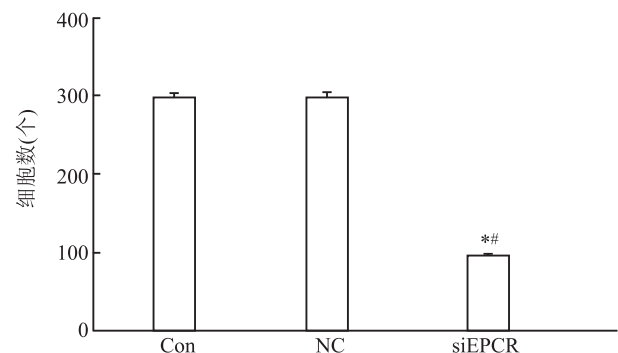


图 3 不同处理组 MCF-7 细胞迁移情况

Con. 空白对照组; NC. 无关序列转染组; siEPCR. EPCR siRNA 转染组; 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 NC 组相比, # $P < 0.05$

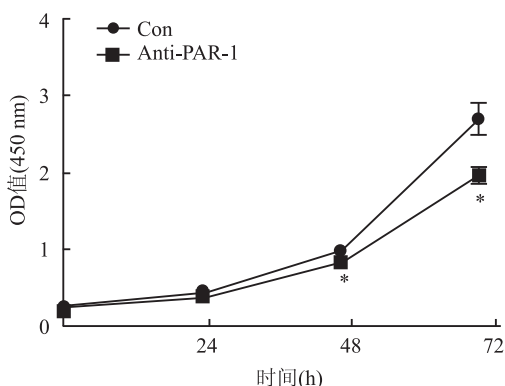


图 4 不同处理组 MCF-7 细胞的增殖情况

Con. 空白对照组; Anti-PAR-1. 抗 PAR-1 抗体处理组; 与对照组相比, * $P < 0.05$

2.3.2 抗 PAR-1 抗体阻断 PAR-1 作用对 MCF-7 细胞迁移的影响 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 PAR-1 抗体处理 MCF-7 细胞后, 穿过 PET 膜上 8 μm 小孔的细胞数目明显减少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图 5)。

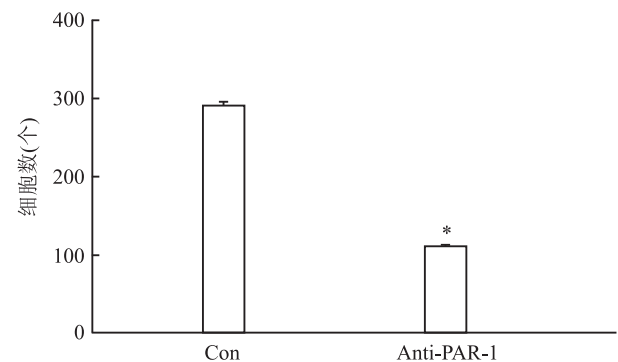


图 5 不同处理组 MCF-7 细胞迁移情况

Con. 空白对照组; Anti-PAR-1. 抗 PAR-1 抗体处理组; 与对照组相比, * $P < 0.05$

2.4 干扰 EPCR 对 MCF-7 细胞表面 PAR-1 裂解活化的影响 干扰 EPCR 表达后, 采用 Cell-ELISA 技术检测细胞表面的未裂解活化 PAR-1 从而反应 PAR-1 活化情况, 以 PAR-1 活化剂凝血酶作为阳性对照。与对照组、无关序列转染组和阳性对照组相比, EPCR 干扰组的细胞表面未裂解型 PAR-1 抗体结合率明显增高($P < 0.05$, 图 6), 说明干扰 EPCR 表达可以抑制 PAR-1 的裂解活化。

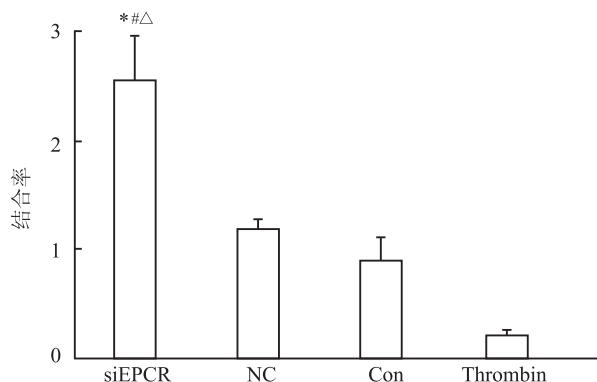


图 6 干扰 EPCR 表达对 MCF-7 细胞表面 PAR-1 活化的影响

siEPCR. EPCR siRNA 转染组; NC. 无关序列转染组; Con. 空白对照组; Thrombin. 凝血酶处理组; 与 Con 对照组相比, * $P < 0.05$; 与 NC 组相比, # $P < 0.05$; 与阳性对照 Thrombin 相比, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

EPCR 为 I 型跨膜糖蛋白, 仅有少量游离于细胞质中。最初研究报道 EPCR 主要参与调节血液凝固及抗炎反应, 近年来研究发现 EPCR 在部分肿瘤组织及细胞表达^[1]。EPCR 在肿瘤细胞中介导的信号传导可促进癌细胞迁移, 侵袭和血管生成并抑制癌细胞凋亡^[7-8]。Menschikowski 等^[9]证明了上调 EPCR 可能会提供一个新颖和更可靠的恶性前列腺肿瘤的生物标志物。Schaffner 等^[10]发现将 EPCR 鉴定为人乳腺癌干细胞的标志物, 其在免疫缺陷小鼠中具有增强肿瘤启动和生长能力。Perurena 等^[11]的研究结果显示, EPCR 增加肿瘤生长潜能并且可能是其预后差的一个因素。本实验发现, 干扰人乳腺癌细胞 EPCR 基因表达之后, 细胞的增殖及迁移能力均降低。提示 EPCR 在乳腺癌中的表达与乳腺癌细胞的生长与转移可能有关, 与报道一致。

PAR-1 是目前 PAR 家族中研究最多的一个成员, 也是作用最为重要的一个成员。研究报道, APC 和 EPCR 结合可以使 PAR-1 在 R41-S42 之间水解, 使 PAR-1 成为其功能性形状, 并与胞内的 G 蛋白结

合引起一系列下游生物学反应^[12]。本实验结果显示,干扰 EPCR 基因表达可以降低细胞表面 PAR-1 的活化水平,提示 EPCR 表达改变可以影响细胞表面 PAR-1 活化。并且将 PAR-1 抗体处理人乳腺癌 MCF-7 细胞,结果发现 PAR-1 抗体处理后细胞的增殖及迁移能力均降低,说明 PAR-1 可以促进人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及迁移。这些结果提示 EPCR 可通过调节 PAR-1 活化从而促进 MCF-7 细胞增殖及迁移。

综上所述,本实验结果证明 EPCR 能促进乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖和迁移能力,并且依赖于 PAR-1 的活化。

参考文献:

- [1] Mohan Rao L V, Esmon C T, Pendurthi U R. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor [J]. *Blood*, 2014,124(10):1553–1562.
- [2] Dahlback B, Villoutreix B O. The anticoagulant protein C pathway [J]. *FEBS Lett*, 2005,579(15):3310–3316.
- [3] Ducros E, Mirshahi S, Azzazene D, *et al.* Endothelial protein C receptor expressed by ovarian cancer cells as a possible biomarker of cancer onset[J]. *Int J Oncol*, 2012,41(2):433–440.
- [4] Tsuneyoshi N, Fukudome K, Horiguchi S, *et al.* Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines[J]. *Thromb Haemost*, 2001,85(2):356–361.
- [5] Keshava S, Sahoo S, Tucker T A, *et al.* Endothelial cell protein C receptor opposes mesothelioma growth driven by tissue factor [J]. *Cancer Res*, 2013,73(13):3963–3973.
- [6] 王庆苓,刘冬梅,韩正杰,等. MK 通过 EPCR/PAR1 通路促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外血管生成[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015,31(9):961–965.
- [7] Gramling M W, Beaulieu L M, Church F C. Activated protein C enhances cell motility of endothelial cells and MDA-MB-231 breast cancer cells by intracellular signal transduction[J]. *Exp Cell Res*, 2010,316(3):314–328.
- [8] Anton I, Molina E, Luis-Ravelo D, *et al.* Receptor of activated protein C promotes metastasis and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012,186(1):96–105.
- [9] Menschikowski M, Hagelgans A, Tiebel O, *et al.* Expression and shedding of endothelial protein C receptor in prostate cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2011,11:4.
- [10] Schaffner F, Yokota N, Carneiro-Lobo T, *et al.* Endothelial protein C receptor function in murine and human breast cancer development[J]. *PLoS One*, 2013,8(4):e61071.
- [11] Perurena N, Zandueta C, Martinez-Canarias S, *et al.* EPCR promotes breast cancer progression by altering SPOCK1/testican 1-mediated 3D growth[J]. *J Hematol Oncol*, 2017,10(1):23.
- [12] Tsopanoglou N E, Maragoudakis M E. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2004,30(1):63–69.

Endothelial cell protein C receptor promotes human breast cancer cell MCF-7 proliferation and migration by activating PAR-1

TANG Yang-yang, XU Yan-yan, YANG Hong-li, ZHUO Qian, WANG Qing-ling
(Department of Pathology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

ABSTRACT Purpose To investigate the effect of EPCR on the proliferation and migration, and to explore the molecular mechanism of EPCR affecting the tumor growth and metastasis in human breast cancer cell line MCF-7. **Methods** MCF-7 cell was transfected with EPCR siRNA and treated with anti-PAR-1 antibody. Then CCK-8 assay was performed to determine the proliferation of MCF-7 cell. Transwell migration assay was employed to determine the cell's migration. Cell-ELISA was used to detect the activation of PAR-1 on the membranes of MCF-7. **Result** After EPCR siRNA transfection, the proliferation and migration ability of the MCF-7 in the interference of EPCR gene group was significantly decreased compared with the negative

control and untreated control group. After treated with anti-PAR-1 antibody, the proliferation and migration of ability of MCF-7 were decreased significantly compared with the negative control group and the untreated control group. Cell-ELISA assay indicated that the activation of PAR-1 in the cells surface of MCF-7 cell in the EPCR gene interference group was mitigated versus the negative control and untreated control group. **Conclusion** EPCR may promote the proliferation and migration of MCF-7 cell by activating PAR-1.

Key words: breast neoplasm; EPCR; PAR-1; proliferation; migration

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.003.html>

人卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 的表达及预后分析

尹 灿¹, 张 莹¹, 董玉玲¹, 陶 林¹, 邹 泓¹, 梁伟华¹, 赵 瑾¹, 李 锋^{1,2}, 贾 薇¹

摘要:目的 探讨有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3, MAP3K3) 的 mRNA 表达与卵巢癌临床病理特征及预后的相关性。方法 采用 qRT-PCR 法检测 MAP3K3 mRNA 在卵巢癌和输卵管组织中的表达, 并分析其差异表达与临床病理特征的关系, 评价 MAP3K3 mRNA 表达在卵巢癌患者预后中的价值。结果 MAP3K3 mRNA 在卵巢癌组织中的表达显著高于输卵管组织 ($P < 0.05$), 其高表达与卵巢癌 FIGO 分期及发病模式分型相关 ($P < 0.05$); Kaplan-Meier 生存分析显示, MAP3K3 mRNA 高表达患者的无瘤生存时间和总体生存时间均显著短于低表达患者 (中位生存时间: 34 个月 vs 52.2 个月, $P < 0.05$; 38.6 个月 vs 52.5 个月, $P < 0.05$); 单因素分析显示, MAP3K3 mRNA 高表达与卵巢癌患者预后差相关 ($HR = 4.198, 95\% CI: 1.711 \sim 10.302, P < 0.05$)。结论 MAP3K3 mRNA 在卵巢癌组织中高表达, 其高表达与卵巢癌 FIGO 分期、发病模式及预后差呈正相关, 可能参与了卵巢癌的恶性转化。

关键词: 卵巢肿瘤; MAP3K3; mRNA; 预后

中图分类号: R 737.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7399(2018)03-0248-05

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.003

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 2015 年中国女性卵巢癌新发病例约 5.21 万例^[1]。卵巢癌发病隐匿, 超过 70% 的患者就诊时已为晚期或转移^[2], 并且治疗过程中化疗耐药常见, 预后差。尽管卵巢癌的诊断及治疗水平不断发展, 但其 5 年生存率仅为 30%, 且病死率仍在不断升高^[1]。因此, 寻找有临床价值的卵巢癌相关分子标志物仍然是当前的研究热点。有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3, MAP3K3) 是一种 MAP3K 家族的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 通过激活 ERK、JNK、ERK5/BMP、p38 在内的 MAPK 和 NF- κ B 信号通路, 调控早期胚胎心血管系统的发育、内皮细胞的增殖与凋亡、肌细胞的形成以及各种炎症和免疫应答过程^[3-4]。随着研究的不断深入, 近年来发现 MAP3K3 在不同类型的肿瘤中发挥癌基因的作用^[5-7]。目前, MAP3K3 在卵巢癌中的研究仅有 2 篇文献报道, 提示 MAP3K3 可能是卵巢癌的潜在癌基因^[8], 这一结论亟待进一步研究

证实。本实验通过定量检测人卵巢癌和正常输卵管组织中 MAP3K3 mRNA 的表达, 分析其差异表达与患者临床病理特征及生存预后的关系, 进一步探究 MAP3K3 在卵巢癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 收集石河子大学第一附属医院 2001 年~2015 年病理科确诊的卵巢上皮性癌石蜡标本 93 例, 正常输卵管标本 33 例 (来自于因其他良性疾病行子宫输卵管切除术标本)。所有病例术前均未行化疗。病理组织学评估由两名病理专家独立完成。根据 WHO(2014) 乳腺和女性生殖系统肿瘤病理学和遗传学分类标准及 2016 版美国国家综合癌症网络 (NCCN) 临床试验指南进行卵巢癌标本的病理组织学分型和临床病理分期 (FIGO 分期)。93 例卵巢癌中, 包括 37 例浆液性癌、16 例黏液性癌、18 例子官内膜样癌、15 例透明细胞癌和 7 例混合性癌, 患者年龄 19~73 岁, 中位年龄 (48.5 岁); 随访截止 2015 年 12 月 4 日, 共获得 48 例患者的生存信息: 15 例死亡, 33 例健在的患者中 9 例复发。依据治疗后缓解持续时间, 初次化疗结束后缓解持续时间为 6 个月及以上患者为化疗敏感; 化疗期间肿瘤出现进展或化疗结束后 6 个月内即出现复发者为化疗抵抗。本实验经石河子大学第一附属医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 根据说明书, 应用 RNA 石蜡

接受日期: 2017-12-11

基金项目: 国家自然科学基金 (81660431)、人力资源和社会保障部项目基金 (2016LX008)

作者单位: ¹ 石河子大学医学院病理系/第一附属医院病理科, 石河子 832002

² 北京朝阳区医院病理科, 北京 100020

作者简介: 尹 灿, 女, 硕士研究生。E-mail: 793290649@qq.com

贾 薇, 女, 博士, 副教授, 通讯作者。E-mail: jiawei@shzu.edu.cn

组织提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)在卵巢癌和输卵管组织中提取 RNA,抽取 1 μg 的 RNA 应用 QuantiTect 反转录试剂盒(德国 Qiagen 公司)获得反转录产物。

1.2.2 qRT-PCR 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)应用 QuantiTect SYBR 荧光染料 PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司)在 7500Fast 荧光定量 PCR 系统下进行。PCR 条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。MAP3K3 正、反向引物分别为 5'-GTTGAAGGCTTACGGTGCCTC-3'和 5'-ACATTC-CCAGCAGACTCTCG-3',计算 mRNA 的相对表达量 F 值采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法 [$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{卵巢癌组织}} - \Delta\text{Ct}_{\text{正常输卵管组织}}$]。

1.3 统计学方法 所有数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法分析实验所得 MAP3K3 mRNA 在卵巢癌和输卵管组织中的表达数据,比较卵巢癌患者各项临床病理特征不同分组之间 mRNA 的表达差异。采用 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验比较 MAP3K3 mRNA 高表达组与低表达组患者无瘤生存时间和总体生存时间的差异。采用 Cox 比例风险模型单因素和多因素分析对影响卵巢癌患者预后的独立因素进行筛选。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAP3K3 mRNA 在卵巢癌和正常输卵管组织中的表达 成功提取出 68 例卵巢癌组织及 28 例正常输卵管组织的总 mRNA,并对目的基因 MAP3K3 和内参基因 GADPH 进行 qRT-PCR 检测,溶解曲线显示峰值 76 $^{\circ}\text{C}$,没有杂峰,扩增特异性较好(图 1)。扩增反应中,MAP3K3 的扩增曲线显示平滑的 S 型曲线,阴性对照(模板为 ddH₂O)未见非特异性荧光信号,提示 MAP3K3 得到有效扩增(图 2)。

通过公式计算 MAP3K3 mRNA 的相对表达量结果显示: F 值为 2.216,表明卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 表达水平是正常输卵管组织的 2.216

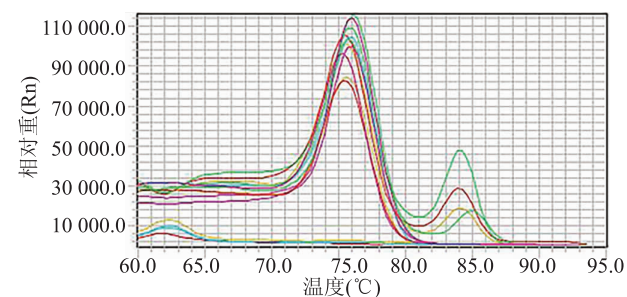


图 1 目的基因 MAP3K3 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线

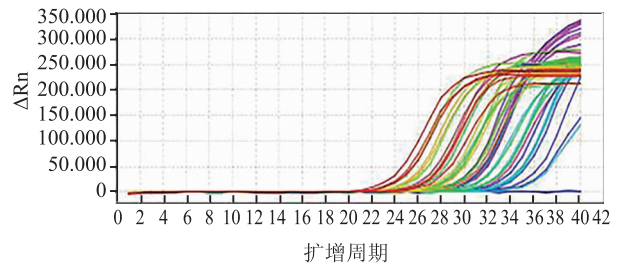


图 2 目的基因 MAP3K3 的扩增曲线

倍,提示卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 的表达水平高于正常输卵管组织(表 1),卵巢癌组织和正常输卵管组织中的 MAP3K3 mRNA 的相对表达量平均值分别为 3.85 ± 0.34 和 1.53 ± 0.47 ,说明卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 的表达显著高于正常输卵管组织,相对于正常输卵管组织,卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 呈高表达(图 3)。

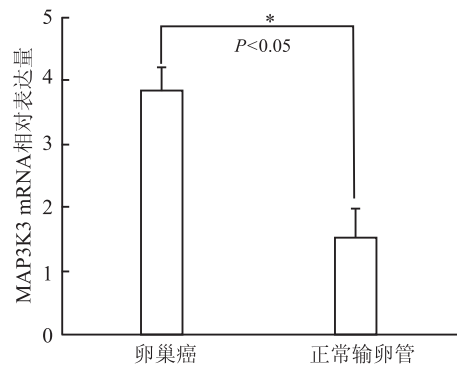


图 3 MAP3K3 mRNA 在卵巢癌及正常输卵管上皮组织中的表达

表 1 卵巢癌及正常输卵管组织中 MAP3K3 mRNA 的表达

分组	n	MAP3K3 mRNA 表达量			Z 值	P 值
		P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅		
输卵管	28	0.847	1.112	1.597	-5.554	<0.001
卵巢癌	68	1.684	2.860	4.470		

P₂₅:下四分位数;P₅₀:中位数;P₇₅:上四分位数

2.2 MAP3K3 mRNA 表达与卵巢癌临床病理特征的相关性 以 68 例卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 表达量的中位数(2.860)为界, $\geq$ 此值界定为高表达组, $<$ 此值为低表达组。经 Fisher 确切概率法检验显示,MAP3K3 mRNA 高表达与 FIGO 分期($P = 0.021$)及发病模式分型($P = 0.007$)相关;与患者年龄($P = 0.797$)、腹水($P = 0.961$)、组织学分型($P = 0.146$)、化疗反应($P = 0.219$)以及分化程度($P = 0.336$)等临床病理特征差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。

表2 卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 表达与临床病理特征的相关性

临床病理参数	n	MAP3K3 mRNA		χ^2 值	P 值
		高表达(%)	低表达(%)		
年龄(岁)	68	33(48.5)	35(51.5)	0.066	0.797
≤50	32	15(46.9)	17(53.1)		
>50	36	18(50.0)	18(50.0)		
FIGO 分期	68			5.328	0.021 *
I + II	37	20(54.0)	17(46.0)		
III + IV	31	25(80.6)	6(19.4)		
腹水	68			0.002	0.961
有	47	24(51.1)	23(48.9)		
无	6	3(50.0)	3(50.0)		
不详	15				
组织学分型	68			6.817	0.146
浆液性癌	31	10(32.3)	21(67.5)		
黏液性癌	12	7(58.3)	5(41.7)		
子宫内膜样癌	12	7(58.3)	5(41.7)		
透明细胞癌	8	5(62.5)	3(37.5)		
其他类型癌	5	4(80.0)	1(20.0)		
化疗反应	68			1.510	0.219
有效	42	24(57.1)	18(42.9)		
耐受	11	4(36.4)	7(63.6)		
不详	15				
分化程度	68			0.926	0.336
低	19	11(57.9)	8(42.1)		
中 + 高	49	22(44.9)	27(55.1)		
发病模式分型	68			7.379	0.007 *
I	38	24(63.2)	14(36.8)		
II	30	9(30.0)	21(70.0)		

* P < 0.05

2.3 MAP3K3 mRNA 差异表达与卵巢癌患者预后的关系 MAP3K3 mRNA 高表达患者的无瘤生存时间和总体生存时间显著短于低表达患者(中位生存时间:34 个月 vs 52.2 个月, $P = 0.017$; 38.6 个月 vs 52.5 个月, $P = 0.014$, 图 4)。通过 Cox 回归模型筛选卵巢癌的预后因素, 单因素 Cox 回归分析显示: MAP3K3 mRNA 高表达 ($HR: 4.198, 95\% CI = 1.711 \sim 10.302, P = 0.002$)、FIGO 分期 ($HR: 3.329, 95\% CI = 1.385 \sim 8.002, P = 0.007$) 和化疗抵抗 ($HR: 3.469, 95\% CI = 1.446 \sim 8.323, P = 0.005$) 是影响卵巢癌预后的危险因素; 多因素 Cox 回归分析显示: FIGO 分期 ($HR: 2.300, 95\% CI = 1.027 \sim 5.153, P = 0.043$) 和化疗抵抗 ($HR: 4.841, 95\% CI = 1.211 \sim 19.347, P = 0.026$) 可能是影响卵巢癌患者预后的独立危险因素(表 3)。

3 讨论

MAP3K3, 又称 MEKK3, 是 MAPKs 家族的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[9], 在进化过程中高度保守, 广

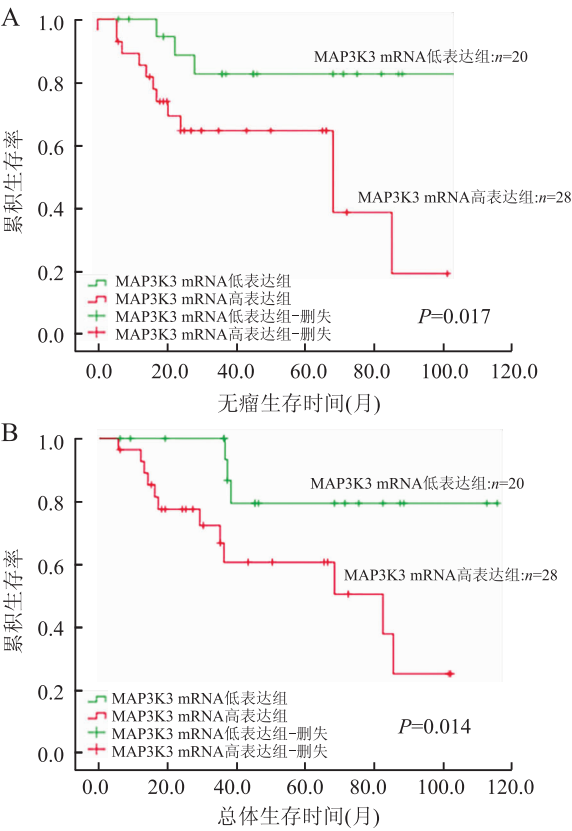


图4 MAP3K3 mRNA 表达与卵巢癌患者术后的 (A) 无瘤生存时间曲线及 (B) 总体生存时间曲线

泛表达于多种哺乳动物组织中, 其作为多种信号转导级联反应的关键激酶, 参与活化 MAPK 信号通路下游的 ERK1/2、p38、JNK、ERK5、NFAT 和 NF- κ B 等多条信号通路^[3], 诱导细胞增殖、分化^[10-11]。MAP3K3 定位于染色体 17q23.3, 该区域被证实在卵巢癌中存在频繁的染色体基因扩增, 是否 MAP3K3 的扩增导致其过表达尚未证实。但本实验发现, 卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 呈显著高表达, 且 mRNA 高表达者无瘤生存时间和总体生存时间比低表达者明显缩短。这与本实验组前期检测卵巢癌组织中 MAP3K3 蛋白的表达水平一致: 63% 的卵巢癌组织中 MAP3K3 呈过表达, MAP3K3 蛋白高表达的卵巢癌患者无瘤生存时间和总体生存时间均显著降低^[12]。Samanta 等^[8] 研究表明, 过表达 MAP3K3 可能过度激活 NF- κ B 信号通路活性, 抵抗凋亡, 参与卵巢癌的恶性转化。

MAP3K3 在实体瘤中的研究较少, 结论均显示 MAP3K3 表达水平与肿瘤的恶性程度呈正相关, 即 MAP3K3 是肿瘤发生的潜在癌基因。在女性生殖系统恶性肿瘤 - 子宫颈癌中的研究发现, MAP3K3 mRNA 表达水平显著升高, 且其蛋白高表达与患者

表 3 卵巢癌患者 Cox 比例风险模型分析

临床病理参数	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P 值	HR(95% CI)	P 值
MAP3K3 mRNA				
低表达	1		1	
高表达	4.198(1.711,10.302)	0.002 *	1.585(0.946,2.655)	0.080
年龄(岁)				
≤50	1		1	
>50	2.070(0.849,5.046)	0.110	1.234(0.891,1.708)	0.206
FIGO 分期				
I + II	1		1	
III + IV	3.329(1.385,8.002)	0.007 *	2.300(1.027,5.153)	0.043 *
腹水				
有	1		1	
无	2.070(0.849,5.046)	0.703	2.018(0.213,19.152)	0.541
组织学分型				
浆液性癌	1		1	
黏液性癌	1.012(0.224,4.577)	0.988	0.540(0.077,3.769)	0.535
子宫内膜样癌	0.571(0.082,3.272)	0.484	1.444(0.090,23.082)	0.795
透明细胞癌	0.539(0.096,3.034)	0.483	3.346(0.495,22.629)	0.216
其他类型癌	1.118(0.202,6.180)	0.898	2.721(0.207,35.694)	0.446
化疗反应				
敏感	1		1	
耐受	3.469(1.446,8.323)	0.005 *	4.841(1.211,19.347)	0.026 *
分化程度				
低	1		1	
中 + 高	0.811(0.332,1.976)	0.644	0.223(0.040,1.230)	0.085
发病模式分型				
I	1		1	
II	1.234(0.537,2.832)	0.621	1.411(0.235,8.822)	0.693

* P < 0.05

的 3 年累积生存期呈正相关^[13]；也有学者证实了 MAP3K3 在 8% ~ 20% 的乳腺癌细胞中出现扩增现象,参与了乳腺癌的恶性进程^[14]。在消化系统恶性肿瘤中的研究发现,在食管鳞状细胞癌中,MAP3K3 通过打破 Zn 平衡导致食管鳞状上皮细胞的恶性转化^[5]；在结肠癌中,MAP3K3 通过与受体相互作用蛋白(receptor-interacting protein, RIP)形成复合体,激活 TNF-α 调节的 NF-κB 信号通路促进结肠癌细胞的生长增殖^[6]。在泌尿系统的肾透明细胞癌中也被证实 MAP3K3 的表达水平与患者临床分期和分级相关,且 MAP3K3 高表达患者的预后差^[7]；然而,He 等^[15]在肺癌中的研究发现,MAP3K3 在高侵袭性的原发肺腺癌细胞中高表达,沉默 MAP3K3 表达后,肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移能力受抑,是肺腺癌的癌基因,但可能由于 MAP3K3 能同时过度激发肿瘤微环境中免疫反应,导致免疫应激与肿瘤过度生长之间的平衡被打破,MAP3K3 高表达肺腺癌患者的预后更佳。因此,MAP3K3 在恶性肿瘤中的生物学作用及分子机制仍需深入研究阐明。

本实验首次通过 qRT-PCR 法定量检测

MAP3K3 mRNA 在卵巢癌组织中的表达,结果显示其表达水平在卵巢癌组织中约为输卵管组织的 2.216 倍,表明卵巢癌组织中 MAP3K3 mRNA 呈显著高表达,推测在卵巢癌的发生、发展中 MAP3K3 可能起重要作用,但其作用机制尚需进一步研究。Fisher 确切概率法结果显示,MAP3K3 mRNA 高表达与 FIGO 分期及发病模式分型有相关性。Kaplan-Meier 生存曲线生存分析发现卵巢癌组织中 mRNA 高表达与患者生存期缩短相关,mRNA 高表达者无瘤生存时间和总体生存时间比低表达者明显缩短。Cox 回归单因素分析显示,MAP3K3 mRNA 的表达、FIGO 分期和化疗反应可能是影响卵巢癌患者预后的危险因素；但是将这些因子纳入 Cox 回归模型进行多因素分析,结果发现仅有 FIGO 分期和化疗反应可能是卵巢癌患者预后差的独立危险因素。可能由于样本量小及失访人数过多导致 MAP3K3 mRNA 高表达在多因素 Cox 回归分析中无意义(P = 0.08),后期我们将扩大样本量和追踪随访进一步分析其意义。

综上所述,MAP3K3 mRNA 在卵巢癌中的表达

水平显著高于正常输卵管组织,且高表达与卵巢癌的 FIGO 分期、发病模式、化疗反应、预后等临床病理特征有明显相关性,MAP3K3 mRNA 高表达可能是卵巢癌患者预后差的危险因素。但是,卵巢癌作为高度异质性的肿瘤,其发生、发展是多种因素共同作用的结果,MAP3K3 在卵巢癌恶性转化中的生物学机制仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(2):115–132.
- [2] Lengyel E, Burdette J E, Kenny H A, *et al.* Epithelial ovarian cancer experimental models[J]. Oncogene, 2014,33(28):3619–3633.
- [3] Hu Q, Shen W, Huang H, *et al.* Insight into the binding properties of MEKK3 PB1 to MEK5 PB1 from its solution structure[J]. Biochemistry, 2007,46(47):13478–13489.
- [4] Nakamura K, Kimple A J, Siderovski D P, Johnson G L. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF-kappaB activation [J]. J Biol Chem, 2010,285(3):2077–2089.
- [5] Kumar A, Chatopadhyay T, Raziuddin M, Ralhan R. Discovery of deregulation of zinc homeostasis and its associated genes in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray [J]. Int J Cancer, 2007,120(2):230–242.
- [6] Nho C W, O'Dwyer P J. NF-kappaB activation by the chemopreventive dithiolethione oltipraz is exerted through stimulation of MEKK3 signaling[J]. J Biol Chem, 2004,279(25):26019–

26027.

- [7] Lu H, Cao X, Chen Q, *et al.* The expression and role of MEKK3 in renal clear cell carcinoma[J]. Anat Rec (Hoboken), 2015,298(4):727–734.
- [8] Samanta A K, Huang H J, Le X F, *et al.* MEKK3 expression correlates with nuclear factor kappa B activity and with expression of antiapoptotic genes in serous ovarian carcinoma [J]. Cancer, 2009,115(17):3897–3908.
- [9] Hagemann C, Blank J L. The ups and downs of MEK kinase interactions[J]. Cell Signal, 2001,13(12):863–875.
- [10] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [J]. Nature, 2001,410(6824):37–40.
- [11] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002,298(5000):1911–1912.
- [12] Jia W, Dong Y, Tao L, *et al.* MAP3K3 overexpression is associated with poor survival in ovarian carcinoma [J]. Hum Pathol, 2016,50:162–169.
- [13] Cao X Q, Lu H S, Zhang L, *et al.* MEKK3 and survivin expression in cervical cancer: association with clinicopathological factors and prognosis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014,15(13):5271–5276.
- [14] Fan Y, Ge N, Wang X, *et al.* Amplification and over-expression of MAP3K3 gene in human breast cancer promotes formation and survival of breast cancer cells[J]. J Pathol, 2014,232(1):75–86.
- [15] He Y, Wang L, Liu W, *et al.* MAP3K3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is correlated with favorable patient survival in lung cancer[J]. Sci Rep, 2015,5:11471.

Expression of MAP3K3 mRNA and its prognosis in human ovarian carcinoma

YIN Can¹, ZHANG Ying¹, DONG Yu-ling¹, TAO Lin¹, ZOU Hong¹, LIANG Wei-hua¹, ZHAO Jin¹, LI Feng^{1,2}, JIA Wei¹

(¹Department of Pathology, Shihezi University Medical School, Shihezi 832002, China;

²Department of Pathology, Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020, China)

ABSTRACT Purpose To investigate the expression of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3) mRNA in ovarian carcinoma patients and to explore the correlation among its expression, clinicopathological features and prognosis.

Methods The expression of MAP3K3 mRNA in ovarian carcinoma and fallopian tube tissues were detected by qRT-PCR, and the correlation between MAP3K3 mRNA expression and clinicopathological features was also analyzed. Whether MAP3K3 mRNA expression could be used as an independent predictor of prognosis for patients with ovarian carcinoma was further determined. **Results** The expression of MAP3K3 mRNA in ovarian carcinoma was significantly higher than that in fallopian tube tissues ($P < 0.05$). High expression of MAP3K3 mRNA was significantly correlated with FIGO stage and Challenge model of o-

varian carcinoma ($P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the disease-free survival time and overall survival time of patients with high MAP3K3 mRNA expression were shorter than those with low expression (34 months *vs* 52.2 months, $P < 0.05$. 38.6 months *vs* 52.5 months, $P < 0.05$). Univariate analysis showed that high expression of MAP3K3 mRNA was a risk factor for poor prognosis of ovarian carcinoma patients ($HR = 4.198$, 95% *CI*: 1.711 ~ 10.302, $P < 0.05$). **Conclusion** MAP3K3 mRNA is highly expressed in ovarian carcinoma tissues. Its high expression is associated with FIGO stage, Challenge model and poor prognosis of ovarian carcinoma, which may involve in the malignant transformation of ovarian carcinoma.

Key words: ovarian neoplasm; MAP3K3; mRNA; prognosis

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.004.html>

维吾尔族女性乳腺增生性病变与癌变组织中 Notch1 基因甲基化的差异比较

李威¹, 张娜^{1,2}, 王留花¹, 陈晓文¹, 梁伟华¹, 孙振柱³, 曹玉文¹

摘要:目的 比较维吾尔族女性乳腺导管增生性病变和导管癌变组织中 Notch1 基因甲基化的差异情况。方法 应用 MALDI-TOF MS 定位和定量检测 Notch1 基因在维吾尔族乳腺普通型导管增生(usual ductal hyperplasia, UDH)、非典型性导管增生(atypical ductal hyperplasia, ADH)、导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)、浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma, IDC)中甲基化率的变化,分析其与临床病理特征的关系,采用免疫组化法检测 Notch1 蛋白表达并分析其与甲基化的关系。结果 Notch1 基因在 UDH、ADH、DCIS、IDC 的甲基化率逐渐降低($P < 0.05$),13 个 CpG 位点中 9 个位点甲基化率明显下降($P < 0.05$),其低甲基化率伴随着低分化、淋巴结转移和 TNM 高分期($P < 0.05$),Notch1 基因低甲基化率与 Notch1 蛋白表达呈负相关($P < 0.05$)。结论 Notch1 蛋白表达和甲基化率在乳腺导管的不同增生性病变及乳腺癌变组织中存在一定的差异,其生物学意义有待进一步研究。

关键词:乳腺肿瘤;Notch1;甲基化

中图分类号:R 737.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0253-05

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.004

乳腺癌是危害妇女健康最常见的恶性肿瘤,通常是由普通型导管增生(usual ductal hyperplasia, UDH)、不典型性导管增生(atypical ductal hyperplasia, ADH)、导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)到浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma, IDC)一个连续发展的过程。新疆维吾尔族乳腺癌患者数呈逐年上升趋势,这可能与不同民族的遗传背景有关。本组前期实验发现 Notch1 基因甲基化水平和蛋白表达与新疆汉族女性乳腺癌的发生进展密切相关^[1-5]。然而,维吾尔族乳腺癌中 Notch1 基因甲基化和蛋白水平的变化目前未见报道。本实验运用 MALDI-TOF MS 技术定量检测 Notch1 基因甲基化,免疫组化法检测 Notch1 蛋白表达,初步探讨维吾尔族女性乳腺导管增生性病变与导管癌变组织中 Notch1 基因甲基化的差异情况。

1 材料与方法

1.1 材料 收集新疆维吾尔自治区人民医院 1989 年 1 月~2009 年 4 月手术切除的石蜡包埋维吾尔族女性乳腺组织 UDH 15 例、ADH 15 例、DCIS 15 例和 IDC 55 例。收集 IDC 患者的临床病理资料,包括年龄、病理分级、淋巴结转移、临床分期、ER、PR 和 HER-2 表达状态,其发病年龄差异无显著性。浸润癌组织学分级参照 WHO(2012)乳腺肿瘤分类^[6],由两位高年资病理医师共同做出诊断。TNM 分期依据美国癌症联合会(AJCC)和国际抗癌联盟(UICC)2010 年乳腺癌 TNM 分期系统第 7 版。ER、PR 和 HER-2 蛋白的表达判读标准分别参照《乳腺癌雌、孕激素受体免疫组织化学检测指南》^[7]和《乳腺癌 HER-2 检测指南》^[8]。

1.2 MALDI-TOF MS MALDI-TOF MS 是近年一种新型高通量、定量检测基因甲基化仪器,其是基于碱基特异性裂解结合质谱测定分析建立的新型检测技术,不仅可以得到定量的甲基化值,而且可以精确到每一个 CpG 位点的甲基化值。应用酚-氯仿方法提取乳腺样本总 DNA,使用 Ez-96 DNA 甲基化处理试剂盒(Zymo Research 公司)处理 DNA,PCR 扩增 Notch1 基因,Notch1 基因引物序列见参考文献^[5],PCR 反应试剂盒购自 Sequenom 公司,然后 EpiTYPER 分析,体外转录和 PCR 扩增以及 T-剪切,质谱技术定量分析 Notch1 基因甲基化状态。操作

接受日期:2018-01-17

基金项目:国家自然科学基金(81560433)、新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(XJGRI2017032)

作者单位:¹ 石河子大学医学院病理学系/石河子大学医学院第一附属医院病理科,石河子 832000

² 湖北省襄阳市中心医院病理科,襄阳 441021

³ 新疆维吾尔自治区人民医院病理科,乌鲁木齐 830002

作者简介:李威,男,硕士研究生。E-mail:623923616@qq.com

曹玉文,女,教授,通讯作者。E-mail:cywwb2013@126.com

com

步骤参照文献^[5]和试剂盒说明书进行。

1.3 免疫组化 免疫组化染色采用 SP 法,具体步骤按照试剂盒说明书操作。anti-Notch1 抗体购自 Abcam 公司,稀释比例为 1:50,以细胞质、细胞膜出现黄色颗粒为阳性染色,判读标准参照文献^[5,9]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,运用多个独立样本 Kruskal-Wallis *H* 检验比较乳腺 4 组组织(UDH、ADH、DCIS、IDC)之间以及不同分期和分级之间的每个 CpG 单位的甲基化率。采用 Wilcoxon *W* 两独立样本非参数秩和检验对乳腺 4 组样本临床病理特征之间的各 CpG 位点的甲基化率差异进行分析。采用 Spearman 相关性分析对 Notch1 蛋白表达阳性率和其甲基化率进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch1 基因在维吾尔族乳腺 UDH、ADH、DCIS、IDC 组织中的甲基化状况 Notch1 基因在乳腺 UDH、ADH、DCIS 至 IDC 过程中的甲基化率逐渐降低(图 1),且 4 组间差异有统计学意义($P = 0.000$)。当 4 组之间进行两两比较时,结果显示,IDC 分别与 DCIS、ADH、UDH 组间差异有统计学意义($P < 0.001$),DCIS 与 ADH 组间差异无统计学意义,但与 UDH 组间差异有显著性($P < 0.001$),ADH 和 UDH 组之间的差异有显著性($P < 0.001$,图 1)。

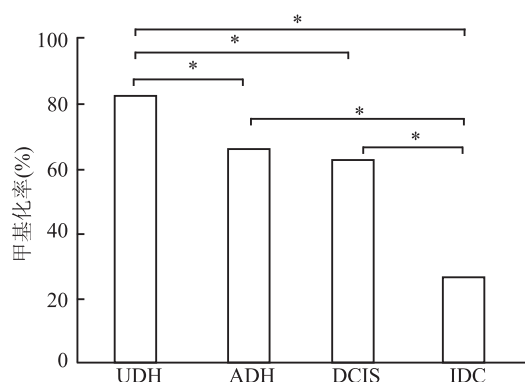


图1 Notch1 基因总甲基化率在乳腺 UDH、ADH、DCIS、IDC 组中的变化 * $P < 0.05$

CpG 单位甲基化率从 UDH 至 IDC 癌变过程中的变化,大部分位点即 CpG_1.2、CpG_3、CpG_4.5、CpG_8、CpG_9、CpG_10.11、CpG_14.15.16、CpG_19、CpG_20、CpG_21 的甲基化逐渐降低,并且 IDC 组中的甲基化率 $< 30\%$,甲基化水平较低,而 UDH、ADH 和 DCIS 中所有 CpG 单位甲基化率 $> 48\%$,甲

基化水平较高。所有 CpG 单位甲基化在 4 组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。两两比较时,13 个 CpG 单位有 9 个单位即 CpG_1.2、CpG_3、CpG_4.5、CpG_8、CpG_10.11、CpG_14.15.16、CpG_19、CpG_20、CpG_21 甲基化率在 IDC 组均显著低于 DCIS、ADH 和 UDH 组($P < 0.05$);大部分 CpG 甲基化率在 DCIS 和 UDH 组间差异有统计学意义($P < 0.05$);所有 CpG 单位甲基化水平在 ADH 和 DCIS 之间无明显变化;ADH 和 UDH 组织中的大多数 CpG 甲基化率之间差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 Notch1 基因甲基化与维吾尔族乳腺癌患者临床病理特征的比较 Notch1 基因在乳腺癌低分化、淋巴结转移和 TNM 高分期中的总甲基化率是降低的,但差异无统计学意义。CpG_9 甲基化率在高分化组(1 级) $>$ 中分化组(2 级) $>$ 低分化组(3 级)($P < 0.05$),CpG_10.11 甲基化率在腋窝淋巴结无转移组高于腋窝淋巴结有转移组($P < 0.05$),CpG_1.2 单位甲基化率 I 期 $<$ II 期 $<$ III 期($P < 0.05$),CpG_1.2 单位甲基化率在 ER(+)、PR(+)、HER-2(-)组小于 ER(-)、PR(-)、HER-2(-)组($P < 0.05$,表 1)。

2.3 Notch1 蛋白在维吾尔族乳腺组织中的表达以及与甲基化的相关性 Notch1 蛋白表达定位于乳腺上皮细胞和癌细胞的胞质和胞膜,极少数癌细胞不仅有胞质和胞膜阳性表达,同时也有胞核弱阳性表达,呈黄色至棕褐色颗粒(图 3)。Notch1 蛋白在乳腺上皮细胞癌变过程(UDH、ADH、DCIS 至 IDC)中的表达逐渐升高,UDH 组中以阴性表达为主,IDC 组阳性表达为主。4 组乳腺组织中 Notch1 基因总甲基化程度与蛋白表达均呈显著负相关($P < 0.05$,表 2)。Notch1 基因 13 个 CpG 位点在每组中的甲基化率与蛋白表达呈负相关,大多数差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

本组实验结果显示,Notch1 基因从维吾尔族乳腺普通型增生细胞到浸润癌细胞的甲基化率显著降低,并且 13 个 CpG 位点中 9 个位点即 CpG_1.2、CpG_3、CpG_4.5、CpG_8、CpG_10.11、CpG_14.15.16、CpG_19、CpG_20、CpG_21 的甲基化水平也明显减低,这与本实验组前期结果相一致^[5]。Gao 等^[10]发现,Notch1 甲基化很少发生在口腔鳞状细胞癌中,进一步说明 Notch1 基因低甲基化与恶性肿瘤的发生、进展相关。Notch1 基因总甲基化率在

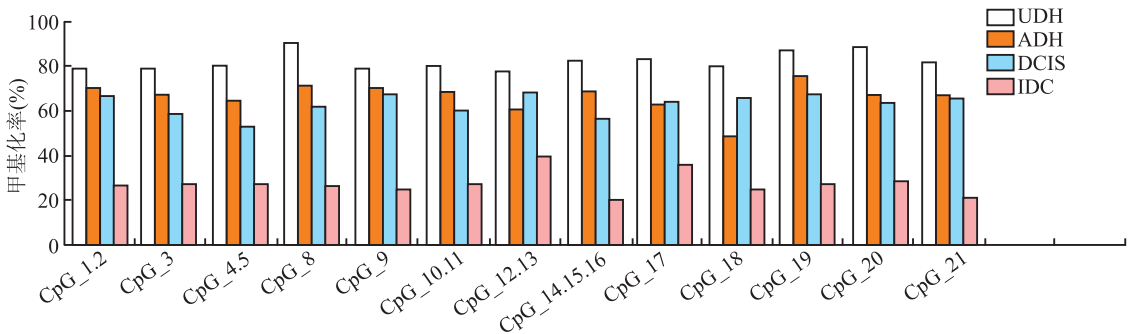


图2 Notch1 基因 CpG 单位甲基化值在乳腺 UDH、ADH、DCIS、IDC 组中的变化

表1 Notch1 基因特异性单位点甲基化与临床病理特征的比较

临床病理 参数	CpG_1.2		CpG_9		CpG_10.11	
	甲基化(%)	P 值	甲基化(%)	P 值	甲基化(%)	P 值
组织学分级						
1	12(28.4)	0.075	12(45.0)	0.044 *	12(18.6)	0.519
2	26(24.3)		28(22.5)		26(19.3)	
3	17(24.5)		15(17.1)		17(20.2)	
淋巴结转移						
无	31(26.3)	0.303	29(31.8)	0.212	29(22.80)	0.012 *
有	24(27.9)		26(21.9)		26(15.43)	
TNM 分期						
I	12(16.9)	0.041 *	12(24.2)	0.118	13(20.9)	0.566
II	32(28.3)		32(23.4)		31(18.0)	
III	11(36.3)		11(22.6)		11(18.6)	
ER/PR/HER-2						
ER + ,PR + ,HER-2 -	31(17.8)	0.005 *	28(21.4)	0.360	30(27.4)	0.623
ER - ,PR - ,HER-2 +	24(42.9)		27(21.0)		25(28.1)	

* P < 0.05

表2 Notch1 在乳腺组织中的表达以及与甲基化的相关性

组织学 类型	蛋白阳性率 (%)	甲基化率 (%)	r 值	P 值
UDH	54.2	82.4	-0.721	0.002
ADH	70.6	65.9	-0.684	0.005
DCIS	88.0	62.3	-0.611	0.015
IDC	89.3	26.8	-0.826	<0.001

维吾尔族乳腺癌低分化、淋巴结转移和高分期组中呈降低趋势,说明 Notch1 低甲基化促进了乳腺癌恶性进展,与汉族乳腺癌的研究结果相符^[5]。在这个过程中,一些位点尤其 CpG_9 甲基化率在低分化组中显著减低,提示 Notch1 基因 CpG_9 位点低甲基化促进维吾尔族乳腺癌发展,而汉族乳腺癌 CpG_1.2 和 CpG_12.13 则发挥主要作用^[5],说明不同民族 Notch1 甲基化的遗传特异性;CpG_10.11 甲基化率在腋窝淋巴结有转移组降低,与汉族乳腺癌中的位点相一致^[5],提示 Notch1 基因位点的低甲基化可能加剧维吾尔族乳腺癌的浸润和转移;CpG_1.2 甲基化率在临床Ⅲ期中升高,提示 Notch1 基因 CpG_1.2 低甲基化在维吾尔族乳腺癌不同临床分期可能起不

同的作用,汉族乳腺癌中则是 CpG_14.15.16 和 CpG_18 在不同临床分期乳腺癌中发挥重要作用^[5];维吾尔族乳腺癌中 CpG_1.2 位点而汉族乳腺癌 CpG_3、CpG_8、CpG_14.15.16 位点^[5]在 ER、PR 和 HER-2 不同表达状态中的甲基化率不同,提示 Notch1 基因的甲基化水平与不同民族患者的雌激素、孕激素水平等有相关性。虽然,Notch1 基因单个 CpG 位点与其他肿瘤的相关性目前尚未见报道,但有研究显示,Notch1 基因 CpG 位点甲基化变化与协调体内神经发生有关^[11]。

此次实验结果表明,Notch1 蛋白在维吾尔族乳腺癌变组织中的表达逐渐升高,而甲基化率逐渐降低,两者呈显著负相关,推测 Notch1 基因低甲基化可能促进了蛋白表达,这与本实验组前期报道的内容相一致^[5]。并且,Sun 等^[12]研究结果也显示,乳腺癌中 Notch1 基因低甲基化与 Notch1 蛋白高表达相关,低甲基化负向调控下游 mRNA 和蛋白表达,低甲基化率可能通过活化原癌基因 Notch1 或者增强其染色体的不稳定性来促进乳腺癌的发生和进

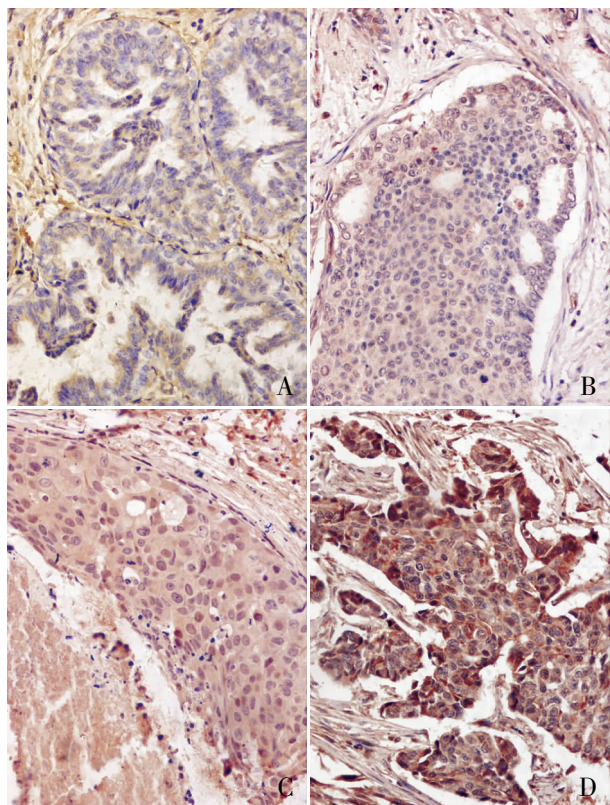


图3 Notch1 蛋白在乳腺不同病变组织中的表达,SP 法:A. UDH;B. ADH;C. DCIS;D. IDC

展。另外,也有文献报道在急性淋巴细胞白血病^[13]中 Notch1 低甲基化促进其蛋白表达,这与本实验结果相一致。

综上所述,我们还需进一步探讨 Notch1 甲基化调控乳腺癌变进展的机制,以期维吾尔族女性乳腺癌预防和诊治提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 万国兴,李 锋,孙建平,等. miRNA-34a、Notch1 与乳腺癌发生、发展的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013,29 (10):1113-1115.
- [2] 孙建平,李 锋,万国兴,等. Notch 信号通路及上皮间质转

化与乳腺癌相关性研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013,27(7):625-626.

- [3] Cao Y W, Li W Q, Wan G X, *et al.* Correlation and prognostic value of SIRT1 and Notch1 signaling in breast cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014,33(1):97.
- [4] Cao Y W, Wan G X, Sun J P, *et al.* Implications of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2015,31(2):70-76.
- [5] Cao Y W, Li Y X, Zhang N, *et al.* Quantitative DNA hypomethylation of ligand Jagged1 and receptor Notch1 signifies occurrence and progression of breast carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5):1621-1634.
- [6] Lakhani S R, Ellis I O, Schnitt S J, *et al.* WHO classification of tumors of the breast. World Health Organization classification of tumors[M]. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2012:19-20.
- [7] 《乳腺癌雌、孕激素受体免疫组织化学检测指南》编写组. 乳腺癌雌、孕激素受体免疫组织化学检测指南[J]. 中华病理学杂志, 2015,44(4):237-239.
- [8] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)[J]. 中华病理学杂志, 2014,43(04):262-267.
- [9] 负 田,王仰坤,原旭涛,等. Mel-18、Notch-1 和 PLK-1 在不同乳腺组织中的表达及临床意义[J]. 诊断病理学杂志, 2017, 24(1):30-33.
- [10] Gao S, Krogdahl A, Eiberg H, *et al.* LOH at chromosome 9q34.3 and the Notch1 gene methylation are less involved in oral squamous cell carcinomas[J]. J Oral Pathol Med, 2007,36(3):173-176.
- [11] Zhang Z, Gao F, Kang X, *et al.* Exploring the potential relationship between Notch pathway genes expression and their promoter methylation in mice hippocampal neurogenesis[J]. Brain Res Bull, 2015,113:8-16.
- [12] Sun H, Li K, Shen S. A study of the role of Notch1 and JAG1 gene methylation in development of breast cancer[J]. Med Oncol, 2016,33(4):35.
- [13] Scourzac L, Couronné L, Pedersen M T, *et al.* DNMT3A882H mutant and Tet2 inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice[J]. Leukemia, 2016,30(6):1388-1398.

Comparison of differences of Notch1 gene methylation between hyperplastic lesions tissues and breast cancer tissues in Uyghur women

LI Wei¹, ZHANG Na^{1,2}, WANG Liu-hua¹, CHEN Xiao-wen¹, LIANG Wei-hua¹, SUN Zhen-zhu³, CAO Yu-wen¹

(¹Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine/Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, China; ²Department of Pathology, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441021, China; ³Department of Pathology, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi 830002, China)

ABSTRACT Purpose To compare the difference of Notch1 methylation in the breast cancer and hyperplastic lesions tissue from Uyghur in Xinjiang. **Methods** The methylation level of

Notch1 gene in Uyghur breast tissues including usual ductal hyperplasia (UDH), atypical ductal hyperplasia (ADH), ductal carcinoma in situ (DCIS), and invasive ductal carcinoma (IDC)

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.005.html>

原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床病理特征及预后

朱 秀,尹文娟,吴梅娟,程国平,孙文勇,倪型灏

摘要:目的 探讨原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤(primary breast diffuse large B-cell lymphoma, PBDLBCL)的临床特点、免疫表型及预后。方法 回顾性分析 2006 年 1 月~2016 年 12 月 49 例 PBDLBCL 的临床病理资料及免疫组化 EnVision 法染色结果。结果 49 例患者女性 47 例,男性 2 例,年龄 24~79 岁,中位年龄 48 岁;镜下见肿瘤细胞中等大小或偏大,弥漫一致浸润分布于乳腺小叶间、导管周围、间质及脂肪组织内,部分呈单行条索状排列。免疫表型:37 例为非生发中心型,12 例为生发中心型;Ki-67 增殖指数均大于 40%。Ann Arbor 分期:ⅠEA 期 16 例,ⅡEA 期 28 例,ⅣE 期 5 例;IPI 评分:30 例 0~1 分,10 例 2 分,9 例 3 分。随访 5~146 个月,3 年患者总生存期为 51.2%,5 年为 36.7%,单因素分析结果显示:临床分期、LDH 水平、IPI 评分、BCL-2 蛋白表达、BCL-6 蛋白表达的患者 3、5 年生存期,差异有统计学意义;Cox 回归多因素分析显示 IPI 危险分级增加是 PBDLBCL 独立的不良预后因素。结论 PBDLBCL 诊断主要依靠病理活检及免疫表型,免疫表型以非生发中心为主,治疗以手术、放、化疗等综合治疗方案为宜。预后需多因素综合评价,IPI 危险分级增加是 PBDLBCL 独立的不良预后因素。

关键词:淋巴瘤;弥漫大 B 细胞淋巴瘤;免疫组织化学;临床特点

中图分类号:R 733.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0257-06

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.005

乳腺原发淋巴瘤(primary breast lymphoma, PBL)临床少见,占乳腺恶性肿瘤的 0.04%~1%,占结外非霍奇金淋巴瘤的 1%~2%,PBL 发病率低、临床表现无特异性,术前诊断困难^[1]。PBL 女性多见,主要为非霍奇金淋巴瘤,以弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)最多,而霍奇金淋巴瘤罕见^[2]。本文回顾性分析 49 例原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤(primary breast diffuse large B-cell lymphoma, PBDLBCL)的一般病理资料、治疗预后等情况进行分析,旨在探讨预后及更合理的治疗方案。

接受日期:2018-02-01

作者单位:浙江省肿瘤医院病理科,杭州 310032

作者简介:朱 秀,女,硕士,主治医师。E-mail: 15868870650@163.com

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集浙江省肿瘤医院 2006 年 1 月~2016 年 12 月诊治的 49 例 PBDLBCL,包括患者的临床资料及随访情况,所有患者通过电话或门诊随访,随访截止时间为 2017 年 10 月 30 日。

1.2 方法 标本均经 10% 中性福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋,切片 4 μm 厚,常规 HE 染色,光镜观察。免疫组化采用 EnVision 法,一抗 CD4、CD20、CD79a、MUM1 购自丹麦 Dako 公司;CK、EMA、CD3、CD5、CD138、CD10、BCL-2、BCL-6、Ki-67 购自北京中杉金桥公司。以不同抗体所对应的阳性切片作阳性对照。

1.3 结果判断及疗效评价 肿瘤细胞核/胞质(膜)出现清晰的棕黄色颗粒为阳性细胞。根据 Hans 等^[3]判断:当 ≥30% 的肿瘤细胞呈棕黄色为阳

were detected by MALDI-TOF-MS technique. The association of the methylation level with clinical pathological characteristics of patients was analyzed. The expression of Notch1 protein was detected by immunohistochemistry. The relationship between the methylation status and expression was assay. **Results** The methylation rate of Notch1 gene in UDH, ADH, DCIS, and IDC group was gradually decreased ($P < 0.05$). The 9 CpG sites methylation level of 13 CpG sites are statistically lower in cancer

tissues ($P < 0.05$). The hypomethylation are accompanied with low differentiation, lymph node metastasis and high stage of TNM ($P < 0.05$). The lower DNA methylation is negatively correlated with the expression of Notch1 ($P < 0.05$). **Conclusion** There was a differences of the expression and methylation rate of Notch1 between breast cancer and hyperplastic lesions tissue, and its biological significances needs to be further studied.

Key words: breast neoplasm; Notch1; methylation

性。Ki-67 增殖指数:高倍镜($\times 400$)下选取 10 个视野 1 000 个肿瘤细胞平均计数。总生存期定义为确诊至患者死亡或末次随访时间。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,临床病理学指标包括发病年龄、肿瘤分期/血中 LDH 浓度、IPI 评分、BCL-2 及 BCL-6 蛋白表达、细胞亚型、治疗方式和 3、5 年生存期。生存情况采用 Kaplan-Meier 法,单因素分析采用 Log-rank 检验,多因素分析采用 Cox 比例风险回归模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特点 本组 49 例中,女性 47 例,男性 2 例,年龄 24 ~ 79 岁,中位年龄 48 岁。均以乳腺肿块为首发症状就诊,肿块直径 2 ~ 10 cm。肿物位于右侧乳腺 24 例,占 48.9%,位于左侧乳腺 20 例,占 42.9%;双侧乳腺 5 例,占 10.2%。原发乳腺淋巴瘤临床分期(Ann Arbor 标准) I E 期(病变局限单侧乳腺)16 例,II E 期(病变局限单侧乳腺侵犯同侧腋窝淋巴结)28 例,IV 期(病变发生在双侧乳腺或伴有腋窝淋巴结转移)5 例。IPI 0 ~ 1 分 30 例,2 分 10 例,3 ~ 4 分 9 例。实验室检查:LDH(< 240 U/L)24 例,LDH(240 ~ 500 U/L)16 例,LDH(> 500 U/L)9 例。

2.2 病理检查 镜下见乳腺正常结构消失,肿瘤细胞弥漫一致浸润分布乳腺小叶间、导管周围纤维及脂肪组织内(图 1),部分呈单行条索状排列,似列兵样。肿瘤细胞中等大小或偏大、胞质中等、弱嗜碱性,核呈圆形或椭圆形,大而深染,核膜清晰,可见小核仁(图 2)。免疫表型:所有患者均表达 CD20(图 3)、CD79a,不表达上皮类标记 CK、EMA 及 T 细胞标记 CD3、CD5。BCL-2 有 47 例表达,CD10 有 10 例表达,BCL-6 有 39 例表达,MUM1 有 38 例表达,Ki-67 增殖指数 $> 40\%$ (图 4)。

2.3 治疗及预后 随访病例中根治手术联合化疗 9 例,单纯化疗 29 例,放化疗 11 例。化疗为 4 ~ 8 周期 CHOP 方案(环磷酰胺、长春新碱、阿霉素、泼尼松)或 CHOP 类似方案(包括加或不加利妥昔单抗),部分患者进行了中枢神经系统预防性甲氨喋呤或阿糖胞苷鞘内注射。化疗后 1 个月内给予累及部位放疗,放疗中位剂量 50 Gy(30 ~ 60 Gy)。1 例达 CR 后行自体干细胞移植巩固治疗。49 例患者获得随访,随访时间 5 ~ 146 个月,中位随访时间 37 个

月。本组病例中死亡 20 例,均因肿瘤致死。30 例出现肿瘤转移,其中同侧乳腺复发 10 例,转移至对侧乳腺 4 例,骨髓转移 8 例,盆腔卵巢转移 1 例,脑转移 7 例。单因素生存分析显示:临床分期($P = 0.003$,图 5)、LDH 水平($P = 0.000$,图 6)、IPI 评分($P = 0.021$,图 7)、BCL-2 蛋白表达($P = 0.001$)、BCL-6 蛋白($P = 0.002$,图 8)的表达患者 3 年、5 年总生存期差异有统计学意义(表 1)。患者年龄、

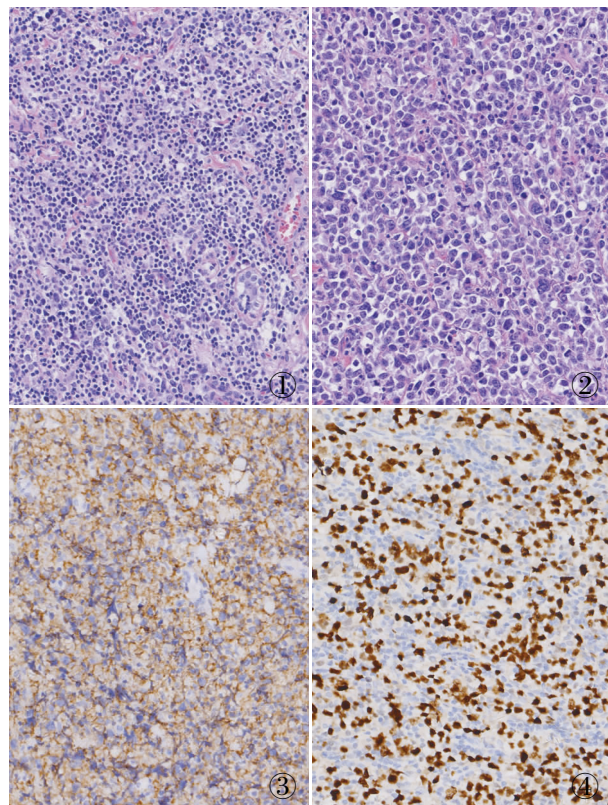


图 1 乳腺正常结构消失,可见部分导管,小叶残存,腺泡萎缩

图 2 瘤细胞中等大小,核卵圆形、圆形或不规则折叠,染色质空泡状或粗颗粒状,可见核仁

图 3 CD20 在肿瘤组织中的表达,EnVision 法

图 4 Ki-67 在肿瘤组织中的表达,EnVision 法

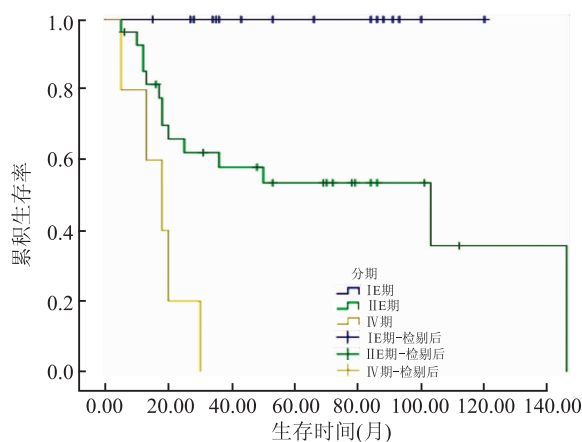


图 5 临床分期与 PBDLBCL 预后的相关性

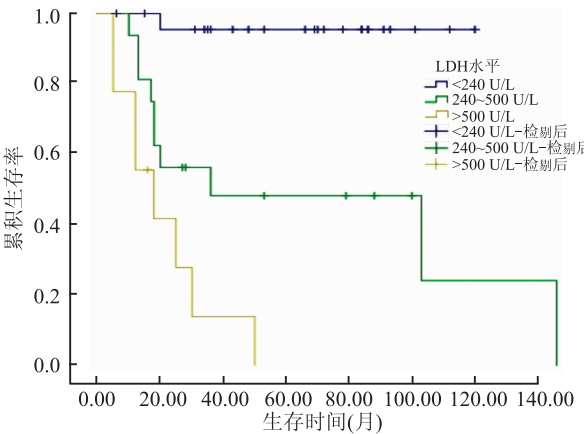


图6 血中LDH水平与PBDLBCL预后的相关性

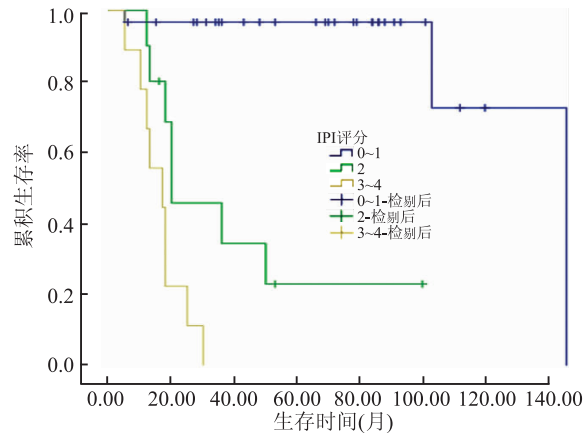


图7 IPI评分与PBDLBCL预后的相关性

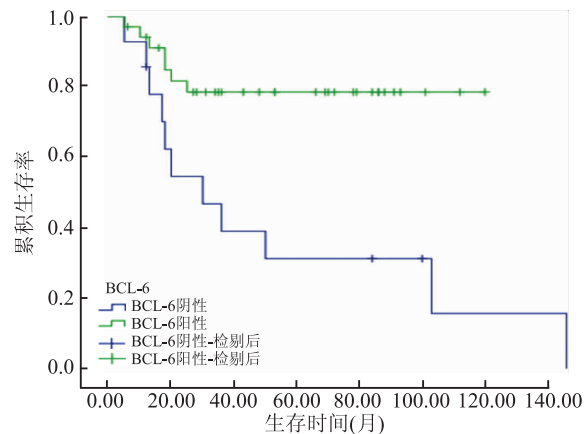


图8 BCL-6蛋白表达与PBDLBCL预后的相关性

CD10 蛋白表达、MUM1 蛋白表达、细胞来源、是否接受放疗对预后影响差异无统计学意义,但患者行根治手术加辅助化疗和(或)放疗的预后相对较好。Cox 风险比例回归模型多因素分析结果显示 IPI 评分是影响患者预后的独立因素(表2)。

表1 PBDLBCL 患者影响预后的单因素分析

临床病理参数	n	3 年 总生存率(%)	5 年 总生存率(%)	P 值
年龄(岁)				
<40	12	66.7	33.3	0.407
40~60	23	78.2	39.1	
>60	14	50.0	21.4	
临床分期				
I E	16	100.0	43.7	0.003
II E	28	50.0	35.7	
IV E	5	0.0	0.0	
LDH 水平(U/L)				
<240	24	70.8	54.1	0.00
240~500	16	37.5	31.2	
>500	9	11.1	0.0	
IPI 评分				
0~1	30	70.0	58.0	0.021
2	10	30.0	15.0	
3	9	0.0	0.0	
BCL-2 蛋白				
阴性	5	20.0	0.0	0.001
阳性	44	54.5	40.9	
CD10 蛋白				
阴性	40	55.0	37.5	0.602
阳性	9	33.3	22.2	
BCL-6 蛋白				
阴性	14	35.7	21.4	0.002
阳性	35	54.3	40.0	
MUM1 蛋白				
阴性	14	57.1	42.8	0.293
阳性	35	47.2	31.4	
细胞亚型				
生发中心型	12	41.7	25.0	0.675
非生发中心型	37	51.3	37.8	
治疗方案				
根治手术+化疗	9	77.8	66.7	0.873
单纯化疗	29	37.9	17.2	
化疗+放疗	11	54.5	45.5	

表2 Cox 风险比例回归模型多因素分析

PBDLBCL 患者预后影响因素					
影响因素	B	SE	χ ² 值	P 值	95% CI for Exp(B)
IPI	0.658	0.193	12.258	0.000	1.662(1.300~2.724)

3 讨论

PBDCLBCL 是一种罕见的肿瘤,发病率低,约占非霍奇金淋巴瘤的 1.6%,发生于乳腺的淋巴瘤有约 60% 为原发性乳腺淋巴瘤,而继发性乳腺淋巴瘤少见^[4]。淋巴瘤诊断依据 WHO(2013)造血和淋巴组织肿瘤分类标准进行。PBL 诊断依据严格采用 1972 年 Wiseman 等^[5]提出的诊断标准:有诊断的足够病理标本组织;标本中既有淋巴瘤侵犯,又要正常

乳腺组织;既往无其他部位淋巴瘤病史;乳腺是首发部位,同时或随后有同侧腋窝来不及累及(如淋巴瘤同时累及的淋巴结大小大于乳腺包块,或者肿块位于腋尾时,应考虑结内淋巴瘤);其他部位无淋巴瘤同时合并。临床分期按 Ann Arbor 标准,并结合全身体格检查,颈、胸、腹、盆腔 CT/PET/CT、骨髓涂片等进行,双侧乳腺受侵归为ⅣE 期,且无Ⅲ期。本组 52 例 PBDCLBCL 均符合 Wiseman 等^[5]提出的诊断指标。

3.1 临床特征 本组 49 例中女性 47 例,男性 2 例,年龄 24~79 岁,中位年龄 48 岁;均以乳腺肿块为首发症状就诊,肿块直径 2~10 cm。右侧乳腺 24 例,左侧乳腺 20 例,双侧乳腺 5 例。与以往的研究中显示肿瘤好发于右侧乳腺结果相似^[6]。PBDCLBCL 通常无特异性临床表现,患者大多数以无痛性肿块为首发症状,肿块大小不一,少部分患者可出现肿块疼痛感觉,因此 PBDCLBCL 患者初诊时大多以乳腺癌收治。当乳腺包块与周围皮肤无粘连、边界清楚、不伴橘皮样改变、无乳头凹陷或溢液时,提示 PBDCLBCL 可能。

3.2 诊断与免疫表型 PBDCLBCL 主要依靠病理活检及免疫表型确诊。本组 40 例患者经肿块切除或穿刺确诊,9 例患者因冷冻组织不能确诊类型或穿刺标本量少不能确定类型行改良根治术。PBDCLBCL 在病理组织学上肿瘤细胞呈浸润性、弥漫性生长、如瘤细胞围绕小叶或导管浸润及乳腺间质出现硬化,瘤细胞呈单行印度列兵样、腺泡样或靶环样排列。瘤细胞中等大小,瘤细胞核的大小相当于反应性吞噬细胞的核或正常淋巴细胞的两倍或更大,核卵圆形、圆形或不规则折叠,染色质空泡状或粗颗粒状,可见 2~4 个核仁,核分裂多见,胞质中等量或丰富,嗜双色或嗜酸性。免疫组化标记一致表达 CD20、CD79a 等 B 细胞标志物,根据 Hans 等的标准,将 DLBCL 分为生发中心型或非生发中心型,PBDCLBCL 以非生发中心型多见,占 2/3 以上^[7]。本组生发中心型 12 例,非生发中心型 37 例。

3.3 治疗与预后 PBDLBCL 治疗策略目前尚无统一的标准。多数学者认为治疗应采取局部放疗联合全身化疗的综合治疗策略,不提倡大范围的乳腺根治术,Ryan 等^[7]统计 204 例病例结果提示根治性乳腺癌切除术增加了死亡风险,风险比 $HR = 2.4$ (95% CI 为 1.2~4.8, $P = 0.03$)。Jennings 等^[8]也认为手术对 PBDCLBCL 仅适合用来明确诊断。但

是本组 9 例接受了乳腺根治术或改良根治术,9 例患者术后行 4~8 周期 CHOP/RCHOP 方案化疗,对比分析发现根治手术+化疗的患者预后较单纯性化疗或化疗+放疗的患者有较好的预后,差异有统计学意义。因此,根治手术对于乳腺淋巴瘤的预后有一定的获益,但是长远的患者生存质量及预后还需要大量的证据证实。同时本实验还分析了是否放疗与预后的关系,但未得到有意义的结果。本组 11 例接受了局部放疗,中位剂量 50 Gy,4 例患者在治疗中出现进展,余 7 例患者随访至 2017 年 10 月 1 日,均未出现局部复发,提示放疗对局部控制起到一定程度的作用。张娜等^[9]也观察到化疗后的全乳放疗能给患者带来生存获益。一项瑞士的随机对照研究结果显示,与单独使用任何一种方式相比,接受化疗联合放疗的患者生存率明显提高^[10]。因此 PBDCLBCL 作为全身性疾病,治疗原则仍应为全身化疗为主的综合治疗,化疗方案目前多为 RCHOP 方案,行 4~8 个周期不等。Yhim 等^[11]回顾性研究强调了联合蒽环类的治疗方案使患者获得更好的无进展生存期及总生存期,且治疗不足 4 个周期的患者预后较充分化疗的患者差。Hosein 等^[12]的研究显示 CHOP+利妥昔单抗同时联合放疗的 5 年无进展生存期与总生存期为 50%~70%。本组病例化疗联合利妥昔单抗患者生存差异无统计学意义,但结合以往文献报道,仍认为利妥昔单抗联合化疗与单纯化疗患者比较,能使 PBDLBCL 患者生存获益。有文献报道,PBL 患者中枢神经系统复发率为 14%~21.0%,其中 DLBCL 患者中枢神经系统复发率为 12.0%~27.0%^[13]。本组有 7 例出现中枢转移,均未行预防性鞘注。目前针对 PBDLBCL 患者,推荐 RCHOP 方案+单侧全乳放疗,双侧乳腺受累患者建议行中枢神经系统的预防性治疗,如甲氨蝶呤鞘内注射等^[14]。本组患者中行预防性鞘注 30 例,均未出现复发转移。复发转移患者一般情况较差,中位生存期约 1 年,5 年生存率约 20%,治疗方案参考其他部位的 DLBCL,可选择性的予以化学免疫治疗再诱导,进而行造血干细胞移植等。本组中 1 例 DLBCL 患者初始治疗达到 PR 或 CR 后行造血干细胞移植,并存活至今,而复发转移患者目前均未行造血干细胞移植。目前 PBDCLBCL 的发病机制尚不明确。BCL-2 蛋白属于凋亡相关蛋白,其过表达可导致细胞凋亡受阻,并赋予淋巴细胞生存优势的能力,在淋巴瘤发病及淋巴瘤细胞对放疗和放化疗敏感性

上起重要作用,PBDBLCL 中 BCL-2 蛋白阳性率为 40%~60%,BCL-2 蛋白表达是 DLBCL 患者的不良预后因素^[15]。本组随访显示 BCL-2 阳性组预后明显好于 BCL-2 阴性组,BCL-2 阳性组的 3、5 年生存率均明显高于阴性组,本组 BCL-2 阴性病例较少,存在偏差。因此,BCL-2 在 PBDBLCL 中的预后意义还需要大量的数据证实。Hans 等通过 CD10、BCL-6 及 MUM1 等抗体的联合检测和结果分析将 DLBCL 分为生发中心和非生发中心型肿瘤,并据此来预测患者的预后。本实验对生发中心与非生发中心型的 3、5 年生存率进行比较,差异无统计学意义,与文献报道一致^[16-17]。另外 BCL-6 蛋白表达与 PBDBLCL 的预后相关,阳性表达提示预后较好,与文献报道一致^[18]。血清中 LDH 浓度与 PBDBLCL 预后相关,有研究表明恶性程度高者其侵犯范围大、有骨髓浸润者其肿瘤组织的酵解酶系统更加活跃等原因有关^[19]。陶谦等^[20]的研究指出对于化疗有效的淋巴瘤患者,治疗后血清 LDH 浓度可明显降低。本实验对比分析显示不同 LDH 浓度患者的总生存率方面差异有显著性。同时还观察到本组 8 例患者出现骨髓转移时,血清 LDH 浓度均有不同程度的升高。因此血清 LDH 可以成为评估患者的预后及患者治疗效果、辅助诊断是否有骨髓浸润转移的重要指标。IPI 评价体系是目前广泛应用的指导 DLBCL 治疗及预后评估的重要指标。本实验中按 IPI 评分进行预后分组,单因素生存分析显示各组患者 5 年生存率差异均有统计学意义,进一步多因素 Cox 回归分析结果也显示 IPI 评分 >2 分是影响 PBDBLCL 预后的独立危险因素。

目前大部分研究样本量仍相对较少,治疗方式不统一,因此期待进行更完整的前瞻性研究,以明确更多的预后因素,尽可能细致而全面地对疾病进行分层,以求在标准化治疗的基础上针对不同患者具有的不同危险因素,进行个体化分层治疗。目前临床分期、IPI 评分仍然是预示预后的主要因素。早期发现、早期确诊、早期治疗,是提高总生存时间的关键。

参考文献:

- [1] Iwatani T, Kawabata H, Miura D, *et al.* Complete spontaneous regression of primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast [J]. J Clin Oncol, 2011,29(5):113-115.
- [2] 周智俊,谢建兰,韦萍,等.原发性乳腺淋巴瘤类型构成与预后分析[J].中华病理学杂志,2017,46(9):618-622.
- [3] Hans C P, Weisenburger D D, Greiner T C, *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray [J]. Blood, 2004, 103(1):275-282.
- [4] Kuroda H, Tamaru J, Takeuchi I, *et al.* Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast [J]. Breast Cancer, 2007,14(3):317-322.
- [5] Wiseman C, Liao K T. Primary lymphoma of the breast [J]. Cancer, 1972,29(6):1705-1712.
- [6] Shao Y B, Sun X F, He Y N, *et al.* Clinicopathological features of thirty patients with primary breast lymphoma and review of the literature [J]. Med Oncol, 2015,32(2):448-453.
- [7] Ryan G, Martinelli G, Kuper-Hommel M, *et al.* Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: prognostic factors and outcomes of a study by the International Extranodal Lymphoma Study Group [J]. Ann Oncol, 2008,19(2):233-241.
- [8] Jennings W C, Baker R S, Mumy S S, *et al.* Primary breast lymphoma: the role of mastectomy and the importance of lymph node status [J]. Ann Surg, 2007,245(5):784-789.
- [9] 张娜,刘鹏,卢珂,等.原发性乳腺淋巴瘤预后分析及文献回顾[J].中华放射肿瘤学杂志,2017,26(8):914-916.
- [10] Aviles A, Delgado S, Nambo M J, *et al.* Primary breast lymphoma: results of a controlled clinical trial [J]. Oncology, 2005,69(3):256-260.
- [11] Yhim H Y, Kang H J, Choi Y H, *et al.* Clinical outcomes and prognostic factors in patients with breast diffuse large B cell lymphoma. Consortium for improving survival of lymphoma (CISL) study [J]. BMC Cancer, 2010,10(1):321-327.
- [12] Hosein P J, Maragulia J C, Salzberg M, *et al.* A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era [J]. Br J Haematol, 2014,165(3):358-363.
- [13] Benevolo G, Stacchini A, Spina M, *et al.* Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination [J]. Blood, 2012,120(16):3222-3228.
- [14] Vitolo U, Seymour J F, Martelli M, *et al.* Extranodal diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and primary mediastinal B-cell lymphoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow up [J]. Ann Oncol, 2016,27(5):91-102.
- [15] Zhu X, Yin W J, Chen G P, *et al.* Comparison of clinical characteristics, immunophenotype and prognosis between primary gastrointestinal and primary nodal diffuse large B-cell lymphomas [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017,10(5):5480-5488.
- [16] Fukuhara S, Watanabe T, Munakata W, *et al.* Bulky disease has an impact on outcomes in primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: a retrospective analysis at a single institution [J]. Eur J Haematol, 2011,87(5):434-440.
- [17] 陈燕,崔自强,王华,等.弥漫性大B细胞淋巴瘤83例预后相关因素分析[J].临床与实验病理学杂志,2013,29(8):844-849.
- [18] Chen Z, Du Z, Chen J Q, *et al.* Prognostic evaluation of immunohistochemical profiles in diffuse large B-cell lymphoma: a Chinese

study[J]. Med Oncol, 2011,28(1):241-248.

[19] 潘超英, 朱 斌. 非霍奇金淋巴瘤患者血清 LDH 检测的临床意义[J]. 中国医师杂志, 2014,16(10):111-112.

[20] 陶 谦, 周宣岩, 任更朴. 血清乳酸脱氢酶、糖类抗原-125、 β 2-微球蛋白和肿瘤坏死因子- α 联检在非霍奇金淋巴瘤预后中的临床意义[J]. 中国实用医刊, 2009,36(14):18-19.

A retrospective analysis of clinical characteristics and prognostic factors for primary breast diffuse large B cell lymphoma

ZHU Xiu, YIN Wen-juan, WU Mei-juan, CHENG Guo-ping, SUN Wen-yong, NI Xing-hao

(Department of Pathology, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310032, China)

ABSTRACT Purpose To study the clinical features, immunophenotypes and prognostic factors of primary breast diffuse large B-cell lymphoma (PBDLBCL). **Methods** The clinical pathological data of 49 cases of PBDLBCL during January 2006 to December 2016 were retrospectively analysed, and the basic clinical and pathologic data, pathologic types and the immunohistochemical slides by EnVision method for staining were summarized. **Results** 47 cases were women and 2 cases were men. The age ranged from 24 to 79 year old with the median age of 48 year old. On microscopic observation, tumor cells were large to medium-sized which characterized as diffuse infiltration between the lobules of mammary gland, around the duct, interstitial and fat tissue, some were single file cord pattern. The immunophenotype showed 37 cases were of non-GCB, 12 cases were GCB type. Ki-67 index were greater than 40%. According to Ann Arbor staging, 16 cases were stage I EA, 28 cases were stage II EA, 5 cases were stage IV E. IPI score: 30 cases with 0 ~ 1 score, 10 cases with 2 score, 9 cases with 3 score. Patients

were followed up from 5 to 146 months, The 3-year overall survival (OS) rate was 51.2% and 5-year OS rate was 36.7%. Single factor analysis showed that there were statistically significant difference in clinical stage, levels of LDH, IPI score, BCL-2 protein expression, and BCL-6 protein expression in 3 and 5 years of OS rate. The multiple factor analysis of Cox regression showed that the increase of IPI risk classification was the independent adverse prognostic factor of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. **Conclusion** The diagnosis of PBDLBCL is confirmed by pathological biopsy and immunohistochemical markers. The immunophenotype was mainly non-GCB type. Comprehensive treatment including surgery, chemotherapy and radiotherapy is appropriate. The prognosis should be comprehensively evaluated by multiple factors. IPI increase risk classification is the independent adverse prognostic factor.

Key words: lymphoma; diffuse large B cell lymphoma; immunohistochemistry; clinical characteristics

· 国外期刊文摘 ·

类似于甲状腺高细胞亚型乳头状肿瘤的乳腺实性乳头状癌是一种具有惰性生物学行为的侵袭性肿瘤

Foschini M P, Asioli S, Foreid S, *et al.* Solid papillary breast carcinomas resembling the tall cell variant of papillary thyroid neoplasms: a unique invasive tumor with indolent behavior. Am J Surg Pathol, 2017,41(7):887-895.

该文报道 13 例类似于甲状腺高细胞亚型乳头状肿瘤的乳腺浸润性实性乳头状癌 (BPTC)。BPTC 是乳腺原发性肿瘤中的一个特殊类型, 尽管具有三阴性表型特征, 但属于低度侵袭潜能的肿瘤。由于目前对 BPTC 的认知还很欠缺, 因此该研究旨在报道 13 例该肿瘤的临床病理特征。所有患者

均为女性, 平均年龄 62.6 岁, 肿瘤结节直径 0.6 ~ 2.5 cm (平均 1.6 cm)。组织学上所有病例以乳头状、滤泡状或实性结构为特征。细胞呈柱状、嗜酸性, 绝大多数具有颗粒状胞质, 富于线粒体, 至少 7 例肿瘤具有这样的细胞学特征。ER、PR 和 HER-2 一致性阴性。Ki-67 增殖指数较低, 甲状腺起源相关标志物如 TTF-1 和甲状腺球蛋白一致性阴性。5 例 mam-moglobin 和 GATA3 阳性。所有病例都具有侵袭性, 其中 2 例分别表现为腋窝和乳房内 1 枚淋巴结转移, 后 1 例还出现局部复发。然而所有患者术后均存活, 无病生存 24 ~ 132 个月, 其中 8 例没有接受进一步治疗。以上表明 BPTC 是一种原发乳腺具有低度恶性潜能的肿瘤。

(赵 芳¹摘译, 魏建国²审校/¹ 浙江省绍兴市中心医院妇产科, 绍兴 312030; ² 浙江省绍兴市人民医院病理科, 绍兴 312000)

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.006.html>

细胞 DNA 图像自动扫描与分析(DNA-ICM)技术在胸科恶性肿瘤诊断中的应用

徐建平¹, 叶伟¹, 赵洁婷¹, 宋蓉蓉¹, 聂琨², 吕莉萍¹

摘要:目的 通过对 DNA 图像分析(DNA image cytometry, DNA-ICM)技术在胸科恶性肿瘤病变诊断应用的研究,寻找该技术在相关病变诊断方面潜在的优势。方法 选取安徽省胸科医院 2015 年 5 月~2017 年 5 月间送检的 4 402 例胸科疾病患者,选取其中 701 例符合要求的标本进行 DNA-ICM 计算机扫描与自动分析,根据分析结果区分阳性、可疑、阴性诊断,与活检结果及临床基线数据进行对比分析。结果 明确恶性肿瘤病变患者的细胞倍体出现异常者可达 65%,未明确诊断恶性肿瘤但提示有恶性可能的患者细胞倍体异常率为 64%,而在非恶性肿瘤病变患者中则仅为 8%。综合评估显示,细胞 DNA 倍体诊断的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 73%、93%、71%、94%。OR 分析发现恶性肿瘤病变比非恶性肿瘤病变引起倍体异常的风险比是 23.236。结论 DNA-ICM 技术对于胸科常见恶性肿瘤诊断有重要的临床应用价值。

关键词:胸科恶性肿瘤;DNA-ICM;细胞倍体分析

中图分类号:R 365 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0263-04

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.006

恶性肿瘤是威胁人类健康和生命的重要杀手。早发现早诊断是肿瘤防治的重要手段。现有的早期诊断方法包括形态学检查、分子标志物的检测、影像学检查等;尤其是好发部位的脱落细胞形态学检查,在恶性肿瘤临床早期诊断中已有非常广泛的应用。很多研究数据显示,细胞形态学诊断因其准确性受限于诊断医师的经验,尤其是形态学改变不典型的病例,更是成为诊断的灰色地带。因此,寻找辅助细胞学诊断的方法越来越受到关注。近年来,DNA-ICM 技术开始在临床用于肿瘤早期检测。本实验拟采用细胞 DNA 图像分析技术对胸科医院各种脱落细胞进行检测,以活检结果或临床最终诊断为金标准,评估该技术在胸科医院常见肿瘤诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 病例收集 收集 2015 年 5 月~2017 年 5 月间安徽省胸科医院诊治的胸科疾病患者 4 402 例,其中绝大多数进行了 DNA 倍体分析。随后选取其中 701 例进行活组织检查明确病情。

1.2 制片染色 采用液基沉降制片,收集脱落细胞

或实体瘤穿刺物或切除物进行印片。并采用 Feulgen 染色(染色试剂,麦克奥迪医疗诊断系统有限公司,厦门)即 10% 福尔马林固定后经 5 mol/L HCl 在 27 ℃ 水解 1 h,再使用 Feulgen 染液染色 1 h,蒸馏水漂洗 15 min。干片后上机检测。

1.3 细胞 DNA 倍体分析 所有 DNA 染色片用全自动细胞 DNA 定量分析系统[麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司,厦门]进行扫描。每张玻片扫描 8 000 个以上细胞核,系统根据不同细胞核所具有的不同特征参数自动完成细胞分类和计数。其中,DNA 含量的大小描述为 DNA 指数(DNA index, DI)。根据出现异常细胞的 DI 值及其个数诊断结果分为:(1)阳性:DI $\geq$ 2.5 的异常细胞个数 $\geq$ 3 个,或增殖细胞比例大于细胞总数的 10%,或出现可疑细胞干系(DI 在 1.1~1.8 或 2.2~2.5 之间);(2)可疑:DI $\geq$ 2.5 的异常细胞个数 1~2 个,或增殖细胞比例在 5%~10% 之间;(3)阴性:未见 DI $\geq$ 2.5 的异常细胞。DNA 倍体分析过程与质量控制严格按照 ESACP(欧洲分析细胞病理学协会)制定的指南和要求进行^[1]。

1.4 统计学方法 所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,计数资料例数,采用百分比表示,所有数据采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA-ICM 检测结果 送检的 4 402 例标本,

接受日期:2018-01-09

基金项目:国家卫计委医药卫生科技发展研究项目(W2014GJ10)

作者单位:¹ 安徽省胸科医院病理科,合肥 230021

² 厦门麦克奥迪医学检验所,厦门 361006

作者简介:徐建平,女,副主任医师。E-mail: xjpxkbl@163.com

吕莉萍,女,主任医师,通讯作者。E-mail: xjpxkbl@163.com

com

除去因临床状况未进入后续检测的样本外,共 3 304 例进行了 DNA-ICM 检测。有 18 例有效诊断细胞数少于 200 个不进入后续分析,阳性 411 例,少量倍体异常 177 例,阴性 2 698 例(表 1)。

表 1 DNA 倍体分析结果及其分类

分类	DNA 倍体分析结果	合计
可见倍体异常或增生	可见 DNA 倍体异常细胞(≥3 个)	396
	可见细胞异常增生(≥10%)	2
	可见异倍体细胞峰	13
少量倍体异常或增生	可见少量 DNA 倍体异常细胞(1~2 个)	177
未见倍体异常或增生	未见 DNA 倍体异常细胞	2 698
标本不满意	未见 DNA 倍体异常细胞,上皮细胞数量不足,请医师结合临床考虑或做进一步检查	1
	未见 DNA 倍体异常细胞,细胞数目偏少,请医师结合临床考虑或做进一步检查	14
	细胞数不理想	2
	有效检测细胞不足	1
总计		3 304

活检或临床追访到 701 例,明确恶性肿瘤 223 例(31.8%)(以鳞癌、腺癌、小细胞癌为主),未明确恶性肿瘤 88 例(12.6%)(主要为轻度不典型、可疑或不明确恶性程度的病变),非恶性肿瘤 390 例(55.6%)(主要为慢性炎症或病理活检阴性的患者,另有少量结核患者)(表 2)。

按组织来源又可分为呼吸道与肺组织标本 369 例(气管、支气管、肺穿刺组织,咽喉部组织,手术肺组织,纤支镜或 EBUS 活检组织等)占总追访数的 52.6%,细胞学标本 253 例(胸腹腔积液、痰液细胞学标本),占 36.1%,其他组织来源标本 79 例,占

11.3%(表 2)。

2.2 DNA-ICM 诊断性能的综合评价 以活检结果作为金标准评价 DNA 图像分析结果的诊断性能(表 3),可见 DNA 倍体分析结果在不同标本来源的阳性率(41%、19%、38%)与活检发现的患病率(61%、19%、47%)存在一定一致性。进一步分析其敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值等,结果显示 DNA 图像分析显示出较高的特异性、阳性预测值(92%、87%),各项性能尤其在细胞学应用方面最为优良,敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 73%、93%、71%、94%,可能主要与细胞学标本对细胞形态的保存最为完整有关。

2.3 不同临床病理特征与 DNA 倍体检查结果的关系及风险评估 进一步对一些可能引起 DNA 倍体水平变化的控制因素,如年龄、性别、组织来源等,评估其引起倍体变化的 OR 值。单变量分析显示,其肿瘤病变引发倍体异常细胞的风险显著。而患者性别、年龄等混杂的多变量分析则显示患者年龄与性别对 DNA 倍体异常差异无显著性(表 4)。因此,肿瘤病变与 DNA 倍体异常呈显著相关性。

3 讨论

正常细胞及肿瘤细胞在生长增殖时,细胞核内 DNA 结构及含量会发生周期性变化,属生理状态。但恶变细胞的本质,决定了其内 DNA 含量的变化幅度与增殖速度均高于正常分裂周期的细胞。因此,若出现 DNA 含量异常增高或是处于增殖期的细胞数目异常增多,均可能是机体组织有恶性病变的重要生物学指征^[2]。细胞 DNA 图像分析技术通过测

表 2 不同临床病理特征与 DNA 倍体检查结果之间的关系[n(%)]

临床病理参数	DNA 倍体分析			χ ² 检验	线性相关
	大量倍体异常或增生(%)	少量倍体异常或增生(%)	未见倍体异常或增生(%)	P 值	检验 P 值
病例数	178(25)	54(8)	469(67)		
年龄(岁)					
均值(标准差)	63(12.9)	57.0(13.4)	56.0(16.8)	<0.001	
年龄范围(95% CI)	61~65	54~61	54~57		
性别					
男	123(26)	35(7)	310(66)	0.707	
女	54(23)	19(8)	157(68)		
主要组织来源					
呼吸道与肺组织	117(32)	36(10)	216(59)	0.002	
细胞学	39(15)	10(4)	204(81)		
其他组织来源	22(28)	8(10)	49(62)		
是否查见非典型或恶性病变					
明确诊断恶性肿瘤	119(53)	27(12)	77(35)	<0.001	<0.001
未明确恶性的不典型病变	35(40)	21(24)	32(36)		
非恶性肿瘤病变	24(6)	6(2)	360(92)		

表3 活检随访与 DNA-ICM 对应结果的综合评价

数据与统计描述	标本类型			
	n	呼吸道与肺组织 ^a	细胞学标本 ^b	其他组织 ^c
活检随访数据				
案例数	701	369	253	79
患病数 ^d	311	226	48	37
患病率	44%	61%	19%	47%
未患病数	390	143	205	42
DNA-ICM 检测				
DNA-ICM 阳性例数	178	117	39	22
DNA-ICM 可疑例数 ^e	54	36	10	8
DNA-ICM 阴性例数	469	216	204	49
DNA-ICM 可疑阳性率 ^f	33%	41%	19%	38%
综合评价				
真阳性例数 ^g	202	142	35	25
敏感性	65%	63%	73%	68%
真阴性例数	360	132	191	37
特异性	92%	92%	93%	88%
约登指数	57%	55%	66%	56%
阳性预测值 ^h	87%	93%	71%	83%
阳性预测值 ⁱ	50%	90%	22%	72%
阴性预测值	77%	61%	94%	76%

a. 含气管、支气管、肺穿刺组织, 咽喉部组织, 手术肺组织, 纤支镜或 EBUS 活检组织等; b. 主要为浆膜腔积液 (胸腔为主)、痰液细胞学标本; c. 含腹腔脏器, 胸腹腔、胸腹壁、脊椎肿物, 甲状腺, 乳腺, 食道与胃, 头颈部, 纵隔, 胸膜, 腋窝, 以及其他来源不明的组织; d. 含活检随访明确诊断为恶性肿瘤, 以及未明确诊断的可疑癌、原位癌以及其他非典型病变; e. DNA-ICM 发现 1 ~ 2 个个体异常细胞或仅 5% ~ 10% 增生的病例; f. DNA-ICM 阳性病例与可疑病例的总和占所有案例数的比例; g. 活检明确或未明确诊断“患病”案例 (参见 d) 中 ICM 诊断阳性或可疑的病例; h. DNA-ICM 判断恶性肿瘤 (含不明确性质的癌前病变病例) 阳性及可疑诊断的正确率; i. DNA-ICM 判断明确诊断恶性肿瘤 (不含不明确病例) 阳性诊断 (不含可疑) 的正确率

表4 风险因素评估

临床病理参数	参考值 ^a	风险因素 ^b	OR	OR(95% CI)	P 值
单变量分析					
年龄分布 (岁)	≤60	>60	0.616	0.447 ~ 0.848	0.003
性别	女	男	0.912	0.651 ~ 1.278	0.594
肿瘤病变	未见	发现	22.239	14.333 ~ 34.506	<0.001
多变量分析 (Logistic 回归)					
年龄分布 (岁)	≤60	>60	1.026	0.671 ~ 1.568	0.906
性别	女	男	1.126	0.721 ~ 1.758	0.603
肿瘤病变	未见	发现	23.236	14.757 ~ 36.588	<0.001

^a 参考值: 不暴露在危险因素下的样本; ^b 危险因素: 暴露在潜在危险因素下的样本

量细胞核染色的深浅, 评估细胞核内 DNA 或染色体倍数的相对含量, 来判断细胞是处于生理状态还是

病理状态, 使病理学由传统的形态学描述走向了定量分析时代。目前, 在中国子宫颈、浆膜腔积液等脱落细胞学检查中已应用于临床^[3-7]。

本实验采用细胞 DNA 图像分析技术对于不同器官来源的脱落细胞进行检测, 结果显示, 在恶性肿瘤病变中, 细胞倍体出现异常者为 65%, 在非恶性肿瘤病变患者中, 采用 DNA 图像分析技术, 阴性率为 92%。针对不同胸部恶性肿瘤诊断的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 65%、92%、50%、77%。而 DNA 图像分析技术用于不同来源脱落细胞诊断的约登指数为 87%, 显示该技术具有较高的诊断价值。其中, 用于呼吸道与肺组织检测的敏感性为 63%, 特异性为 92%, 阳性预测值为 93%, 阴性预测值为 61%。用于细胞学标本诊断的敏感性为 73%, 特异性为 93%, 阳性预测值为 71%, 阴性预测值为 94%, 相较于文献^[7]报道 LBC (液基细胞学) 诊断的敏感性 (63.4%)、特异性 (81.9%)、阳性预测值 (78.5%)、阴性预测值 (68.2%), DNA 图像分析技术用于肿瘤检测, 其性能要优于常规细胞形态学检测。且该技术采用了全自动检测方式, 可提高工作效率; 检测结果客观, 可重复性好, 便于质控。因此, 细胞 DNA 图像分析技术在肿瘤早期诊断中, 具有广泛的应用价值。

参考文献:

[1] Haroske G, Baak J P, Danielsen H, *et al.* Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry [J]. Anal Cell Pathol, 2001, 23(2): 89-95.

[2] Duesberg P. Chromosomal chaos and cancer [J]. Sci Am, 2007, 296(5): 52-59.

[3] 孟芝兰, 高亮, 顾建刚, 等. 全自动 DNA 定量分析系统在胸腔积液细胞病理诊断中的应用 [J]. 协和医学杂志, 2012, 3(1): 36-40.

[4] 张立冬, 张慧敏, 刘美玲, 等. 细胞 DNA 倍体分析结合高危型 HPV、支原体和衣原体检查与宫颈上皮内瘤变相关性研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(6): 464-466.

[5] 王应霞. 液基细胞学检测联合 DNA 倍体分析在良恶性胸腹水鉴别诊断中的应用 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(10): 1152-1155.

[6] 田智丹, 齐琼, 王劲松, 等. DNA 倍体分析在胃黏膜上皮反应性增生与异型增生鉴别中的价值 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(10): 1164-1166.

[7] 陶伟, 李俊. 细胞 DNA 定量分析在鉴别良恶性胸腹水中的应用价值 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 1016-1019.

Study of a novel diagnostic assay for thoracic malignant tumor based on DNA image cytometry

XU Jian-ping¹, YE Wei¹, ZHAO Jie-ting¹, SONG Rong-rong¹, NIE Kun¹, LÜ Li-ping¹

(¹Department of Pathology, Anhui Chest Hospital, Hefei 230021, China;

²Xiamen Mike Audi Medical Laboratory, Xiamen 361006, China)

ABSTRACT Purpose To explore the effects of ploidy analysis on thoracic neoplasms based on DNA image cytometry (DNA-ICM), and to look for a meaningful novel diagnostic assay for tumor patients. **Methods** 4 402 patients who were diagnosed with thoracic disease were recruited in 2 years. By the DNA-ICM analysis, all the specimens were diagnosed as three types——positive, equivocal and negative ones. The results of 701 specimens were compared with biopsy and clinical follow-up. **Results** DNA aneuploidy detected by DNA-ICM were 65% in confirmed malignant samples, 64% in equivocal malig-

nancy, and 8% in non-malignant diseases. The comprehensive performance of DNA-ICM in malignancy was 73%, 93%, 71%, 94% respectively for sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value. OR analysis found that the risk ratio of aneuploidy in malignancy was 23.236 compared to non-malignancy. **Conclusion** DNA-ICM can be applied in thoracic malignancy and have more potential values to be explored in oncology.

Key words: thoracic tumor; DNA-ICM; ploidy analysis

· 国外期刊文摘 ·

Cyclin D1 在 Langerhans 细胞组织细胞增生症和反应性 Langerhans 细胞增生中的表达

Shanmugam V, Craig J W, Hornick J L, *et al.* Cyclin D1 is expressed in neoplastic cells of langerhans cell histiocytosis but not reactive langerhans cell proliferations. Am J Surg Pathol, 2017, 41(10): 1390-1396.

Langerhans 细胞组织细胞增生症(LCH)常以有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路的激活突变为特征。因此, MAPK 通路激活的下游标志物,例如 Cyclin D1 可作为诊断 LCH 肿瘤新的标志物。该文旨通过免疫组化法探讨档案组织中 Cyclin D1 在 LCH 和 Langerhans 细胞聚集反应中的表达情况。所有检测的 LCH 病例(39/39)均显示 Cyclin D1 在 CD1a⁺ Langerhans 细胞中表达,多数病例(22/39, 56%)显示大多数(≥50%)病变细胞强表达 Cyclin D1,仅少数病例(6/

39, 15%)少部分表达 Cyclin D1(<20%)。免疫组化标记几乎所有的 LCH 病例(26/27, 96%)与 Cyclin D1 平行表达 p-ERK。用 CD1a/Cyclin D1 双染色显示,在所有旺组织性皮肤淋巴瘤病和正常皮肤的病例中,CD1a⁺ Langerhans 细胞 Cyclin D1 呈阴性。大多数皮炎相关的皮肤样本(14/18, 18%),表皮内 CD1a⁺ Langerhans 细胞聚集区均不表达 Cyclin D1,少数病例(4/18, 22%)CD1a⁺ Langerhans 细胞局灶区域(5%~10%)Cyclin D1 呈弱表达。结论:在 LCH 中 Cyclin D1 普遍表达,与已知几乎都存在的 MAPK 活化相一致,而且,在淋巴结或皮肤反应性 Langerhans 细胞增生中 Cyclin D1 表达并不显著。因此,在与 LCH 相似的非肿瘤性病变的鉴别诊断中, Cyclin D1 免疫组化标记可能有帮助。

(解建军¹摘译,张仁亚²审校/¹青岛城阳人民医院病理科,城阳 266109;²济宁医学院附属医院病理科,济宁 272029)



本刊网站投稿: <http://www.cjcep.com>
电子邮箱投稿: lcsybl@163.com

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.007.html>

益赛普介导 TNF- α 调控 UUO 小鼠肾组织 C3 在肾间质纤维化中的作用机制

董福兴

摘要:目的 探索 TNF- α 是否通过调控 UUO 小鼠肾小管上皮细胞补体 3 (complement 3, C3) 水平介导肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 及相关机制,而 TNF- α 受体拮抗剂益赛普 (etanercept) 能否拮抗 TNF- α 作用减轻 RIF。**方法** 将野生型 (wide type, WT) 与 C3 基因敲除 (C3 knock out, C3KO) 小鼠分别设置假手术 (Sham) 组、单侧输尿管结扎 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 组;另外,给 WT UUO 鼠腹腔注射不同浓度 etanercept。观察 WT UUO 鼠及 C3KO UUO 鼠肾组织中 TNF- α 、C3 的表达及 TNF- α 与表达 C3 肾小管的相关性及 RIF 程度;观察 etanercept 处理 WT UUO 鼠后各组肾小管上皮细胞表达 TNF- α 受体 (TNF- α receptor, TNFR)、NF- κ B p65、肾小管 C3 表达及 RIF 程度。**结果** UUO 鼠肾组织几乎所有肾小管上皮细胞均表达 TNF- α 受体 (TNF- α receptor, TNFR) 及 UUO 后肾组织高表达 TNF- α , 部分肾小管上皮细胞表达 C3, 表达 C3 肾小管周围有强阳性表达 TNF- α 细胞浸润;C3KO UUO 组 RIF 程度较 WT UUO 组减轻 ($P < 0.01$);经 etanercept 处理 WT UUO 鼠,肾小管 C3 和肾组织 NF- κ B p65 表达均明显下降 ($P < 0.01$), RIF 减轻 ($P < 0.01$)。**结论** UUO 术后 TNF- α 、C3 均参与 RIF, TNF- α 可能通过调控肾小管上皮细胞转录因子 NF- κ B p65 的表达介导肾小管上皮细胞 C3 产生参与 RIF, 而 etanercept 可能拮抗 TNF- α 减轻 RIF。

关键词: 肾间质纤维化; TNF- α ; 补体 3; NF- κ B p65

中图分类号: R 692 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7399(2018)03-0267-06

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.007

肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 是各种慢性肾脏病进展至终末期肾衰的最终结局^[1], 越来越多的动物实验研究证实, 肾间质炎症及补体活化与 RIF 有关^[2-4]。TNF- α 是重要致炎因子, 主要由单核巨噬细胞分泌, 而补体 3 (complement 3, C3) 是一种急性期反应蛋白, 其产生与炎症环境中 TNF- α 、IL-1 β 关系密切^[5-10], TNF- α ^[5,11-14] 及 C3^[15-18] 均可介导多种病理生理效应参与 RIF。有研究发现, UUO 后肾组织中检测出异常增高 C3、TNF- α ^[2-3], 且大量体内外研究证实, TNF- α 等炎症因子可能通过活化 C3 mRNA 启动子位点前与 PPRE^[19]、NF- κ B^[20] 等可与 PPAR α 、NF- κ B p50/65 多种核转录因子结合位点从而调控 C3 表达。以上研究结论为我们在 UUO 这一经典研究 RIF 动物模型中 TNF- α 是否通过调控肾组织 C3 参与 RIF 提供了可能。多种 TNF- α 融合蛋白如恩利、强克、益赛普因可拮抗 TNF- α 作用, 已在临床上广泛应用于类风湿性关节炎等风湿结缔组织疾病的治疗, 并已

取得明显疗效^[21]。然而 TNF- α 是否调控 UUO 后肾小管上皮细胞 C3 水平参与 RIF, etanercept 能否拮抗 TNF- α 减轻 RIF 需要进一步研究。因此, 本实验基于探索 TNF- α 是否调控 UUO 小鼠肾小管上皮细胞 C3 水平及相关机制, 及 TNF- α 受体拮抗剂 etanercept 能否拮抗 TNF- α 下调肾小管上皮细胞 C3 水平减轻 RIF, 为将来 etanercept 是否可用于 RIF 治疗临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物 清洁级雄性 C57BL/6 野生型 (wide type, WT) 小鼠、C3 基因敲除 C57BL/6 小鼠 (C3KO), 由第三军医大学神经病研究所实验室赠送, 体重 18~25 g。

1.2 UUO 小鼠模型建立及分组 按标准 UUO 动物造模方式, 并同时建立 Sham 组, 手术方式同 UUO 组 (仅分离一侧输尿管, 不结扎输尿管)。WT 及 C3KO 分 2 组: Sham 组 ($n=6$)、UUO 组 ($n=6$)。另外, WT 又分 3 组: UUO 组 ($n=6$)、UUO + L-etanercept 组 (每天 0.9 mg/kg) ($n=6$)、UUO + H-etanercept 组 (每天 1.8 mg/kg) ($n=6$), etanercept 用法参考文献^[22]进行腹腔注射。以上小鼠均在术后第 10 天处死并取术侧肾组织。

接受日期: 2017-12-05

作者单位: 福建医科大学省立临床学院/福建省立医院肾内科, 福州 350001

作者简介: 董福兴, 女, 硕士, 医师。E-mail: 1957038420@qq.com

1.3 肾组织免疫荧光及 Masson 染色 切取 2 mm 肾组织切片,采用柠檬酸钠微波炉修复 20 min; 0.5% 胃蛋白酶(调 pH 2.5), 37 ℃ 修复 20 min; 10% 驴血清封闭 60 min; 分别滴加 TNF- α (1 : 100)、C3(1 : 100)、anti-TNFR II (1 : 100), NF- κ B p65 (1 : 50), TNF- α (1 : 100) + C3(1 : 100), 4 ℃ 孵育过夜,再分别滴加驴来源对应荧光二抗(1 : 800), 避光孵育 30 min。采用常规 Masson 染色法处理组织切片。均用 Image Pro Plus 6.0 软件扫描,并取得 IOD 值及 area,根据 Aod(即 IOD/area)及 Masson 染色胶原面积百分比分别作各指标统计分析。

1.4 血清 C3 水平 Elisa 测定 WT UUO 组、WT UUO + L-etanercept、WT UUO + H-etanercept 组,应用断尾法,分别留取血样本,取得上清按 C3 试剂盒说明书使用方法,计算血 C3 浓度。

1.5 统计学处理 所有数据分析均采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 肾组织中 TNF- α 的表达 TNF- α 免疫荧光显示,WT 及 C3KO UUO 组肾组织均可见亮绿色荧光 TNF- α ,主要位于肾间质;WT 及 C3KO Sham 组均可见肾组织呈非特异性暗绿色荧光 TNF- α (图 1)。

2.2 肾组织中 C3 的表达 C3 免疫荧光显示,WT UUO 组肾组织可见部分肾小管上皮细胞表达亮红色荧光 C3;Sham 组可见肾组织呈非特异性暗红色荧光 C3;C3KO Sham 组与 UUO 组几乎未见红色荧光 C3 表达(图 1)。

2.3 肾组织中 TNF- α 与 C3 的关系 TNF- α 与 C3 荧光(图 1):WT UUO 组可见亮红色荧光的肾小管周边有亮绿色 TNF- α 表达;WT Sham 组可见肾组织普遍呈非特异性暗黄绿色荧光;C3KO Sham 组隐约可见肾组织非特异性橙黄色荧光;C3KO UUO 组可见肾间质有亮黄绿色荧光,而周围肾小管呈非特异性暗黄绿色荧光。用 Image pro plus6.0 软件对 TNF- α 、C3 荧光强度 AOD 值进行统计学分析,结果显示 UUO 组 TNF- α 表达明显强于 Sham 组,UUO 组 C3 表达明显强于 Sham 组($P < 0.01$)。

2.4 C3 在 RIF 中的作用 WT UUO 组肾间质中见大量蓝绿色胶原纤维沉积,C3KO UUO 组肾间质蓝绿色胶原纤维沉积面积明显少于 WT UUO 组,WT Sham 组及 C3KO Sham 组仅见肾间质血管附近有淡绿色胶原纤维(图 2)。用 Image pro plus 6.0 软件对各组蓝绿色胶原沉积面积百分比进行统计学分析:WT UUO 组、C3 KO UUO 组蓝绿色胶原沉积面积百分比比较 WT Sham 组、C3KO Sham 组明显($P < 0.01$);且 WT UUO 组蓝绿色胶原沉积面积百分比

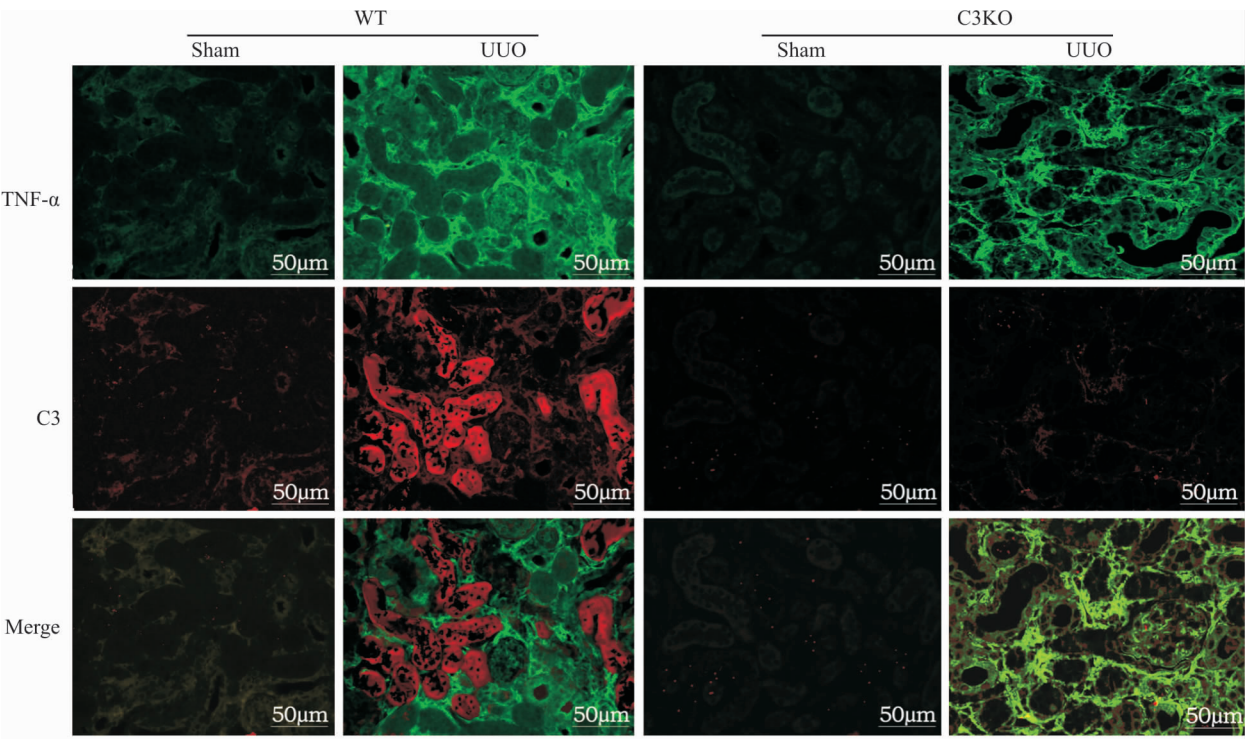


图 1 免疫荧光法检测各组 TNF- α 、C3 蛋白在肾组织中的表达:绿色荧光代表 TNF- α ,红色荧光代表 C3

较 C3 KO UUO 组明显 ($P < 0.01$); WT Sham 组与 C3KO Sham 组间蓝绿色胶原沉积面积百分比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 TNFR 在 UUO 鼠术侧肾组织中的表达 TNFR 免疫荧光及统计分析结果如下:在 WT UUO 组、WT UUO + L-etanercept、WT UUO + H-etanercept 组,几乎所有肾小管上皮细胞胞膜均表达绿色荧光 TNFR。用 Image pro plus 6.0 软件对 TNFR 荧光强度 AOD 值进行统计学分析:WT UUO 组、WT UUO + L-etanercept 组和 WT UUO + H-etanercept 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 3)。

2.6 TNF- α 与肾组织 C3 和 NF- κ B p65 表达的关系 免疫荧光结果显示 WT UUO 组、WT UUO + L-etanercept 组、WT UUO + H-etanercept 组 C3、NF- κ B p65 表达及统计结果如下:WT UUO 组可见部分肾小管上皮细胞胞质表达红色荧光 C3;WT UUO + L-etanercept 组仅有少数上皮细胞胞质表达红色荧光 C3 的肾小管;WT UUO + H-etanercept 组未见上皮细胞胞质表达红色荧光 C3 的肾小管;WT UUO 组见大部分肾小管上皮细胞、少数间质细胞表达绿色荧光;WT UUO + L-etanercept 组仅见部分肾小管上皮细胞

表达弱绿色荧光 NF- κ B p65;WT UUO + H-etanercept 组隐约可见肾小管上皮细胞表达绿色荧光 NF- κ B p65。用 Image pro plus 6.0 软件对 NF- κ B p65、C3 荧光强度 AOD 值进行统计学分析:NF- κ B p65、C3 在三组间表达差异有显著性 ($P < 0.01$),其中 WT UUO 组 TNF- α 及 C3 表达明显强于 WT UUO + L-etanercept 组 ($P < 0.01$),WT UUO + L-etanercept 组 TNF- α 及 C3 表达明显强于 WT UUO + H-etanercept 组 ($P < 0.01$,图 4)。

2.7 TNF- α 在 RIF 中的作用 Masson 及统计分析结果如下:WT UUO 组肾间质中大量蓝绿色胶原纤维沉积,WT UUO + L-etanercept 组,肾间质中蓝绿色胶原纤维含量较 UUO 组低,WT UUO + H-etanercept 组几乎未见蓝绿色胶原纤维成分。用 Image pro plus 6.0 软件对各组蓝绿色胶原沉积面积百分比进行统计学分析:三组间表达差异有显著性 ($P < 0.01$),其中 WT UUO 组蓝绿色胶原沉积面积百分比比较 WT UUO + L-etanercept 明显 ($P < 0.01$);WT UUO + L-etanercept 组蓝绿色胶原沉积面积百分比比较 WT UUO + H-etanercept 组明显 ($P < 0.01$,图 5)。

2.8 TNF- α 对血清 C3 水平的影响 经断尾法,取

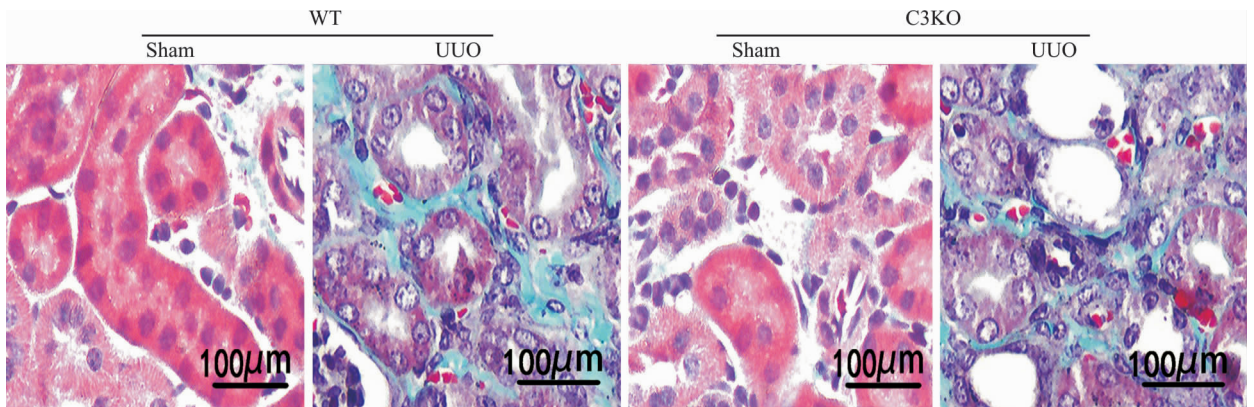


图2 Masson 染色法检测各组肾间质纤维化程度,蓝绿色代表间质中胶原纤维沉积

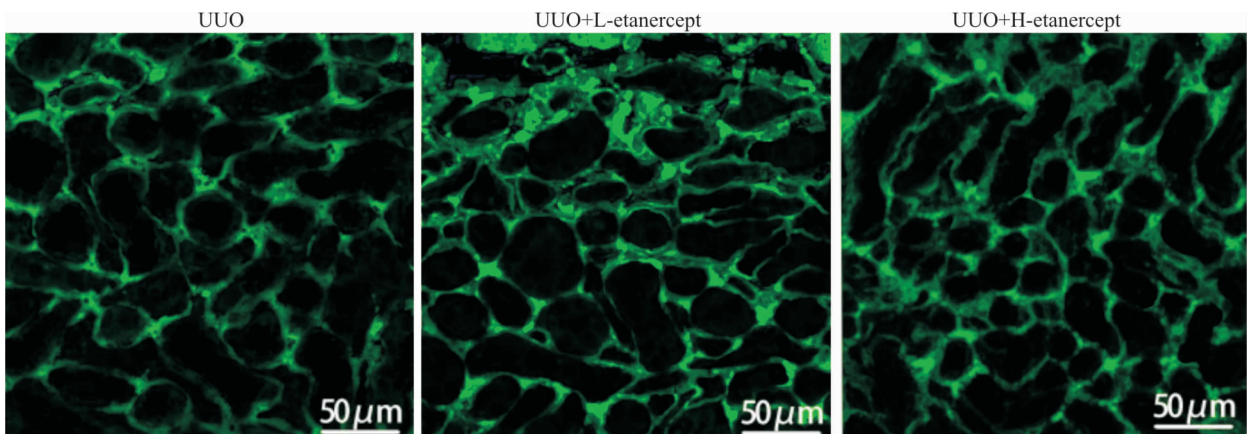


图3 免疫荧光法检测各组 TNFR 在肾组织中的表达,绿色荧光代表 TNFR

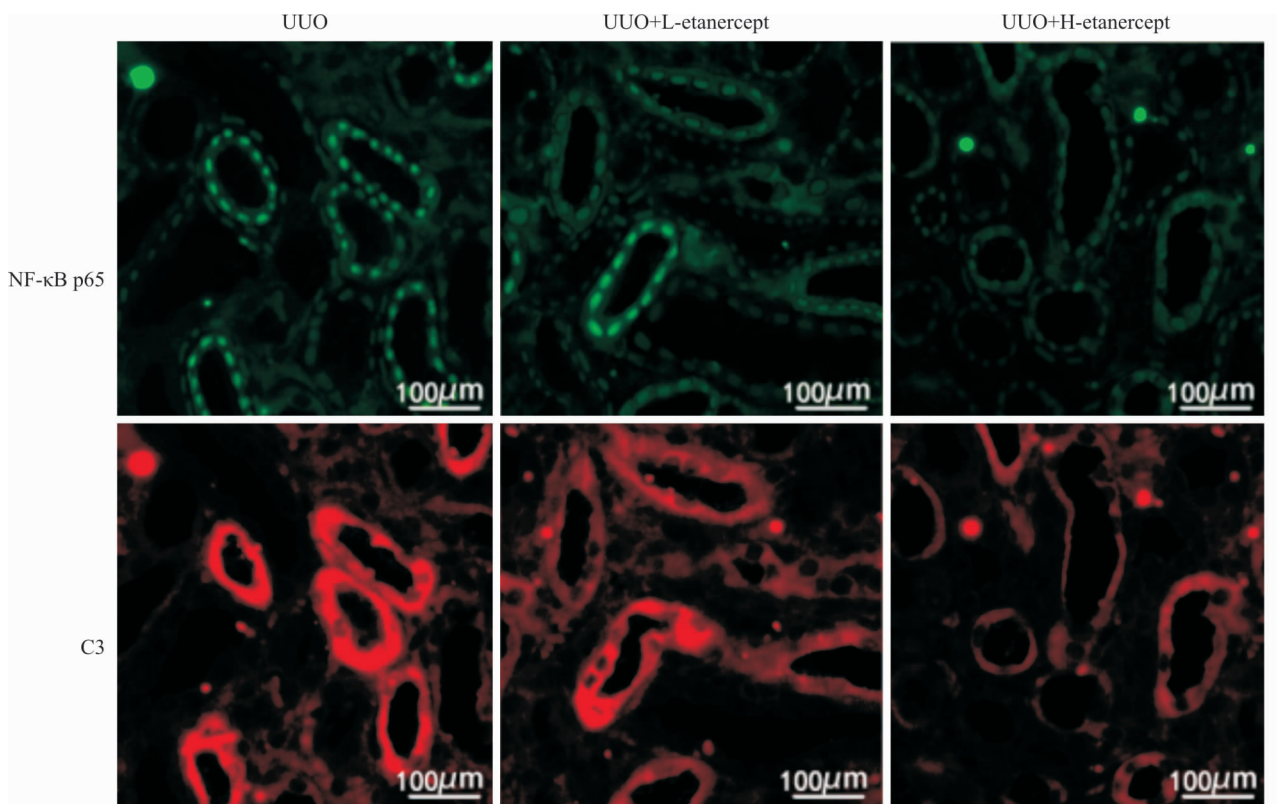


图4 免疫荧光法检测各组 NF-κB p65、C3 蛋白在肾组织中的表达,绿色荧光代表 NF-κB p65,红色荧光代表 C3

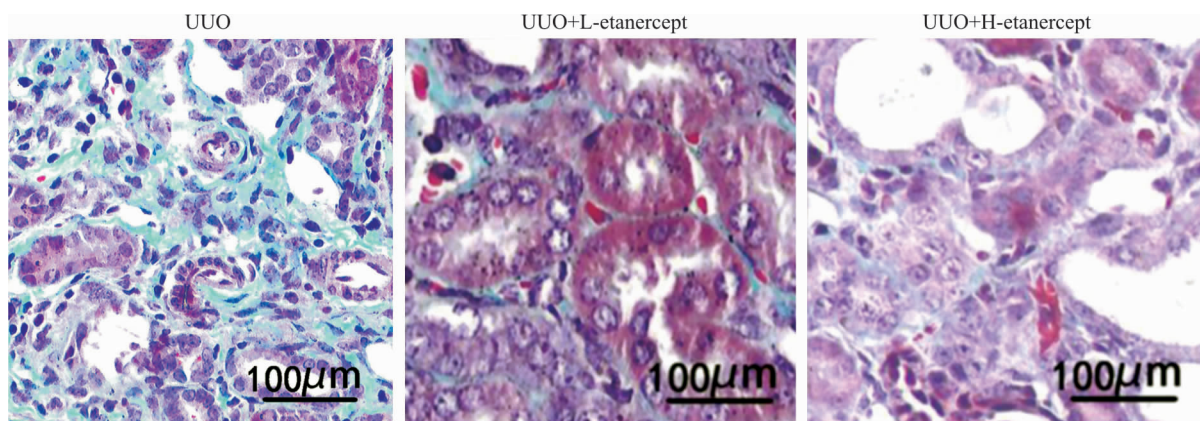


图5 Masson 染色法检测各组肾纤维化程度,蓝绿色代表间质中胶原纤维沉积

经不同浓度 etanercept 处理的 WT UUO 鼠,用 ELISA 法检测血清水平 C3 浓度,单因素方差分析结果显示:UUO 组 $1.40 \pm 0.13 (\times 10^6 \text{ ng/mL})$, UUO + L-etanercept (每天 0.9 mg/kg) $1.33 \pm 0.01 (\times 10^6 \text{ ng/mL})$, UUO + H-etanercept (每天 1.8 mg/kg) $1.29 \pm 0.11 (\times 10^6 \text{ ng/mL})$,提示随着 etanercept 浓度上升,三组间血清 C3 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

越来越多的研究认为肾内炎症微环境与 RIF 有关^[23],且已有研究发现炎症因子通过补体活化介导

RIF^[24],但 TNF-α 能否通过调控肾组织局部补体水平参与 RIF 及相关机制的研究甚少。

本实验发现几乎所有小鼠行 UUO 后肾小管上皮细胞表达 TNF-α 受体,这为研究 TNF-α 是否介导 RIF 提供可能,且发现 TNF-α、C3 均参与 RIF,这与前人研究结果一致,更为重要的是发现 C3 阳性肾小管周边有大量 TNF-α 阳性细胞浸润,这为进一步研究 TNF-α 与 C3 的相关性提供可能。基于目前细胞水平研究发现,C3 产生与炎症环境中 TNF-α、IL-1β 关系密切^[5-10],提示是否由于 UUO 术后主要浸润于肾间质中 TNF-α 阳性细胞通过分泌 TNF-α 介

导其周边肾小管上皮细胞 C3 的表达。为进一步证实这一结论,实验引入不同浓度的特异性 TNF- α 受体阻滞剂 etanercept,通过阻断 TNF- α 作用观察 UUO 术后 C3 的表达,结果发现随着 etanercept 升高,C3 表达下降,本实验通过体内实验证实 TNF- α 可能介导肾小管上皮细胞 C3 的表达。近年来,有实验发现 etanercept 对血清 C3 几乎无影响^[25],本实验通过设置 3 个不同浓度 etanercept 干预 UUO 术后小鼠,通过 Elisa 检测即将处死术后第 10 天小鼠血清 C3 浓度,同样证实使用不同浓度 etanercept 不影响血清 C3,从而排除可能由于 etanercept 影响肾组织 C3 水平的假阳性结果。因时间关系,本实验未进一步展开探索求证这些高表达 TNF- α 细胞的来源,但既往体外研究提示在炎性刺激下,M ϕ 表达 TNF- α mRNA 水平明显高于肾小管上皮细胞,且呈持续高表达^[26],而 UUO 术后随着梗阻积水时间的延长,肾间质中大量 M ϕ 浸润并参与 RIF^[27-28],因此作者推测,这些细胞很可能为 M ϕ 。

基于前人的研究,C3 的产生可能与炎性因子活化 C3 mRNA 启动子位点前 PPRE^[19]、NF- κ B p65^[20] 调控 C3 的表达。为进一步证实 TNF- α 如何介导肾小管上皮细胞 C3 的表达,本实验通过设置 3 个不同浓度 etanercept 干预 UUO 术后小鼠,发现术后第 10 天较多肾小管上皮细胞及部分间质炎症细胞均有 NF- κ B p65 表达,肾小管上皮细胞表达 C3 随着 etanercept 浓度上升而下降,在这一过程中还发现由肾小管上皮细胞核表达 NF- κ B p65 水平也随之下降低,这提示 TNF- α 可能通过肾小管上皮细胞核 NF- κ B p65 调控肾小管上皮细胞 C3 表达。因条件有限,未能采用 NF- κ B p65 基因敲除动物来直接验证肾组织原位 C3 表达与 NF- κ B p65 的相关性,待将来进一步完善。因此,结合前人研究及本实验结果,作者推测 TNF- α 调控肾组织 C3 表达可能通过肾小管上皮细胞转录因子 NF- κ B p65 水平实现。

综上所述,本实验揭示 TNF- α 通过调控肾小管上皮细胞内转录因子 NF- κ B p65 水平介导 C3 表达参与 RIF,而益赛普可阻断 TNF- α 作用减轻 RIF 程度。本实验为寻求 RIF 治疗药物提供实验依据。

参考文献:

- [1] Eddy A A. Molecular basis of renal fibrosis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000,15(3-4):290-301.
- [2] Kaneto H, Morrissey J J, McCracken R, *et al*. The expression of mRNA for tumor necrosis factor increases in the obstructed kidney of rats soon after unilateral ureteral ligation[J]. *Nephrologie*, 1996,2(3):161-166.
- [3] Zhou X, Fukuda N, Matsuda H, *et al*. Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013,305(7):F957-F967.
- [4] Li L, Chen L, Zang J, *et al*. C3a and C5a receptor antagonists ameliorate endothelial-myofibroblast transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic kidney disease[J]. *Metabolism*, 2015,64(5):597-610.
- [5] Wan J, Zhou X, Cui J, *et al*. Role of complement 3 in TNF- α -induced mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells in vitro[J]. *Mol Biotechnol*, 2013,54(1):92-100.
- [6] Pratt J R, Abe K, Miyazaki M, *et al*. In situ localization of C3 synthesis in experimental acute renal allograft rejection[J]. *Am J Pathol*, 2000,157(3):825-831.
- [7] Serinsöz E, Bock O, Gwinner W, *et al*. Local complement C3 expression is upregulated in humoral and cellular rejection of renal allografts[J]. *Am J Transplant*, 2005,5(6):1490-1494.
- [8] Andoh A, Fujiyama Y, Hata K, *et al*. Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumour necrosis factor- α (TNF- α)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 1999,118(1):23-29.
- [9] Cardinaux J R, Allaman I, Magistretti P J. Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes[J]. *Glia*, 2000,29(1):91-97.
- [10] Puri T S, Quigg R J. The many effects of complement C3- and C5-binding proteins in renal injury[J]. *Semin Nephrol*, 2007,27(3):321-337.
- [11] Khan S B, Cook H T, Bhargal G, *et al*. Antibody blockade of TNF- α reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2005,67(5):1812-1820.
- [12] Guo G, Morrissey J, McCracken R, *et al*. Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy[J]. *Am J Physiol*, 1999,277(5Pt 2):F766-F772.
- [13] Xu C, Chang A, Hack B K, *et al*. TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis[J]. *Kidney Int*, 2014,85(1):72-81.
- [14] Lenda D M, Kikawada E, Stanley E R, *et al*. Reduced macrophage recruitment, proliferation, and activation in colony-stimulating factor-1-deficient mice results in decreased tubular apoptosis during renal inflammation[J]. *J Immunol*, 2003,170(6):3254-3262.
- [15] Lin Z H, Fukuda N, Jin X Q, *et al*. Complement 3 is involved in the synthetic phenotype and exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2004,44(1):42-47.
- [16] Locatelli M, Buelli S, Pezzotta A, *et al*. Shiga toxin promotes podocyte injury in experimental hemolytic uremic syndrome via activation of the alternative pathway of complement[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014,25(8):1786-1798.

- [17] Li L, Chen L, Zang J, *et al.* C3a and C5a receptor antagonists ameliorate endothelial-myofibroblast transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic kidney disease[J]. *Metabolism*, 2015,64(5):597–610.
- [18] Simone S, Rascio F, Castellano G, *et al.* Complement-dependent NADPH oxidase enzyme activation in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014,74:263–273.
- [19] Mogilenko D A, Kudriavtsev I V, Shavva V S, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor α -mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic-derived cells[J]. *J Biol Chem*, 2013,288(3):1726–1738.
- [20] Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling[J]. *Cell Death Differ*, 2003,10(1):45–65.
- [21] Murdaca G, Colombo B M, Puppo F. Anti-TNF- α inhibitors: a new therapeutic approach for inflammatory immune-mediated diseases: an update upon efficacy and adverse events[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009,22(3):557–565.
- [22] Shagdarsuren E, Wellner M, Braesen J H, *et al.* Complement activation in angiotensin II-induced organ damage[J]. *Circ Res*, 2005,97(7):716–724.
- [23] Grande M T, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa J M. Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2010,7:19.
- [24] Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006,17(11):2974–2984.
- [25] Cantaert T, De Rycke L, Mavragani C P, *et al.* Exposure to nuclear antigens contributes to the induction of humoral autoimmunity during tumour necrosis factor alpha blockade[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009,68(6):1022–1029.
- [26] Jevnikar A M, Brennan D C, Singer G G, *et al.* Stimulated kidney tubular epithelial cells express membrane associated and secreted TNF α [J]. *Kidney Int*, 1991,40(2):203–211.
- [27] Fujii K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011,121(9):3425–3441.
- [28] Elkington P T, Green J A, Friedland J S. Analysis of matrix metalloproteinase secretion by macrophages[J]. *Methods Mol Biol*, 2009,531:253–265.

Mechanisms of complement 3 expression via etanercept-mediated TNF- α in UUO mice renal tubular fibrosis

DONG Fu-xing

(Provincial Institute of Clinical Medicine, Fujian Medical University/Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT Purpose In order to explore whether TNF- α could regulate C3 expression in tubular epithelial cell which induced renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction, while whether TNF- α receptor antagonist etanercept could reduce C3 expression in renal tubular epithelial cell which could alleviate renal interstitial fibrosis. **Methods** Wide type (WT) and C3 knock out (C3KO) mice were separately established to set up sham group and UUO group. Moreover, WT UUO mice were intraperitoneal injected with different concentrations of etanercept. Observed TNF- α and C3 expression in operated kidney after UUO in WT mice and C3KO mice, the correlation between TNF- α expression in operated kidney and C3 positive renal tubules, degree of operated kidney renal interstitial fibrosis. Observed TNFR, NF- κ B p65, C3 expression in kidney tubular epithelial cell cytomembrane and degree of renal interstitial fibrosis after intraperitoneal injected with different concentrations of etanercept. **Results** Nearly all of kidney tubular epithelial cells cytomembrane were TNFR positive, some of kidney tubular

epithelial cells cytomembrane were C3 positive, operated kidney was TNF- α strongly positive in WT and C3KO mice after UUO, and C3 positive renal tubules were strongly correlated with TNF- α positive cells which were infiltrated in renal interstium. Degree of renal interstitial fibrosis in C3KO UUO mice were alleviated when compared to WT UUO mice ($P < 0.01$). Expression of C3, NF- κ B p65 in kidney tubular epithelial cells were reduced ($P < 0.01$) and degree of renal interstitial fibrosis were alleviated ($P < 0.01$) after etanercept treated in WT UUO mice. **Conclusion** After UUO, TNF- α and C3 were both participated in renal interstitial fibrosis. TNF- α regulated renal tubular epithelial cell C3 expression via renal tubule epithelial cell transcription factor NF- κ B p65 which was involved in renal interstitial fibrosis, while the TNF- α receptor antagonism etanercept may block the pathway, and degree of renal interstitial fibrosis pathological changes were alleviated at last.

Key words: renal interstitial fibrosis; renal interstitial fibrosis tumor necrosis factor alpha; complement 3; NF- κ B p65

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.008.html>

神经节细胞胶质瘤 19 例临床病理分析

梁 乐¹, 付 静¹, 李大胜², 冷 慧¹, 刘永玲¹, 姚晓香¹, 歌日乐¹, 李云林³, 马康平³

摘要:目的 探讨神经节细胞胶质瘤(ganglioglioma, GG)的临床病理特征。方法 收集因难治性癫痫接受致病病灶切除术并经病理诊断的 GG 19 例,回顾性分析其临床病理特征。结果 患者平均发病年龄 9.1 岁,平均病程 9.3 年,头颅核磁共振检查可见异常信号表现,多位于颞叶(14/19, 73.7%)。肿瘤表现出异质性,常伴有局灶性皮质发育不良(13/19, 68.4%)。免疫组化标记 18 例 CD34 阳性、16 例 Nestin 阳性,二者阳性表达率差异无显著性($P > 0.05$);6 例 BRAF-V600E 阳性。结论 GG 诊断应强调临床、影像和病理学特点的综合判断,需与其他肿瘤及皮质发育异常病变鉴别,CD34、Nestin 免疫组化标记对诊断有重要帮助。

关键词:脑肿瘤;神经节细胞胶质瘤;局灶性皮质发育不良

中图分类号:R 739.41 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0273-06

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.008

神经节细胞胶质瘤(ganglioglioma, GG)是少见的中枢神经系统肿瘤,占中枢神经系统肿瘤的 0.3%~3.8%^[1],在癫痫相关脑肿瘤中占 40%。GG 最早由 Ewing 于 1926 年提出,最常见的临床症状是癫痫且多为难治性癫痫。随着癫痫外科手术的开展,GG 逐渐被深入认识。新近研究认为 GG 有哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3k-AKT-mTOR)信号转导通路的异常激活^[2]。“雷帕霉素靶蛋白病(toropathies)”一词已被采用于 mTOR 信号转导通路异常相关的具有相似临床和病理学表现的疾病谱系,包括局灶性皮质发育不良(focal cortical dysplasias, FCD)Ⅱ型、结节性硬化复合症(tuberous sclerosis complex, TSC)、GG 和半侧巨脑症^[3-4]。本文收集 19 例 GG,回顾性分析其临床病理学特征,以加强对 GG 的病理特点尤其是鉴别诊断的认识。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2008 年 1 月~2016 年 6 月北

接受日期:2018-01-12

基金项目:北京市海淀区/北京大学第三医院海淀区青年科研项目(KYQ2017004)、首都儿科研究所科研基金(FX-2017-04)

作者单位:¹北京市海淀区医院/北京大学第三医院海淀区病理科、

²影像科,北京 100080

³首都儿科研究所附属儿童医院功能神经科 100020

作者简介:梁 乐,女,硕士,副主任医师。E-mail: lianglelele@163.com

付 静,女,主任医师,通讯作者。E-mail: yxlxfw@126.com

com

京市海淀医院功能神经科因难治性癫痫接受手术治疗,经病理确诊为 GG 的病例 19 例,回顾性分析其临床病理资料。所有病理切片由 3 名主治及主治以上资质医师共同阅片。肿瘤诊断标准依据 WHO (2016)中枢神经系统肿瘤分类^[5],肿瘤旁 FCD 诊断分类依据 2011 年国际抗癫痫联盟(ILAE)专家共识^[6]。

1.2 方法 所有标本经 10% 中性缓冲福尔马林固定,垂直皮层 5 mm 切开,大体异常改变者全部取材,病灶周围广泛取材,石蜡包埋,4 μm 厚切片,HE 染色。每例选取肿瘤和肿瘤旁切片各一块,免疫组化采用 MaxVision 两步法。标记一抗:神经元核抗原(NeuN, 1:75)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP, 1:120)、人微管相关蛋白 2(Map-2, 1:100)、少突胶质细胞转录因子-2(Olig-2, 1:150)、巢蛋白(Nestin, 1:100)、CD34(1:50)、BRAF-V600E(RMD15, 1:100)、Ki-67(1:200)均购自北京中杉金桥公司。

1.3 结果判定 NeuN、Olig-2、Ki-67 表达于胞核,CD34 表达于胞质、胞膜和细胞突起,GFAP、Map-2、Nestin、BRAF-V600E 表达于胞质。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。使用配对 χ^2 检验(Mc Nemar Test)比较 Nestin 和 CD34 阳性表达差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征 19 例中男性 10 例,女性 9 例,平均年龄 18.4 岁(2~29 岁),平均发病年龄 9.1 岁

(0.5 ~ 24.5 岁),平均病程 9.3 年(0.5 ~ 27 年)。均表现为复杂部分性发作,大多数继发全面性发作。术前所有患者经电生理检查,术中在电生理检测引导下对患者行病灶及致痫灶切除术,术后辅助抗癫痫药物治疗。16 例患者术后随访 3 ~ 60 个月,均存活,癫痫发作均得到有效控制;按照 Engel 疗效分级标准,Ⅰ级 13 例,Ⅱ级 3 例(表 1)。

2.2 神经影像学特征 全部患者术前进行头颅 MRI 检查均发现异常信号:占位性病变 9 例,表现为囊性伴有附壁结节或囊实性,瘤周无或仅有轻度水肿;片状或斑片状异常信号表现 7 例;脑软化 1 例;皮质发育不良 2 例。均为单发,14 例位于颞叶,3 例位于枕叶,1 例位于颞枕叶,1 例位于额叶。11 例位于左侧,8 例位于右侧(图 1)。

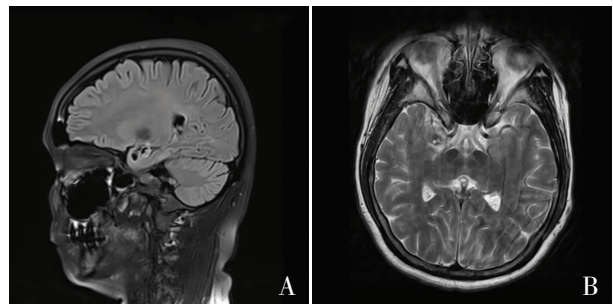


图 1 MRI 示右颞叶内侧异常混杂信号影:A. T1WI 矢状位显示长 T1 信号混杂小片状短 T1 信号;B. T2WI 横轴位显示长 T2 信号混杂小片状短 T2 信号

2.3 病理检查 眼观:切面灰白、实性或囊实性、质

地韧或略硬,未见出血和坏死。镜检:19 例均为 WHO Ⅰ级;由肿瘤性的神经节细胞和胶质细胞成分混合构成,肿瘤表现出异质性,表现在:肿瘤性神经节细胞大小不一致,胞质多少不一,极性紊乱,疏密不匀(稀少、簇状聚集或密集聚集),可见双核或巨核等不典型形态,核仁清楚。胶质成分背景 12 例类似低级别纤维型星形细胞瘤;5 例类似少突星形细胞瘤;2 例类似少突胶质细胞瘤。肿瘤可以以神经元形态细胞为主,也可以以胶质成分为主。1 例表现为弥漫性 GG,即肿瘤沿脑表累及多个脑回呈带状分布。1 例肿瘤呈浸润性生长至蛛网膜下腔(图 2)。1 例有纯粹少突胶质细胞瘤区域,局部密集增生的少突胶质细胞排列呈流水样及花环状(图 3)。1 例肿瘤中央为纯粹星形细胞瘤区域,边缘为两种细胞成分混合存在。2 例肿瘤累及海马(图 4)。13 例肿瘤周围伴发 FCD(占 68%;Ⅲb 型 12 例,Ⅱa 型 1 例),FCD 与肿瘤间有移行区域。6 例伴海马硬化(占 32%),8 例伴胶质神经元错构结节(占 47%),5 例伴钙化,4 例伴囊性变,6 例脑表或血管周可见淀粉样小体,6 例可见血管周围淋巴袖套。未见坏死、核分裂和血管增生。免疫表型:NeuN、Map-2 显示肿瘤性神经元呈阳性,GFAP 显示星形细胞成分阳性,Olig-2 显示少突胶质细胞和星形细胞阳性。Nestin 和 CD34 表达模式相似,有三种:弥漫表达、簇状/丛状表达和单个细胞表达,在肿瘤组织中主要为弥漫表达,周边小卫星灶多呈簇状或单个细胞阳性

表 1 19 例 GG 临床病理资料

病例	性别	年龄 (岁)	发病年龄 (岁)	病程 (年)	部位	方向	伴随病变				免疫表型				MRI	随访时间 (月)	Engel 分级
							海马硬化	钙化	错构结节	FCD	CD34	Nestin	BRAF-V600E	Ki-67			
1	男	23	3	20	枕叶	左					+	+	+	-	斑片状	失访	无
2	男	24	8	16	枕叶	左				+	+		-	2% +	斑片状	3	Ⅰ
3	女	13	1	12	颞叶	右	+		+		+	+	+	-	占位	18	Ⅰ
4	男	7	2	5	颞叶	左		+	+	+	+		-	1% +	占位	9	Ⅰ
5	女	25	20	5	颞叶	左		+		+		+	-	1% +	斑片状	12	Ⅰ
6	女	26	14	12	枕叶	左				+	+	+	-	1% +	占位	失访	无
7	男	27	16	11	颞枕叶	右				+	+		-	-	FCD	4	Ⅰ
8	女	26	24.5	1.5	颞叶	左				+	+	+	-	1% +	占位	12	Ⅰ
9	女	27	21	6	颞叶	左	+		+	+	+	+	+	-	软化灶	4	Ⅰ
10	男	13	6	7	颞叶	右	+	+			+	+	-	-	占位	24	Ⅰ
11	女	12	6	6	额叶	右			+		+	+	-	-	FCD	36	Ⅱ
12	男	21	1	20	颞叶	右			+	+	+	+	+	-	斑片状	60	Ⅰ
13	女	6	1	5	颞叶	左	+		+	+	+	+	-	-	斑片状	60	Ⅰ
14	男	4	1	3	颞叶	右	+	+	+		+	+	-	-	占位	36	Ⅱ
15	男	17	13	4	颞叶	左			+	+	+	+	-	-	占位	42	Ⅰ
16	女	29	2	27	颞叶	右				+	+	+	+	-	占位	6	Ⅰ
17	男	26	11	15	颞叶	左				+	+	+	+	-	斑片状	42	Ⅱ
18	男	2	0.5	1.5	颞叶	右	+	+		+	+	+	-	2% +	斑片状	4	Ⅰ
19	女	22	21.5	0.5	颞叶	左					+	+	-	1%	占位	失访	无

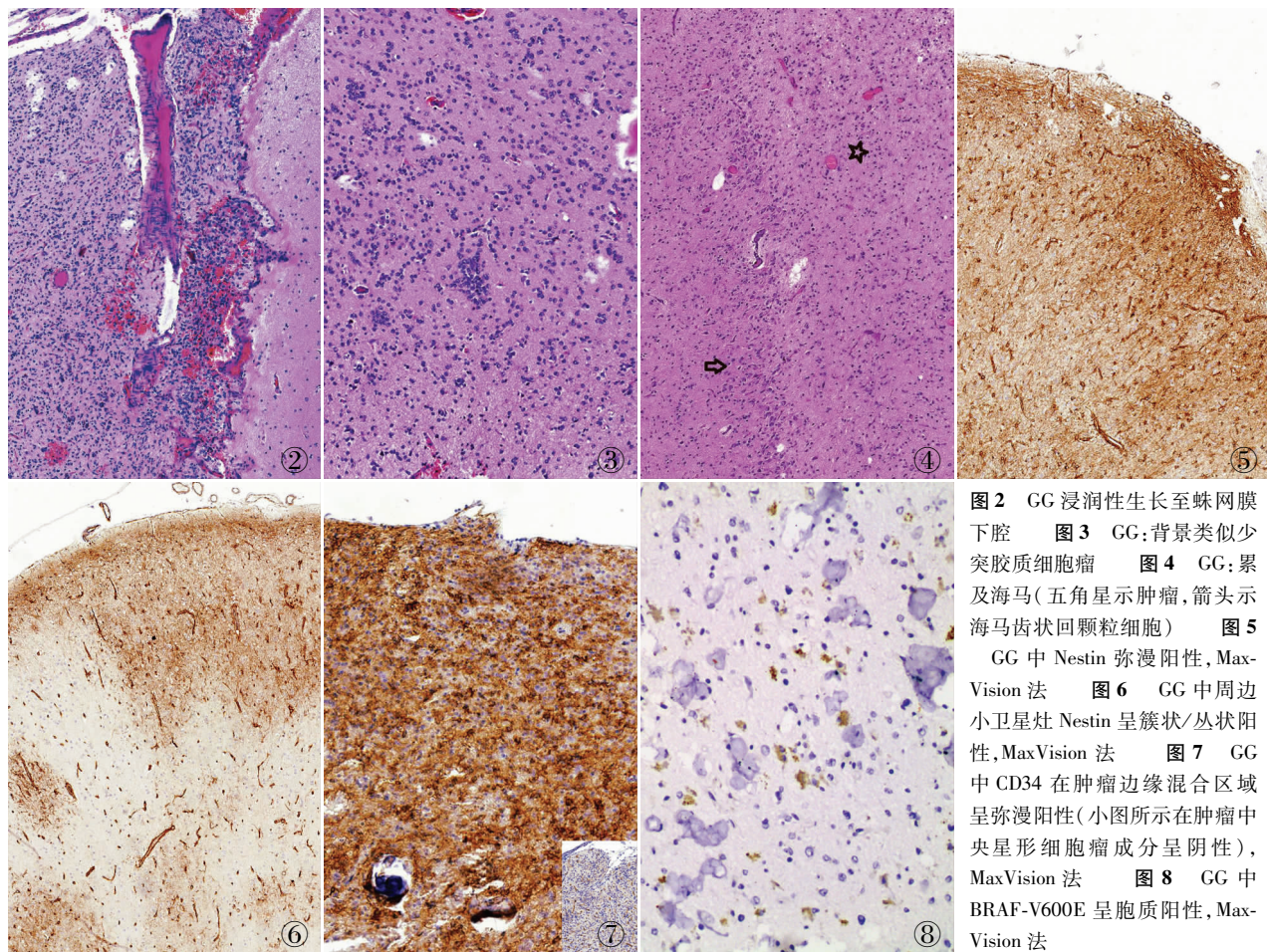


图2 GG 浸润性生长至蛛网膜下腔 图3 GG:背景类似少突胶质细胞瘤 图4 GG:累及海马(五角星示肿瘤,箭头示海马齿状回颗粒细胞) 图5 GG 中 Nestin 弥漫阳性,Max-Vision 法 图6 GG 中周边小卫星灶 Nestin 呈簇状/丛状阳性,MaxVision 法 图7 GG 中 CD34 在肿瘤边缘混合区域呈弥漫阳性(小图所示在肿瘤中央星形细胞瘤成分呈阴性),MaxVision 法 图8 GG 中 BRAF-V600E 呈胞质阳性,Max-Vision 法

(图5,6)。18例表达CD34(阳性率95%),16例表达Nestin(阳性率84%)。观察到1例CD34在肿瘤中央星形细胞瘤成分呈阴性,在肿瘤边缘混合区域呈弥漫阳性(图7)。6例神经元及胶质成分BRAF-V600E呈阳性(图8)。13例Ki-67为阴性,6例仅胶质瘤成分1%~2%表达。

2.4 Nestin 和 CD34 表达的关系 Nestin 和 CD34 阳性表达率差异无统计学意义($P=0.625$)。

3 讨论

WHO(2016)中枢神经系统肿瘤分类将GG归类为神经元和混合性神经元-胶质肿瘤^[5],是最常见的难治性癫痫相关脑肿瘤。本组病例具备GG典型的临床特点,即起病早,以儿童和年轻人为主(平均发病年龄9.1岁),临床主要表现为难治性癫痫,肿瘤生长缓慢,病史较长(平均病程9.3年);神经影像学显示均位于幕上脑表浅层,均为单发且以颞叶多见(14例),与文献^[1]报道可发生于任何部位且以颞叶多见(76%)基本一致。

绝大多数GG为WHO I级,GG胶质成分有间

变特征为WHO III级(间变型GG),GG的WHO II级标准仍未建立^[5,7]。本组GG具有经典的组织形态学特征,均为WHO I级。尽管个别病例肿瘤细胞密度增高,但其Ki-67增殖指数为阴性或很低(热区仅1%~2%),结合肿瘤生长缓慢、影像学显示肿瘤位于脑表浅层且无明显占位效应、单纯手术完整切除效果良好、术后无复发且无升级倾向的特点,认为不应将其归入WHO II级,以避免术后过度放、化疗。此外本实验还观察到GG具有异质性,表现在:不同病例肿瘤性神经节细胞大小不一致,分布疏密不匀,异型性大小有差别;胶质瘤背景可以是低级别纤维型星形细胞瘤、少突-星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤;肿瘤成分在某些病例不是均匀混合分布。Wolf等^[8]报道近15%的GG有纯粹的星形细胞瘤分化区域。本组1例可见纯粹星形细胞瘤区域,1例可见纯粹少突胶质细胞瘤区域。

BRAF-V600E是致癌基因,其突变可见于多种肿瘤。Blümcke等^[9-10]的研究显示BRAF-V600E突变可见于长期癫痫相关脑肿瘤,如GG、胚胎发育不良性神经上皮瘤,多形性黄色星形细胞瘤。WHO

(2016)中枢神经系统肿瘤分类^[5]指出GG中存在不同比例的BRAF-V600E突变(20%~60%)。Breton等^[10]研究中,GG/节细胞瘤/间变型GG中61.5%的胶质及神经节细胞成分BRAF-V600E(VE1)呈弥漫阳性,38.5%仅见神经节细胞成分阳性,无病例仅见胶质成分阳性。本组采用克隆号RMD15,该克隆号利用独特技术,封闭可能具有交叉的非特异性位点,发现6例GG的神经元及胶质成分均呈阳性。

CD34是糖磷酸化蛋白的干细胞标志物,Blümcke等^[9,11]强烈建议在癫痫相关脑肿瘤诊断及鉴别诊断中将CD34作为重要的指标,有诸多文献报道约75%的GG中CD34阳性表达^[12]。本组GG(18/19)中CD34阳性表达高于上述报道。Nestin是一种中间丝蛋白,表达在多潜能神经干细胞,在分化成星形胶质细胞和神经元细胞时会伴随着Nestin的下调。Nestin在GG的相关研究鲜有报道。有一项研究^[13]观察到在GG的两种细胞成分中均有Nestin强弱不等的表达,认为在慢性癫痫或肿瘤发生过程中因神经元树突重构而发生了重表达。本实验中Nestin表达模式类似于CD34,在肿瘤性神经元和胶质细胞均有表达,说明在这些病变中细胞有持久的干细胞细胞骨架蛋白(巢蛋白)存在,支持上述观点。本实验发现Nestin和CD34阳性表达率差异无显著性,故认为类似于CD34的重要诊断作用,Nestin也可以作为GG诊断的一个有意义的指标。

在最大样本的国人难治性癫痫病理研究中,对435例连续性病例分析发现脑肿瘤51例(占11.7%),其中GG有19例且多伴FCD^[14]。2012年Barkovich等^[15]结合分子生物学、遗传学和影像学对广义皮质发育畸形的神经发育学和遗传学的分类标准进行更新,将GG归入Group I d型即伴异常细胞增生和新生的皮质发育异常。2011年ILAE专家共识^[6]中指出FCDⅢb亚型是皮质发育异常伴中枢神经系统肿瘤;当FCDⅡ型与海马硬化、中枢神经系统肿瘤、血管畸形等病变伴随出现时称为“双重病理”。根据新分型标准,本组病例中12例伴FCDⅢb型,1例为GG伴FCDⅡa的“双重病理”。有研究认为^[16]癫痫发作经常起源于肿瘤周围组织,但GG伴随FCD的比率常被低估,原因可能是外科手术切除的范围和用于检查的肿瘤周围的标本量不足,故需要对切除标本进行广泛取材从而进行准确的分类和评估;如果只有肿瘤和紧密相邻组织被切除,未被切除的FCD区域可能成为致病灶,迫使二次手术。本组标本取材充分,为详细观察提供了必

要条件。

GG的组织学起源始终存在争议。一种观点则认为,GG可能起源于多潜能干细胞,它有能力分化为神经胶质细胞和神经元细胞。另一种观点是基于GG与FCD密切相关、症状持续时间长及相似的良性组织学外观,认为GG起源于皮质发育异常,GG可能代表发育不良病灶的肿瘤性转化或是皮质发育不良的肿瘤形式。本实验证实GG有神经干细胞标记CD34和Nestin的表达,同时观察到GG与FCD具有密切关系。本实验组前期研究发现具有转化特征的混合性神经元胶质肿瘤,表现为GG早期组织学特征,CD34和Nestin呈弥漫阳性。可见,GG的起源问题复杂,有待进一步深入研究。

需鉴别诊断的有,(1)弥漫性星形细胞瘤:WHOⅡ级。发病年龄多为30~40岁,癫痫不是最重要症状;呈浸润性生长,边界不清,>60%病例可有p53阳性,CD34阴性。因部分GG可有纯粹的星形细胞瘤分化区域,若取材没有取到神经元成分,就会作出弥漫性星形细胞瘤的错误诊断,引起误诊或漏诊,因此手术医师和病理医师仔细取材对诊断的准确性至关重要。(2)少突胶质细胞瘤:WHOⅡ级。当GG胶质瘤背景为少突胶质细胞瘤且肿瘤成分分布不均时需与之鉴别;有些少突胶质细胞瘤可能表达神经元标记如CgA、NeuN,可伴有GG样分化特征^[17],然而缺乏嗜伊红颗粒小体、CD34阴性、80%染色体1p/19q联合缺失有助于鉴别。(3)胚胎发育不良性神经上皮肿瘤(dysembryoplastic neuroepithelial tumour, DNT):具有特殊的胶质神经元成分,即具有与皮质表面垂直的由少突胶质样细胞沿着轴突束排列的柱形结构。不典型病例时两者鉴别有困难,已有多个文献报道GG和DNT的混合性肿瘤,说明两者间存在一个过渡类型。(4)多形性黄色星形细胞瘤(pleomorphic xanthoastrocytoma, PXA):WHOⅡ级。组织学表现多形,许多瘤细胞内含脂质,CD34可阳性;易侵犯脑膜在影像学上呈现“硬膜尾征”;罕见情况下,PXA是GG的胶质瘤成分。(5)节细胞瘤:仅由肿瘤性成熟的神经节细胞组成,不含胶质成分,影像上与GG难以区分,囊性变和钙化少。(6)FCDⅡb型及TSC:与GG同属TOR病,在Barkovich新分类中属于1c组即出现异常细胞成分的皮质发育畸形,均可有形态异常神经元和气球样细胞/巨细胞;TSC为神经皮肤综合征,常有多发皮质结节及室管膜下结节。此外,值得注意的是75%的巨细胞胶质母细胞瘤呈现不同程度的CD34阳性,56%非巨细胞胶

质母细胞瘤也表达 CD34^[15]; 高级别胶质瘤中 Nestin 高表达。因此鉴别 GG 特别是考虑间变性 GG 时, 利用 CD34、Nestin 鉴别诊断应慎重。近期有研究^[9]认为混合性神经元胶质肿瘤尽管形态学差异较大, 但有相似的分子学特征即可存在 7 号或 5 号染色体异常, 需进一步证实。WHO(2016) 中枢神经系统肿瘤分类引入一些新的分子标志物, 与传统形态学诊断整合更有助于精准诊断。

GG 具有良好的生物学行为和预后, 首选手术全切。FCD 在影像学上常无阳性发现, 如仅采用常规影像学定位单纯切除肿瘤病灶, 必然会影响术后癫痫控制结果。规范的手术方式应该采用神经电生理学功能定位, 完整切除肿瘤和其周围的 FCD 病灶。一般无需术后辅助放疗和化疗。对于无法手术全切的患者, 次全切除术后辅助放疗可降低复发率, 延长其生存时间。

(本文疑难病例承蒙北京市宣武医院病理科卢德宏教授及朴月善教授会诊及指导, 特此致谢!)

参考文献:

- [1] Southwell D G, Garcia P A, Berger M S, *et al.* Long-term seizure control outcomes after resection of gangliogliomas[J]. *Neurosurgery*, 2012, 70(6):1406–1413.
- [2] 倪海春, 孙福海, 朴月善, 等. PI3K 通路蛋白在难治性癫痫相关脑皮质发育畸形病灶中的表达[J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(6):391–395.
- [3] Sarnat H B, Flores-Sarnat L. Infantile tauopathies: hemimegalencephaly; tuberous sclerosis complex; focal cortical dysplasia 2, ganglioglioma[J]. *Brain Dev*, 2015, 37(6):553–562.
- [4] Liu J, Reeves C, Michalak Z, *et al.* Evidence for mTOR pathway activation in a spectrum of epilepsy-associated pathologies[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2:71.
- [5] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, Cavenee WK(2016) World Health Organization histological classification of tumours of the central nervous system. International agency for research on cancer [M]. Lyon: IARC Press, 2016:138–141.

- [6] Blümcke I, Thom M, Aronica E, *et al.* The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission[J]. *Epilepsia*, 2011, 52(1):158–174.
- [7] 路平, 孟宇宏, 虞积耀, 等. 颅内节细胞胶质瘤病理诊断与鉴别诊断[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(10):1055–1058.
- [8] Wolf H K, Müller M B, Spänle M, *et al.* Ganglioglioma: a detailed histopathological and immunohistochemical analysis of 61 cases[J]. *Acta Neuropathol*, 1994, 88(2):166–173.
- [9] Blümcke I, Aronica E, Urbach H, *et al.* A neuropathology-based approach to epilepsy surgery in brain tumors and proposal for a new terminology use for long-term epilepsy-associated brain tumors[J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(1):39–54.
- [10] Breton Q, Plouhinec H, Prunier-Mirebeau D, *et al.* BRAF-V600E immunohistochemistry in a large series of glial and glial-neuronal tumors[J]. *Brain Behav*, 2017, 7(3):e00641.
- [11] Blümcke I, Aronica E, Miyata H, *et al.* International recommendation for a comprehensive neuropathologic workup of epilepsy surgery brain tissue: a consensus task force report from the ILAE commission on diagnostic methods[J]. *Epilepsia*, 2016, 57(3):348–358.
- [12] Marucci G, Martinoni M, Giulioni M. Relationship between focal cortical dysplasia and epilepsy-associated low-grade tumors: an immunohistochemical study[J]. *APMIS*, 2013, 121(1):22–29.
- [13] Duggal N, Hammond R R. Nestin expression in ganglioglioma[J]. *Exp Neurol*, 2002, 174(1):89–95.
- [14] Piao Y S, Lu D H, Chen L, *et al.* Neuropathological findings in intractable epilepsy: 435 Chinese cases[J]. *Brain Pathol*, 2010, 20(5):902–908.
- [15] Barkovich A J, Guerrini R, Kuzniecky R I, *et al.* A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012[J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 5):1348–1369.
- [16] Prayson R A. Brain tumors in adults with medically intractable epilepsy[J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(4):557–563.
- [17] Perry A, Burton S S, Fuller G N, *et al.* Oligodendroglial neoplasms with ganglioglioma-like maturation: a diagnostic pitfall[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 120(2):237–252.

Ganglioglioma: a clinicopathological study of 19 cases

LIANG Le¹, FU Jing¹, LI Da-sheng², LENG Hui¹, LIU Yong-ling¹, YAO Xiao-xiang¹, GE Ri-le¹, LI Yun-lin³, MA Kang-ping³

(¹Department of Pathology, ²Department of Radiology, Beijing Haidian Hospital/Haidian Section of Peking University Third Hospital, Beijing 100080, China; ³Department of Neurosurgery, Children's Hospital Affiliated to Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China)

ABSTRACT Purpose To study the clinicopathologic features of ganglioglioma. **Methods** The clinicopathologic data of the cases pathologically diagnosed as ganglioglioma that under-

went resection of epileptic focus were retrospectively analyzed.

Results In the 19 cases studied, the mean onset age was 9.1 years, and the duration of disease was 9.3 years. MRI images

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.009.html>

去分化软骨肉瘤 40 例临床病理特征与预后分析

杨婷婷, 黄文涛, 张惠箴

摘要:目的 探讨去分化软骨肉瘤(dedifferentiated chondrosarcoma, DDCS)的临床、影像、病理学特征及诊断、治疗和预后等。**方法** 收集 2005 年 1 月~2017 年 8 月上海交通大学附属第六人民医院经病理确诊的 40 例 DDCS, 包括临床、影像、病理和随访资料, 采用 HE、免疫组化对其进行分析并复习相关文献。**结果** 40 例 DDCS 中男性 21 例, 女性 19 例, 平均年龄 51 岁。发病部位分别为髌部、股骨、肱骨、胸骨、胫骨、肩部、手指、胸椎。临床主要表现为疼痛、肿胀、活动受限等。典型的影像学表现为双相征, 即呈现出软骨肉瘤的点状、环状钙化和具有侵袭性特征的软组织肿块两种表现。镜下可见界限清楚的高分化软骨肉瘤成分和高度恶性成分(包括骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、纤维肉瘤、不能明确分类的梭形细胞肉瘤), 或去分化为低级别肿瘤(包括骨巨细胞瘤或低级别骨肉瘤), 两种成分比例不定。40 例中有 34 例术前行穿刺活检, 仅 9 例正确诊断为 DDCS, 穿刺诊断正确率为 26.5%。在初诊时已发生转移患者的平均生存时间明显短于未发生转移患者。**结论** DDCS 的诊断需临床、影像和病理三结合。其组织学形态表现复杂多样、术前穿刺活检存在局限性, 其诊断比较困难。初次诊断时伴有转移的患者预后更差。

关键词: 软骨肉瘤; 去分化; 临床病理; 诊断; 预后

中图分类号: R 738.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7399(2018)03-0278-06

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.009

去分化软骨肉瘤(dedifferentiated chondrosarcoma, DDCS)是软骨肉瘤的特殊亚型, 占有软骨肉瘤的 11% 左右, 恶性度高, 易转移尤其是肺转移, 平均存活时间 7.5 个月, 文献报道其 5 年生存率介于 7%~24%, 对化疗和放疗效果不明显, 早期明确诊断和治疗显得尤为重要^[1-2]。其临床表现无特异性, 影像学 and 镜下表现多种多样, 诊断较为困难, 尤其是穿刺活检时往往由于取材的局限性导致诊断失误。该病相对罕见, 目前国内有关 DDCS 的大宗报道相对较少, 本文收集 40 例 DDCS, 通过回顾性分析、随访调查及文献复习, 探讨其临床病理学特征、

诊断及鉴别诊断和预后。

1 材料与方法

1.1 临床材料 收集上海市第六人民医院 2005 年 1 月~2017 年 8 月经病理诊断为 DDCS 的病例 40 例, 标本均经 10% 中性福尔马林固定, 骨组织经过脱钙处理、石蜡包埋和 HE 染色。复习临床病史、影像学资料及所有 HE 切片, 并通过回顾性住院病历随访和电话随访, 影像学随访资料和病理诊断资料作为复发和转移的依据。其 HE 及免疫组化切片经两位经验丰富的病理医师参照 WHO(2013)骨与软组织分类诊断标准重新阅片后确认, 影像学资料由工作 20 年以上、对骨肿瘤具有丰富诊断经验的影像医师协助查看。

1.2 病理标准阅片 镜下可见软骨性成分和非软骨性肉瘤两种成分, 两者界限清楚, 属于突然转化型。去分化成分可以明确分类的重新分类, 不能明

接受日期: 2018-01-26

基金项目: 上海交通大学医学院科技基金(14XJ10078)

作者单位: 上海交通大学附属第六人民医院病理科, 上海 200233

作者简介: 杨婷婷, 女, 硕士研究生。E-mail: flower1dream@163.com

张惠箴, 女, 主任医师, 硕士生导师, 通讯作者。E-mail: liuyuanblz@aliyun.com

showed abnormal signals. The majority of the site was temporal lobe (14/19, 73.7%). The tumors showed heterogeneity and often accompanied by focal cortical dysplasias (13/19, 68.4%). Immunohistochemical staining showed CD34 positive in 18 cases, Nestin positive in 16 cases, and BRAF-V600E positive in 6 case. The positive expression rate of CD34 and Nestin did not have significant differences. **Conclusion** The diagnosis

of ganglioglioma relies on pathological observations combined with clinical features and neuroradiological examinations. Differential diagnosis should be done from other tumors or cortical dysplasia. Immunohistochemical staining of CD34 and Nestin can help diagnosis.

Key words: brain neoplasm; ganglioglioma; focal cortical dysplasia

确分类的根据软组织肉瘤 FNCLCC 组织学评分及分级系统,依据肿瘤分化程度、核分裂计数和肿瘤坏死评分结果,分为 I、II、III 级。

1.3 免疫组化 复习 HE 切片,选择具有代表性的未经脱钙处理的石蜡包埋组织,统一制作 3 μm 厚切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱过夜脱蜡,EDTA 加热抗原修复,En-Vision 两步法免疫标记,经 DAB 显色后,苏木精复染,中性树脂封固。抗体 Ki-67 为即用型,购自福州迈新公司。用 PBS 液代替一抗作阴性对照。Ki-67 半定量计数标准为:在 400 倍光镜下随机观察 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性百分率 = 阳性细胞/细胞计数总数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,采用生存函数的单因素 Kaplan-Meier 和多因素 Cox 回归的统计方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征 40 例 DDCCS 中,男性 21 例,女性 19 例,年龄 31 ~ 88 岁,平均 51 岁。发病部位髌部 18 例、股骨近端 8 例、肱骨 5 例、胸骨 3 例、胫骨 2 例、肩部 2 例、手指 1 例、胸椎 1 例。主要表现为局部疼痛、肿胀、活动受限等,有 2 例因粉碎性骨折入院,另 1 例无意间发现胸前肿块入院就诊。有 5 例是继发性去分化形成,其中 4 例由普通型软骨肉瘤术后多次复发后继发性去分化形成,复发时间 1 ~ 7 年不等;另 1 例发生于手指,由内生性软骨瘤局部刮除术后多次复发,恶变为软骨肉瘤,进而发展为去分化肉瘤,历时 8 年(2008 ~ 2016 年)。34 例行术前穿刺,仅 9 例(26.5%)正确诊断为 DDCCS,其余 25 例均因只穿刺到一种成分而致误诊。34 例得到完整随访资料,随访截止时间 2017 年 8 月 30 日,随访时间 2 ~ 74 个月,平均 14.8 个月。其中 17 例初诊时伴有转移,平均生存时间 6 个月,而初诊时未出现转移的患者平均生存时间为 27 个月。术后发生复发者 12 例,复发时间 1 ~ 27 个月不等,平均 14 个月。

2.2 影像学特征 本组中 35 例有完整影像学资料,其中表现出双相征的有 23 例,既可以看到典型的软骨肉瘤的点状、环状钙化,又可看到具有侵袭性特征的软组织肿块;5 例可看到典型的软骨肉瘤表现,但未见到软组织成分;7 例显示出明显的软组织肿块或骨肉瘤改变但未见到典型的软骨肉瘤成分。相对而言,CT 可以显示出 X 线显示不出的钙化灶,

而 MRI 在显示病灶范围和软组织形态上优于前两者(图 1)。

2.3 组织学特征 40 例 DDCCS 镜下均看到软骨肉瘤成分和去分化成分,两种成分界限清楚,突然转变。软骨性成分多数为高分化软骨肉瘤(30/40),少数为中分化和低分化软骨肉瘤,其中 8 例(20%)为高级别软骨肉瘤,2 例为纤维软骨性成分。去分化成分可以表现出多种类型,其中去分化成分为骨肉瘤的有 16 例,恶性纤维组织细胞瘤 4 例,纤维肉瘤 3 例,未明确分类、报为梭形细胞肉瘤的 17 例,将其按照 FNCLCC 组织学评分及分级系统: I 级 4 例, II 级 6 例, III 级 7 例。同一例 DDCCS 的去分化成分含有异质性:2 例同时含有高级别梭形细胞肉瘤和高级别骨肉瘤两种成分(图 2A、B);1 例为梭形细胞肉瘤伴上皮样分化;部分病例去分化成分中含有成片多核巨细胞区域(图 2C)。转移灶的成分与去分化成分一致,复发性的 DDCCS 中去分化成分的恶性度可高于原发灶。

2.4 免疫表型 Ki-67 表达定位于细胞核,平均增殖指数 31%,在去分化成分为骨肉瘤中平均指数为 25%,在纤维肉瘤中为 13%,恶性纤维组织细胞瘤 53%;在梭形细胞肉瘤 I 级 10%、II 级 42%、III 级 42%。

2.5 生存分析 将患者性别、年龄、发生部位、初诊时有无转移、术前活检、手术方式、辅助治疗、去分化类型、Ki-67 增殖指数、肿块大小等情况做生存函数单因素 Kaplan-Meier 分析和多因素 Cox 回归。Kaplan-Meier 生存分析结果显示,仅与初诊时已发生转移有显著相关性($P < 0.05$,表 1,图 3);随后将这些因素进行生存函数 Cox 回归,结果与单因素 Kaplan-Meier 分析相吻合,显示初诊时已发生转移是影响患者总体生存情况的独立预后因子($P = 0.009$,表 2)。

3 讨论

软骨肉瘤是纯软骨分化的恶性肿瘤,是发生于骨组织的三大常见肿瘤(多发性骨髓瘤、骨肉瘤和软骨肉瘤)之一,而 DDCCS 是其罕见亚型,其发病率约占所有软骨肉瘤的 11%,1971 年由 Dahlin 和 Beabout^[3] 首先提出并命名,镜下主要由高分化软骨性肿瘤和恶性间变性肉瘤两种成分构成,两者分界清楚,突然转变。

3.1 临床表现 结合本次统计结果,该病主要发生于中老年人,男性患者稍多于女性,发病年龄 31 ~ 88 岁,多数为 40 ~ 60 岁。发病部位以盆三角即骨

表 1 DDCS 临床病理特征与预后的生存函数						
单因素 Kaplan-Meier 分析						
临床病理参数	n	中位生存时间(月)	SE	95% CI		P 值
				lower	upper	
性别						
男	21	18.785	5.04	8.906	28.663	>0.05
女	19	26.097	6.417	13.521	38.673	
年龄(岁)						
<50	22	31.483	7.082	17.601	45.364	>0.05
>50	18	12.113	2.56	7.095	17.132	
初诊时转移情况						
有	19	6.421	0.542	5.358	7.484	0.00
无	21	46.204	7.661	31.189	61.218	
术前穿刺活检						
无	6	11.333	3.139	5.181	17.485	>0.05
诊断错误	25	23.451	5.683	12.313	34.589	
诊断正确	9	17.533	4.791	8.143	26.923	
辅助治疗						
有	20	13.928	2.37	9.282	18.573	>0.05
无	20	42.368	8.891	24.941	59.795	
是否原发						
原发	35	21.334	4.619	12.28	30.388	>0.05
继发	5	50.667	17.419	16.526	84.807	
手术方式						
未手术	3	8	4	0.16	15.84	>0.05
保肢扩大切除	31	18.146	3.437	11.409	24.883	
截肢	6	41.667	13.318	15.563	67.77	
Ki-67 增殖指数						
未做	7	7.25	1.601	4.112	10.388	>0.05
<20%	10	37.2	9.278	19.015	55.385	
20%~40%	14	14.108	2.296	9.607	18.609	
>40%	9	20.556	9.538	1.862	39.249	
去分化成分						
中~高度恶性	32	19.345	4.343	10.833	27.857	>0.05
低度恶性	8	49.667	12.894	24.394	74.939	
肿瘤直径(cm)						
>8	14	7	1.113	4.819	9.181	>0.05
<8	16	32	16.119	0.407	63.593	
未知大小	10	12	6.000	0.240	27.760	

盆、股骨近端最多,其次为肩三角即肩胛骨和肱骨,也可发生于胸骨、胸椎、手指等。也曾有发生于喉、肋骨、颞下颌关节的个案报道^[4-8]。

3.2 影像学特征 DDCS 典型的影像学表现为双相征,即病灶一部分区域表现为软骨肉瘤的点状、环状钙化,另一部分区域表现出非软骨性改变伴有骨皮质破坏及向周围软组织侵袭的特点,具体表现因组织学形态不同而异。Mercuri 等^[9]将 DDCS 分为 3

型,Ⅰ型指影像学仅有软骨肉瘤的特征性表现,但无软组织肿块;Ⅱ型指既有软骨肉瘤特征性表现,又伴有软组织肿块;Ⅲ型指仅发现恶性非软骨性肿瘤,无软骨肉瘤的特征性表现。本组病例中Ⅰ型 5 例,Ⅱ型 23 例,Ⅲ型 7 例。去分化成分和软骨肉瘤成分比例往往不定,致影像学诊断存在困难,当肿块以一种成分为主时,往往会忽略另一种成分的存在。CT 引导下术前穿刺活检常由于取材局限导致诊断困难,国内学者^[10]认为 MRI 可清楚显示病灶范围及不同成分的分布,对术前穿刺具有指导意义。

3.3 病理学特征 DDCS 镜下表现为软骨肉瘤成分和高度恶性非软骨性肉瘤成分突然转变,界限清楚。本组 40 例 DDCS 的软骨肉瘤成分多数为高分化软骨肉瘤,也可为中分化和低分化,偶尔可为纤维软骨性成分,有文献报道可以为内生性软骨瘤^[11];而去分化成分除高度恶性的骨肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞、横纹肌肉瘤、血管肉瘤等外,也可为低度恶性,如高分化纤维肉瘤、巨细胞瘤^[12-13];去分化成分也可呈现出上皮样结构,可表现为鳞状细胞癌,也可为腺上皮样结构^[14];同一例 DDCS 去分化成分的不同区域可表现出异质性。Ki-67 表达与肉瘤的恶性程度有一定相关性,对去分化成分的恶性程度及预后判断有一定指导意义。

3.4 诊断与鉴别诊断 DDCS 的诊断需要临床、影像和病理三结合。该疾病异质性较大,临床表现无特异性,影像学和组织学形态变化多端,且无特殊的生物学标志物用于鉴别诊断。若影像学表现不典型而病理镜下只观察到一种成分或者没看到明显的两种成分交界往往容易误诊,导致治疗方面的失误,因此充分正确的取材十分重要,无论术前穿刺活检还是大体取材,对于肿块内具有异质性的区域分别取材,并要注重不同区域交界处的取材。另外,DDCS 术前穿刺活检的诊断正确率较低,其结果直接响临床医师的治疗方式,因此术前明确诊断对临床治疗方式的选择有很大的指导意义。

DDCS 的诊断需要与成软骨细胞型骨肉瘤、高级别软骨肉瘤进行鉴别^[15-16]:(1)成软骨细胞型骨肉瘤中存在软骨肉瘤和骨肉瘤两种成分,但这两种成分交界处是混杂和移行,无明确分界。骨肉瘤

表 2 Cox 多因素分析结果方程中的变量

因素	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI	
							下部	上部
初诊时已发生转移	5.162	1.984	6.770	1	0.009	174.514	3.573	8 522.830

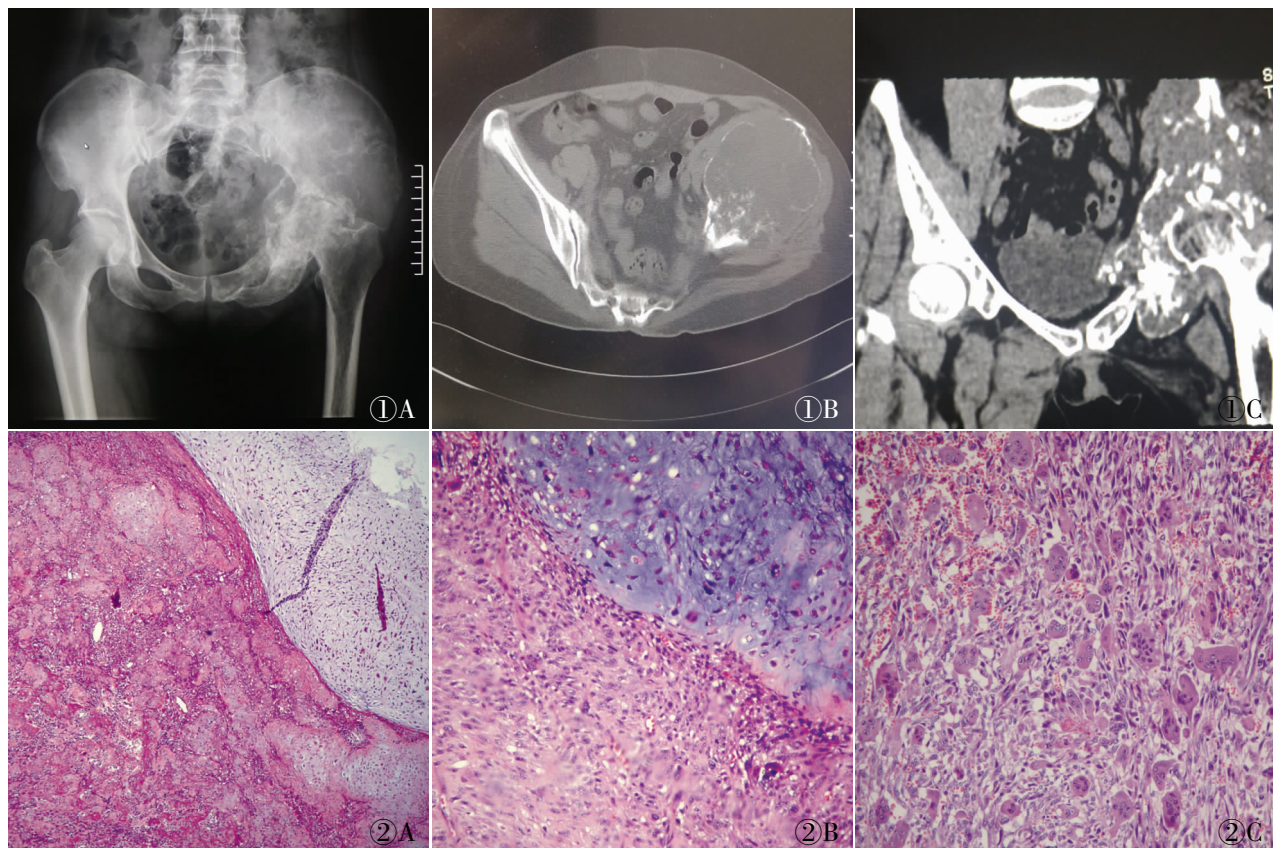


图1 1例发生于左侧髂骨的去分化软组织肉瘤的影像学表现:A. X线示左侧髂部(包括耻骨、坐骨升支、髂骨)膨胀性骨质破坏,累及髌臼,内见絮状高密度影;B. CT示左髂骨一巨大软组织肿块,骨质破坏,肿块边缘见絮状钙化灶;C. CT软组织窗冠状面,可见左侧多发性骨质破坏,肿块压迫周围软组织,低密度软组织肿块中见散在钙化灶

图2 同一例DDCS的显微镜下表现,其去分化成分既有骨肉瘤(A),又有高级别梭形细胞肉瘤(B),部分区域含有成片巨细胞成分(C)

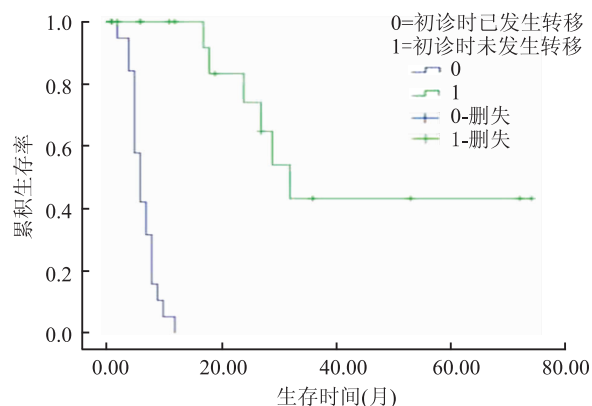


图3 初诊时发生转移DDCS的生存函数

若术前穿刺活检中显示软骨和肉瘤两种成分,但没有取到明确交界处,在影像学表现不是很典型的情况下,很容易将这两种疾病误诊。(2)高级别软骨肉瘤(Ⅲ级)在软骨岛小叶周围会存在少量梭形细胞成分,但这两种成分也是逐渐移行和混合存在的。近几年分子基因学研究显示 IDH1/2 突变可用于具有 IDH1/2 突变的 DDCS 与形态学相似的单一成分的肉瘤相鉴别^[17-19]。

3.5 治疗与预后 目前以手术扩大切除治疗为主,对放疗和化疗不敏感,部分患者去分化成分对化疗有一定反应。本文2例去分化成分为骨肉瘤,术前化疗后骨肉瘤成分部分区域见坏死,但尚有大部分区域无效,统计学分析发现辅助放化疗对生存无明显改善。

该肿瘤极易发生转移,尤其是肺转移,病死率较高,预后较差。17例在初诊时伴有转移,平均生存时间6.3个月,初诊时未发生转移者平均生存时间为27个月,最长存活时间74个月,至今仍存活。多数报道认为,诊断时发生转移者预后更差。Strotman等^[1]采用SEER方法和疾病特异性多因素生存分析法回顾性分析159例DDCS,结果显示诊断时已发生转移、肿瘤>8cm是预后差的因素。曾有报道显示去分化成分恶性度越高、所占比例越高,预后越差^[2,20-21]。而在本组病例统计结果仅显示初诊时已发生转移者是预后的独立危险因素,而肿瘤发生部位、有无放化疗、去分化成分以及肿瘤大小等对预后的影响不大。

3.6 起源 两种成分的起源性问题,目前仍存在较大争议,文献报道有三种观点^[22-24]:(1)起源于具有多向分化潜能的原始细胞,分别向不同的方向分化;(2)去分化成分来自于软骨肉瘤细胞的突然去分化;(3)DDCS 是体内两种类型的肿瘤相互碰撞形成,即“碰撞学说”。近几年,分子研究显示,同一例 DDCS 的两种成分 IDH1/2 基因突变具有一致性,而 IDH1/2 突变是肿瘤发生的早期事件,故而推测 DDCS 是单克隆起源^[17,19]。然而,DDCS 去分化成分到底是从具有多向分化潜能的原始细胞向不同方向分化形成,还是在软骨肉瘤细胞的基础上发生的去分化,这个问题类似于去分化脂肪肉瘤^[25],其机制还需进一步深入研究。

原发性和继发性 DDCS 两者存在何种差异, Bharath 等^[22]报道 1 例 60 岁患者,胸壁肿块 10 年,随后发现肿块迅速肿大并伴疼痛后到医院就诊,这是否意味着患者出现疼痛和肿块迅速肿大是去分化的征兆?结合本组病例病史资料笔者认为有两种可能:(1)所有 DDCS 均是在软骨肉瘤的基础上继发性去分化的过程,原发性的 DDCS 在初诊之前已经存在软骨肉瘤慢慢发生去分化这个过程,只是病灶比较隐匿等出现明显症状去就诊时已经是去分化的状态;本组病例中有 1 例患者,14 年前发现胸壁肿块逐渐长大,由于各种原因未曾就诊治疗,最终出现肿块迅速肿大并伴有疼痛就诊,诊断为 DDCS,是否肿块在这 14 年内由最初的软骨肉瘤慢慢发生恶变去分化,这个过程很难验证。(2)继发性的 DDCS 是有别于原发性的,两者的发病机制不同,原发性 DDCS 发病一开始就表现为两种成分共存状态,而继发性 DDCS 最初是软骨肉瘤,慢慢发生恶变,最终去分化形成,正如本组病例中多数患者从发现肿块或出现症状到就诊不到 1 年时间,而且多数已发生转移,从时间上看其形成不支持缓慢的去分化过程。

总之,DDCS 无论是在镜下还是影像学上,表现出很大的差异性,去分化成分复杂多变,术前穿刺活检诊断困难,其正确的诊断需要结合患者的临床症状、影像学仔细观察、术前多部位穿刺、病理医师对异质性区域及其交界的多处取材和镜下观察。该疾病除了外科扩大手术切除外尚无特殊有效的治疗方法。多数 DDCS 在发病初期就已发生转移,是预后差的独立危险因素。其发病机制及两种不同成分的起源问题还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Strotman P K. Dedifferentiated chondrosarcoma: a survival analysis of 159 cases from the SEER database (2001 - 2011) [J]. *Cancer Med*, 2017,116(2):252 - 257.
- [2] Grimer R J, Gosheger G, Taminiau A, *et al.* Dedifferentiated chondrosarcoma: prognostic factors and outcome from a European group [J]. *Eur J Cancer*, 2007,43(14):2060 - 2065.
- [3] Dahlin D C, Beabout J W. Dedifferentiation of low-grade chondrosarcomas [J]. *Cancer*, 1971,28(2):461 - 466.
- [4] Rath R, Das B K, Baisakh M, Das S N. Dedifferentiated chondrosarcoma of temporomandibular joint: atypical features of a rare case [J]. *J Clin Diagn Res*, 2014,8(9):Zd09 - 11.
- [5] Abraham V J, Devgarha S, Mathur R M, *et al.* Dedifferentiated chondrosarcoma of the rib masquerading as a giant chest wall tumor in a teenage girl: an unusual presentation [J]. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014,47(4):427 - 430.
- [6] Kim S W, Kim M S, Jung Y J. Chondrosarcoma apoplexy in thoracic spine [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2013,53(1):46 - 48.
- [7] Fidai S S, Ginat D T, Langerman A J, *et al.* Dedifferentiated chondrosarcoma of the larynx [J]. *Head Neck Pathol*, 2016,10(3):345 - 348.
- [8] Mishra N, Singh A K, Agrawal R, *et al.* Massive dedifferentiated chondrosarcoma affecting whole mandible with high recurrence potential [J]. *Natl J Maxillofac Surg*, 2015,6(2):224 - 228.
- [9] Mercuri M, Picci P, Campanacci L, *et al.* Dedifferentiated chondrosarcoma [J]. *Skeletal Radiol*, 1995,24(6):409 - 416.
- [10] 杨小军, 郝 艳, 姚伟武. 去分化软骨肉瘤的影像学诊断 [J]. *医学影像学杂志*, 2015,25(4):674 - 677.
- [11] Uhl M, Herget G, Kurz P. Cartilage tumors: pathology and radiomorphology [J]. *Radiologe*, 2016,56(6):476 - 488.
- [12] Knosel T, Werner M, Jung A, *et al.* Dedifferentiated chondrosarcoma mimicking a giant cell tumor. Is this low grade dedifferentiated chondrosarcoma? [J]. *Pathol Res Pract*, 2014,210(3):194 - 197.
- [13] Huang J, Jiang Z, Yang Q, *et al.* Benign looking giant cell component in dedifferentiated chondrosarcoma: benign or malignant? A case report [J]. *Int J Surg Pathol*, 2013,21(1):48 - 53.
- [14] Gambarotti M, Righi A, Frisoni T, *et al.* Dedifferentiated chondrosarcoma with "adamantinoma-like" features: a case report and review of literature [J]. *Pathol Res Pract*, 2017,213(6):698 - 701.
- [15] 黄 瑾, 张惠箴, 郑 莉, 等. 去分化软骨肉瘤的临床病理诊断 [J]. *中华病理学杂志*, 2009,38(12):820 - 823.
- [16] 高 峰, 丁 洋, 吴文娟, 等. 去分化软骨肉瘤 11 例临床病理分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010,26(1):81 - 83.
- [17] Chen S, Fritchie K, Wei S, *et al.* Diagnostic utility of IDH1/2 mutations to distinguish dedifferentiated chondrosarcoma from undifferentiated pleomorphic sarcoma of bone [J]. *Hum Pathol*, 2017,65:239 - 246.
- [18] Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, *et al.* Mutant IDH1 Dysregulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Association with Gene-Specific Histone Modifications to Cartilage- and Bone-Related Genes [J]. *PLoS One*, 2015,10(7):e0131998.
- [19] Amary M F, Bacsí K, Maggiani F, *et al.* IDH1 and IDH2 muta-

- tions are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours[J]. J Pathol, 2011, 224(3):334-343.
- [20] Yokota K, Sakamoto A, Matsumoto Y, *et al.* Clinical outcome for patients with dedifferentiated chondrosarcoma: a report of 9 cases at a single institute[J]. J Orthop Surg Res, 2012, 7:38.
- [21] Staals E L, Bacchini P, Bertoni F. Dedifferentiated central chondrosarcoma[J]. Cancer, 2006, 106(12):2682-2691.
- [22] Bharath G, Burrah R, Shivakumar K, *et al.* Dedifferentiated chondrosarcoma: an aggressive variant of chondrosarcoma[J]. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2015, 23(2):221-223.
- [23] Dornauer K, Soder S, Inwards C Y, *et al.* Matrix biochemistry and cell biology of dedifferentiated chondrosarcomas[J]. Pathol Int, 2010, 60(5):365-372.
- [24] Meijer D, de Jong D, Pansuriya T C, *et al.* Genetic characterization of mesenchymal, clear cell, and dedifferentiated chondrosarcoma[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2012, 51(10):899-909.
- [25] 张兆祥, 韩林. 去分化脂肪肉瘤的病理学研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(1):97-100.

Clinicopathological features and prognosis of dedifferentiated chondrosarcoma: an analysis of 40 cases

YANG Ting-ting, HUANG Wen-tao, ZHANG Hui-zhen

(Department of Pathology, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT **Purpose** To explore the clinical, imaging, pathologic features and diagnosis, treatment and prognosis of dedifferentiated chondrosarcoma (DDCS). **Methods** Forty cases of DDCS confirmed by pathologists were collected from Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital from January 2005 to August 2017, including clinical, imaging, pathologic and follow-up data. HE, immunohistochemistry and statistical methods were used with review of the related literature. **Results** There were 21 males and 19 females in 40 cases of DDCS, with an average age of 51 years. The tumors were located in hip, proximal femur, humerus, sternum, tibia, shoulder, finger, and thoracic cavity. The main clinical manifestations were local pain, swelling, limited mobility and so on. Typical radiographic manifestations are "bimorphic features", which showed two manifestations of dot or circular like calcification of chondrosarcoma, and invasive soft tissue masses. Histologically, clearly defined well-differentiated chondrosarcoma components

juxtaposed highly malignant dedifferentiation components, which can display as follows: osteosarcoma, fibrosarcoma, malignant fibrous histiocytoma, and spindle cell sarcoma that could not be clearly classified. The dedifferentiated components might also be low-grade tumors such as giant cell tumor of bone or low grade osteosarcoma. The proportions of these two ingredients were uncertain. Preoperative biopsy was performed in 34 cases, of whom only 9 (26.5%) were correctly diagnosed as DDCS. The average survival time of patients with metastasis at first visit was significantly shorter than the patient without metastasis. **Conclusion** Diagnosis of DDCS should be combined with clinical features, imaging and histological morphology. As their histological morphology complex, and preoperative puncture biopsy limitations, its diagnosis is very difficult. Patients with metastases at the time of initial diagnosis have a worse prognosis.

Key words: chondrosarcoma; dedifferentiate; clinical pathology; diagnosis; prognosis

· 简 讯 ·

论文修改注意事项

- 1 论文“题目”是否精炼、准确,一般不超过25个字;
- 2 论著的“中英文摘要”是否符合结构式要求,综述类论文用指示性摘要,各项描述是否准确,内容有无交叉,要删繁就简;
- 3 “前言”是否简明扼要,与“讨论”部分有无重复,“材料与方法”和“结果”的内容有无交叉;
- 4 “正文”内容和撰写格式是否符合相应栏目的要求,图、表是否规范,数量是否适中,内容有无重复,数字、计量单位、专业术语、缩略语的运用是否规范;
- 5 “讨论”是否结合本文进行,论述是否精辟、流畅;
- 6 “参考文献”是否新颖,数量是否适中,著录格式是否规范,有无缺项,标点符号是否符合本刊格式,尽可能引用本刊相关文献;
- 7 注意控制论文篇幅和图表数量,一般5号字打印稿不要超过5页,即全篇包括摘要、正文、图表和参考文献在内不要超过6000字;
- 8 修改时可参阅医学期刊编辑的常用“国家标准和规范”和本刊的《投稿须知》。

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.010.html>

垂体细胞瘤及其罕见室管膜样亚型的临床病理分析

司海鹏¹, 王剑蓉¹, 章宜芬¹, 王震², 张智弘²

摘要: **目的** 探讨垂体细胞瘤及其罕见的室管膜样亚型的临床病理学特征和免疫表型、诊断和鉴别诊断。**方法** 应用 HE 和免疫组化 EnVision 两步法染色观察 7 例垂体细胞瘤(6 例经典型和 1 例室管膜样亚型)的组织学形态和免疫表型,并复习相关文献。**结果** 镜下 6 例经典型肿瘤均由致密的肥胖梭形细胞构成,瘤细胞呈短束状和车辐状排列;而 1 例室管膜样亚型,瘤细胞呈漩涡状和乳头状排列,伴明显的血管周菊形团结构。免疫表型:所有肿瘤均弥漫表达 S-100 蛋白和 TTF-1,而 IDH1 R132H、Olig-2、NF、CD34、Syn、CgA 及垂体激素均阴性,Ki-67 增殖指数均 <2%。不同的是,经典型病例 GFAP 和 EMA 仅灶阳性,室管膜样亚型中 GFAP 呈弥漫阳性,且 >50% 瘤细胞 EMA 点状阳性。**结论** 垂体细胞瘤是起源于神经垂体细胞罕见的低级别胶质瘤,该实验有助于扩大垂体细胞瘤的形态学谱系和对新亚型的认识,对病理的鉴别诊断和临床治疗有益。

关键词: 垂体细胞瘤;室管膜样;免疫表型;诊断;鉴别

中图分类号: R 739.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7399(2018)03-0284-05

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.010

垂体细胞瘤是 WHO(2007)中枢神经系统肿瘤分类中新增的类型^[1],其最早由 Brat 等^[2]报道,并认为它起源于神经垂体或漏斗柄处的垂体细胞。垂体细胞可分为 5 种超微结构亚型,包括亮细胞、暗细胞、颗粒细胞、嗜酸细胞和室管膜样细胞^[3]。近年来,被视为神经垂体组织起源标记的 TTF-1 相继在垂体细胞瘤、鞍区颗粒细胞瘤和梭形细胞嗜酸细胞瘤中发现,有作者提出这三种肿瘤可能起源于上述前 4 种超微细胞亚型^[4-6]。另有研究者指出鞍区的室管膜瘤可能是垂体细胞瘤的室管膜样亚型^[7]。随后,陆续有报道伴有 TTF-1 阳性室管膜分化成分的垂体细胞瘤,也证实了上述观点^[8-9]。垂体细胞瘤临床极罕见,尤其是室管膜样亚型。本文收集 6 例经典型垂体细胞瘤和室管膜样亚型肿瘤 1 例,探讨其临床病理和免疫表型,并结合文献复习分析其诊断及鉴别诊断。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2010~2017 年南京医科大学第一附属医院(6 例)和南京中医药大学附属医院(1 例)病理科诊断的 7 例垂体细胞瘤,所有患者临床资料

完整。

1.2 方法 所有病例均为手术切除标本,10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,HE 染色观察并选取典型病变切片行免疫组化染色。

1.3 免疫组化 免疫组化染色采用 EnVision 两步法,并设立阴、阳性对照。所有一抗均购自福州迈新公司,包括 S-100 蛋白、TTF-1、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、IDH1 R132H、Olig-2、神经纤维细丝蛋白(NF)、CD34、EMA、Syn、CgA、Ki-67 和垂体激素[包括泌乳素(PRL)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促甲状腺素(TSH)、人类生长激素(hGH)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)]。

2 结果

2.1 临床特征 7 例患者中,男性 3 例,女性 4 例,发病年龄 40~68 岁,平均 55 岁。临床症状多表现为视野受损、头痛和垂体机能减退,如月经紊乱,性欲减退等。影像学表现为鞍区或垂体占位性病变(表 1,图 1)。

2.2 镜检 在经典型垂体细胞瘤中,肿瘤细胞多呈致密、略显杂乱的短束状和车辐状排列。瘤细胞呈肥胖梭形,细胞核呈卵圆形或梭形,染色质细腻,部分可见小核仁,核异型性和核分裂象罕见;胞质中等丰富,轻度嗜酸性。部分肿瘤间质多为扩张的薄壁中~小血管,少数厚壁血管可见明显的玻璃样变性,但未见肾小球样血管增生改变(图 2)。紧邻病变可见残存的正常神经垂体组织显示较低的细胞密度和特征性 Herring 小体。

接受日期:2018-01-09

作者单位:¹ 南京中医药大学附属医院病理科,南京 210029

² 南京医科大学第一附属医院病理科,南京 210029

作者简介:司海鹏,女,硕士,副主任医师。E-mail: mtshp@sina.com

王震,男,副主任医师,通讯作者。Tel: (025) 68136445,

E-mail: 3275099@qq.com

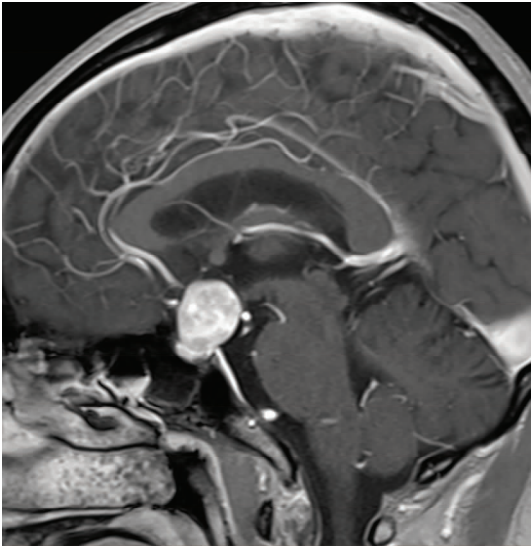


图1 垂体细胞瘤 MRI 矢状位 T1 加权相,鞍内及鞍上实性占位性病变,大小 2.2 cm × 1.6 cm × 2 cm,边界清楚,对比增强明显,垂体柄受压显示不清

在室管膜样亚型病变中,肿瘤细胞构成仍然以肥胖短梭形细胞为主,多以小血管为中心呈漩涡状和乳头状排列,部分血管周围见明显的无核区,呈血管周菊形团样结构(图3)。另见灶性区示短梭形细

胞构成的束状区,两者移行形态明显。

2.3 免疫表型 所有病例肿瘤细胞均弥漫表达 S-100 蛋白和 TTF-1 (图4), IDH1 R132H、Olig-2、NF、CD34、Syn、CgA 和垂体激素均阴性, Ki-67 增殖指数均小于 2%。6 例经典型病变中 GFAP 呈灶性或斑片状阳性(图5), 仅 2 例 EMA 呈散在肿瘤细胞胞质阳性(图6)。室管膜亚型肿瘤中, 瘤细胞 GFAP 弥漫阳性(图7), 超过 50% 瘤细胞 EMA 表达呈明显胞质点状阳性(图8)。

3 讨论

历史上,垂体细胞瘤这一诊断名词曾广泛用于一组发生于鞍区的异质性肿瘤,包括毛细胞星形细胞瘤、颗粒细胞瘤和垂体腺瘤等。直到 2000 年, Brat 等^[2]报道了一组发生于鞍区的低级别梭形细胞胶质瘤,并认为其来源于神经垂体中特化性胶质细胞-垂体细胞。此后,垂体细胞瘤这一命名仅限用于该类肿瘤的诊断,并列于 WHO (2007) 中枢神经系统肿瘤新分类/WHO I 级肿瘤中^[2]。临床上,垂体细胞瘤发病年龄范围广,患者常有视觉障碍、头痛、性欲减退、疲劳及月经紊乱等临床表现。约 25%

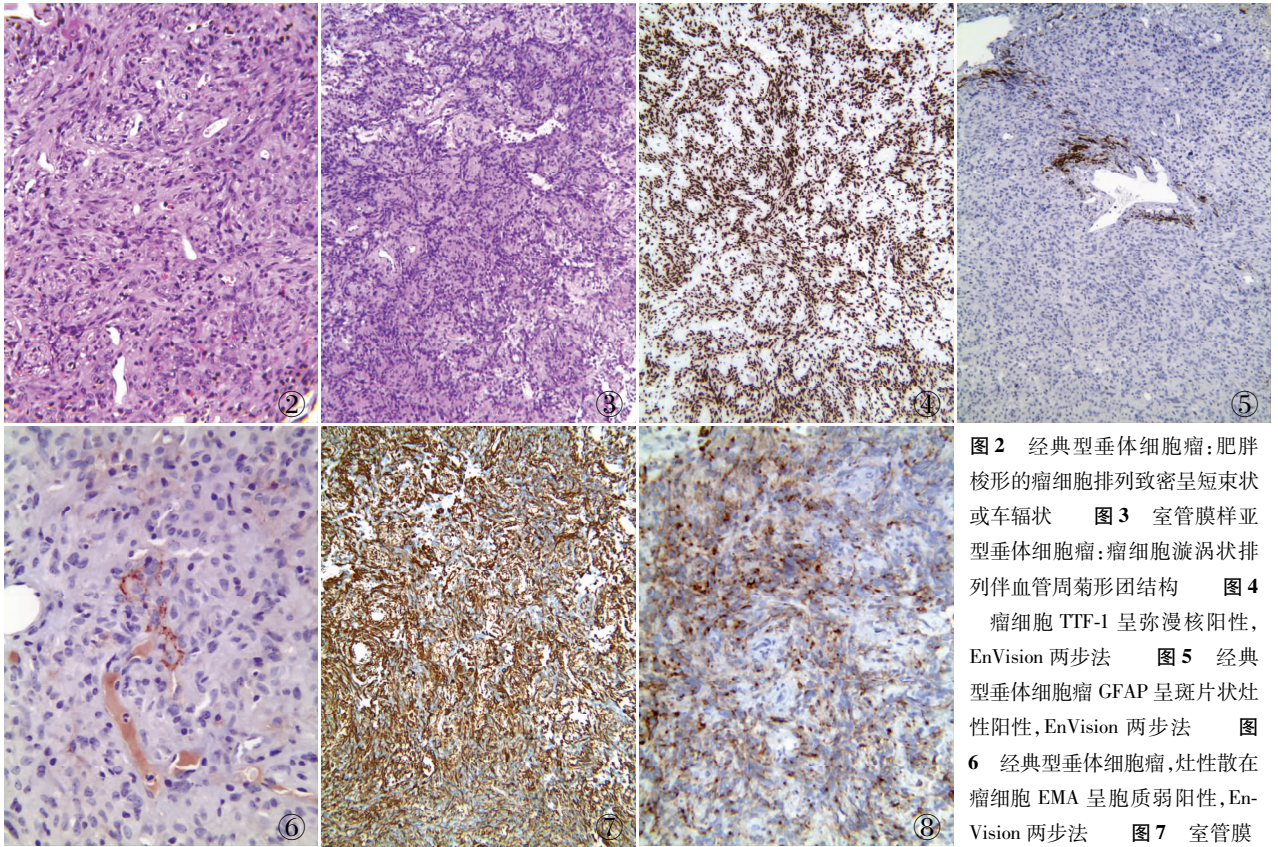


图2 经典型垂体细胞瘤:肥胖梭形的瘤细胞排列致密呈短束状或车辐状 图3 室管膜样亚型垂体细胞瘤:瘤细胞漩涡状排列伴血管周菊形团结构 图4 瘤细胞 TTF-1 呈弥漫核阳性, EnVision 两步法 图5 经典型垂体细胞瘤 GFAP 呈斑片状灶性阳性, EnVision 两步法 图6 经典型垂体细胞瘤,灶性散在瘤细胞 EMA 呈胞质弱阳性, EnVision 两步法 图7 室管膜

样亚型垂体细胞瘤,瘤细胞 GFAP 呈弥漫胞质阳性, EnVision 两步法

图8 室管膜样亚型垂体细胞瘤,瘤细胞 EMA 呈胞质点状阳性, En-

表 1 垂体细胞瘤的临床资料

病例	性别/ 年龄(岁)	临床表现	影像学检查	治疗、随访和预后
1	女/45	月经紊乱 3 年	MRI 示垂体后部占位,术中病灶直径约 5 mm	全切;随访 6 年;无复发
2	男/45	视力下降,视物不清 4 年	CT 示垂体柄前移、垂体后方占位,大小 14 mm×13 mm	全切;随访 3 年;无复发
3	女/43	头痛、月经紊乱 5 年	MRI 示垂体左侧结节占位,直径约 6.7 mm	全切;随访 2.5 年;无复发
4	男/54	四肢乏力,性欲减退 6 年伴泌乳素轻微增高。口服溴隐亭后,垂体占位无明显缩小	外院 MRI 示鞍区占位	全切,术后垂体功能减退,内分泌支持治疗 4 个月好转;随访 2.5 年;无复发
5	男/58	头晕伴视力下降半年	MRI 示垂体占位 15 mm×21 mm	全切;随访 2 年;无复发
6	女/68	月经紊乱伴轻度泌乳素升高,溴隐亭治疗效果不明显	MRI 示垂体微腺瘤,病变直径约 4 mm	全切;随访 1.5 年;无复发
7	女/40	头痛 2 个月	外院 MRI 示垂体腺瘤,病变直径约 20 mm	全切;随访 2 年;无复发

例 1~6 为经典型垂体细胞瘤,例 7 为室管膜样亚型垂体细胞瘤

的患者因垂体柄效应和垂体受损,可分别表现为泌乳素轻度升高和垂体功能减退等内分泌紊乱症状^[1-2]。

TTF-1 作为组织起源的特异性标记广泛应用于肺和甲状腺组织相关肿瘤的病理学诊断。但 TTF-1 不仅仅是在肺和甲状腺组织的发生中起关键作用,其表达也见于胚胎时期的腹侧神经外胚层^[4]。胚胎发育期间,腺垂体起源于胚胎口凹的外胚层(Rathke 囊),而神经垂体恰起源于腹侧的神经外胚层^[10]。近来研究发现 TTF-1 在正常的神经垂体细胞、鞍区的垂体细胞瘤、颗粒细胞瘤和梭形细胞嗜酸细胞瘤中均有表达^[4]。同时,超微结构研究显示垂体细胞有亮细胞、暗细胞、颗粒细胞、嗜酸细胞和室管膜细胞 5 种亚型^[3]。结合超微亚型分类,现阶段较为广泛的共识是经典的梭形细胞垂体细胞瘤多起源于亮细胞和暗细胞,而鞍区的梭形细胞嗜酸细胞瘤、颗粒细胞瘤分别起源于嗜酸细胞和颗粒细胞^[5-6]。在 WHO(2016)中枢神经肿瘤最新分类修订中尽管尚未将三者合并,但在肿瘤组织起源上基本接受了三者同源但不同超微细胞亚型的观点^[11-12]。室管膜样细胞是垂体细胞超微结构亚型的一种,是否存在与其相对应的肿瘤性病变是需要我们探究的问题。事实上,早在 2009 年 Scheithauer 等^[7]报道 1 例发生于鞍区神经垂体的室管膜瘤,瘤细胞 EMA 表达呈胞质点状阳性,与室管膜分化肿瘤 EMA 的表达方式相似,而与经典型垂体细胞瘤 EMA 仅灶性胞质弱阳性明显不同;同时电镜显示室管膜细胞分化特征,如桥粒连接和含微绒毛的细胞内管腔,指出其可能就是垂体细胞瘤的室管膜样亚型。此后,2014 年 Saeed Kamil 等^[8]报道了 1 例鞍

区垂体细胞瘤中 TTF-1 阳性的室管膜菊形团成分和梭形嗜酸细胞成分两者并存,支持室管膜样垂体细胞肿瘤性成分的存在。最近,2015 年 Yoshimoto 等^[9]报道了 1 例相似的病例,电镜下室管膜分化超微结构特征明显,进一步证实了肿瘤成分源于室管膜样垂体细胞亚型。

本组 6 例经典型垂体细胞瘤的组织学形态与以往报道病例相似,表现为低级别梭形细胞增生呈短束状和车辐状排列,以 S-100 和 TTF-1 弥漫阳性、灶性 GFAP 表达及少数病例见散在瘤细胞 EMA 胞质阳性为典型免疫表型改变。本文报道的室管膜样亚型病例具有与经典型垂体细胞瘤重叠的组织学形态及免疫表型,如形态上可见与经典的梭形细胞垂体细胞瘤成分移行区以及 S-100 和 TTF-1 弥漫表达。但两者也有显著的区别,室管膜样亚型肿瘤形态上以漩涡状或乳头状围血管生长伴血管周菊形团结构为主,免疫表型上近 50% 肿瘤细胞 EMA 胞质点状阳性,与以往报道及本文观察到的经典型垂体细胞瘤不同,但与 Scheithauer 等^[7]报道的病例相似。

室管膜样亚型垂体细胞瘤的出现扩大了垂体细胞瘤的形态学及免疫表型谱系。病理诊断中,经典型垂体细胞瘤首先需与非肿瘤性神经垂体组织鉴别,其次需与鞍区颗粒细胞瘤和梭形细胞嗜酸细胞瘤,以及偶发于鞍区毛细胞星形细胞瘤、纤维性脑膜瘤、神经鞘瘤和孤立性纤维性肿瘤等鉴别^[13]。在实践中,有时垂体腺瘤或垂体 Rathke 囊肿等病变的送检标本中,可见以神经垂体组织为主体的送检标本,但垂体细胞增生的密度较低,仔细观察可见 Herring 小体,此外 NF 呈阳性,这些均有助于与垂体细胞瘤鉴别,并将注意力转移到寻找其它真正的病变上来。

与肿瘤的鉴别,前两者现在被认为是与垂体细胞瘤同源的肿瘤性病变,各自具有鲜明的组织学特点,如胞质丰富的多边形嗜酸性颗粒细胞和梭形嗜酸性细胞,不易混淆。此外,TTF-1在垂体细胞瘤中的表达易于将其同毛细胞星形细胞瘤、纤维性脑膜瘤、神经鞘瘤和孤立性纤维性肿瘤区别。我们认为室管膜样亚型垂体细胞瘤与室管膜瘤的鉴别诊断显得较为重要,后者是WHO II级的肿瘤,治疗方案及预后显著不同。两者具有相似的室管膜分化形态,如血管周菊形团结构及室管膜菊形团分化成分,GFAP弥漫阳性或多量瘤细胞EMA点状阳性。尽管有文献报道第三脑室的室管膜瘤也可表达TTF-1,但明确的鞍区垂体发生部位及伴有与经典型垂体细胞瘤或其它同源性肿瘤移行成分更支持垂体细胞瘤室管膜样亚型的诊断。

综上所述,本文报道的垂体细胞瘤不仅包括了经典的梭形细胞垂体细胞瘤,还有罕见的室管膜样亚型病例。结合文献复习,可注意到垂体细胞瘤具有比以往定义更广泛的形态学及免疫表型谱系,探讨其诊断及鉴别诊断有助于对该肿瘤的认识。

(本文中室管膜样亚型垂体细胞瘤经上海华山医院神经病理室汪寅教授会诊,特此致谢!)

参考文献:

- [1] Brat D J, Scheithauer B W, Fuller G N, *et al.* Newly codified glial neoplasms of the 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system: angiocentric glioma, pilomyxoid astrocytoma and pituitaryoma[J]. Brain Pathol, 2007,17(3):319–324.
- [2] Brat D J, Scheithauer B W, Staugaitis S M, *et al.* Pituitaryoma: a distinctive low-grade glioma of the neurohypophysis [J]. Am J Surg Pathol, 2000,24(3):362–368.
- [3] Takei Y, Seyama S, Pearl G S, *et al.* Ultrastructural study of the human neurohypophysis. II. Cellular elements of neural parench-

- ma, the pituitary cells[J]. Cell Tissue Res, 1980,205(2):273–287.
- [4] Lee E B, Tihan T, Scheithauer B W, *et al.* Thyroid transcription factor 1 expression in sellar tumors: a histogenetic marker? [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2009,68(5):482–488.
- [5] Mete O, Lopes M B, Asa S L. Spindle cell oncocytomas and granular cell tumors of the pituitary are variants of pituitaryoma [J]. Am J Surg Pathol, 2013,37(11):1694–1699.
- [6] Zygourakis C C, Rolston J D, Lee H S, *et al.* Pituitaryomas and spindle cell oncocytomas: modern case series from the University of California, San Francisco[J]. Pituitary, 2015,18(1):150–158.
- [7] Scheithauer B W, Swearingen B, Whyte E T, *et al.* Ependymoma of the sella turcica: a variant of pituitaryoma [J]. Hum Pathol, 2009,40(3):435–440.
- [8] Saeed Kamil Z, Sinson G, Gucer H, *et al.* TTF-1 expressing sellar neoplasm with ependymal rosettes and oncocytic change: mixed ependymal and oncocytic variant Pituitaryoma [J]. Endocr Pathol, 2014,25(4):436–438.
- [9] Yoshimoto T, Takahashi-Fujigasaki J, Inoshita N, *et al.* TTF-1-positive oncocytic sellar tumor with follicle formation/ependymal differentiation: non-adenomatous tumor capable of two different interpretations as a pituitaryoma or a spindle cell oncocytoma [J]. Brain Tumor Pathol, 2015,32(3):221–227.
- [10] Silverberg S G, Gardner W A, Sobin L H. The atlas of tumor pathology [M]. Washington DC: Armed Forces Institute Pathol, 2011:8–10.
- [11] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, *et al.* WHO classification of tumours of the central nervous system [M]. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2016:329–336.
- [12] Sahm F, Reuss D E, Giannini C. WHO 2016 classification: changes and advancements in the diagnosis of miscellaneous primary CNS tumours [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2017. doi: 10.1111/nan.12397. [Epub ahead of print].
- [13] 吴燕妮,何燕,李南云,吴波.鞍区垂体细胞瘤10例临床病理分析[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(6):662–665.

Clinicopathological study of pituitaryoma and its rare ependymal variant

SI Hai-peng¹, WANG Jian-rong¹, ZHANG Yi-fen¹, WANG Zhen², ZHANG Zhi-hong²

(¹Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China;

²Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Purpose To study the clinicopathological, immunophenotypic features of pituitaryoma and its rare ependymal variant with discussion of its diagnosis and differential diagnosis.

Methods 7 cases of pituitaryoma, including 6 conventional pituitaryomas and 1 ependymal variant tumor, were evaluated by HE staining and immunohistochemistry, and the relevant literatures were reviewed. **Results** Microscopically, the tumors

were composed of closely packed plump spindle cells arranged in short fascicle and storiform pattern in 6 conventional pituitaryomas, and whorl and papillary architecture with obvious perivascular rosette formation in the ependymal variant tumor. Immunohistochemically, all tumor cells were diffuse positive for S-100 and TTF-1, but negative for IDH1 R132H, Olig-2, CD34, NF, Syn, CgA, and pituitary hormones. Ki-67 proliferation index

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.011.html>

ER 拮抗剂对人子宫内膜样癌 JEC 细胞中 ER α 、ER β 、p57^{kip2} 表达的影响

刘蒙蒙^{1,2}, 袁 丹¹, 周正平³, 孙小杰¹, 刘俊江¹

摘要:目的 探讨雌激素受体(estrogen receptor, ER)拮抗剂对人子宫内膜样癌(endometrioid carcinoma, EC)JEC 细胞(中分化)中 ER 亚型 ER α 、ER β 及 p57^{kip2} 表达的影响。方法 分别用两种 ER 拮抗剂[他莫昔芬(Tamoxifen, TAM)(10^{-6} mol/L)、氟维司群(Faslodex, ICI182780)(10^{-6} mol/L)]及雌二醇(β -Estradiol, E₂)(10^{-6} mol/L)干扰 JEC 细胞,体外培养 24、48、72 h 后,MTT 法观察 JEC 细胞的生长曲线;光镜与电镜观察 JEC 细胞的形态变化;Western blot 法检测 JEC 细胞中 ER α 、ER β 及 p57^{kip2} 蛋白表达的变化。结果 MTT 结果显示,与对照组 JEC 细胞比较,E₂ 可明显促进 JEC 细胞增殖,ICI182780 则明显抑制 JEC 细胞的增殖($P < 0.05$);与 E₂ 组比较,E₂ + ICI182780 组 JEC 细胞增殖能力明显降低($P < 0.05$)。形态学改变:与对照组比较,E₂ 组细胞密度增大较明显,病理性核分裂象易见,ICI182780 组细胞密度减小较明显;与 E₂ 组比较,E₂ + TAM 组与 E₂ + ICI182780 组细胞密度均有所减小,核分裂象不易见。Western blot 结果显示:与对照组比较,E₂ 组 ER β 蛋白表达增高,p57^{kip2} 蛋白表达降低($P < 0.05$);ICI182780 组与 TAM 组 ER β 蛋白表达均降低,p57^{kip2} 蛋白表达均增高,但仅 ICI182780 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 E₂ 组比较,E₂ + ICI182780 组与 E₂ + TAM 组 ER β 蛋白表达均降低,p57^{kip2} 蛋白表达均增高,但仅 E₂ + ICI182780 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验各组及对照组 JEC 细胞中均无 ER α 蛋白表达。结论 JEC 细胞不表达 ER α 蛋白。ICI182780 有较强的拮抗雌激素的作用,可能通过下调 JEC 细胞中 ER β 蛋白表达,诱导 p57^{kip2} 蛋白的表达,发挥其阻滞细胞周期进程的作用,从而抑制肿瘤细胞生长;TAM 则对 JEC 细胞生长有较弱的雌激素样作用。联合检测 ER α 、ER β 、p57^{kip2} 蛋白在 EC 中的表达,对 EC 患者内分泌治疗的个体化选择有重要的参考价值。

关键词:子宫内膜癌;雌激素受体拮抗剂;ER α ;ER β ;p57^{kip2};TAM;ICI182780

中图分类号:R 737.33 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0288-07

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.011

在欧美等发达国家,子宫内膜癌是妇科最常见的恶性肿瘤,目前在发展中国家其发病率仅次于子宫颈癌,且发病率呈上升趋势。根据 WHO(2014)分类标准,子宫内膜癌组织学类型分为:子宫内膜样癌(endometrioid carcinoma, EC)、黏液性癌、浆

液性癌、透明细胞癌等,以 EC 最为多见。子宫内膜癌的发生、发展与女性内分泌调控密切相关,其中长期高水平雌激素刺激是其发生、发展的高危因素^[1]。ER 拮抗剂可与雌激素竞争 ER 的结合位点,从而消除 ER 介导的雌激素促进肿瘤细胞增殖的作用。他莫昔芬(Tamoxifen, TAM)是一种 ER 拮抗剂,被广泛应用于乳腺癌的内分泌治疗及预防,但长期使用有促进子宫内膜癌发生的危险^[2-3]。氟维司群(Faslodex, ICI182780)是另一种 ER 拮抗剂,目前发现只具有单纯拮抗雌激素作用^[4]。p57^{kip2} 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)中 Cip/Kip 家族的一员。研究发现^[5-6],p57^{kip2} 在很多肿瘤中低表达,被认为是一种抑癌基因,但本课题组前期研究发现^[7],p57^{kip2} 在

接受日期:2017-12-22

基金项目:贵州省社发攻关项目[黔科合 SY 字(2013)3011]、贵州省科技计划项目[黔科合基础(2017)1216]

作者单位:¹ 遵义医学院病理学教研室、³ 基础医学院电镜室,遵义 563003

² 滨州市人民医院病理科,滨州 256610

作者简介:刘蒙蒙,女,硕士研究生。E-mail:916494973@qq.com

周正平,女,硕士,教授,硕士生导师,通讯作者。E-mail:zhouzp66@163.com

was less than 2% in all cases. GFAP and EMA were only focally positive in conventional pituitaryomas, whereas GFAP was diffuse positive in ependymal variant tumor with EMA dot-like staining in more than half of tumor cells. **Conclusion** Pituitaryoma is a rare low grade glioma derived from neurohypophysis. To study

helps recognition of extending morphological spectrum of pituitaryoma and its new variant, which is important for its differential diagnosis consideration and clinical therapy.

Key words: pituitaryoma; ependymal; immunophenotype; diagnosis; differential

子宫内膜癌中的表达与其他肿瘤不完全一致,考虑与雌激素调控有关。本实验拟通过对体外培养的人 EC 细胞(细胞株)进行雌激素及其受体拮抗剂等药物干扰,用 MTT 法观察细胞的生长曲线,用光镜及电镜观察细胞的形态变化,用 Western blot 法检测细胞中 ER α 、ER β 及 p57^{kip2} 蛋白的表达水平,以探讨 ER 拮抗剂参与细胞周期调控,以及与 EC 发生、发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人 EC 中分化 JEC 细胞株(遵义医学院微生物教研室提供), E₂ (北京华迈科公司), TAM (美国 Sigma-Aldrich 公司), ICI182780 (美国 Sigma-Aldrich 公司), MTT 试剂(北京 Solarbio 公司), ER α 、ER β 鼠抗人单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), p57^{kip2} 兔抗人单克隆抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 仪器 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 科技公司,倒置显微镜(CKX41SF)购自日本 OLYMPUS 公司,透射电子显微镜(H-7650)购自日本日立公司,超薄切片机(EM UC6)购自德国 Leica 公司, Western blot 相关仪器购自 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 用 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清),在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件的培养箱中体外培养 JEC 细胞,取对数生长期的细胞进行药物处理。

1.3.2 药物分组 实验组:含有 E₂ (10⁻⁶ mol/L)、TAM (10⁻⁶ mol/L)、ICI182780 (10⁻⁶ mol/L)、E₂ (10⁻⁶ mol/L) + TAM (10⁻⁶ mol/L)、E₂ (10⁻⁶ mol/L) + ICI182780 (10⁻⁶ mol/L) 的培养基进行细胞培养;对照组:用等量不含任何药物的培养基进行细胞培养。

1.3.3 MTT 法观察细胞的生长曲线 将对数生长期的 JEC 细胞制成浓度为 5 × 10⁴ 个每毫升的单细胞悬液,接种于 96 孔板,设空白组(只含培养基)、实验组与对照组,每组 5 个复孔,培养 24、48、72、96 h 后 PBS 冲洗各孔,每孔加入 20 μ L MTT,4 h 后吸尽 MTT 再于各孔加入 100 μ L 二甲基亚砷(DMSO),用酶标仪检测 JEC 细胞在 490 nm 波长处的吸光度值(OD 值)。实验重复 3 次。

1.3.4 倒置显微镜观察细胞的生长情况 6 孔板培养 JEC 细胞,设实验组与对照组,每组 3 个复孔,培养 24、48、72 h 后在倒置显微镜下观察细胞的生长情况,实验重复 3 次。

1.3.5 透射电镜观察细胞的超微结构 各组 JEC 细胞分别培养,通过酶消化、离心成细胞团,加入固定液固定,经脱水、浸透、包埋聚合,用超薄切片机进行超薄切片、电子染色后,在透射电镜下进行观察。

1.3.6 Western blot 法检测细胞中 ER α 、ER β 及 p57^{kip2} 蛋白的表达 将实验组与对照组细胞培养 24、48、72 h 后,分别提取细胞总蛋白备用。根据目的蛋白的分子量大小,按照配胶说明书配制相应的分离胶与浓缩胶。在细胞蛋白样品中加入蛋白上样缓冲液(比例为 4 : 1),沸水煮沸 5 min。将制备好的样品加至浓缩胶各加样孔后在 80 V 电压下电泳,约 15 min 后,待样品跑过浓缩胶,将电压切换至 120 V 电泳 1 h。按照目的蛋白分子量切下目的区域的分离胶后转膜,5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h。加入对应的一抗单克隆抗体稀释液 4 ℃ 摇床过夜。TBST 洗膜 3 次,放入荧光二抗单克隆抗体稀释液中室温避光孵育 2 h, TBST 洗膜,曝光。

1.4 统计学分析 实验数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,运用单因素方差分析进行数据处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,双随机变量采用相关性分析及线性回归分析,按照 $\alpha = 0.05$ 的检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法观察 JEC 细胞的生长曲线 相同作用时间比较:与对照组比较,在 48、72、96 h, E₂ 组 JEC 细胞增殖能力增强, ICI182780 组 JEC 细胞增殖能力降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TAM 组 JEC 细胞增殖能力增强,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 E₂ 组比较,在 48、72、96 h, E₂ + ICI182780 组 JEC 细胞增殖能力降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), E₂ + TAM 组 JEC 细胞增殖能力降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。相同药物分组比较:随着药物作用时间的延长,对照组与实验各组 JEC 细胞增殖能力均逐渐增强,其中各组作用 24、48、72 h 之间比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 倒置显微镜观察 JEC 细胞的生长情况 培养 72 h 后,对照组 JEC 细胞呈多边形、长梭形、不规则形,局部细胞围成腺腔样结构。随着培养时间的延长,对照组细胞密度逐渐增大,且伴少量细胞凋亡。与对照组比较, E₂ 组细胞密度增大, ICI182780 组细胞密度减小,其他各组细胞密度变化不明显;与 E₂ 组比较, E₂ + TAM 组与 E₂ + ICI182780 组细胞密度均减小;各组细胞形态变化不明显(图 1)。

表1 JEC 细胞实验各组与对照组 24、48、72、96 h 的生长率(%)

药物分组	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	10.52 ± 2.31	17.23 ± 1.20	29.92 ± 2.05	30.50 ± 1.01
E ₂ 组 [▲]	10.34 ± 1.57	20.41 ± 1.85	33.21 ± 1.69	33.14 ± 0.91
TAM 组	11.08 ± 1.79	17.37 ± 2.20	31.43 ± 1.45	31.53 ± 0.64
ICI182780 组 [▲]	10.91 ± 1.41	14.05 ± 0.89	26.95 ± 0.35	26.93 ± 1.08
E ₂ + TAM 组	11.10 ± 2.16	17.73 ± 2.13	31.37 ± 1.87	31.83 ± 0.58
E ₂ + ICI182780 组 [★]	10.85 ± 2.62	15.74 ± 1.67	30.09 ± 1.82	29.80 ± 1.12

在 48、72、96 h 与对照组比较, [▲]*P* < 0.05, 在 48、72、96 h 与 E₂ 组比较, [★]*P* < 0.05

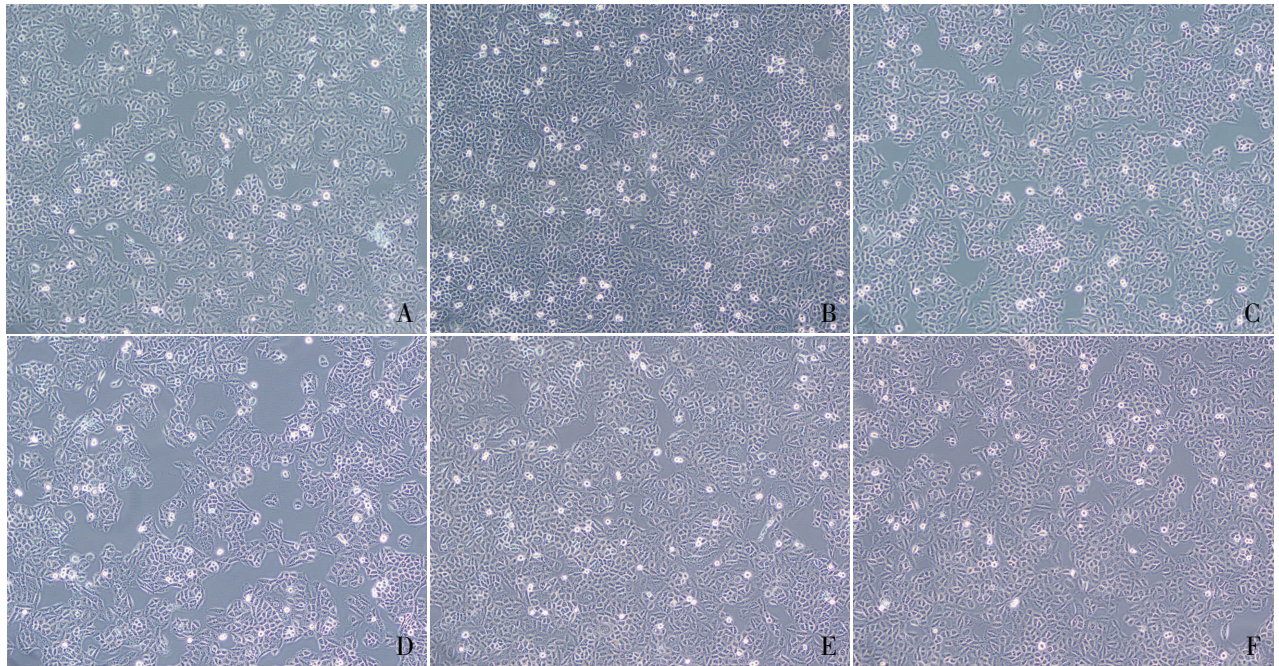


图1 JEC 细胞实验各组与对照组 72 h 生长情况:A. 对照组;B. E₂ 组;C. TAM 组;D. ICI182780 组;E. E₂ + TAM 组;F. E₂ + ICI182780 组

2.3 透射电镜下观察 JEC 细胞的超微结构变化
培养 72 h 后,对照组 JEC 细胞呈圆形或椭圆形,表面有微绒毛,胞质中可见线粒体、内质网、高尔基复合体等细胞器,还可见次级溶酶体,分泌泡不明显,偶见脂滴;核呈不规则形,核仁明显。与对照组比较,E₂ 组细胞病理性核分裂象易见;ICI182780 组部分细胞自噬现象明显。与 E₂ 组比较,E₂ + TAM 组与 E₂ + ICI182780 组细胞病理性核分裂象少见(图 2)。

2.4 Western blot 法检测 JEC 细胞中 ERα、ERβ、p57^{kip2} 蛋白的表达

2.4.1 各组 JEC 细胞中 ERα 蛋白的表达 实验各组与对照组 JEC 细胞中均无 ERα 蛋白的表达(表 2,图 3~5)。

2.4.2 各组 JEC 细胞中 ERβ 蛋白的表达 相同作用时间比较:与对照组比较,ERβ 蛋白在 E₂ 组表达增加,在 TAM 组与 ICI182780 组表达均减少,且 ICI182780 组减少更加明显,但仅在 48、72 h E₂ 组与 ICI182780 组分别与对照组之间表达比较,在 72 h

TAM 组与对照组之间表达比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05,表 2,图 3~5)。与 E₂ 组比较,ERβ 蛋白在 E₂ + TAM 组与 E₂ + ICI182780 组表达均减少,且 E₂ + ICI182780 组减少更明显,两组分别在 48、72 h 与 E₂ 组之间表达比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

相同药物分组比较:随着药物作用时间的延长,ERβ 蛋白在 E₂ 组表达增加,在 TAM 组与 ICI182780 组表达减少,但仅 E₂ 组在 24 h 与 72 h 之间表达比较,TAM 组在 24 h 分别与 48、72 h 之间表达比较,ICI182780 组在 24 h 与 72 h 之间表达比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05,表 2,图 3~5)。

2.4.3 各组 JEC 细胞中 p57^{kip2} 蛋白的表达 相同作用时间比较:与对照组比较,p57^{kip2} 蛋白在 E₂ 组表达减少,在 TAM 组与 ICI182780 组表达增加,且 ICI182780 组增加更明显。但仅在 48、72 h E₂ 组与 ICI182780 组之间表达比较,在 72 h TAM 组与对照组之间表达比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05,表 2,图 3~5)。与 E₂ 组比较,p57^{kip2} 蛋白在 E₂ + TAM

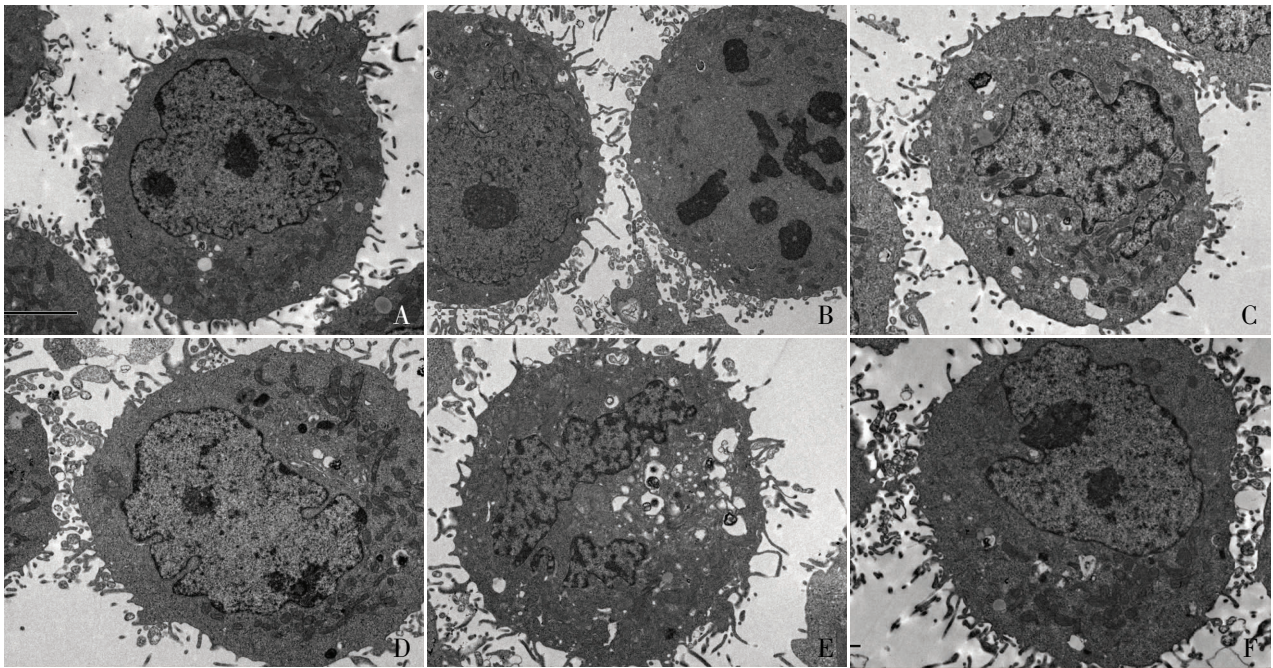


图2 JEC 细胞实验各组与对照组 72 h 超微结构 (bar = 5.0 μm): A. 对照组; B. E₂ 组; C. TAM 组; D. ICI182780 组; E. E₂ + TAM 组; F. E₂ + ICI182780 组

组与 E₂ + ICI182780 组表达均增加, 且 E₂ + ICI182780 组增加更明显, 两组分别在 48、72 h 与 E₂ 组之间表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

相同药物分组比较: 随着药物作用时间的延长, p57^{kip2} 蛋白在 E₂ 组表达减少, 在 TAM 组与 ICI182780 组表达增加, 但仅 E₂ 组在 24 h 分别与 48、72 h 之间表达比较, TAM 组在 72 h 分别与 24、48 h 之间表达比较, ICI182780 组在 24 h 分别与 48、72 h 的表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2, 图 3 ~ 5)。

2.4.4 ER 拮抗剂干扰后 JEC 细胞中 ERβ、p57^{kip2} 蛋白表达的相关性分析 (1) TAM 干扰后: Pearson 相关性分析结果显示, ERβ、p57^{kip2} 蛋白表达之间呈负相关关系 ($r = -0.507, P = 0.032$)。根据线性回归分析, 按 $\alpha = 0.05$ 检验水准, 可以认为 ERβ 与 p57^{kip2} 蛋白表达之间有线性回归关系 ($t = -2.353, P = 0.032$)。回归方程式为: $\hat{Y} = 0.211 - 1.216X$ 。(2) ICI182780 干扰后: 根据 Pearson 相关性分析结果显示, ERβ、p57^{kip2} 蛋白表达之间呈负相关 ($r = -0.737, P < 0.001$)。根据线性回归分析结果显示, ERβ 与 p57^{kip2} 蛋白表达之间有线性回归关系 ($t = -4.365, P < 0.001$), 回归方程式为: $\hat{Y} = 0.237 - 1.791X$ 。

表2 JEC 细胞实验各组与对照组 24、48、72 h ERα、ERβ 和 p57^{kip2} 蛋白的表达

分组	ERβ	p57 ^{kip2}	ERα
24 h			
对照组	4.37 ± 0.23	15.73 ± 0.92	—
E ₂ 组	4.68 ± 1.24	14.61 ± 1.04 [*]	—
TAM 组	4.40 ± 0.44 [#]	15.86 ± 0.69	—
ICI182780 组	4.18 ± 0.37 [●]	16.52 ± 0.33 ^{&}	—
E ₂ + TAM 组	4.60 ± 0.35	14.96 ± 2.07	—
E ₂ + ICI182780 组	4.21 ± 0.51	15.80 ± 2.18	—
48 h			
对照组	4.32 ± 0.40	15.45 ± 0.78	—
E ₂ 组 [▲]	5.90 ± 0.53	13.01 ± 0.19	—
TAM 组	3.73 ± 0.12	16.12 ± 1.06	—
ICI182780 组 [▲]	3.50 ± 0.35	18.07 ± 0.40	—
E ₂ + TAM 组 [*]	4.57 ± 0.17	15.18 ± 0.64	—
E ₂ + ICI182780 组 [*]	4.32 ± 0.61	16.85 ± 0.37	—
72 h			
对照组	4.37 ± 0.45	15.40 ± 1.16	—
E ₂ 组 [◆]	6.25 ± 0.79 [▼]	12.65 ± 0.77	—
TAM 组 [◆]	3.48 ± 0.36	17.90 ± 0.55 [△]	—
ICI182780 组 [◆]	3.17 ± 0.41	18.38 ± 0.64	—
E ₂ + TAM 组 [◇]	5.07 ± 0.15	15.52 ± 1.41	—
E ₂ + ICI182780 组 [◇]	4.25 ± 0.47	17.03 ± 0.62	—

▲与 48 h 对照组比较, ◆与 72 h 对照组比较, *与 48 h E₂ 组比较, ◇与 72 h E₂ 组比较, ▼与 24 h E₂ 组比较, #与 48 h、72 h TAM 组比较, ●与 72 h ICI182780 组比较, *与 48 h、72 h E₂ 组比较, △与 24 h、48 h TAM 组比较, &与 48、72 h ICI182780 组比较, $P < 0.05$

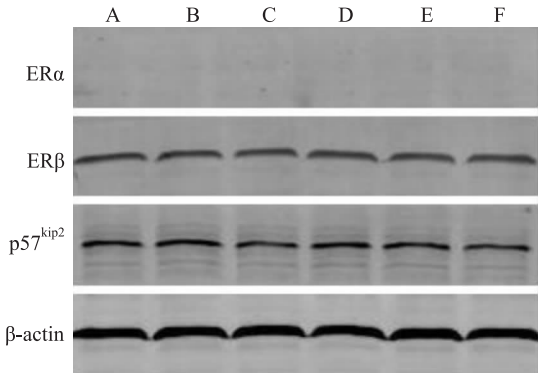


图3 Western blot 法检测各组 JEC 细胞 24 h 时 ERα、ERβ、p57^{kip2} 蛋白的表达

A. 对照组; B. E₂ 组; C. TAM 组; D. ICI182780 组; E. E₂ + TAM 组; F. E₂ + ICI182780 组

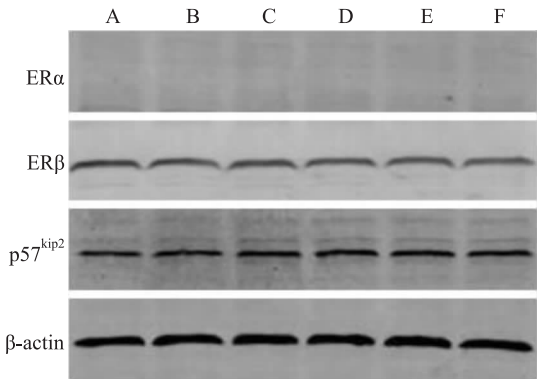


图4 Western blot 法检测各组 JEC 细胞 48 h 时 ERα、ERβ、p57^{kip2} 蛋白的表达

A. 对照组; B. E₂ 组; C. TAM 组; D. ICI182780 组; E. E₂ + TAM 组; F. E₂ + ICI182780 组

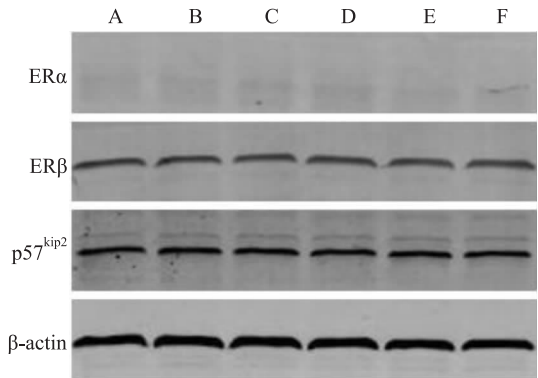


图5 Western blot 法检测各组 JEC 细胞 72 h 时 ERα、ERβ、p57^{kip2} 蛋白的表达

A. 对照组; B. E₂ 组; C. TAM 组; D. ICI182780 组; E. E₂ + TAM 组; F. E₂ + ICI182780 组

3 讨论

长期高水平的雌激素刺激是子宫内膜癌发生的

高危因素之一,雌激素主要通过 ER 结合形成激素-受体复合物调节基因的转录,从而促进子宫内膜细胞增殖^[8]。使用 ER 拮抗剂可以下调 ER 水平,拮抗雌激素作用。研究发现,TAM 在有效抑制乳腺癌细胞增殖的过程中,可导致子宫内膜癌的发生,推测 TAM 可能具有拮抗雌激素与激动雌激素双重效应,在子宫内膜组织中可发挥弱雌激素样作用^[9]。目前研究发现,ICI182780 可有效抑制对 TAM 耐药的激素依赖性乳腺癌细胞的生长,还可抑制子宫内膜癌细胞的增殖,但尚未发现其有雌激素样作用^[10-11]。本实验结果显示,与对照组比较,E₂ 可明显促进 JEC 细胞的增殖,细胞中病理性核分裂象易见,TAM 对 JEC 细胞增殖有较弱的促进作用,ICI182780 则可明显抑制 JEC 细胞的增殖;与 E₂ 组比较,TAM 与 ICI182780 可拮抗 E₂ 对 JEC 细胞增殖的促进作用,且 ICI182780 的拮抗作用更加明显,E₂ + TAM 组与 E₂ + ICI182780 组细胞中病理性核分裂象不易见。这提示在 JEC 细胞中,ICI182780 比 TAM 拮抗雌激素的作用更强,可明显抑制肿瘤细胞增殖;TAM 在发挥 ER 拮抗剂作用的同时,还具有弱雌激素作用,从而促进肿瘤细胞一定程度的增殖。

在哺乳动物中发现的 ER 受体亚型主要包括 ERα 和 ERβ,两者结构相似,功能上有一定差异。有研究发现,ERα 与 E₂ 结合后其转录活性被激活,可促进肿瘤细胞的增殖,与 ER 拮抗剂结合后则失去转录活性,从而无法介导雌激素的促增殖作用;ERβ 与 ERα 相反,与 E₂ 结合后不能激活转录,与 TAM 结合后可激活转录;但也有研究表明,ERβ 在无 ERα 表达的情况下可促进乳腺癌细胞的增殖和转移^[12-13]。Zhang 等^[14] 研究认为,ERα 是 TAM 与 ICI182780 发挥雌激素拮抗作用的关键受体。但 Niu 等^[15] 的研究则发现,ERβ 阳性表达可增强乳腺癌细胞对 TAM 的敏感性。还有研究认为,ERα 在子宫内膜癌中的表达低于正常子宫内膜组织中的表达,ERα/ERβ 的比值降低与子宫内膜癌的转移有关^[16-17]。因此,ER 在子宫内膜癌细胞中的表达及功能与在其他肿瘤细胞中并不完全一致,且 ERα、ERβ 在肿瘤中的作用仍有争议,可能与 ERα、ERβ 两种受体亚型在肿瘤中的不同表达有关,也可能存在未知因素影响 ER 在子宫内膜癌中的作用。本实验结果显示,E₂ 组 JEC 细胞中 ERβ 蛋白表达增高,TAM 组与 ICI182780 组则 ERβ 蛋白表达降低,以 ICI182780 组作用更明显;与单纯 E₂ 组比较,E₂ + TAM 组、E₂ + ICI182780 组 ERβ 蛋白表达均降低,

但 E_2 + ICI182780 组作用更明显;对照组及实验各组 JEC 细胞均无 $ER\alpha$ 蛋白表达。提示,在 JEC 细胞中 TAM 与 ICI182780 可下调 $ER\beta$ 蛋白表达,并可拮抗 E_2 上调 $ER\beta$ 蛋白表达的作用,且 ICI182780 的作用更强;JEC 细胞为 $ER\alpha$ 蛋白表达缺失的细胞株, TAM 与 ICI182780 干扰刺激均不能诱导其表达。

$p57^{kip2}$ 主要在 G_1 -S 期发挥负向调控细胞周期的作用。许多研究发现^[5,18-19], $p57^{kip2}$ 在肝癌、乳腺癌、前列腺癌等许多肿瘤组织中的表达低于对应正常组织, $p57^{kip2}$ 表达增高则可抑制肿瘤细胞的增殖。因此推测, $p57^{kip2}$ 是重要的肿瘤抑制基因之一。 $p27^{kip1}$ 与 $p57^{kip2}$ 同属于 CKI 中的 Cip/Kip 家族,研究显示,在卵巢癌细胞中, TAM、ICI182780 可通过阻滞 ER 的功能,使细胞中 $p27^{kip1}$ 稳定表达,以达到阻滞细胞周期的作用^[20]。本课题组前期研究发现, $p57^{kip2}$ 在子宫内膜癌组织中的表达低于在子宫内膜正常组织分泌期中的表达,高于在正常组织增生期中的表达^[7],与 Kim 等^[21]的研究结果相近,与在其他肿瘤组织中的表达情况不完全相同,考虑 $p57^{kip2}$ 在子宫内膜癌中的异常表达受到女性激素的调控。本实验结果显示,与对照组比较, E_2 组 JEC 细胞中 $p57^{kip2}$ 蛋白表达降低, TAM 组与 ICI182780 组细胞中 $p57^{kip2}$ 蛋白表达增高,且 ICI182780 组作用更明显;与 E_2 组比较, E_2 + TAM 组、 E_2 + ICI182780 组 $p57^{kip2}$ 蛋白表达增高,其中 E_2 + ICI182780 组作用更明显。提示 TAM 与 ICI182780 可上调 JEC 细胞中 $p57^{kip2}$ 蛋白的表达,并可拮抗 E_2 下调 $p57^{kip2}$ 蛋白表达的作用,且以 ICI182780 的作用更强。

本实验结果显示,在 JEC 细胞中,雌激素可上调 $ER\beta$ 蛋白、下调 $p57^{kip2}$ 蛋白的表达,促进细胞生长, ICI182780 与 TAM 均可拮抗雌激素的作用,但以 ICI182780 的作用更强。 ICI182780 可明显下调 $ER\beta$ 蛋白、并上调 $p57^{kip2}$ 蛋白在 JEC 细胞中的表达,且两者表达之间呈负相关,推测 ICI182780 可通过下调 JEC 细胞中 $ER\beta$ 蛋白的表达,诱导 $p57^{kip2}$ 蛋白表达,发挥其阻滞细胞周期进程的调控作用,从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的。 TAM 对雌激素的拮抗作用较弱,并对 JEC 细胞的生长有较弱的促进作用,提示 TAM 在 JEC 细胞中发挥 ER 拮抗剂作用的同时,也具有较弱的雌激素样促细胞生长的作用。因此推测, ICI182780 比 TAM 更适合用于 $ER\alpha$ 蛋白不表达的 EC 患者的内分泌治疗;联合检测 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $p57^{kip2}$ 蛋白在 EC 中的表达,对 EC 患者内分泌治疗的个体化选择有重要参考价值。

参考文献:

- [1] Rutkowska A Z, Szybiak A, Serkies K, Rachon D. Endocrine disrupting chemicals as potential risk factor for estrogen-dependent cancers[J]. Pol Arch Med Wewn, 2016,126(7-8):562-570.
- [2] Jack C, Ivana S, Simon C, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial[J]. Lancet Oncol, 2015,16(1):67-75.
- [3] Zhang L, Li Y, Lan L, et al. Tamoxifen has a proliferative effect in endometrial carcinoma mediated via the GPER/EGFR/ERK/cyclin D1 pathway: a retrospective study and an in vitro study [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016,437:51-61.
- [4] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015 版)[J]. 中国癌症杂志, 2015,25(9):692-754.
- [5] Yang C, Nan H, Ma J, et al. High Skp2/Low $p57^{kip2}$ expression is associated with poor prognosis in human breast carcinoma[J]. Breast Cancer(Auckl), 2015,9(Suppl 1):13-21.
- [6] Guo H, Li Y, Tian T, et al. The role of cytoplasmic p57 in invasion of hepatocellular carcinoma[J]. BMC Gastroenterol, 2015,15:104.
- [7] 罗祖强,周正平,格桑志玛,等. 子宫内膜癌及不同子宫内膜病变组织中 $p57^{kip2}$ 、ER、PR 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013,29(9):982-985.
- [8] Zhu Y, Shen J, Gao L, et al. Estrogen promotes fat mass and obesity-associated protein nuclear localization and enhances endometrial cancer cell proliferation via the mTOR signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016,35(4):2391-2397.
- [9] Du G Q, Zhou L, Chen X Y, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative and invasive effects induced by hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012,420(2):343-349.
- [10] Keenen M M, Kim S. Tumor suppressor ING4 inhibits estrogen receptor activity in breast cancer cells[J]. Breast Cancer (Dove Med Press), 2016,8:211-221.
- [11] Ertija N, Domingo M, Dosil M A. Combinatorial therapy using dovitinib and ICI182.780 (fulvestrant) blocks tumoral activity of endometrial cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2014,13(4):776-787.
- [12] Murphy L C, Watson P H. Is oestrogen receptor-beta a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? [J]. Endocr Relat Cancer, 2006,13(2):327-334.
- [13] 查中青,元敏,吴巧胜,等. 雌激素受体 β 表达对于乳腺癌细胞生长特性及内分泌治疗的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013,23(31):18-22.
- [14] Zhang X, Wang Z Y. Estrogen receptor- α variant, ER- $\alpha 36$, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity[J]. Endocrinology, 2013,154(6):1990-1998.
- [15] Niu X L, Wang Y, Yao Z, et al. Autocrine interferon- γ may affect malignant behavior and sensitivity to tamoxifen of MCF-7 via estrogen receptor β subtype [J]. Oncol Rep, 2015,34(6):3120-3130.

- [16] Kreizman-Shefer H, Pricop J, Goldman S, *et al.* Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2014,9:77.
- [17] Mylonas I. Prognostic significance and clinical importance of estrogen receptor alpha and beta in human endometrioid adenocarcinomas [J]. *Oncol Rep*, 2010,24(2):385–393.
- [18] Hu T, Guo H, Wang W, *et al.* Loss of p57 expression and RhoA overexpression are associated with poor survival of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013,30(4):1707–1714.
- [19] Mishra S, Lin C L, Huang T H, *et al.* MicroRNA-21 inhibits p57^{kip2} expression in prostate cancer[J]. *Mol Cancer*, 2014,13(1):212.
- [20] Simpkins F, Garcia-Soto A, Slingerland J. New insights on the role of hormonal therapy in ovarian cancer[J]. *Steroids*, 2013,78(6):530–537.
- [21] Kim S T, Lee S K, Gye M C. Cyclic changes in the expression of p57(kip2) in human endometrium and its regulation by steroid-hormones in endometrial stromal cells in vitro[J]. *Reprod Sci*, 2012,19(1):92–101.

Effects of estrogen receptor antagonist on the expressions of ER α , ER β and p57^{kip2} in JEC cells of human endometrial carcinoma

LIU Meng-meng^{1,2}, YUAN Dan¹, ZHOU Zheng-ping³, SUN Xiao-jie¹, LIU Jun-jiang¹

(¹Department of Pathology, ³Electron Microscope Laboratory of Basic Medical College, Zunyi Medical

University, Zunyi 563003, China; ²Department of Pathology, Binzhou People's Hospital, Binzhou 256610, China)

ABSTRACT Purpose To explore the effects of estrogen receptor antagonist on the expression of estrogen receptor subtype (ER α , ER β), and p57^{kip2} protein in human endometrioid carcinoma cells named JEC. **Methods** The JEC cells (moderately differentiated EC cells) cultured in vitro were treated with β -Estradiol (E₂) (10⁻⁶ mol/L) and two types of estrogen receptor antagonists, tamoxifen (TAM) and fulvestrant (ICI182780) (10⁻⁶ mol/L). After 24, 48, 72 h, MTT was used to detect the growth condition of JEC cells, and the light microscopy and electron microscopy were used to observe the growth condition and morphological changes of cells, Western blot was used to detect the expression of ER α , ER β , PR-A, PR-B and p57^{kip2} protein in JEC cells. **Results** MTT results: Compared with the control group, E₂ could promote the proliferation of JEC cells significantly ($P < 0.05$), and ICI182780 could inhibit the proliferation of JEC cells obviously ($P < 0.05$). Compared with the E₂ group, the proliferation ability of JEC cells in E₂ + ICI182780 group were lower ($P < 0.05$). Morphological change: Compared with the control group, the cells density of E₂ group increased obviously, and the pathologic mitosis was easy to seen in some cells. The cells density decreased obviously in ICI182780 group. Compared with E₂ group, the cells density of E₂ + TAM group and E₂ + ICI182780 group were decreased, and pathological mitotic figures were difficult to seen. Western blot results;

Compared with the control group, the expression of ER β protein increased, and the expression of p57^{kip2} protein decreased in E₂ group ($P < 0.05$). The expression of ER β protein decreased, and the expression of p57^{kip2} protein increased in ICI182780 group and TAM group, and the difference was statistically significant between ICI182780 group and control group ($P < 0.05$). Compared with the E₂ group, the expression of ER β protein decreased, and the expression of p57^{kip2} protein increased in E₂ + ICI182780 group and E₂ + TAM group, and the difference was statistically significant between E₂ + ICI182780 group and E₂ group ($P < 0.05$). ER α protein of JEC cells did not expressed in experimental group or control group. **Conclusion** ER α protein are not expressed in JEC cells. ICI182780 have a stronger role in antagonizing estrogen, and may induce the expression of p57^{kip2} protein by down-regulating the expression of ER β protein in JEC cells, block the cell cycle progression and inhibit the growth of tumor cells. TAM has a weaker estrogen like effect on the growth of JEC cells. It is possible that combined detection of the expression of ER α and p57^{kip2} protein in EC has an important reference value for individualized selection of endocrine therapy for EC patients.

Key words: endometrial carcinoma; estrogen receptor antagonist; ER α ; ER β ; p57^{kip2}; TAM; ICI182780



欢迎投稿, 欢迎订阅。

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.012.html>

卡波西型血管内皮瘤 29 例临床病理分析

张雷¹, 魏建国², 侯梦¹, 孔令非¹

摘要:目的 探讨卡波西型血管内皮瘤(Kaposiform hemangioendothelioma, KHE)的临床病理学特征、诊断及鉴别诊断。**方法**

对 29 例 KHE 的组织病理学特征和免疫表型进行观察,结合临床资料进行分析,并复习相关文献。**结果** 29 例 KHE 中,男性 15 例,女性 14 例,除 1 例患者年龄 25 岁外,其余均 < 1 岁;发生于浅表皮肤 28 例,包括四肢 15 例、头颈部 5 例、躯干 4 例、腋窝 1 例、多部位同时累及 3 例,盆腔内 1 例。临床表现为局限或弥漫的皮肤无痛性斑块,其中 16 例伴卡梅现象。镜下肿瘤由增生的小血管和梭形细胞构成,呈不规则结节状或分叶状分布,浸润性生长,梭形细胞呈束状排列,并见上皮样细胞和梭形细胞排列成巢,似肾小球样结构,后者边缘有月牙状血管裂隙形成。免疫表型:瘤细胞 VEGFR-3、CD31、CD34、ERG 强阳性,部分细胞 SMA 和 D2-40 阳性,Glut-1 和 HHV8 恒定阴性,上皮样细胞 CK 阴性。**结论** KHE 是一种罕见的好发于婴幼儿和年轻成人的中间型局部侵袭性血管源性肿瘤,诊断主要靠病理组织学及免疫组化标记,须与簇状血管瘤、婴儿血管瘤、先天性血管瘤、梭形细胞血管瘤、疣状静脉曲张和卡波西肉瘤等鉴别,肿瘤扩大切除是治疗 KHE 的最佳手段。

关键词:卡波西型血管内皮瘤;卡梅现象;临床病理

中图分类号:R 732.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0295-05

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.012

卡波西型血管内皮瘤(Kaposiform hemangioendothelioma, KHE)是一种组织形态兼具毛细血管瘤及卡波西肉瘤样形态且具有局部侵袭性的血管肿瘤,好发于儿童和婴幼儿,常与卡梅现象(Kasabach-Merritt phenomenon, KMP)相关。KHE 较少见,迄今为止国内外文献多为个案报道,本文对手术切除的 29 例 KHE 的临床表现、组织形态、免疫表型、治疗及预后综合分析,重点探讨其病理诊断及鉴别诊断。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2013 年 11 月~2017 年 6 月经河南省人民医院病理科诊断的 29 例 KHE,病理切片均重新复习,病理诊断均经两位病理专家会诊确认。临床资料均来自本单位的电子病历,全面复习 29 例 KHE 患者的临床病理资料,并对其进行随访。

1.2 试剂与方法 所有标本均经 10% 中性福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μ m 厚切片,HE 染色,光镜下观察。免疫组化染色采用 EnVision 两步

法,DAB 显色。所用抗体包括 VEGFR-3、CD31、CD34、ERG、Factor VIII-Rag、Fli-1、SMA、Glut-1、HHV8、CK(AE1/AE3)、SMA、D2-40 及 Ki-67,均购自福州迈新公司。试验过程严格按照试剂说明书步骤完成,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

2 结果

2.1 临床特征 29 例中男性 15 例,女性 14 例。除 1 例年龄为 25 岁外,其余均 < 1 岁,其中最小者仅 21 天。除 1 例位于盆腔内之外,其余 28 例肿瘤均位于皮下,表现为周界不清的孤立或多结节状蓝紫色斑块,平均大小 4.6 cm(3.5~12.5 cm)。10 例患者肿瘤周边皮肤可见散在的出血点或瘀斑。发生部位为下肢 8 例,上肢 7 例,头颈部 5 例,躯干 4 例,腋窝 1 例,盆腔 1 例;其余 3 例则表现为多部位同时受累的弥漫性病变:1 例累及右腹壁、右腹股沟及会阴区,1 例累及左下腹壁、左腹股沟及左大腿,另 1 例累及左肩部、左上臂及左背部。29 例患者中,包括发生于盆腔者共 16 例就诊时伴有 KMP。

2.2 镜检 发生于不同部位的肿瘤镜下表现大致相同,均呈弥漫性多结节状浸润性生长模式,血管瘤样结节之间为多少不等的纤维组织间隔(图 1)。血管瘤样结节由卵圆形或短梭形细胞纵横交错而成,其间见含有多量红细胞碎片的裂隙状腔隙和大小不一的毛细血管,结节的周边可见分化成熟的毛细血管。本组 29 例中,有 7 例于结节的周边可见明显扩

接受日期:2018-01-26

基金项目:河南省科技厅重大科技项目(161100311400)

作者单位:¹ 河南省人民医院病理科,郑州 450003

² 浙江省绍兴市人民医院病理科,绍兴 312000

作者简介:张雷,男,硕士,副主任医师。E-mail: zl742006@163.com

孔令非,男,主任医师,教授,通讯作者。E-mail: lfkong9@163.com

张的淋巴管形成(图2)。所有病例均可见由圆形、上皮样或梭形细胞组成的巢状结构,其一侧为裂隙状或新月形血管腔形成的包曼囊状结构,似肾小球(图3)。结节内总见散在的小淋巴细胞浸润。瘤细胞异型性不大,核呈卵圆形或短梭形,部分核型不规则,核染色质细腻,可见小核仁,核分裂象不明显(图4)。部分病例在血管瘤样结节腔隙内可见纤维素性血栓(图5)及含铁血黄素沉着(图6)。

2.3 免疫表型 肿瘤细胞均弥漫表达 VEGFR-3、ERG(图7)、CD31(图8)、CD34 及 Fli-1,而 Factor VIII-Rag 阴性或仅灶性表达。13 例于肿瘤结节的周边灶性表达 D2-40,提示存在淋巴管分化;11 例灶性表达 SMA,提示存在血管周皮细胞分化。所有病例 Glut-1 和 HHV8 均为阴性。Ki-67 增殖指数 3% ~ 20%,平均为 6%。

2.4 随访及预后 29 例患者均行肿瘤扩大手术切除,伴 KMP 患者根据具体生化指标同时行糖皮质激素及免疫抑制剂联合治疗。共有 21 例患者得到随访资料,随访时间 2 ~ 30 个月。其中 6 例术后复发病例均位于肢体浅表部位,且均同时伴有 KMP;复发距手术间隔时间 4 ~ 23 个月不等,平均为 14.5 个

月。6 例复发病例中有 4 例再次行肿瘤扩大切除术,另外 2 例因肿瘤较弥漫而行糖皮质激素及免疫抑制剂联合治疗,目前均生存。

3 讨论

KHE 最初由 Niedt 等^[1]描述为具有卡波西肉瘤样特征的血管瘤,随后 Tsang 和 Chan^[2]将其更名为卡波西样血管内皮瘤,1993 年 Zukerberg 等^[3]将其命名为 KHE 并被 WHO(2002)所采用。WHO(2013)软组织及骨肿瘤分类将其定义为具有局部侵袭性的血管肿瘤,常与 KMP 相关,兼具毛细血管瘤和卡波西肉瘤的形态学特征。

3.1 临床特征 KHE 几乎均发生于儿童,成人罕见;高达 50% 以上病例发生于 1 岁以内。男性较女性稍多见。50% ~ 70% 的 KHE 发生于四肢及躯干,其次为腹膜后、腹股沟区和头颈部,发生于纵隔、胸腺、脾脏、肠管、胆管、子宫颈、乳腺和骨等部位也有报道^[4-7]。浅表部位 KHE 通常表现为皮肤边界不清的紫蓝色或红色斑块,按压不褪色,常侵及皮下组织、肌肉甚至骨组织;发生于腹膜后、盆腔等深部的 KHE 常表现为腹部单个或多结节状肿块,伴有腹

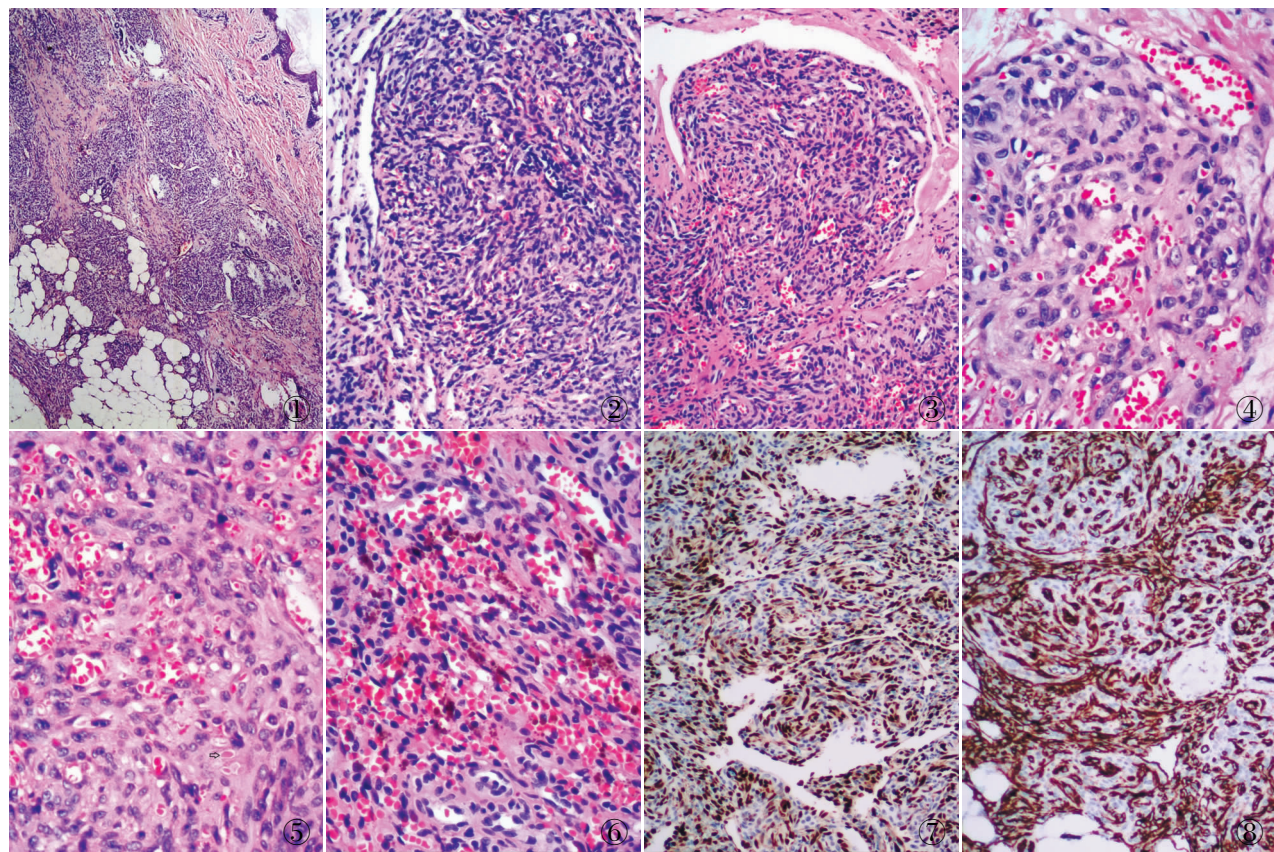


图1 血管瘤样结节累及真皮及皮下 图2 结节周边可见淋巴细胞 图3 肾小球样结构 图4 瘤细胞核呈卵圆形或短梭形,核染色质细腻,可见小核仁 图5 可见透明血栓 图6 可见含铁血黄素沉着 图7 肿瘤细胞 ERG 弥漫核表达,EnVision 两步法 图8 肿瘤细胞 CD31 弥漫核表达,EnVision 两步法

水、肠梗阻及黄疸等症状。超过 50% 的 KHE 患者伴发 KMP 并常为致死性病因。KMP 系指血管肿瘤患者同时伴发血小板及凝血因子减少,导致消耗性凝血功能障碍,致死率可达 12% ~ 24%^[8], 因由 Kasabach 和 Merritt 于 1940 年首先报道而得名。KMP 的发生机制目前尚不清楚,推测可能因为 KHE 异常增生的内皮细胞捕获血小板,加之血管内皮损伤,激发凝血因子消耗,纤溶增加,最终导致病变部位出血甚至引发弥漫性血管内凝血 (diffuse intravascular coagulation, DIC)^[5]。文献报道,几乎所有的深部 KHE 均伴发 KMP。本组 29 例患者除 1 例患者年龄为 25 岁外,其余均不超过 1 岁;男性略多于女性 (15 : 14);28 例均发生于四肢和 (或) 躯干;包括发生于盆腔患者共 16 例伴有 KMP,均与文献报道相符合。

3.2 病理学特征 发生于皮肤及深部的 KHE 镜下形态相似,肿瘤组织由融合的血管团组成,被纤维结缔组织分隔呈大小不一的分叶状或多结节状结构,发生于皮肤者肿瘤在真皮、皮下组织或脂肪组织间浸润性生长。融合的血管团细胞较丰富、密集,主要由形态温和的梭形细胞围绕着圆形上皮样细胞组成,典型的可形成肾小球样结构,对于诊断有帮助。梭形细胞区有多量裂隙样结构,其间常含有多量外渗的红细胞、含铁血黄素沉着及纤维性微血栓,很像卡波西肉瘤。分化较成熟的毛细血管一般集中于结节的周边,呈圆形、卵圆形或不规则形。此外,在结节的周边常可见形态不规则的裂隙状淋巴管,D2-40 染色可以清晰地显示出其轮廓,有学者推测 KHE 可能通过分泌淋巴管内皮生长因子诱导淋巴管生成。如果淋巴管成分明显,可诊断为 KHE 伴淋巴管瘤病。免疫组化标记 VEGFR-3、Flt-1、ERG、CD31 和 CD34 在梭形细胞和上皮样细胞中均强阳性表达^[8],证实其均为血管内皮细胞源性。但梭形细胞 Factor VIII-Rag 则一般不表达或仅灶性弱表达。SMA 常灶性表达,提示至少局灶存在含有血管周皮细胞。Glut-1 在 KHE 中为阴性,而在婴幼儿血管瘤中则为阳性,故可作为两者鉴别的有用标志物。HHV8 是发生 Kaposi 肉瘤的病原体,一般在 Kaposi 肉瘤中阳性表达、在 KHE 中不表达,可用于这两种肿瘤的鉴别。此外,文献报道淋巴管标志物如同源盒基因转录因子-1 (prospero-related homeobox protein-1, PROX-1) 和淋巴管内皮透明质酸受体-1 (lymphatic endothelial hyaluronan receptor-1, LYVE-1) 梭形内皮细胞区域表达也支持 KHE 的诊断^[9]。电镜下梭形细胞无明

显的内皮细胞特征性超微结构,有发育不良的血管腔和不连续的基膜^[10]。关于 KHE 的细胞遗传学目前研究甚少,Zhou 等^[11]报道 1 例发生于 7 岁男孩骶骨和胸椎的 KHE 存在 t(13;16)(q14;p13.3) 平衡易位,其是否为 KHE 特异性改变尚需更多病例研究。

3.3 鉴别诊断 以下几种血管病变在临床表现和 (或) 组织学形态上与 KHE 均有不同程度重叠,须与 KHE 相鉴别。(1) 簇状血管瘤 (tufted angioma, TA): 现在越来越多的学者认为 TA 和 KHE 是同一肿瘤的不同表现形式^[12],但 TA 为良性肿瘤,局部完整切除后可治愈。其一般发生于儿童和年轻成人,病变位置表浅、局限,虽与 KMP 相关,但发生率较 KHE 低。镜下表现与 KHE 相似,但病变范围较小,局限于真皮,不弥漫浸润脂肪及深部组织。免疫表型大致与 KHE 相同,但淋巴管标志物 PROX1 的阳性率低于 KHE。(2) 婴儿血管瘤 (infantile haemangioma, IH): 好发于头面部,女性多见;通常出生时不明显,随后数月内快速生长,但 75% ~ 90% 的病例在 7 岁内消退。瘤细胞排列成多结节状结构,早期病变主要由胖梭形内皮细胞组成,血管腔隙不明显,可见多量核分裂象;消退期血管腔隙形成明显,间质明显纤维化,似成人毛细血管瘤。与 KHE 不同,IH 无肾小球样结构,无淋巴管形成。免疫组化标记 Glut-1 强阳性,淋巴管标志物 PROX1 和 D2-40 阴性,而 LYVE-1 阳性。IH 通常为良性,但有罕见恶变的报道^[13]。(3) 先天性血管瘤 (congenital haemangioma, CH): 较 IH 少见,为一种发生于胎儿期至出生时完全形成的良性血管瘤,通常境界清楚。根据临床进展不同分为两型,即快速消退型 (rapidly involuting CH, RICH) 和非消退型 (non-involuting CH, NICH)。两型 CH 均由分叶状毛细血管组成,小叶可相互融合,小叶间为丰富的纤维结缔组织;小叶内无梭形内皮细胞,小叶周边无淋巴管形成。约 1/2 的 RICH 在小叶中央出现退变,表现为纤维结缔组织增生伴含铁血黄素沉着,血管内皮萎缩甚至消失。(4) 梭形细胞血管瘤 (spindle cell haemangioma): 主要发生于青少年和年轻成人,好发于下肢;约 5% 患者伴有多发性骨内软骨瘤 (Maffucci 综合征),少数患者同时伴有先天性淋巴水肿和血管扩张性肢体肥大症 (Klippel-Trenaunay 综合征)。病变位于真皮或皮下,由海绵状血管瘤样区域和实性梭形细胞区域以不同比例混合而成,一般以梭形细胞成分为主。梭形细胞间可见裂隙及红细胞外渗,似

Kaposi 肉瘤。梭形细胞表达 vimentin、SMA 和淋巴管标志物,不表达血管内皮标记^[14-15]。(5)疣状静脉畸形(verrucous venous malformation, VVM):是一种非遗传性的先天性血管畸形,91%病例发生于四肢。VVM 常随年龄增大而增长,被覆表皮呈疣状增生,偶伴出血。病变主要位于真皮浅层,由扩张的毛细血管和海绵状血管组成,常伴有表皮角化过度、角化不全和乳头状瘤样增生。毛细血管内皮细胞偶尔表达 Glut-1,淋巴管标志物 D2-40 和 PROX1 在浅表部位的血管偶尔表达^[16]。(6)Kaposi 肉瘤:低度恶性的血管肿瘤和 HHV8 感染相关。除淋巴结外,一般极少发生于婴幼儿。肿瘤由呈束状排列的梭形细胞组成,梭形细胞间有血管腔样裂隙,其内见外渗的红细胞及透明小体形成;无上皮样细胞团或肾小球样结构形成。梭形细胞表达血管内皮及淋巴管标记,HHV8 在 Kaposi 肉瘤细胞核表达,而在 KHE 中阴性,有助于两者鉴别^[17]。

3.4 治疗和预后 KHE 以扩大肿瘤切除术为首选治疗手段,其预后取决于肿瘤发生部位、肿瘤范围及是否伴发 KMP。位置表浅者多因病变广泛切除而治愈。包括皮质醇、长春新碱、环磷酰胺、放线菌素、阿霉素和卡西他滨等单一或联合化疗对于治疗伴有 KMP 的 KHE 患者有一定效果。低剂量放射治疗也可获得较好疗效。KHE 为局部侵袭性中间性肿瘤,虽然 Lyons 等^[18]报道的 33 例 KHE 中有 2 例出现区域淋巴结转移,但尚无远处转移的报道。文献报道 KHE 的致死率为 12%~24%^[8],且通常发生于伴有 KMP 患者。

总之,KHE 是一种罕见的具有局部侵袭性的中间型血管肿瘤。多数病例伴发 KMP,此时患者的病死率明显增高。KHE 组织学形态与其他一些血管病变有重叠,但其多平面侵袭性生长方式、肿瘤性内皮细胞表达 PROX-1、LYVE-1 等淋巴管标志物有助于与其他血管病变相鉴别。

参考文献:

- [1] Niedt G W, Greco M A, Wieczorek R, *et al.* Hemangioma with Kaposi's sarcoma-like features: report of two cases[J]. *Pediatr Patholol*, 1989,9(5):567-575.
- [2] Tsang W Y, Chan J K. Kapos-like hemangioendothelioma. A distinctive vascular neoplasm of the retroperitoneum[J]. *Am J Surg Pathol*, 1991,15(10):982-989.
- [3] Zukerberg L R, Nickoloff B J, Weiss S W. Kaposiform heman-

gioendothelioma of infancy and childhood: an aggressive neoplasm associated with Kasabach-Merritt syndrome and lymphangiomatosis[J]. *Am J Surg Pathol*, 1993,17(4):321-328.

- [4] 马捷,石群立,周晓军,等.骨卡波西样血管内皮瘤临床病理特点[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2007,23(2):189-193.
- [5] Filotico M, Filotico R. Kaposiform hemangioendothelioma in an adult with rheumatoid arthritis[J]. *Pathologica*, 2017,109(3):143-147.
- [6] Shabtaie S A, Wang B, Owyong M, *et al.* Neonatal kaposiform hemangioendothelioma of the spleen associated with Kasabach-Merritt phenomenon[J]. *J Pediatr Surg*, 2016,51(6):1047-1050.
- [7] Azma R, Alavi S, Khoddami M, *et al.* Multifocal kaposiform hemangioendothelioma of soft tissue with bilateral pulmonary involvement in an adolescent[J]. *Korean J Pediatr*, 2014,57(11):500-504.
- [8] Goss J A, Greene A K. Congenital vascular tumors[J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2018,51(1):89-97.
- [9] Le Huu A R, Jokinen C H, Rubin B P, *et al.* Expression of prox1, lymphatic endothelial nuclear transcription factor, in Kaposiform hemangioendothelioma and tufted angioma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2010,34(11):1563-1573.
- [10] 袁斯明,沈卫民,王修坤,等.增殖期血管瘤和卡波西样血管内皮瘤的病理比较研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2010,6(2):85-88.
- [11] Zhou S, Wang L, Panossian A, *et al.* Refractory kaposiform hemangioendothelioma associated with a chromosomal translocation (13;16)(q14;p13.3)[J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2016,19(5):417-420.
- [12] Silva C M D, Schettini A P M, Santos M, *et al.* Tufted angioma[J]. *An Bras Dermatol*, 2017,92(5):742-743.
- [13] Jeng M R, Fuh B, Blatt J, *et al.* Malignant transformation of infantile hemangioma to angiosarcoma: response to chemotherapy with bevacizumab[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014,61(11):2115-2117.
- [14] Requena L, Kutzner H. Hemangioendothelioma[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2013,30(1):29-44.
- [15] Miettinen M, Wang Z F. Prox1 transcription factor as a marker for vascular tumors-evaluation of 314 vascular endothelial and 1086 nonvascular tumors[J]. *Am J Surg Pathol*, 2012,36:351-359.
- [16] Wang L, Gao T, Wang G. Verrucous hemangioma: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 74 cases[J]. *J Cutan Pathol*, 2014,41(11):823-830.
- [17] Newton R, Labo N, Wakeham K, *et al.* Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in a rural ugandan cohort, 1992-2008[J]. *J Infect Dis*, 2018,217(2):263-269.
- [18] Lyons L L, North P E, Mac-Moune Lai F, *et al.* Kaposiform hemangioendothelioma: a study of 33 cases emphasizing its pathologic, immunophenotypic, and biologic uniqueness from juvenile hemangioma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2004,28(5):559-568.

Kaposiform hemangioendothelioma: a clinicopathological analysis of 29 cases

ZHANG Lei¹, WEI Jian-guo², HOU Meng¹, KONG Ling-fei¹

(¹Department of Pathology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China;

²Department of Pathology, Shaoxing People's Hospital, Shaoxing 312000, China)

ABSTRACT Purpose To explore the clinicopathologic features, diagnosis and differential diagnosis of Kaposiform hemangioendothelioma. **Methods** To reported the histopathological and immunohistochemical features in 29 cases of Kaposiform hemangioendothelioma, combined with the clinical data and the literature review. **Results** Of the 29 patients, 15 were male and 14 were female, almost all patients were no more than 1 year old, except one patient aged 25 years. 28 cases occurred in superficial skin, including 15 cases in limbs, 5 cases in head and neck, 4 cases in trunk, 1 case in armpit, 3 cases were multiple sites, and 1 case in pelvic cavity. The clinical manifestations were limited or diffuse skin painless plaque, and 16 cases with Kasabach-Merritt phenomenon. Microscopically, the tumor was composed of proliferating small blood vessels and spindle cells, with irregular nodular or lobulated distribution, and invasive growth. Spindle cells were arranged in bundles, with epithelioid

cells and spindle cells arranged in nests, and glomerulus-like structures, and the latter with crescent shaped vascular fissures. Immunohistochemically, the tumor cells were strongly positive for VEGFR-3, CD31, CD34 and ERG. Partial tumor cells were positive for SMA and D2-40, but negative for CK, Glut-1 and HHV8. **Conclusion** Kaposiform hemangioendothelioma is a rare, intermediate, locally aggressive angiogenic tumor, mainly occurring in infants and young adults. The diagnosis relies on its unique morphology and immunophenotype, and it should be differentiated from tufted angioma, infantile hemangioma, congenital hemangioma, spindle cell hemangioma, verrucous venous malformation and Kaposi sarcoma. Extended resection is the best way to treat Kaposiform hemangioendothelioma.

Key words: Kaposiform hemangioendothelioma; Kasabach-Merritt phenomenon; diagnosis and differential diagnosis

· 简 讯 ·

《临床与实验病理学杂志》征稿启事

《临床与实验病理学杂志》(ISSN 1001-7399 CN 34-1073/R), 月刊, 连续入选《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊(核心库)、北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》"临床医学类核心期刊"及科技部中国信息研究所中国科技核心期刊(统计源期刊)。

精准医疗被认为是继经验医学、循证医学之后的第三次医学革命,作为当今肿瘤临床研究最活跃的领域之一,精准医疗在肿瘤治疗中正发挥越来越重要的作用;而肿瘤诊断的"金标准",病理诊断不仅能判定肿瘤的良恶性、分类和分级,也是临床医师进行预后评估和药物选择的重要依据。为加强病理学与临床的联系,《临床与实验病理学杂志》现面向广大医务工作者征集有关精准医学与肿瘤专业领域在基础研究、临床诊断、治疗等方面的最新研究论文或进展评述。本刊对有国家和省部级基金资助的文章,将优先予以发表。本刊网址: <http://www.cjcep.com>, 邮箱投稿: lcsybl@163.com, 编辑部电话: 0551-65161102。

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.013.html>

17 β -雌二醇对大鼠肾缺血再灌注损伤肾小管细胞凋亡及炎症的影响

周奥飞,倪 钊,李 强,王新敏,钱 彪,李 丽,王勤章,李应龙

摘要:目的 探讨 17 β -雌二醇对肾缺血再灌注损伤大鼠肾小管细胞凋亡及炎症的影响及机制。方法 将所有去卵巢处理后的雌性 SD 大鼠随机分为正常组(Control)、假手术组(Sham 组)、缺血再灌注损伤组(I/R 组)及缺血再灌注雌激素治疗组(E₂ + I/R)(每组 8 只)。切除右肾,夹闭左侧肾动脉 45 min,再灌注 24 h 后留取各组大鼠血和肾脏标本。全自动生化分析仪测定血尿素氮(BUN)及血肌酐(Cr)水平,采用 HE 染色观察肾组织病理学形态,原位末端标记法(TUNEL)检测肾小管细胞凋亡率,Western blot 法检测肾组织 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平,肾组织病理学观察炎症反应及免疫荧光法检测各组肾组织 CD4⁺T 淋巴细胞的浸润数量。结果 与 Sham 组相比,I/R 组血 BUN 和 Cr 水平升高($P < 0.05$),肾组织病理学损伤明显($P < 0.05$),凋亡细胞数增加($P < 0.05$),Cleaved-Caspase-3 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),炎症反应加重($P < 0.05$),CD4⁺T 淋巴细胞浸润增加($P < 0.05$);与 I/R 组相比,E₂ + I/R 组血 BUN 和 Cr 水平降低($P < 0.05$),肾组织病理学损伤减轻($P < 0.05$),凋亡细胞数减少($P < 0.05$),Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),炎症反应减轻($P < 0.05$),CD4⁺T 淋巴细胞浸润减少($P < 0.05$)。结论 雌激素可抑制缺血再灌注损伤后肾组织 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达,减少肾小管细胞凋亡,并且可以减轻炎症反应和 CD4⁺T 淋巴细胞浸润,对肾缺血再灌注损伤发挥保护作用。

关键词:17 β -雌二醇;肾缺血再灌注损伤;Cleaved-Caspase-3;CD4⁺T 淋巴细胞

中图分类号:R-332 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0300-06

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.013

肾缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤是导致急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的主要原因,常发生于肾移植手术、肾肿瘤切除术、肾脏动脉血管成形术、肾积水、选择性尿路手术以及休克后复苏等。在过去几十年中,AKI 的发病率不断上升,由于预后较差,在临床上被广泛关注。肾脏 I/R 损伤是一种涉及氧化应激反应、炎症反应、钙超载以及细胞凋亡的病理过程。细胞凋亡是 I/R 的重要环节之一^[1-3]。Castaneda 等^[4]研究发现肾小管上皮细胞凋亡在肾 I/R 损伤过程中起重要作用。目前认为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)依赖的细胞凋亡途径在 I/R 诱导的肾小管上皮细胞凋亡中发挥主要作用^[5]。在肾 I/R 过程中缺血肾组织发生严重的炎症反应,活化固有和适应性免疫应答,T 淋巴细胞亚群(尤其是 CD4⁺T 淋巴细胞)被认为是连接这两种免疫应答的桥梁,其介导了 I/R 的病理过

程^[6-7]。因此,抑制肾 I/R 肾小管细胞凋亡和肾组织炎症的发生,对 I/R 的防治具有重要的临床意义。已有研究表明,17 β -雌二醇对肾脏缺血再灌注损伤具有保护作用^[8-9],然而其保护作用的相关机制尚未完全明确。本实验旨在评价 17 β -雌二醇对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用和对 I/R 诱导的肾小管上皮细胞凋亡及肾组织 T 淋巴细胞浸润的影响,以探讨 17 β -雌二醇对肾脏缺血再灌注损伤的保护机制及临床应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取雌性 SD 大鼠 32 只,分为 4 组,每组 8 只,体重 250 ~ 300 g,清洁级,由新疆医科大学实验动物中心提供(许可证编号 XCXK 新 2003-0001),适应性饲养 1 周后进行实验,动物房室内温度为 20 ~ 25 ℃,湿度为 50% ~ 55%,给予标准饲料,自由进食水,周围环境安静。

1.2 主要试剂与仪器 肾上腺素、乙酰胆碱(Sigma);大鼠多克隆 Cleaved-Caspase-3 抗体(艾美捷公司); β -actin 一抗、二抗(北京中杉金桥公司);TUNEL 试剂盒(博士德公司);CD4⁺T 淋巴细胞抗体(Abcam 公司)。

1.3 方法

接受日期:2017-10-11

基金项目:新疆生产建设兵团科技计划(2014AB052)

作者单位:石河子大学医学院第一附属医院泌尿外科,石河子

832000

作者简介:周奥飞,男,硕士,医师。E-mail: 365235018@qq.com

李应龙,男,博士,主任医师,通讯作者。E-mail: ly10993

@sina.com

1.3.1 动物模型制备 动物模型制备选用雌性 SD 大鼠 32 只,所有大鼠均先做去卵巢处理(实验大鼠麻醉成功后,备皮并消毒手术视野,做腹部正中切口,从耻骨联合上方 1 cm 至剑突下方,暴露双侧卵巢,切除卵巢后缝合切口),2 周后准备实验。随机分为 4 组(每组 8 只):(1)正常组(Control 组):不做任何处理。(2)假手术组(Sham 组):实验大鼠应用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉成功后,备皮并消毒手术视野,做腹部正中切口,从耻骨联合上方 1 cm 至剑突下方。暴露双侧肾脏,切除右肾,但不夹闭左侧肾蒂,45 min 后关闭腹腔。(3)缺血再灌注组(I/R 组):实验大鼠麻醉成功后,备皮并消毒手术视野,做腹部正中切口,从耻骨联合上方 1 cm 至剑突下方。暴露双侧肾脏,用无创动脉夹夹闭左侧肾蒂,观察肾脏由鲜红色逐渐变为暗红色,说明缺血成功,反之缺血失败。45 min 后去除动脉夹,恢复灌注。(4)17 β -雌二醇预处理干预组(E_2 + I/R 组):在手术开始 1 h 前给予 17 β -雌二醇(100 μ g/kg,sc);Control 组和 Sham 组均给予等量的生理盐水腹腔注射,后同缺血再灌注组。各组大鼠再灌注 24 h,麻醉后经腹腔静脉取血,剥离肾脏后处死大鼠。

1.3.2 血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)的检测 将留取的静脉血送往石河子大学医学院第一附属医院检验科采用 ROCHE 罗氏 COBAS INTEGRA 800 全自动生化分析仪进行 BUN 和 Cr 检测,以评估肾功能变化。

1.3.3 HE 染色 将留取的肾脏组织沿中线剖开,一半置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用;另一半置于 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡切片和 HE 染色,200 倍光镜下观察肾脏组织病理形态的改变。肾小管间质损害 Paller 氏评分:切片进行 HE 染色,采用 Paller 法对肾小管损伤程度评分:即每高倍镜视野随机选取 10 个有病变的肾小管,按 100 个肾小管记分,标准:肾小管明显扩张、细胞扁平为 1 分;刷状缘损伤 1 分,脱落为 2 分;管型 2 分,肾小管管腔内有脱落的、坏死的细胞(未成管型或细胞碎片)计 1 分。

1.3.4 末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的原位末端标记法(TUNEL)测定细胞凋亡率 将肾脏组织石蜡切片常规处理,TUNEL 染色,镜下细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性凋亡细胞。高倍镜下观察,对 8 个连续不重叠的视野中阳性细胞进行计数。细胞凋亡指数(AI) = (凋亡细胞数/细胞总数) $\times$ 100%。

1.3.5 Western blot 法检测肾脏组织 Cleaved-Caspase-

3 蛋白表达水平 取冻存肾脏,提取肾组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,通过绘制标准曲线计算上样量,等量蛋白样品经 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温孵育 2 h,ECL 显影并扫描测定光密度值。

1.3.6 免疫荧光观察 CD4⁺T 淋巴细胞浸润肾组织的位置及数量 将肾脏组织石蜡切片常规处理,2.5 mL/L Triton 破膜 10 min,PBS 漂洗 3 次,BSA 室温封闭 1 h。一抗湿盒内 4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 漂洗 3 次。滴加 FITC 荧光二抗室温避光孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次。滴加 PI(碘化丙啶)后湿盒内室温避光染色 30 s,PBS 漂洗 3 次,100 mL/L 甘油封片,激光扫描共焦显微镜观察(400 $\times$)。采用 FITC 染料标记二抗和 PI 标记细胞核的双重免疫荧光来显示 CD4⁺T 淋巴细胞在肾组织上浸润的位置和数量。镜下在小管外且不被内皮包围的双染细胞视为 CD4 阳性细胞。高倍镜下观察,对 10 个连续不重叠的视野中阳性细胞进行计数,计数取平均值。

1.4 统计学处理 所有数据应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。各组间进行单因素方差分析检验:首先对各组数据进行方差齐性检验,若符合方差齐性假设,采用 SNK、LSD 和 Bonferroni 检验;若不符合方差齐性假设,则采用 Tamhane T_2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。之后用 GraphPad Prism 6 将数据结果制作成柱状图。

2 结果

2.1 肾功能指标检测结果 Control 组的 BUN 和 Cr 表达与 Sham 组相比差异无统计学意义,I/R 组的 BUN 和 Cr 表达相比 Sham 组明显升高($P < 0.05$), E_2 + I/R 组的 BUN 和 Cr 表达水平较 I/R 组降低($P < 0.05$,图 1)。

2.2 肾组织病理学检查及肾组织 Paller 氏评分 光镜下肾组织病理学改变:按 Paller 氏法进行肾小管损伤评分可见 Control 组、Sham 组:肾组织形态结构无明显变化,偶见肾间质水肿,肾小管水肿;I/R 组:肾小球结构无明显变化,肾小管上皮细胞有不同程度的肿胀、坏死和脱落,管腔扩张,肾间质水肿,炎性细胞浸润明显,Paller 评分明显高于 Sham 组($P < 0.05$); E_2 + I/R 组:肾小球结构无明显变化,肾小管上皮细胞肿胀、坏死及肾间质水肿、炎性细胞浸润程度较 I/R 组明显减轻,Paller 损伤评分显著低于 I/R 组($P < 0.05$,图 2)。

2.3 TUNEL 检测细胞凋亡率 TUNEL 阳性细胞

光镜下表现为细胞核呈黄褐色,细胞质无染色,位于髓质肾小管上皮细胞,肾小球及近端小管无表达。Sham 组与 Control 组未见凋亡细胞。I/R 组与 Sham 组比较细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与 I/R 组比较, $E_2 + I/R$ 组大鼠肾组织细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 Western blot 法检测 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达 采用 Western blot 技术检测 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达变化结果表明, I/R 组 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平明显高于 Sham 组 ($P < 0.05$); $E_2 + I/R$ 组 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平明显低于 I/R 组 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 肾组织病理学观察炎症反应及免疫荧光观察 $CD4^+$ T 淋巴细胞浸润肾组织的位置及数量

2.5.1 肾组织病理学观察炎症反应 HE 染色下肾组织髓质区每个高倍视野的炎性细胞数数目 ($n = 10$)。光镜下可见 Control 组、Sham 组髓质肾小管间质区未见炎性细胞浸润; 与 Sham 组比较, I/R 组炎性细胞浸润明显 ($P < 0.05$); 与 I/R 组比较, $E_2 +$

I/R 组炎性细胞的浸润程度减少 ($P < 0.05$, 图 5)。
2.5.2 免疫荧光观察 $CD4^+$ T 淋巴细胞浸润肾组织的位置及数量 缺血 24 h 后在髓质区肾小管间质中发现了 $CD4^+$ T 淋巴细胞, 与 Sham 组相比, I/R 组 $CD4^+$ T 淋巴细胞在肾髓质小管区大量浸润 ($P < 0.05$), 与 I/R 组比较, $E_2 + I/R$ 组 $CD4^+$ T 淋巴细胞在肾髓质小管区浸润减少 ($P < 0.05$, 图 6)。

3 讨论

肾脏缺血再灌注损伤主要表现为血肌酐升高, 严重者可导致急性肾小管坏死进而引起 AKI^[10]。AKI 是一种常见的临床并发症, 其特点是肾小球滤过率急剧减少。目前虽然有很多治疗方法, 但 AKI 的发病率和病死率仍然很高。因此有必要为 AKI 寻求新的治疗策略^[11]。

17 β -雌二醇(E_2)是雌激素的主要形式, 其在 I/R 上已显示出具有广泛的保护作用, 包括抗凋亡、抗炎等^[12-13]。以往有研究发现 17 β -雌二醇可以通过减少炎症反应和加速受损的肾小管细胞再生来减弱

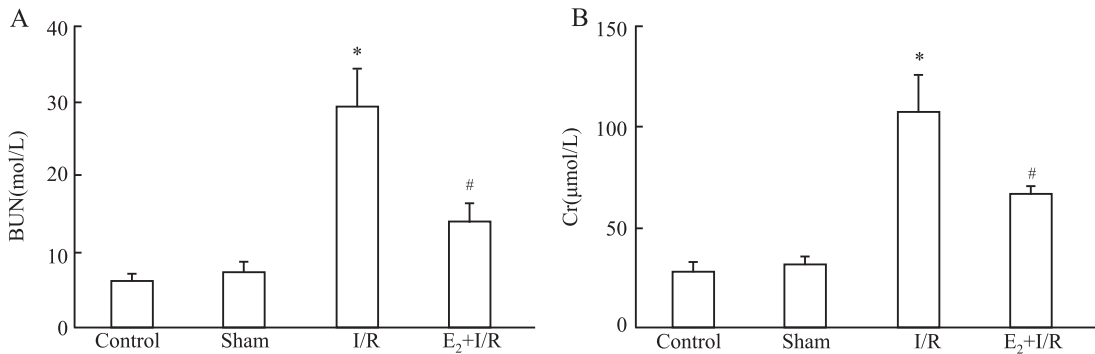


图1 各组大鼠 BUN(A) 和 Cr(B) 的水平
与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 I/R 组相比, # $P < 0.05$

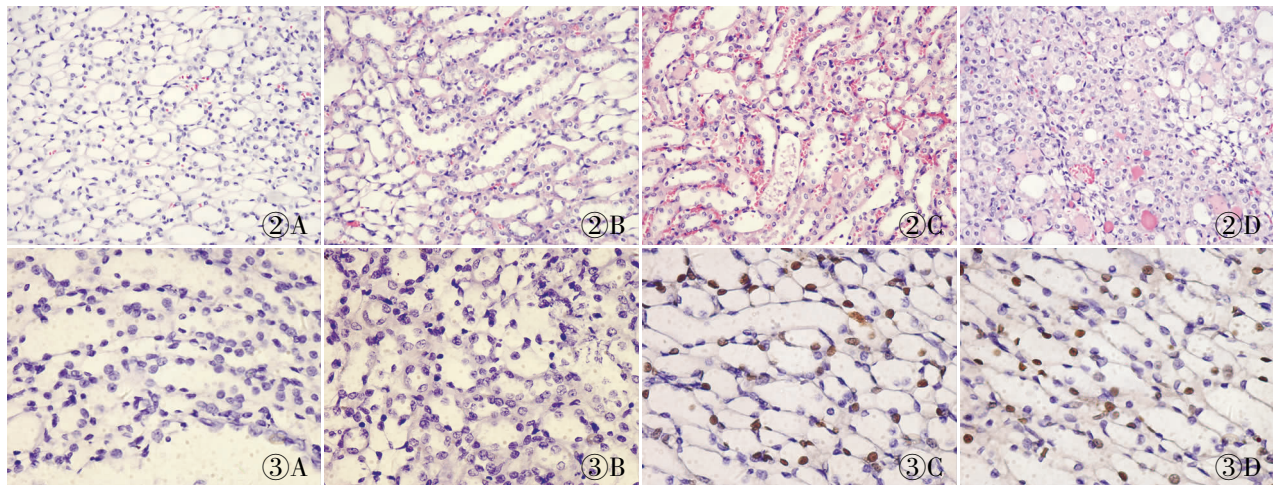


图2 各组肾脏 HE 染色病理组织学变化: A. Control 组; B. Sham 组; C. I/R 组; D. $E_2 + I/R$ 组
图3 各组大鼠 TUNEL 染色肾脏组织细胞凋亡情况: A. Control 组; B. Sham 组; C. I/R 组; D. $E_2 + I/R$ 组

图3 各组大鼠 TUNEL 染色肾脏组织细胞

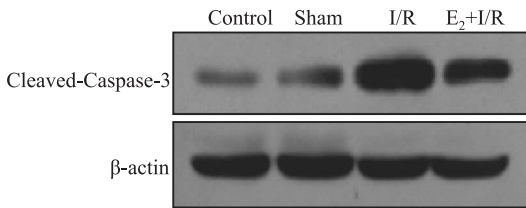


图4 各组大鼠肾组织 Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达变化与 Sham 组相比, * $P < 0.01$; 与 I/R 组相比, # $P < 0.05$

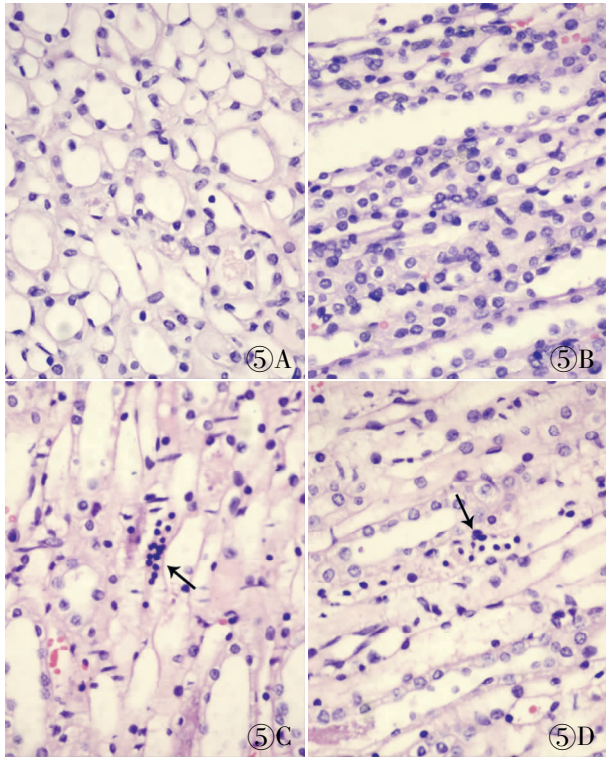


图5 各组大鼠肾脏组织 HE 染色炎性细胞浸润的位置及数量: A. Control 组; B. Sham 组; C. I/R 组; D. $E_2 + I/R$ 组

I/R 诱导的急性肾衰竭^[14]。目前普遍认为肾小管细胞凋亡是导致肾脏缺血再灌注后功能障碍的因素之一^[15-16]。基于各种研究(包括半胱天冬酶-3 活性、Bax 活化、细胞色素 c 释放和 BCL-2/Bax 比例的变化)已经证明细胞凋亡是缺血再灌注引起的^[17]。凋亡机制是复杂的, 胱天蛋白酶级联在复杂的凋亡过程中起关键作用。本实验结果表明, 大鼠在遭遇肾脏缺血再灌注损伤后, 血清 BUN 和 Cr 显著增加, 肾组织损伤显著加重, 其肾小管细胞凋亡显著增加。17 β -雌二醇治疗组与缺血再灌注损伤组相比血清 BUN 和 Cr 显著下降, 肾组织损伤明显减轻, 肾小管凋亡细胞减少。

雌激素的保护机制与凋亡相关蛋白的表达水平相关。Caspase-3 是一种以无活性酶原形式存在的重要的半胱氨酸蛋白酶。Caspase-3 位于细胞凋亡的下游, 是各种凋亡通路的必经之路, 在细胞凋亡中

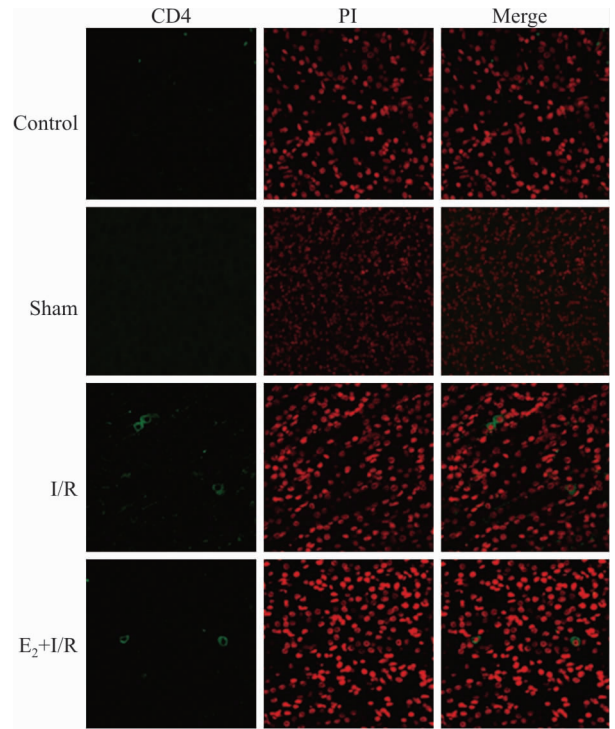


图6 各组大鼠免疫荧光观察 $CD4^+$ T 淋巴细胞浸润肾组织的位置及数量

发挥关键性作用。Caspase-3 是一种催化蛋白酶, 活化的 Caspase-3 可以水解 PARP(DNA 修复酶)和多种其它细胞内的底物, 最终导致细胞凋亡^[18]。Western blot 结果显示, 与 Sham 相比 I/R 组的 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平明显上调, 并且 17 β -雌二醇治疗明显能够下调由 I/R 引起的 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达变化, 表明雌激素可以通过下调 Caspase-3 蛋白水平的表达来减弱细胞凋亡, 这与以前的研究结果类似^[19]。

雌激素的肾 I/R 保护机制也与炎症反应密切相关。有研究发现 T 淋巴细胞在肾急性 I/R 之后出现在肾外部髓质^[7]。Park 等^[20]在基因敲除小鼠中发现接受 $CD4^+$ T 细胞而不是 $CD8^+$ T 细胞导入的小鼠能够恢复 I/R 引起肾功能损伤, 其结果显示 $CD4^+$ T 淋巴细胞在肾 I/R 中发挥重要作用。本实验应用免疫荧光技术发现雌激素减少了肾 I/R 引起的 $CD4^+$ T 淋巴细胞浸润, 表明雌激素可能通过减轻 $CD4^+$ T 淋巴细胞浸润进而减轻缺血再灌注损伤, 但其机制有待进一步研究。

总之 17 β -雌二醇对肾缺血再灌注损伤有保护作用, 其机制可能是通过抗凋亡和抑制炎症反应作用实现的。这可能是 17 β -雌二醇防治肾脏 I/R 的重要机制, 也为临床防治肾脏 I/R 提供了新途径。

参考文献:

- [1] 张雅丽, 崔丽艳, 杨 硕, 等. 自噬对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(4): 431–435.
- [2] Zhang Z X, Shek K, Wang S, *et al.* Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury [J]. J Immunol, 2010, 185(2): 967–973.
- [3] Lin M, Li L, Li L, *et al.* The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1): 19.
- [4] Castaneda M P, Swiateckaurban A, Mitsnefes M, *et al.* Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia/reperfusion injury [J]. Transplantation, 2003, 76(1): 50–54.
- [5] Saikumar P, Venkatachalam M A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney [J]. Semin Nephrol, 2003, 23(6): 511–521.
- [6] White L E, Hassoun H T. Inflammatory mechanisms of organ crosstalk during ischemic acute kidney injury [J]. Int J Nephrol, 2012, 2012(2012): 505197.
- [7] Burne M J, Daniels F, El Ghandour A, *et al.* Identification of the CD4⁺ T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure [J]. J Clin Invest, 2001, 108(9): 1283–1290.
- [8] Singh A P, Singh N, Singh Bedi P M. Estrogen attenuates renal IRI through PPAR- γ agonism in rats [J]. J Surg Res, 2016, 203(2): 324–330.
- [9] Hutchens M P, Fujiyoshi T, Komers R, *et al.* Estrogen protects renal endothelial barrier function from ischemia-reperfusion *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303(3): F377–F385.
- [10] Menke J, Sollinger D, Schamberger B, *et al.* The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2014, 19(4): 395–400.
- [11] Chatterjee P K. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2007, 376(1-2): 1–43.
- [12] Yang X, Qin L, Liu J, *et al.* 17 β -Estradiol protects the liver against cold ischemia/reperfusion injury through the Akt kinase pathway [J]. J Surg Res, 2012, 178(2): 996–1002.
- [13] 刘佩芳, 梁庆成, 王志勇. 17 β -雌二醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 NF- κ B 及 TNF- α 表达的影响 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2008, 42(4): 354–357.
- [14] Wu C, Chang C Y, Chang S T, *et al.* 17 β -Estradiol accelerated renal tubule regeneration in male rats after ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury [J]. Shock, 2016, 46(2): 158–163.
- [15] Saikumar P, Venkatachalam M A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney [J]. Semin Nephrol, 2003, 23(6): 511–521.
- [16] Kinaci M K, Erkasap N, Kucuk A, *et al.* Effects of quercetin on apoptosis, NF- κ B and NOS gene expression in renal ischemia/reperfusion injury [J]. Exp Ther Med, 2012, 3(2): 249–254.
- [17] Havasi A, Borkan S C. Apoptosis and acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2011, 80(1): 29–40.
- [18] Huang X, Brown C, Ni W, *et al.* Critical role for the Ets transcription factor ELF-1 in the development of tumor angiogenesis [J]. Blood, 2006, 107(8): 3153–3160.
- [19] Li Y, Zhong D, Lei L, *et al.* Propofol prevents renal ischemia-reperfusion injury via inhibiting the oxidative stress pathways [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(1): 14–26.
- [20] Park P, Haas M, Cunningham P N, *et al.* Injury in renal ischemia-reperfusion is independent from immunoglobulins and T lymphocytes [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(2): F352–357.

Effect of 17 β -estradiol on renal tubular cells apoptosis and inflammation induced by renal ischemia /reperfusion injury in rats

ZHOU Ao-fei, NI Zhao, LI Qiang, WANG Xin-min, QIAN Biao, LI Li, WANG Qing-zhang, LI Ying-long

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT Purpose To investigate the effects and mechanism of 17 β -estradiol on the apoptosis and inflammation of renal tubular cells in rats with renal ischemia/reperfusion injury.

Methods All the female Sprague-Dawley rats were ovariectomized and randomly divided into four groups: Control group, Sham group, I/R group and estrogen plus I/R (E₂ + I/R) group ($n=8$). Right kidney of the rat was excised and artery of the left kidney was blockaded for 45 min. 24 h after the reperfusion, we collected the blood and nephridial tissue of each group. An automatic biochemical analyzer was used to measure the expression level of BUN and Cr in blood. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes and

the degree of inflammatory reaction of the ischemia/reperfusion injury kidney. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method was used to detect the apoptosis of renal tubular cells. The expression levels of Cleaved-Caspase-3 protein were measured by Western blot, while the numbers of CD4⁺ T lymphocyte infiltration in each group were tested by immunofluorescence (IF). **Results** Compared with the Sham group, expression level of BUN, Cr and Cleaved-Caspase-3 in I/R group significantly increased ($P < 0.05$) as well as the number of apoptotic cells ($P < 0.05$). In the meantime, inflammatory reaction significantly aggravated ($P < 0.05$) and the number of CD4⁺ T lymphocytes increased

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.014.html>

骨巨细胞瘤细胞自噬特征及其对细胞增殖的影响

张盼盼¹, 陆荣柱², 郝彦明³, 方玲娜⁴, 何大伟⁵, 李 翀³

摘要:目的 探讨骨巨细胞瘤细胞自噬特征及其对细胞增殖的作用。方法 体外培养骨巨细胞瘤细胞(GCT-0404细胞),分别采用血清饥饿、雷帕霉素以及抑制剂氯喹进行处理,Western blot检测自噬相关蛋白LC3、Beclin 1的表达;免疫荧光显示细胞内自噬体的形成;倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化;CCK-8检测细胞的活性。结果 血清饥饿、雷帕霉素以及氯喹干预GCT-0404细胞,可使LC3-I向LC3-II的转化水平明显增高($P < 0.05$);绿色荧光的斑点增多;而Beclin 1的表达水平无显著变化。同时,干预处理后细胞形态发生了显著变化,并抑制细胞增殖($P < 0.05$)。结论 血清饥饿、雷帕霉素以及抑制剂氯喹干预GCT-0404细胞所致自噬的发生及其自噬流的变化可参与对细胞增殖抑制的调控。

关键词:骨肿瘤;自噬;骨巨细胞瘤;细胞增殖

中图分类号:R 738.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7399(2018)03-0305-05

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.014

骨巨细胞瘤(giant cell tumor of bone, GCT)是一种常见的局部侵袭性原发性骨肿瘤,并且具有较高的复发率^[1-2]。但其发病机制一直未明,也缺乏有效的治疗手段,因此选择早期及恰当的治疗措施可直接关系到患者的预后及其生活质量。自噬是降解、回收利用细胞内受损细胞器以及生物大分子的代谢过程,从而维持细胞的代谢平衡和存活状态^[3]。而自噬的过度激活可导致细胞死亡,又称II型程序性细胞死亡,与肿瘤的发生、发展密切相关^[3-4]。但自噬反应在骨巨细胞瘤细胞中的研究较

少,具体机制尚不清楚。本实验以骨巨细胞瘤细胞GCT-0404为研究对象,探讨血清饥饿、雷帕霉素以及抑制剂氯喹诱导或抑制GCT-0404细胞发生的自噬反应,分析调控自噬对GCT-0404细胞增殖抑制的作用,为进一步研究自噬在GCT-0404细胞中的作用机制及其治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 实验所用GCT-0404细胞购自中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器 细胞培养基EMEM购自维森特生物(南京)公司,胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自上海宏生生物公司,HRP标记的二抗、CCK-8细胞增殖检测试剂盒、BCATM Protein Assay Kit购自上海碧云天生物公司,兔抗小鼠多克隆抗体LC3抗体(12741)、兔抗大鼠单克隆抗体Beclin 1(3495)、单克隆抗体GAPDH(5174)购自美国CST公司,雷帕霉素、氯喹购自美国Sigma公司,倒置显微镜、荧光显微镜购自日本Olympus公司,酶标仪SpectraMax 190购

接受日期:2018-01-12

基金项目:昆山科技专项项目(KS1542、KS1728)、江苏大学附属昆山医院科研基金(ksy2015002)、昆山市国际、境外科技合作专项(KG2016011)

作者单位:¹ 江苏大学附属昆山医院检验科、³ 骨科、⁴ 内分泌科、⁵ 临床试验研究中心,苏州 215000

² 江苏大学医学院预防医学与卫生检验系,镇江 212013

作者简介:张盼盼,女,硕士,初级检验师。E-mail: panpan1916@163.com

李 翀,男,硕士,副主任医师,通讯作者。E-mail: lichong1705@163.com

remarkably ($P < 0.05$). However, expression level of BUN, Cr and Cleaved-Caspase-3 in E₂ + I/R group decreased significantly ($P < 0.05$) and the pathological damage in the kidney was alleviated ($P < 0.05$) compared with I/R group. furthermore, the number of apoptotic cells decreased ($P < 0.05$) compared with I/R group. The inflammatory reaction significantly blunted ($P < 0.05$) and the infiltration of CD4⁺ T lymphocytes decreased remarkably ($P < 0.05$) compared with I/R group. **Conclusion**

Estrogen can inhibit the expression of Cleaved-Caspase-3 in renal tissue during ischemia/reperfusion injury and reduce the apoptosis of renal tubular cells. It can also reduce the infiltration of CD4⁺ T lymphocytes, thus playing a protective role on renal ischemia/reperfusion injury.

Key words: 17 β -estradiol; renal ischemia/reperfusion injury; Cleaved-Caspase-3; CD4⁺ T lymphocytes

自美国 Molecular Devices 公司、多功能成像系统 ChemStudio PLUS 购自德国 Jena 公司等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 GCT-0404 细胞在含青霉素 1 000 U/mL、链霉素 1 000 g/mL 以及 10% 胎牛血清的 EMEM 培养液(完全培养基)中,37 ℃、5% 湿化 CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 实验分组与处理 将对数生长期的 GCT-0404 细胞分成对照组、血清饥饿组、雷帕霉素组以及氯喹组,换液后按实验所需分别加入完全培养基、无血清培养基、50 nmol/L 的雷帕霉素以及 50、100 μmol/L 的氯喹,于 37 ℃、5% 湿化 CO₂ 培养箱内培养至检测。

1.2.3 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3、Beclin 1 的表达 收集处理 6 h 后的 GCT-0404 细胞,用预冷的 PBS 洗 2 遍,加入细胞裂解液冰上裂解 15 min,低温高速离心机 12 000 r/min 离心 8 min 后取上清,BCA 法测蛋白浓度。总蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移到 PVDF 膜上,分别加入 1:1 000 稀释的 LC3、Beclin 1 抗体,4 ℃ 孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h,ECL 化学发光法显色,凝胶成像系统采集图像,并进行图像处理。

1.2.4 免疫荧光法检测细胞自噬体的形成 取状态良好的单个 GCT-0404 细胞悬液于 24 孔板内培养,孔内事先置入爬片,过夜培养。然后,按实验所需分别处理 6 h,PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定,3% BSA(0.2% TritonX-100)封闭;加入一抗(LC3,滴度为 1:100),过夜;PBS 清洗 3 次,加入荧光标记二抗常温下孵育 1 h;PBS 冲洗,加入 DAPI 荧光染色试剂,室温,5 min;PBS 冲洗,甘油封片,于荧光显微镜下观察。

1.2.5 倒置显微镜观察细胞形态 取对数期生长的 GCT-0404 细胞接种于 24 孔板内培养,待细胞贴壁后进行分组并给予相应处理 6 h,于倒置显微镜下直接观察细胞形态的变化。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖活力 取对数期生长的 GCT-0404 细胞接种于 96 孔板内,每孔加入 100 μL 每 2 000 个细胞,分别进行处理 6、12、24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液 37 ℃、5% CO₂ 的完全培养基环境中继续孵育 1 h 后,在 450 nm 测定吸光度。

1.3 统计学分析 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 14.0 软件对各项实验数据进行统计学分析,两组样本间比较采用 *t* 检验,两两比较采用 S-N-K,

多组样本比较采用单因素方差分析(ANOVA),*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 检测自噬蛋白 LC3 及 Beclin 1 的表达水平 利用血清饥饿、50 nmol/L 雷帕霉素、以及 50、100 μmol/L 氯喹分别培养 GCT-0404 细胞 6 h,采用 Western blot 法检测 GCT-0404 细胞自噬蛋白 LC3、Beclin 1 的表达水平。细胞自噬标志性蛋白 LC-3 在血清饥饿、自噬诱导剂雷帕霉素或抑制剂氯喹等药理学水平干预后,LC3- I 向 LC3- II 的转化水平与对照相比明显增高(*P* < 0.05,图 1),而 Beclin 1 的表达水平差异无显著性。

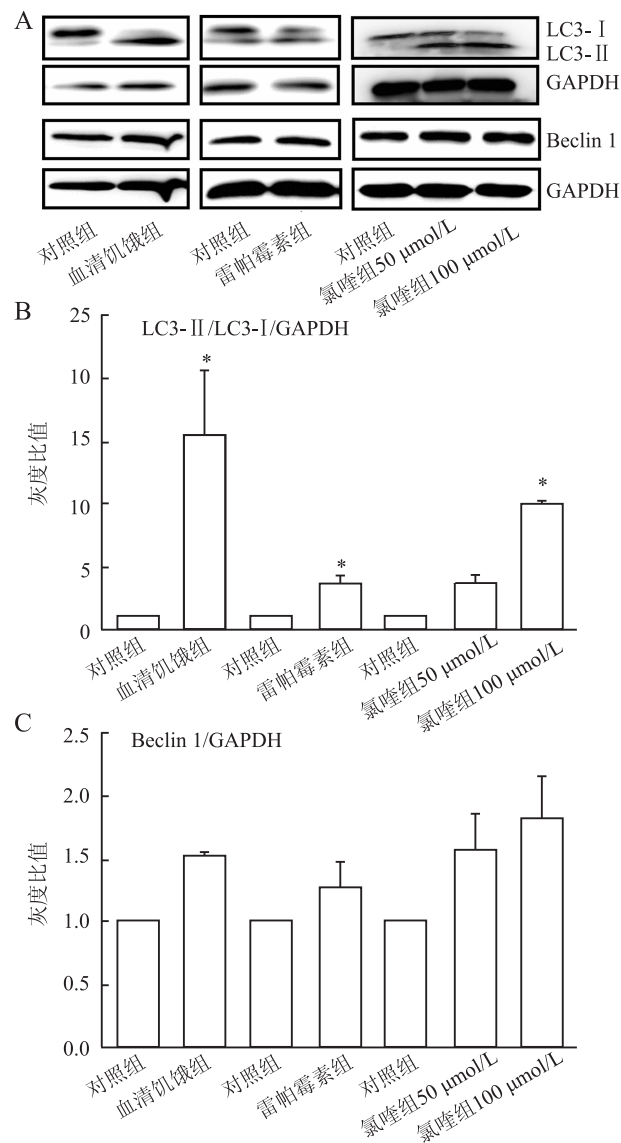


图 1 Western blot 检测 GCT-0404 细胞内 LC3 和 Beclin 1 的表达

A. Western blot 检测结果;B:半定量分析 LC3 表达;C. 半定量分析 Beclin1 表达;与对照组相比,**P* < 0.05

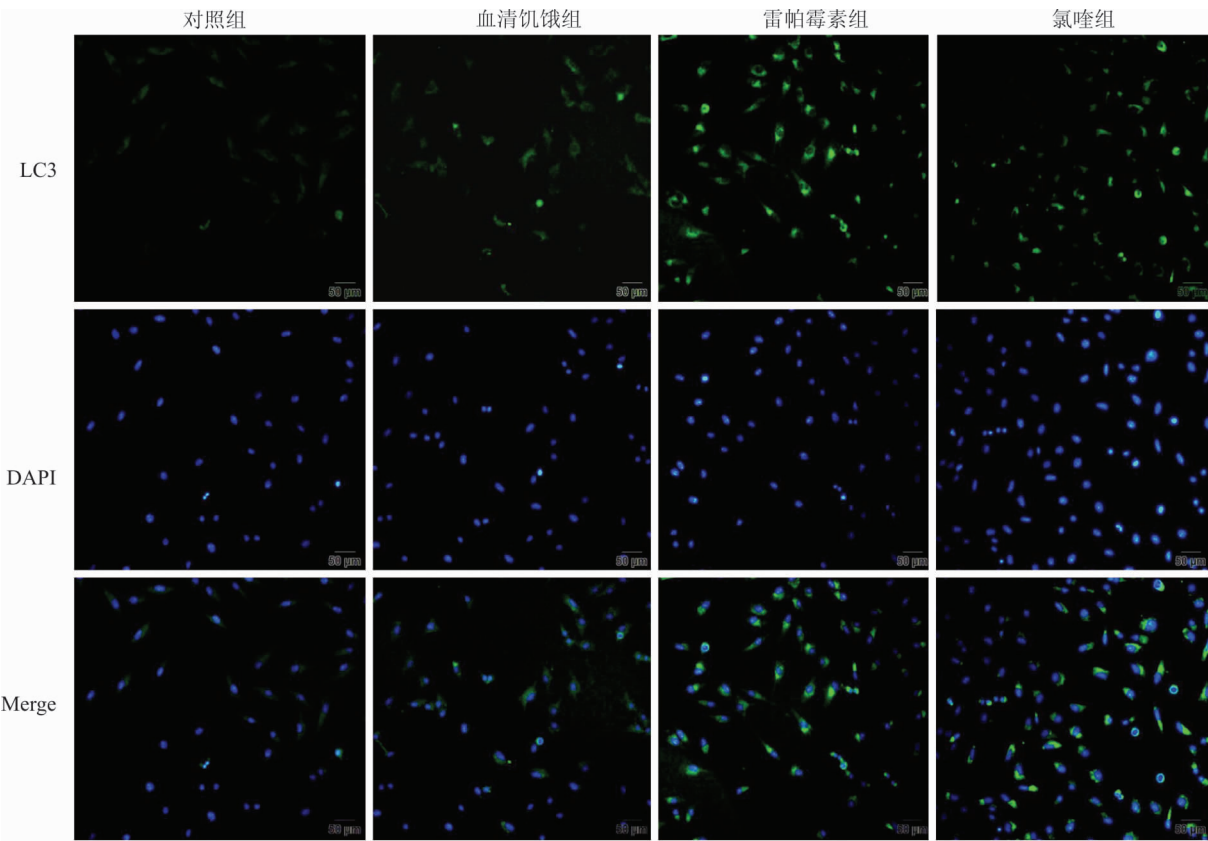


图2 免疫荧光检测 GCT-0404 细胞自噬体的形成

2.2 免疫荧光法显示细胞内自噬体的形成 采用免疫荧光法发现血清饥饿、自噬诱导剂 50 nmol/L 的雷帕霉素或抑制剂氯喹等药理学水平干预后,与对照组相比,细胞质内 LC3 堆积,聚集成绿色荧光斑点增多,其中 100 μ mol/L 氯喹处理 GCT-0404 细胞 6 h 后,绿色荧光斑点增多较为显著(图 2),这进一步提示自噬反应可在 GCT-0404 细胞中被诱导。

2.3 自噬调节对 GCT-0404 细胞形态的影响 倒置相差显微镜下观察正常对照组 GCT-0404 细胞,为单一的纤维母细胞样基质细胞,生长旺盛,细胞形态为梭形单核细胞,细胞质丰富,胞膜完整。血清饥饿处理 GCT-0404 细胞 6 h 后,GCT-0404 细胞形态发生了显著变化:伪足变为细长,分支较多,胞质减少(图 3)。采用自噬诱导剂雷帕霉素或抑制剂氯喹分别处理 GCT-0404 细胞 6 h 后,可观察到细胞发生不同程度的皱缩,伪足减少或消失,细胞轮廓不清晰,胞膜不完整,细胞数量变少(图 3)。在倒置相差显微镜下观察发现,50 nmol/L 的雷帕霉素可使 GCT-0404 细胞以伪足缩小为主,而 100 μ mol/L 的氯喹可使细胞膜发生明显变化。上述结果显示血清饥饿、自噬诱导剂雷帕霉素和抑制剂氯喹分别可使 GCT-0404 细胞形

态发生显著变化,可抑制细胞增殖。

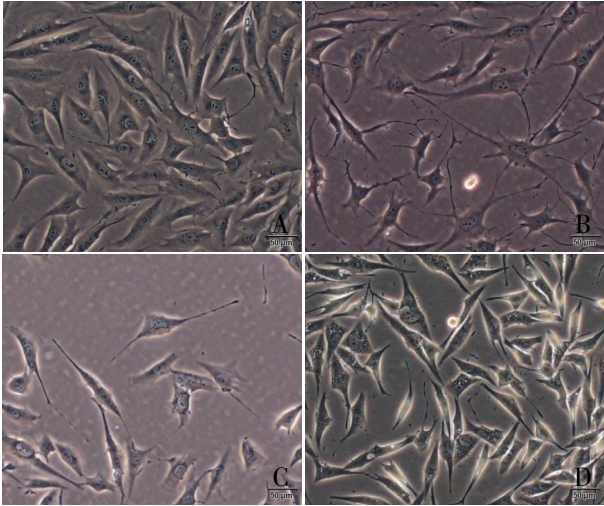


图3 光学显微镜观察 GCT-0404 细胞的形态:A. 对照组;B. 血清饥饿组;C. 雷帕霉素组;D. 氯喹组

2.4 自噬调节对 GCT-0404 细胞增殖的影响 采用无血清培养基即血清饥饿组以及不同浓度的雷帕霉素(50、100 nmol/L)对 GCT-0404 细胞分别培养 6、12、24 h,并采用 CCK-8 检测细胞的增殖。与对照组相比,血清饥饿组和雷帕霉素组可显著影响 GCT-

0404 细胞活性 ($P < 0.05$)。不同浓度的氯喹 (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 GCT-0404 细胞 6 h, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的氯喹即可显著抑制 GCT-0404 细胞增殖, 并具有剂量效应 (图 4)。

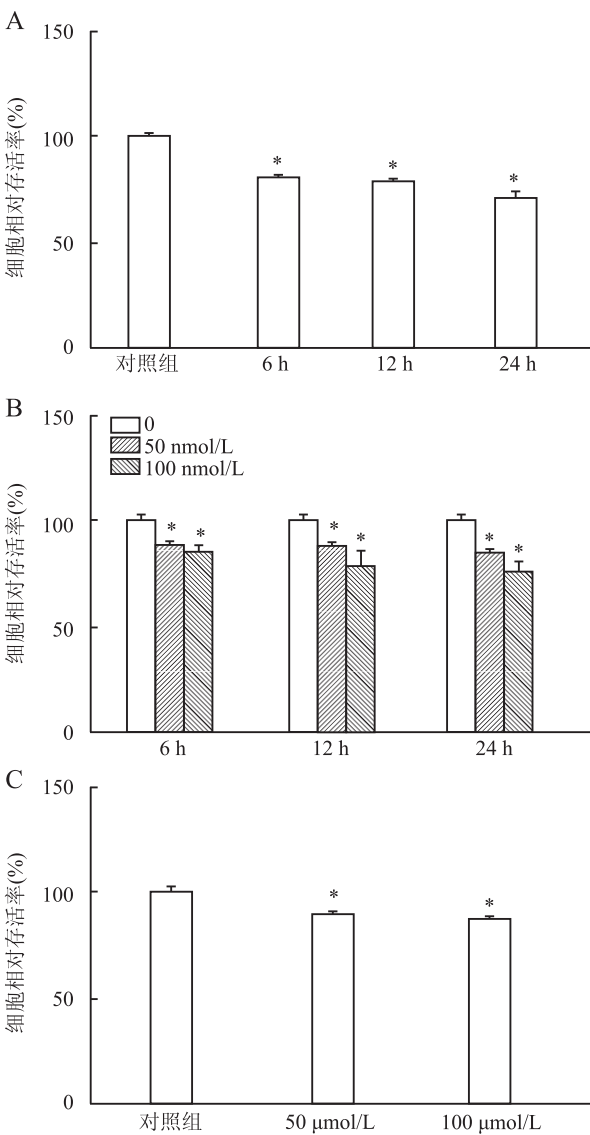


图 4 CCK-8 方法检测 GCT-0404 细胞的活性

A. 血清饥饿组; B. 雷帕霉素组; C. 氯喹组; 与对照组相比, * $P < 0.05$

3 讨论

自噬是将细胞内衰老、变性或受损的细胞器以及蛋白质运输至溶酶体, 降解、消化的代谢过程, 是维持细胞稳态的重要机制^[5]。根据细胞物质进入溶酶体的不同途径, 自噬可分为巨自噬、微自噬以及分子伴侣介导的自噬。巨自噬是由内质网来源的双层膜包裹待降解物而形成自噬体为主要的特征, 即

通常所指的自噬。LC3 是研究最多的家族蛋白, 即细胞自噬发生时, 胞质型 LC3 被 Atg4 的同源体 hATG4B 加工形成 LC3- I, PE 与其结合转变为膜型 LC3- II, 膜型 LC3- II 常用于监测自噬的活性^[6-7]。因此, LC3- I 向 LC3- II 的转换常作为自噬发生的标志性分子, LC3- II/LC3- I 则反应细胞活性的高低^[7-8]。

自噬, 又被称为肿瘤的“双刃剑”, 可参与保护多种肿瘤细胞免受化学治疗, 但也可导致细胞死亡, 因此, 调控自噬是目前大量学者研究的热点^[9-10]。本实验发现 GCT-0404 细胞经血清饥饿、雷帕霉素诱导后, LC3- I 向 LC3- II 的转化明显增加, 免疫荧光法观察到点状聚集的绿色荧光斑点增多, 即自噬体的形成, 表明自噬反应在 GCT-0404 细胞中的具有可诱导性。同时, 黄秋等^[11]研究发现 MPPa-PDT 能诱导人骨巨细胞瘤细胞发生自噬。此外, 本实验还采用 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的氯喹处理 GCT-0404 细胞 6 h, LC3- I 向 LC3- II 的转化逐渐显著, 点状聚集的绿色荧光斑点增多。Lin 等^[12]的研究结果也发现氯喹可促进 LC3 的聚集增多。以上研究结果与氯喹改变溶酶体的 pH 值, 影响溶酶体对底物的降解, 同时阻断溶酶体与自噬体的融合从而影响自噬流的主要机制有关。

Beclin 1 是自噬逃避程序性死亡的关键调节因子, 参与自噬体形成的特异性基因, 而多种肿瘤存在 Beclin 1 等自噬基因缺陷, 能够逃避自噬性死亡^[13]。编码 Beclin 1 蛋白的必需自噬基因 ATG6/BECN1 已被认为是乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌中的单倍体肿瘤抑制因子^[14]。本实验表明 GCT-0404 细胞发生自噬的同时, 能够检测到自噬相关蛋白 Beclin 1 的表达, 然而其表达无明显变化, 这可能与 Beclin 1 调控细胞自噬和凋亡的复杂机制有关^[15]。而自噬又是一个溶酶体降解的过程, 在正常骨组织的稳态以及骨疾病中可发挥重要作用^[16]。黄秋等^[11]研究表明自噬可参与 MPPa-PDT 对骨巨细胞瘤细胞的抗肿瘤效应。本实验采用血清饥饿、雷帕霉素以及自噬抑制剂氯喹处理 GCT-0404 细胞, 发现其细胞形态发生显著变化, 并抑制细胞增殖, 这表明 GCT-0404 细胞导致自噬流发生的变化参与调控 GCT-0404 细胞的增殖抑制作用。因此, 调控 GCT-0404 细胞的自噬水平将为防治骨巨细胞瘤及其复发提供新靶点。

综上所述, 本实验采用血清饥饿、雷帕霉素以及

抑制剂氯喹干预 GCT-0404 细胞,检测自噬的标记蛋白 LC3、Beclin 1 的表达,表明 GCT-0404 细胞能够发生自噬反应,并且自噬流的变化可参与对细胞增殖抑制的调控。但 GCT-0404 细胞发生自噬的具体调控机制及其抗肿瘤效应,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] He Y, Zhang J, Ding X. Prognosis of local recurrence in giant cell tumour of bone: what can we do? [J]. Radiol Med, 2017,122(7):505–519.
- [2] Sobti A, Agrawal P, Agarwala S, *et al.* Giant Cell Tumor of Bone- An Overview[J]. Arch Bone Jt Surg, 2016,4(1):2–9.
- [3] Gozuacik D, Akkoc Y, Ozturk D G, *et al.* Autophagy-Regulating microRNAs and Cancer[J]. Front Oncol, 2017,7:65.
- [4] Bento C F, Renna M, Ghislat G, *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? [J]. Annu Rev Biochem, 2016,85:685–713.
- [5] Kimmelman A C, White E. Autophagy and Tumor Metabolism [J]. Cell Metab, 2017,25(5):1037–1043.
- [6] Schaaf M B, Keulers T G, Vooijs M A, *et al.* LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions[J]. FASEB J, 2016,30(12):3961–3978.
- [7] Yang A, Hacheney I, Wu Y W. Semisynthesis of autophagy protein LC3 conjugates[J]. Bioorg Med Chem, 2017,25(18):4971–4976.
- [8] 王霞,孙楷,肖长燕,等. 自噬在谷胱甘肽保护槟榔碱致肝损害中的作用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016,32(6):660–664.
- [9] Li Y J, Lei Y H, Yao N, *et al.* Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. Chin J Cancer, 2017,36(1):52.
- [10] Filfan M, Sandu R E, Zăvăleanu A D, *et al.* Autophagy in aging and disease[J]. Rom J Morphol Embryol, 2017,58(1):27–31.
- [11] 黄秋,涂平华,欧云生,等. MPPa-PDT 诱导人骨巨细胞瘤细胞自噬[J]. 第三军医大学学报, 2015,37(17):1755–1760.
- [12] Lin Y C, Lin J F, Wen S I, *et al.* Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2017,33(5):215–223.
- [13] Lee J W, Jeong E G, Lee S H, *et al.* Somatic mutations of BECN1, an autophagy-related gene, in human cancers[J]. AP-MIS, 2007,115(6):750–756.
- [14] Laddha S V, Ganesan S, Chan C S, *et al.* Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers[J]. Mol Cancer Res, 2014,12(4):485–490.
- [15] Elgendy M, Ciro M, Abdel-Aziz A K, *et al.* Beclin 1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner[J]. Nat Commun, 2014,5:5637.
- [16] Cinque L, Forrester A, Settembre C. Autophagy gets to the bone [J]. Cell Cycle, 2016,15(7):871–872.

Characteristics of autophagy and its effect on cell proliferation in giant cell tumor of bone

ZHANG Pan-pan¹, LU Rong-zhu², HAO Yan-ming³, FANG Ling-na⁴, HE Da-wei⁵, LI Chong³

(¹Department of Clinical Laboratory, ³Department of Orthopaedics, ⁴Department of Endocrinology,

⁵Clinical Research & Lab Center, Affiliated Kunshan Hospital, Jiangsu University, Suzhou 215000, China;

²Department of Preventive Medicine and Public Health Laboratory Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT Purpose To investigate the autophagy characteristics of giant cell tumor of bone and its effect on cell proliferation. **Methods** Giant cell tumors of bone (GCT-0404 cells) were cultured in vitro and treated with serum-starvation, rapamycin and inhibitor chloroquine. Western blot analysis was performed to detect the autophagic markers LC3 and Beclin 1 expression. Immunofluorescence method was used to show intracellular autophagy formation. Inverted microscope was used to observe the cell morphology. CCK-8 assays were used to detect the cell viability. **Results** Green fluorescent spots that represented the transformation level of LC3- I to LC3- II increased signifi-

cantly ($P < 0.05$) by serum-starvation, rapamycin and inhibitor chloroquine respectively, but the expression level of Beclin 1 was not raised. In addition, the cell morphology changed significantly, and cell proliferation was inhibited after serum-starvation, and treatment with rapamycin and inhibitor chloroquine ($P < 0.05$). **Conclusion** The changes of autophagy caused by serum starvation, rapamycin and inhibitor chloroquine in GCT-0404 cells may be involved in the down-regulation of cell proliferation.

Key words: bone neoplasm; autophagy; giant cell tumor of bone; cell proliferation

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.015.html>

· 综 述 ·

长链非编码 RNA PANDAR 在肿瘤中的研究进展

王新庄,王泉雄,陈鑫,韩大勇,赵世光

摘要:长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNAs) 近年来成为研究的热点。lncRNA CDKN1A 反义链启动子 DNA 损伤激动 RNA (promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA, PANDAR) 在多种肿瘤中表达上调,其主要通过结合核转录因子 Y (NF-Y) 抑制细胞凋亡激活因子的转录等途径参与肿瘤的发生、发展。进一步研究发现,PANDAR 还可作为肿瘤预后标志物,在肿瘤的早期诊断、疗效判断及预后评估等方面具有重要的应用前景。

关键词:恶性肿瘤;长链非编码 RNAs;PANDAR;肿瘤标志物
中图分类号:R 730 **文献标志码:**A

文章编号:1001-7399(2018)03-0310-03

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.015

长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是一类位于细胞核内或胞质中长度超过 200 bp 的 RNA^[1-2],其本身没有明显的开发阅读框,不具有蛋白编码功能,并在表观遗传学、转录及转录后等多种层面上调控基因表达。lncRNA 主要包括:反义长非编码 RNA、内含子非编码 RNA、大基因非编码 RNA (large intergenic non-coding RNA, lincRNA)、启动子相关 lncRNA 以及非翻译区 lncRNA 等。近些年发现,lncRNA CDKN1A 反义链启动子 DNA 损伤激动 RNA (promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA, PANDAR) 在许多恶性肿瘤中异常表达,与肿瘤的发生、发展密切相关,并在恶性肿瘤的诊断与治疗中有着广阔的潜在应用前景。该文主要从 PANDAR 的结构功能以及与肿瘤的关系角度作一综述。

1 PANDAR 的结构与功能

PANDAR 位于细胞周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 抑制蛋白 p21 转录起始位点 (transcription start site, TSS) 上游 5 kb 左右。该基因仅有一个外显子,可沿 p21 的相反方向转录,产生 1.5 kb 的转录产物。p21 和 PANDAR 基因组区域同时受抑癌基因 p53 调控,p53 与 p21 上游

结合,激活 p21 和 PANDAR 转录以应对 DNA 损伤^[3]。Hung 等^[4]于 2011 年首次发现 PANDAR 基因,当致癌基因 RAS 激活或 DNA 受损时可诱导 p53 表达^[5],PANDAR 以 p53 依赖的方式被诱导表达并与转录因子 NF- κ B 相互作用来限制促凋亡基因的表达。核转录因子 (nuclear transcription factor Y, NF-Y) 为三聚体复合物,包括 A、B 和 C 三个亚基,其启动子可以与细胞表面 Fas 死亡受体 (Fas) 结合,来诱导凋亡基因转录。PANDAR 通过结合核转录因子 Y (NF-Y) A 亚基抑制细胞凋亡激活因子的转录,如细胞凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic peptidase activating factor 1, APAF1)、BIK (B cell lymphoma 2 interacting killer),死亡受体 FAS 和 LDD 进而阻断 NF- κ B 亚基启动子与凋亡转录激活因子的结合,最终促进肿瘤细胞的增殖^[3]。PANDAR 和支架附着因子 A (scaffold-attachment-factor A, SAFA) 是调控肿瘤细胞衰老重要节点,调节 PANDAR 的表达水平可能导致肿瘤细胞进入或退细胞衰老状态,从而进一步影响肿瘤细胞的增殖能力^[6]。

2 PANDAR 在恶性肿瘤中的作用

近些年来,随着对 lncRNAs 的研究深入,PANDAR 的生物学功能也渐渐被熟知,在包括消化系统恶性肿瘤、泌尿系统恶性肿瘤、甲状腺癌、乳腺癌、肺癌及骨肉瘤等多种肿瘤中发挥重要调控作用。

2.1 PANDAR 与消化系统肿瘤

2.1.1 PANDAR 与肝癌 PANDAR 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的表达仍不清楚。Puvvula 等^[6-7]发现 PANDAR 在肝癌组织中与癌周组织相比呈低表达。在小鼠模型中,过表达 PANDAR 肝癌细胞具有明显的增殖倾向,PANDAR 表达增高不仅能够促进肿瘤细胞的增殖,还可促进肿瘤在体内的生长。其主要促癌机制可能为:PANDAR 可与 IL-8 启动子的转录因子结合形成多梳复合物,进而抑制 IL-8 基因转录活性,使衰老细胞逃避衰老并继续增殖,最终导致肿瘤的发生。但 PANDAR 是如何通过促进组蛋白修饰或作为组装支架来抑制 IL-8 基因启动子转录活性的生物学机制仍然不清。Peng 等^[8]对临床 482 例肝癌样本进行统计分析,发现 PANDAR 在肝癌组织和细胞系中的表达高于正常肝组织,其表达水平与肝硬化、乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)、甲胎蛋白、体积、血管浸润、TNM 分期密切相关,且 PANDAR 表达越高患者预后越差。由于现有文章中有关 PANDAR 在肝癌中的表达和作用存在一定矛盾,这可能与肿瘤异质性、肿瘤所处的微环境以及目的基因

接受日期:2018-01-05

基金项目:哈尔滨医科大学中俄医学研究中心转化医学专项基金项目 (CR201410)

作者单位:哈尔滨医科大学附属第一医院,哈尔滨 150000

作者简介:王新庄,男,硕士研究生。E-mail: 736756821@qq.com

赵世光,男,博士,教授,通讯作者。E-mail: guangsz@hotmail.com

上游序列的调控相关,这提示在临床中需要进行个体化治疗。

2.1.2 PANDAR 与胃癌 Ma 等^[9]报道胃癌组织与癌旁正常组织相比 PANDAR 表达显著上调,PANDAR 高表达与肿瘤侵袭、TNM 分期Ⅲ + Ⅳ期、淋巴结转移以及不良预后呈正相关,但与患者年龄、性别、肿瘤体积、组织学分化以及远处转移无显著相关性。单变量和多变量 Cox 生存回归分析进一步表明,PANDAR 高表达是胃癌患者预后不良的独立风险因素。由于大多数患者在晚期才能被确诊,胃癌往往不能完全切除或已经发生转移,其治疗和预后仍不理想。鉴于胃癌的早期诊断是可治愈的,相信不久的将来,PANDAR 对于早期诊断和预后评估有着积极的意义。

2.1.3 PANDAR 与结直肠癌 刘宁等^[10]报道 PANDAR 在结直肠正常上皮细胞和癌旁组织中的表达明显低于结直肠癌细胞系和组织,并且与结直肠癌 TNM 分期、淋巴结转移和远处转移相关。PANDAR 在结直肠癌中作为一种促癌基因,通过调控 ZEB1 表达进而促进结直肠癌上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),并增强结直肠癌细胞的转移能力。Lu 等^[11]对 124 例临床结直肠癌组织样本进行统计分析发现,PANDAR 表达上调与肿瘤直径(>5 cm)、低组织分化、TNM 分期Ⅲ + Ⅳ期、远处淋巴结转移、浸润深度呈正相关,与患者生存期、肿瘤复发率呈负相关。当敲除 PANDAR 基因后,N-cadherin、vimentin、 β -catenin、TWIST1、Snail 等肿瘤间质细胞蛋白表达明显减弱,E-cadherin 上皮样细胞蛋白表达水平明显上调,进一步证实 PANDAR 可通过促进 EMT 参与肿瘤的侵袭进展。

2.1.4 PANDAR 与肝胆管癌 Xu 等^[12]发现,PANDAR 在肝胆管癌组织样本和肝胆管癌细胞系中均为高表达,且其高表达水平与肿瘤淋巴结转移、TNM 分期及术后肿瘤复发密切相关。其促癌机制为:(1)PANDAR 可通过上调 MMP-9 表达破坏细胞外基质周围的组织屏障从而增强肝胆管癌细胞的侵袭能力;(2)PANDAR 可通过降低 E-cadherin 以及增加 N-cadherin 和 vimentin 参与 EMT 进而促进肿瘤细胞的侵袭;(3)在体外抑制 PANDAR 基因表达后,可促进癌细胞通过依赖 Caspase-3 途径的细胞凋亡。进一步多因素 Cox 生存回归分析证实,PANDAR 可作为评估患者总生存率的独立指标。

2.2 PANDAR 与甲状腺癌 Li 等^[13]对 64 例甲状腺癌标本统计发现,甲状腺癌组织与癌旁组织相比 PANDAR 表达上调。在体外实验中,用 siRNA 敲除 PANDAR 之后,Bax 蛋白表达增强,BCL-2 蛋白表达受到抑制。众所周知,BCL-2 抑制细胞凋亡和促进多种抗凋亡诱导因素。Bax 可通过与 BCL-2 形成异源二聚体而抑制 BCL-2 的抗凋亡作用。对甲状腺癌细胞增殖作用进一步分析显示,敲除 PANDAR 后可使甲状腺癌细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,并伴有细胞周期相关蛋白 Chk1 和细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达明显降低。除此之外,敲除 PANDAR 还可以抑制甲状腺癌细胞的侵袭。这些研究表明,PANDAR 可作为甲状腺癌的潜在治疗靶点。

2.3 PANDAR 与乳腺癌 Sang 等^[14]对 24 例新鲜冷冻乳腺癌组织和乳腺囊肿组织进行荧光定量 PCR 分析,乳腺癌与乳腺囊肿组织相比 PANDAR 表达显著上调。具体机制可能为,PANDAR 通过相互作用和影响 Bmi1-PRC1 的活动来调控目的基因,其部分作用机制可能下调 p16 表达,进而促进细胞周期 G_1/S 过渡,进一步促进乳腺癌细胞的增殖。李文环等^[15]通过 CCK-8 和 Transwell 实验,证实了 PANDAR 作为癌基因能显著促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭,并可能通过其他蛋白质或 micro-RNA 相互作用发挥生物学功能。随着肿瘤病例特性的进一步研究,PANDAR 对指导临床手术、术后辅助治疗及预后评估有显著意义。

2.4 PANDAR 与肺癌 Han 等^[16]研究发现,p53 基因与 PANDAR 上游 p53 反应元件结合,诱导 PANDAR 基因表达,PANDAR 进而与转录因子(nuclear transcription factor Y, NF-YA)相互作用调控下游 BCL-2 基因的转录,进而促进细胞凋亡,发挥其抑癌基因的功能。在对 140 例非小细胞肺癌患者组织标本研究中发现,PANDAR 在肿瘤细胞系中均为低表达,并且 PANDAR 高表达与肿瘤直径(>3 cm)、TNM 分期Ⅲ + Ⅳ期呈负相关。PANDAR 低表达与患者生存时间呈正相关。在体内外试验中 PANDAR 过表达还可明显抑制非小细胞肺癌细胞的增殖能力。因此,PANDAR 可以作为非小细胞肺癌诊断和治疗的新靶点。

2.5 PANDAR 与泌尿系统肿瘤

2.5.1 PANDAR 与膀胱癌 Zhan 等^[17]通过比较膀胱癌组织及细胞株中 PANDAR 表达,证实 PANDAR 在癌组织和细胞株表达明显高于正常组。PANDAR 表达水平与膀胱癌组织学分级及临床 TNM 分期密切相关。进一步在膀胱癌细胞株中降低 PANDAR 表达后,发现膀胱癌细胞的增殖、迁移能力均受到明显抑制,并且细胞凋亡也明显增加。可能由于临床样本数量偏少,PANDAR 表达水平与肿瘤大小、患者年龄、淋巴结转移等并未表现出明显的差别。随着 PANDAR 与肿瘤关系不断明确,相信 PANDAR 在膀胱癌的早期诊断中扮演着重要作用。

2.5.2 PANDAR 与肾细胞癌 Xu 等^[18]对 62 对肾透明细胞癌进行检测发现,PANDAR 在肾细胞癌组织呈高表达,且与晚期肾透明细胞癌的进展密切相关。进一步研究发现 PANDAR 在肾透明细胞癌中作为促癌基因,其致癌机制为:(1)PANDAR 通过调节细胞周期从 G_0/G_1 期到 S 的过渡,进而促进肿瘤的增殖;(2)PANDAR 通过调节 BCL-2 家族成员和 PI3K/Akt/mTOR 通路从而抑制肾透明细胞癌细胞凋亡。但金露等^[19]的研究发现,PANDAR 在肾癌组织中表达明显低于正常组织。且 PANDAR 在肾癌中的表达和肾癌 TNM 分期、AJCC 分级相关。PANDAR 低表达患者生存率低于高表达患者,这提示 PANDAR 可作为肾癌患者预后生物学标志物。上述研究结果存在不一致,需进一步研究证实。

2.6 PANDAR 与骨肉瘤 骨肉瘤是原发于骨的恶性肿瘤,好发于儿童和青少年,其恶性度高,易发生早期肺转移,且缺

乏早期诊断的标志物^[20]。Kotake 等^[21]首先研究了 PANDAR 在不同人类细胞系中的表达情况,结果显示 PANDAR 在人骨肉瘤细胞中呈高表达。致癌基因 Ras 诱导的 PANDAR 表达可通过抑制细胞凋亡参与癌变过程,并通过促进细胞周期从 G₀/G₁ 期到 S 期的转变调节骨肉瘤细胞的增殖能力。另外,在体外实验沉默 PANDAR 基因后,p18 mRNA 水平显著增加,PANDAR 也可能通过抑制 p18 表达,促进细胞增殖和抑制细胞凋亡,导致细胞恶性转化。但 PANDAR 是否可成为骨肉瘤的治疗靶点,还需进一步研究。

3 展望

虽然近年来有关 lncRNAs 的研究较多,但其生物学功能研究时间尚短,尚有众多不明确的地方。PANDAR 在大多数肿瘤中高表达,但在非小细胞肺癌、肾透明细胞癌中低表达,表明其可同时扮演促癌和抑癌基因双重角色。然而在肝癌中,PANDAR 的表达水平存在不一致性。这可能与肿瘤异质性、肿瘤所处的微环境以及基因多种调控途径相关。PANDAR 在不同肿瘤中的表达水平和生物学功能仍存在矛盾,且在肿瘤中的具体作用机制仍然不明朗,这需要对 PANDAR 的生物学功能作进一步的研究和探索。相信在不久的将来,PANDAR 可以作为肿瘤的潜在治疗靶点和肿瘤预后标志物,更好的服务于临床肿瘤诊治。

参考文献:

- [1] Spizzo R, Almeida M I, Colombatti A, *et al.* Long non-coding RNAs and cancer; a new frontier of translational research? [J]. *Oncogene*, 2012,31(43):4577-4587.
- [2] Bhan A, Soleimani M, Mandal S S. Long Noncoding RNA and Cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017,77(15):3965-3981.
- [3] Kotake Y, Kitagawa K, Ohhata T, *et al.* Long non-coding RNA, PANDA, contributes to the stabilization of p53 tumor suppressor protein[J]. *Anticancer Res*, 2016,36(4):1605.
- [4] Hung T, Wang Y, Lin M F, *et al.* Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell cycle promoters[J]. *Nat Genet*, 2011,43(7):621.
- [5] Kotake Y, Naemura M, Kitagawa K, *et al.* Oncogenic Ras influences the expression of multiple lncRNAs[J]. *Cytotechnology*, 2016,68(4):1591-1596.
- [6] Puvvula P K, Desetty R D, Pineau P, *et al.* Long noncoding RNA PANDA and scaffold-attachment-factor SAFA control senescence entry and exit[J]. *Nat Communicat* 2014,5:5323.
- [7] Peng C, Hu W, Weng X, *et al.* Over expression of long non-coding RNA PANDA promotes hepatocellular carcinoma by inhibiting senescence associated inflammatory factor IL8 [J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):4186.
- [8] Peng W, Fan H. Long non-coding RNA PANDAR correlates with poor prognosis and promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015,72:113-118.
- [9] Ma P, Xu T, Huang M, *et al.* Increased expression of lncRNA PANDAR predicts a poor prognosis in gastric cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016,78:172.
- [10] 刘 宁,成冬冬,姜金波. 长链非编码 RNA PANDAR 促进结肠癌转移的作用和机制研究[J]. *中国癌症杂志*, 2017,27(4):268-275.
- [11] Lu M, Liu Z, Li B, *et al.* The high expression of long non-coding RNA PANDAR indicates a poor prognosis for colorectal cancer and promotes metastasis by EMT pathway[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017,143(1):71-81.
- [12] Xu Y, Jiang X, Cui Y. Upregulated long noncoding RNA PANDAR predicts an unfavorable prognosis and promotes tumorigenesis in cholangiocarcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017,10:2873-2883.
- [13] Li Z, Gao B, Hao S, *et al.* Knockdown of lncRNA-PANDAR suppresses the proliferation, cell cycle and promotes apoptosis in thyroid cancer cells[J]. *Excli J*, 2017,16:354.
- [14] Sang Y, Tang J, Li S, *et al.* lncRNA PANDAR regulates the G1/S transition of breast cancer cells by suppressing p16INK4A expression[J]. *Sci Rep*, 2016,6:22366.
- [15] 李文环,王龙强,江学庆,等. 长链非编码 RNA PANDAR 对乳腺癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2017,34(4):575-577.
- [16] Han L, Zhang E B, Yin D D, *et al.* Low expression of long non-coding RNA PANDAR predicts a poor prognosis of non-Small cell lung cancer and affects cell apoptosis by regulating Bcl-2[J]. *Cell Death Dis*, 2015,6(2):e1665.
- [17] Zhan Y, Lin J, Liu Y, *et al.* Up-regulation of long non-coding RNA PANDAR is associated with poor prognosis and promotes tumorigenesis in bladder cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016,35(1):83.
- [18] Xu Y, Tong Y, Zhu J, *et al.* An increase in long non-coding RNA PANDAR is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2017,17(1):373.
- [19] 金 露,李一帆,何 韬,等. 长链非编码 RNAPANDAR 在肾癌中的表达分析及临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2016,51(9):1342-1345.
- [20] 蒋 念,王雪迪,田 锐,等. 骨肉瘤中 Axl 抑制凋亡及与凋亡蛋白的相关性[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017,33(5):490-496.
- [21] Kotake Y, Goto T, Naemura M, *et al.* Long Noncoding RNA PANDA positively regulates proliferation of osteosarcoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2017,37(1):81.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.016.html>

鼻腔鼻窦球血管外皮细胞瘤的诊断与鉴别诊断

马洪军, 李 磊, 张仁亚

摘要:鼻腔鼻窦球血管外皮细胞瘤是一种少见、惰性和独特的肿瘤,具有血管周肌样表型,可能来源于变异的血管球样肌样细胞,占有鼻腔鼻窦肿瘤的不足1%。好发于中老年人,具有低度恶性潜能,手术切除不完整可复发。组织学上,肿瘤由富于细胞的梭形细胞组成,表面被覆正常黏膜上皮,实质内可见特征性鹿角状血管和透明变性的毛细血管大小的血管,肿瘤间红细胞外渗是其另一形态学特点。梭形细胞呈席纹状排列伴毛细血管增生和鹿角状血管壁透明变性是区别于其它类型肿瘤的一个较为显著的组织学特征。有挑战性的鉴别诊断是其它良性/交界性血管丰富的梭形细胞病变,包括分叶状毛细血管瘤、孤立性纤维性肿瘤、平滑肌瘤和血管纤维瘤等。

关键词:球血管外皮细胞瘤;血管外皮细胞瘤;鼻腔鼻窦;鉴别诊断; β -catenin 突变

中图分类号:R 739.62 **文献标志码:**A

文章编号:1001-7399(2018)03-0313-04

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.016

球血管外皮细胞瘤/鼻腔鼻窦型血管外皮细胞瘤(glo-mangiopericytoma/sinonasal-type hemangiopericytoma)是一种罕见的伴血管周肌样分化的鼻腔鼻窦肿瘤。该肿瘤在发生部位、生物学行为和组织学特征等方面均不同于常见的软组织孤立性纤维性肿瘤(solitary fibrous tumor, SFT),细胞可能来源于变异的血管球样肌样细胞。球血管外皮细胞瘤是一种惰性肿瘤,好发于中老年鼻腔鼻窦,具有低度恶性潜能,手术切除后预后良好。组织学上,病变由上皮下弥漫增生的梭形细胞组成,梭形细胞形态温和、一致,排列紧凑,以各种方式生长,各种不同大小的血管腔组成独特的血管网,时常可见血管周玻璃样变的较小血管。笔者结合活检中遇到的1例鼻腔鼻窦球血管外皮细胞瘤,对其组织起源、临床病理特征、免疫表型、诊断和鉴别诊断以及分子生物学特征等简要综述,以提高临床和病理医师对其的认识。

1 组织起源

1942年 Stout 和 Murray 首次提出血管外皮细胞瘤^[1],

接受日期:2017-10-24

基金项目:济宁市科技发展计划项目[济科字(2016)56号-28]

作者单位:济宁医学院附属医院病理科,济宁 272029

作者简介:马洪军,男,副主任医师。E-mail:fsyymhj@163.com

张仁亚,男,教授,主任医师,通讯作者。E-mail:hzzhang_1964@163.com

1976年 Compagno 和 Hyams 首次描述了鼻腔血管外皮瘤样肿瘤^[2],肿瘤特征显著,由梭形肌样细胞围绕突出的脉管系统构成,其特征表明该病变与软组织经典血管外皮细胞瘤缺少共同点,但与其他血管周肌样病变相似,尤其是血管球瘤^[3-5],血管外皮细胞瘤受到了质疑^[3]。球血管外皮细胞瘤仅见于鼻腔和鼻道,软组织中没有对应肿瘤,有学者建议将其称为血管外皮细胞瘤样肿瘤^[2-5]。WHO(2005)将该肿瘤归于交界性和低度恶性的鼻及鼻窦旁软组织肿瘤,目前将其称为球血管外皮细胞瘤,在鼻腔鼻窦肿瘤中所占比例不足1%^[6]。

2 临床特征

球血管外皮细胞瘤发病年龄宽泛,发病高峰60~70岁,女性略多见。最常见于鼻腔,可以延伸到鼻窦旁,也有单发于鼻窦旁的报道^[2-3,6]。患者临床通常表现为鼻塞和鼻出血,临床症状持续时间为1~60个月,平均为10.0个月,长期的症状很可能与最初症状的一般非特异性有关。检查发现该肿瘤在鼻腔内以息肉样团块生长,临床上容易误诊为炎症性息肉,如侵及鼻窦、眼眶及颅内,可表现出相应症状。肿瘤组织也可分泌异位激素,临床上偶见高血压、低血糖和女性男性化性征。作者遇到1例67岁男性患者,左鼻腔反复出血10年,加重4天,鼻腔及鼻窦CT扫描所见:双侧上颌窦筛窦及蝶窦见黏膜增厚,窦腔内见低密度影,所见骨质无明显增生及破坏,鼻中隔向右侧偏曲,双下鼻甲明显肥大,左侧鼻腔内见软组织影,CT诊断:副鼻窦炎,左侧鼻息肉可能,鼻中隔偏曲,双下鼻甲肥大,内镜切除破碎组织,病理诊断为鼻腔鼻窦球血管外皮细胞瘤。

3 病理特征

3.1 眼观 肿瘤多呈息肉样团块状生长,累及鼻腔或鼻窦旁,表现为弥漫性黏膜下肿物,围绕小涎腺。由于多数样本是内镜下切除的碎片,故病变大体形态一般意义不大,如果切除完整,病变呈实性、较软、肉质或切面易碎,伴出血和(或)水肿区,肿瘤直径1~8cm,平均3.1cm^[7]。本例送检组织为破碎组织,大小4cm×3.5cm×2cm,切面灰白色,质韧,部分为碎骨组织。

3.2 镜检 肿瘤由富于细胞的梭形细胞组成,实质内可见特征性鹿角状血管和透明变性的毛细血管大小的血管(图1),尤其是低倍镜下更显著。瘤细胞呈圆形、卵圆形或梭形,胞质轻度嗜酸性,细胞界限清楚。瘤细胞密度大,除了呈弥漫和短束状生长外(图2),也可呈席纹状和车辐状生长,不

同生长模式常常混合存在。肿瘤细胞间可见较多大小不等的薄壁血管,管腔呈圆形、不规则形或裂隙状,常见血管壁玻璃样变性。梭形细胞席纹状排列伴毛细血管增生和鹿角状血管壁透明变性是其区别于鼻腔鼻窦其他类型肿瘤的一个较为显著的组织学特点。肿瘤间红细胞外渗(图3)也是球血管外皮细胞瘤的形态学特点之一,部分区域细胞稀疏、部分水肿样变性。少数情况下,肿瘤覆盖的表面上皮鳞化和溃疡形成,基膜和瘤细胞之间有较薄的无瘤区^[4](图4)。除上述细胞形态特征外,偶尔肿瘤局灶有更圆的细胞外观,类似血管球瘤^[7],而与血管球瘤不同的是因为球血管外皮细胞瘤细胞无明显的细胞边界,其嗜酸性胞质形成合胞体外观的缘故。尽管胞质淡染,可见一个较小的核仁,但是细胞核具有椭圆形平滑的轮廓,多数可见散在分布的肥大细胞、嗜酸粒细胞、淋巴细胞浸润,尽管不特异,也可见轻度细胞异型性,偶见核分裂象(图5),但无坏死。小部分肿瘤可显示肿瘤巨细胞、透明细胞或黏液变性^[7]。

4 免疫和超微结构及分子表型

免疫组化标记和电镜表明^[8]:球血管外皮细胞瘤是真正具有肌样表型的周细胞肿瘤。大多数肿瘤表达 SMA、MSA 和 vimentin^[3-4,8],典型的呈弥漫强阳性,有时局灶表达,也常表达 XIIIa。尽管 CD34 呈和 S-100 蛋白可能在极少数肿瘤中呈局灶和弱阳性^[3-4,7-8],但多数肿瘤 desmin、S-100 蛋白和

CD34 阴性,另外 BCL-2、CD99、CD117 和 CK 亦呈阴性。最近文献已证实鼻腔鼻窦型血管外皮细胞瘤有 CTNNB1 基因突变与 β -catenin 的核表达^[9-10]。本例 β -catenin 核强阳性(图6),vimentin(图7)、SMA(图8)及 actin 阳性,CD34、desmin、S-100、BCL-2、CD99、CD117 和 CK 均阴性。

5 诊断和鉴别诊断

球血管外皮细胞瘤可能与发生在鼻道的各种梭形细胞和血管肿瘤混淆,术前病理检查至关重要,误诊导致切除不彻底是术后复发的主要原因。有挑战性的鉴别诊断常不是肉瘤,因肉瘤多明显恶性,而是其他良性/交界性血管丰富的梭形细胞病变,最常见的是分叶状毛细血管瘤(lobular capillary hemangioma, LCH)、SFT、平滑肌瘤和血管纤维瘤等。由于该病少见,病理诊断相对困难,病理科医师的经验显得尤为重要。影像学常表现为软组织团块影,具有局部破坏行为。CT 可准确地显示肿瘤部位、大小、范围及相邻结构的受侵犯情况。免疫组化作为该病主要的病理检测手段,大大增加了该病的检出率和准确率。以下重点讨论有助于和球血管外皮细胞瘤相鉴别的其它病变特征。

5.1 LCH LCH 又称化脓性肉芽肿,鼻腔中比较常见,约占上呼吸道 LCH 的 1/3。多数发生在鼻中隔,可累及任何部位,比球血管外皮细胞瘤小,直径 1~8 cm,平均 1.7 cm,有类似临床表现,年龄范围广,总体发病年龄较

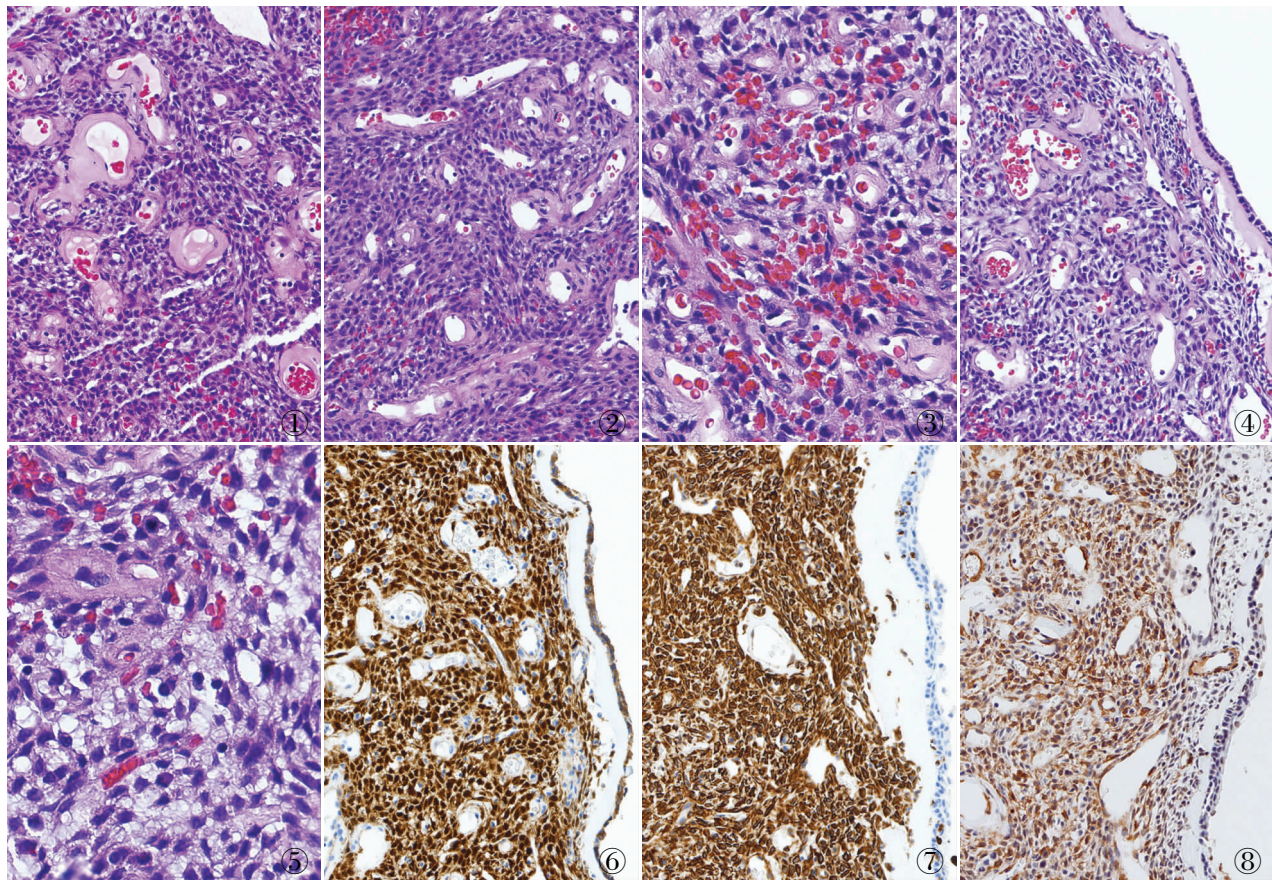


图1 血管壁玻璃样变 图2 短束状排列 图3 红细胞外渗 图4 上皮下无细胞带 图5 核分裂象 图6 肿瘤细胞 β -catenin 核阳性, EnVision 两步法 图7 肿瘤细胞 vimentin 阳性, EnVision 两步法 图8 肿瘤细胞 SMA 阳性, EnVision 两步法

低,范围 8 ~ 82 岁,平均 37 岁,小于 18 岁的患者男性较多(男女比为 4 : 1),18 岁及以上患者女性较多(男女比为 1 : 4)。大体观察是息肉样血管黏膜下肿物,表面黏膜完整,黏膜下结构消失,是一种富于细胞性肿瘤,伴有突出的血管,大的不规则扩张的血管伴间质出血,不同于球血管外皮细胞瘤,血管呈分叶状,常见大的营养性中央血管,逐渐分支,变小,最终呈狭缝状血管腔,与球血管外皮细胞瘤所见不同,细胞往往更紊乱,核不规则,沿血管腔成行排列,相比之下,核分裂象更常见,覆盖的黏膜也常溃烂伴有肉芽组织和慢性炎症。免疫组化标记 LCH 呈血管内皮分化,CD31 和 CD34 阳性。actin 将突出血管周肌样细胞和非内衬血管腔的细胞。该病变通过手术切除可治愈且很少复发。

5.2 血管纤维瘤 血管纤维瘤以前称幼年型鼻咽血管纤维瘤(juvenile nasopharyngeal angiofibroma, JNA),几乎完全发生在青春期男性,成人很少发生。这些良性血管间叶性肿瘤是由逐渐变成毛细血管大小的扩张性大血管组成,位于后外侧鼻腔靠近蝶腭孔,可长很大,侵蚀骨和扩展至颅内,且往往难以切除。由于具有丰富的间质胶原,低倍显示比球血管外皮细胞瘤更嗜酸的外观,血管纤维瘤的星状细胞形态温和,分布均匀,染色质呈空泡状,并且与胶原纤维密切相关。相对少的临床情况和间质胶原足以将其和球血管外皮细胞瘤区别。免疫组化标记 AR 和 β -catenin 核阳性。血管纤维瘤为良性肿瘤,复发率为 5% ~ 10%,局部可以呈侵袭性,罕见死于肿瘤进展,典型的表现为颅内蔓延。

5.3 SFT 头颈部 SFT 约占 SFT 总数的 6%,近 1/3 胸膜外 SFT 发生在头颈部,其中 15% 发生在鼻腔、鼻窦。总的来说,鼻腔鼻窦 SFT 罕见,不足所有鼻腔鼻窦肿瘤的 1%^[11],鼻腔比鼻窦更常见,成人多见,平均年龄 52 岁,性别大致相当,临床表现类似任何伴鼻塞、流涕等阻塞性鼻腔肿瘤^[12]。大体上,SFT 往往比鼻腔鼻窦球血管外皮细胞瘤更大(范围 1.7 ~ 8 cm,平均 5.25 cm),两者形态学上有重叠,镜下可见完整的表面上皮,黏膜下结构消失,呈弥漫富于梭形细胞的增殖,可能类似于球血管外皮细胞瘤,由鹿角型和毛细血管型血管组成各种血管的富于细胞区和寡细胞区也像球血管外皮细胞瘤,但血管玻璃样变性不典型。与缺少明显生长模式的球血管外皮细胞瘤相比,其核不规则,细胞重叠,排列更无序,可见突出的绳索样胶原束,梭形瘤细胞与间质细胞密切相关。SFT 瘤细胞 CD34 常胞质呈弥漫强阳性,STAT6 核阳性^[13-15],而 SFT 中 β -catenin 可呈阳性^[15],actin 阴性。鼻腔鼻窦 SFT 与软组织 SFT 相比恶性可能性小,复发率低,罕见转移。

5.4 平滑肌瘤 可以发生在鼻腔鼻窦但很少见,占鼻腔鼻窦非上皮性肿瘤不足 1%,发病年龄较宽,20 ~ 67 岁,但最常见于中年成人(平均年龄 40 岁),女性稍多(男比女为 1 : 1.5),与球血管外皮细胞瘤一样,平滑肌瘤富于鹿角状和毛细血管大小的血管伴有富于梭形细胞的增生。低倍镜下有平滑肌瘤明确的特征,表现为更多的嗜酸性以及常呈明显的束状结构,嗜酸性低倍特征是因为丰富的嗜酸性纤维胞质。细

胞核更长,染色质粗糙,偶见核周空泡。desmin 强阳性有助于和球血管外皮细胞瘤区别,临床预后好,手术后很少复发。

6 治疗和预后

球血管外皮细胞瘤是一种惰性肿瘤,手术切除后 5 年生存率超过 90%^[3,6]。部分由于切除不完整,局部复发率占手术患者的 7% ~ 40%,而侵袭性病例罕见^[3-5,8]。肿瘤较大(5 cm)、侵犯骨组织、具有深染多形性核、坏死、高核分裂象(4/10 HPF)以及 10% 以上 Ki-67 增殖活性,可能更具有侵袭性生物学行为^[3,6,16]。

7 小结

综上所述,球血管外皮细胞瘤是中老年人鼻腔鼻窦发生的少见、惰性、独特的肿瘤,具有血管周肌样表型,无论是发生部位、生物学行为还是形态学均不同于软组织血管外皮细胞瘤。特征性的组织学特点包括上皮下弥漫性增生的梭形细胞,形态温和,富于细胞,独特的血管网组成的各种大小的血管通路,部分血管玻璃样变性。需与 LCH、SFT、平滑肌瘤和血管纤维瘤等肿瘤鉴别。重要的是,球血管外皮细胞瘤常表现为良性生长方式,局部切除即可,很少需要进一步治疗。

参考文献:

- [1] Stout A P, Murray M R. Hemangiopericytoma: a vascular tumor featuring Zimmerman's pericytes[J]. Ann Surg, 1942,116(1): 26 - 33.
- [2] Compagno J, Hyams V J. Hemangiopericytoma-like intranasal tumors. A clinicopathologic study of 23 cases[J]. Am J Clin Pathol, 1976,66(4): 672 - 683.
- [3] Thompson L D R, Miettinen M, Wenig B M. Sinonasal-type hemangiopericytoma a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 104 cases showing perivascular myoid differentiation[J]. Am J Surg Pathol, 2003,27(6): 737 - 749.
- [4] Tse L L Y, Chan J K C. Sinonasal haemangiopericytoma-like tumour: a sinonasal glomus tumour or a haemangiopericytoma? [J]. Histopathology, 2002,40(6): 510 - 517.
- [5] Kuo F Y, Lin H C, Eng H L, Huang C C. Sinonasal hemangiopericytoma-like tumor with true pericytic myoid differentiation: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases[J]. Head Neck, 2005,27(2): 124 - 129.
- [6] Barnes L, Eveson J W, Reichart P, et al. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours[M]. Lyon: IARC Press, 2005: 43 - 44.
- [7] Dandekar M, McHugh J B. Sinonasal glomangiopericytoma: case report with emphasis on the differential diagnosis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2010,134(10): 1444 - 1449.
- [8] Eichorn J H, Dickersin G R, Bhan A K, et al. Sinonasal hemangiopericytoma: a reassessment with electron microscopy, immunohistochemistry, and long-term follow-up[J]. Am J Surg Pathol, 1990,14(9): 856 - 866.
- [9] Haller F, Bieg M, Moskalev E A, et al. Recurrent mutations with-

- in the amino-terminal region of β -catenin are probable key molecular driver events in sinonasal hemangiopericytoma [J]. Am J Pathol, 2015,185(2):563–571.
- [10] Lasota J, Felisiak-Golabek A, Aly F Z, *et al.* Nuclear expression and gain-of-function beta-catenin mutation in glomangiopericytoma (sinonasal-type hemangiopericytoma): insight into pathogenesis and a diagnostic marker [J]. Mod Pathol, 2015,28(5):715–720.
- [11] Ganly I, Patel S G, Stambuk H E, *et al.* Solitary fibrous tumors of the head and neck: a clinicopathologic and radiologic review [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2006,132(5):517–525.
- [12] Morales-Cadena M, Zubiaur F M, Alvarez R, *et al.* Solitary fibrous tumor of the nasal cavity and paranasal sinuses [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2006,135(6):980–982.
- [13] Doyle L A, Vivero M, Fletcher C D, *et al.* Nuclear expression of STAT6 distinguishes solitary fibrous tumor from histologic mimics [J]. Mod Pathol, 2014,27(3):390–395.
- [14] Schweizer L, Koelsche C, Sahn F, *et al.* Meningeal hemangiopericytoma and solitary fibrous tumors carry the NAB2-STAT6 fusion and can be diagnosed by nuclear expression of STAT6 protein [J]. Acta Neuropathol, 2013,125(5):651–658.
- [15] Jo V Y, Fletcher C D M. Nuclear b-Catenin expression is frequent in sinonasal hemangiopericytoma and its mimics [J]. Head Neck Pathol, 2017,11(2):119–123.
- [16] Thompson L D, Fanburg-Smith J C. Update on select benign mesenchymal and meningotheial sinonasal tract lesions [J]. Head Neck Pathol, 2016,10(1):95–108.

· 国外期刊文摘 ·

原发性甲状腺癌与对应淋巴结转移灶中 BRAF 及 NRAS 突变的一致性

Fakhruddin N, Jabbour M, Novy M, *et al.* BRAF and NRAS mutations in papillary thyroid carcinoma and concordance in BRAF mutations between primary and corresponding lymph node metastases. Sci Rep, 2017,7(1):4666–4667.

为了对比分析晚期原发性乳头状甲状腺癌 (PTC) 及其相对应的淋巴结转移灶之间基因突变的一致性,阐明分子靶向治疗的潜在作用,选择 2001 年 1 月~2011 年 12 月黎巴嫩贝鲁特病理和实验室医学部门美国贝鲁特大学医学中心 (AUBMC) 及哈穆德医院大学医学中心 (HHUMC) 312 例 PTC 的福尔马林固定、石蜡包埋组织,对其中 253 例可用石蜡块中肿瘤直径 >1 mm 的 PTC 病例进行 BRAF 和 KRAS 突变分析,202 例可用提取 DNA 的进行 NRAS 突变分析,将 15 例多结节性甲状腺肿作为阴性对照。应用 Strip Assays (Vienna Lab Diagnostics) 分析软件对原发性 PTC ($n=253$) 与具有相应转移灶的淋巴结 ($n=46$) 中 BRAF 和 NRAS 突变数据进行处理。结果显示:普通型 PTC (cPTC)、甲状腺微小乳头状癌 (PTMC)、滤泡变异型 PTMC (PTMC-FV) 及滤泡变异型 PTC (PTC-FV) 中 BRAF 突变率分别为 56.8%、36.5%、2.7% 和 4.1%,而 NRAS 突变率分别为 19.0%、28.6%、23.8% 及 28.6%。将 cPTC、PTMC、PTMC-FV 和 PTC-FV 中 BRAF 和 NRAS 的突变状态与患者年龄、性别、肿瘤大小、包膜外扩散、淋巴管血管累及、淋巴结转移和多灶性等临床病理参数包括进行比较后发现,BRAF 突变仅与患者年龄相关 ($P < 0.001$)。原发性 PTC 及其相应的淋巴结转移灶中 BRAF 突变率一致 ($\kappa=0.77, P < 0.0001$),表明 cPTC 和 PTMC 中以

BRAF 突变为主,而 PTC-FV 中以 NRAS 突变为主。在淋巴结转移灶中 BRAF 突变保守,属于早期致病驱动子。因此,靶向治疗在复发和晚期疾病中具有潜力。

PTC 占美国所有癌症的 1.5%,而阿拉伯国家高达 6%。约 50% 的 PTC 存在淋巴结转移,5%~7% 呈现远处转移,通常涉及肺和骨。PTC 复发和转移的临床病理预后因素包括年龄、性别、肿瘤大小、浸润性生长模式、多发性和甲状腺外扩散。近来,遗传畸变也被假定为 PTC 临床与转移行为的风险因素,包括丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路的酶,特别是 BRAF 和 RAS 基因。PTC 病例中 BRAF V600E 占突变亚型的 98.0%,其次是 BRAF V600M;而 NRAS 突变亚型包括 c.182A $>$ G (p. Q61R) c.181C $>$ A (p. Q61K), c.34G $>$ A (p. G12S) 和 c.38G $>$ A (p. G13D)。已有研究发现 BRAF 突变状态与预后相关,如 Nikiforova 等报道 BRAF 状态仅与高龄 (55 岁) 及甲状腺外扩展相关;而 Barabaro 等确定 BRAF 突变与淋巴结转移无显著关联。然而,越来越多的证据表明,BRAF 突变与其他尤其是 TERT 启动子突变共存,提示预后不良。在手术不可切除和对放疗抗的复发性和晚期转移性 PTC 病例中选择性分子靶向治疗是否具有潜在作用,尚存争议。一项使用 Selumetinib (一种靶向治疗 PTC 中 BRAF 突变的酪氨酸激酶抑制剂) 进行的 II 期临床试验表明,患者无任何显著的生存获益。因此有必要推荐淋巴结中进行 BRAF 突变检测,以便准确鉴定晚期 cPTC 中选择性酪氨酸激酶抑制剂的反应者。但研究同时指出,仅在 cPTC 和 PTMC 中检测到转移性淋巴结内的 NRAS 突变,数量太低,无法在两者之间得出显著的一致率。

(张丽华 摘译,方三高 审校/福建医科大学附属三明第一医院病理科,三明 365000)

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.017.html>

· 短篇论著 ·

膀胱尿路上皮癌中碳酸酐酶IX的表达及意义

章萍萍^{1,2}, 黄文斌², 王晓蕾², 王劲松², 黄悦²

摘要:目的 探讨碳酸酐酶IX(carbonic anhydrase IX, CAIX)在膀胱尿路上皮癌中的表达,及CAIX在膀胱尿路上皮癌中的诊断价值及临床意义。方法 应用免疫组化EnVision法检测70例(低级别尿路上皮癌30例,高级别尿路上皮癌40例)和10例膀胱黏膜慢性炎中CAIX的表达。结果 CAIX在膀胱尿路上皮癌中的阳性率为67.1%(47/70),而在膀胱慢性炎中均阴性,差异有统计学意义($P < 0.01$)。CAIX在低级别尿路上皮癌中的表达高于高级别尿路上皮癌,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CAIX在膀胱pT0期尿路上皮癌中的阳性表达高于pT1及以上分期,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 CAIX免疫组化检测可有助于膀胱尿路上皮癌的诊断。膀胱尿路上皮癌中CAIX低表达可能会预测膀胱癌的生物行为。

关键词:膀胱肿瘤;尿路上皮癌;碳酸酐酶IX;免疫组织化学
中图分类号:R 737.14 **文献标志码:**B

文章编号:1001-7399(2018)03-0317-02

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.017

膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma)是膀胱最常见的恶性肿瘤,占膀胱肿瘤的90%,具有多灶性发生和易复发的特点。低级别非浸润性膀胱尿路上皮癌与膀胱炎性病变引起的尿路上皮增生、低级别和高级别尿路上皮癌之间的鉴别有时比较困难,但它们的鉴别对于临床治疗非常重要。虽然目前文献报道关于它们的鉴别诊断已有一些免疫组化标志物,但这些标志物在临床应用中尚存在不足^[1]。本文应用免疫组化法检测膀胱尿路上皮癌中碳酸酐酶IX(carbonic anhydrase IX, CAIX)的表达,探讨CAIX在膀胱尿路上皮癌中的临床病理意义及在上述病变鉴别诊断中的价值。

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集南京市第一医院病理科2013年1月~2016年12月行膀胱镜活检或手术切除病理诊断为膀胱尿路上皮癌标本70例,患者年龄35~97岁,中位年龄68

岁,其中男性48例,女性22例。其中低级别尿路上皮癌30例,高级别尿路上皮癌40例。pT0期36例,pT1期及以上34例。同时收集膀胱黏膜慢性炎标本10例作为对照。

1.2 方法 所有标本均经过4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm厚连续切片。免疫组化染色采用EnVision法,石蜡切片常规脱蜡、水化后,经高温高压抗原修复(10%柠檬酸盐抗原修复缓冲液,pH 6.0);滴加100 μL一抗(鼠抗人CAIX单克隆抗体,H-11,购自北京中杉金桥公司),4℃过夜;滴加100 μL经HRP标记的二抗;冲洗后DAB显色;苏木精复染,中性树脂胶封固。

1.3 结果判断 CAIX阳性表达主要位于细胞膜和(或)细胞质中。根据染色强度及染色细胞百分率进行分级评分,(1)按细胞染色强度评分:无阳性染色为0分,淡黄色为1分,黄色2分,棕黄色至棕褐色为3分;(2)按染色细胞百分率评分:<5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。综合两种评分结果最后判定:≤3分为(-),4~5分为阳性(+),6~7分为强阳性(++)。

1.4 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,CAIX在膀胱尿路上皮癌与慢性炎中的表达差异采用Fisher确切概率计算法,CAIX表达与膀胱尿路上皮癌分级和分期之间的关系采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 CAIX在膀胱尿路上皮癌及慢性炎中的表达 CAIX在膀胱慢性炎症中的尿路上皮均阴性,而在膀胱尿路上皮癌中表达于癌细胞胞膜和(或)胞质,阳性部位主要位于乳头结构的腔面和坏死区域的周边(图1)。CAIX在膀胱尿路上皮癌中阳性者47例,阳性率为67.1%,CAIX在膀胱尿路上皮癌中的阳性率显著高于膀胱黏膜慢性炎,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 膀胱尿路上皮癌中CAIX表达与病理分级和pT分期的关系 CAIX在膀胱低级别尿路上皮癌中的表达高于高级别尿路上皮癌,差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。CAIX在pT0期尿路上皮癌中的表达高于pT1期及其以上分期,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

CAIX是酸性氨基酸组成的糖蛋白,对细胞内碱性环境和细胞外酸性环境的维持起着重要调控作用。CAIX在肿瘤增殖中也是通过pH值改变来调控肿瘤细胞的分化与增殖。一些文献报道,CAIX在多种恶性肿瘤如肺癌、结肠癌、乳腺

接受日期:2018-01-27

作者单位:¹南京中医药大学附属南京市中西医结合医院病理科,南京 210000

²南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)病理科,南京 210006

作者简介:章萍萍,女,硕士研究生,医师

黄悦,女,副主任医师,通讯作者。Tel: (025) 52887063, E-mail: huangyuexy@163.com

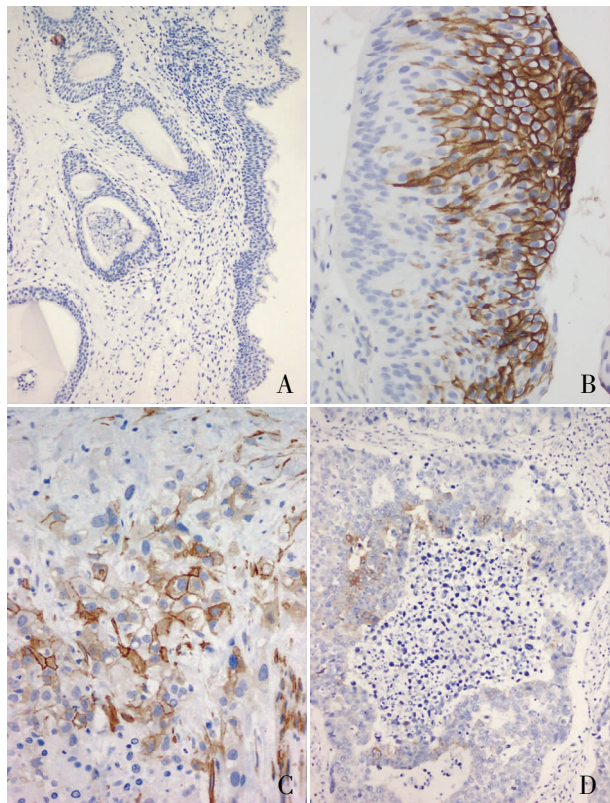


图1 A. CAIX在正常膀胱中呈阴性;B. CAIX在低级别尿路上皮癌中的表达;C. CAIX在高级别浸润性尿路上皮癌中的表达;D. CAIX在肿瘤性坏死周围尿路上皮癌中的表达,EnVision 法

表1 膀胱尿路上皮癌中 CAIX 的表达与病理分级和 pT 分期的关系

临床病理参数	n	CAIX	χ^2 值	P 值
		+ (%)		
病理分级				
低级别	30	25 (83.3)	6.638	0.013
高级别	40	22 (55.0)		
pT 分期				
T0	36	28 (77.8)	3.800	0.051
≥T1	34	19 (55.9)		

癌、宫颈癌、肾细胞癌和膀胱癌中均有表达,并且 CAIX 表达与肿瘤的预后密切相关^[2]。近来国外有研究通过组织微阵列技术发现 CAIX 可以作为乳腺癌、肺癌、卵巢癌和膀胱癌等不良预后的生物标志物^[3-4]。

Turner 等^[5]采用免疫印迹和免疫组化法分别检测 22 例膀胱癌中 VEGF mRNA 和 CAIX 蛋白的表达,结果发现 18 例检测 VEGF mRNA 的病例中,至少 50% 表达 VEGF 的区域也表达 CAIX,而且 CAIX 的表达分布与 VEGF 相似,CAIX 表达主要位于乳头状结构表面和浸润性肿瘤坏死周围区域,且在浅表性肿瘤中表达更强,而正常膀胱组织中未见 CAIX 表达。Klatte 等^[4]报道所有正常尿路上皮 CAIX 呈阴性,而 71% 的膀胱癌表达 CAIX。Urquidi 等^[6]采用酶联免疫吸附法检测 64 例膀胱尿路上皮癌和 63 例正常人尿液中 CAIX 和 VEGF 的水平,结果发现膀胱癌患者尿液中 CAIX 和 VEGF 均明显高于正常人。本实验结果显示 CAIX 在慢性膀胱炎的膀胱黏

膜上皮均阴性,而在膀胱尿路上皮癌中的阳性率为 67.1%。综合本实验和国外研究结果,提示 CAIX 可作为膀胱尿路上皮癌诊断的标志物。

膀胱癌中 CAIX 表达与临床病理特征之间的关系国外文献亦有一些报道,但结果也不一致。Ord 等^[7]研究发现 21 例浅表性和 11 例浸润性膀胱癌中分别有 13 例和 3 例表达 CAIX。Ord 等^[8]另一项研究发现 98 例不同 pT 分期的膀胱癌中,CAIX 从 T1 到 T3 期表达增加,T4 期则表达降低,而且他们还发现 CAIX 表达与尿路上皮癌病理分级无关。Klatte 等^[4]报道 CAIX 在浸润性尿路上皮癌(T1 ~ T4)、高级别膀胱癌和转移灶中的表达均低于非浸润性尿路上皮癌、低级别膀胱癌和对应的原发灶。赵孟文等^[9]研究发现 CAIX 在非肌层浸润性膀胱癌中的表达低于肌层浸润性膀胱癌。本实验结果显示 CAIX 在低级别尿路上皮癌中的表达高于高级别尿路上皮癌,pT0 期尿路上皮癌中的表达高于 pT1 期及以上分期,提示 CAIX 低表达不仅可有助于膀胱高级别尿路上皮癌的诊断,而且还可预测膀胱尿路上皮癌具有更强的侵袭性行为,需要临床给予积极处理和治理。

由于 CAIX 在非肿瘤性膀胱黏膜中表达阴性,是否可以作为临床抗肿瘤药物治疗的潜在靶点,尚有待于更进一步的实验和临床研究。

参考文献:

[1] Amin M B, McKenney J K, Paner G P, *et al.* ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012; pathology [J]. Eur Urol, 2013, 63 (1): 16 - 35.

[2] Ilardi G, Zambrano N, Merolla F, *et al.* Histopathological determinants of tumor resistance: a special look to the immunohistochemical expression of carbonic anhydrase IX in human cancers [J]. Curr Med Chem, 2014, 21 (14): 1569 - 1582.

[3] van Kuijk S J, Yaromina A, Houben R, *et al.* Prognostic significance of carbonic anhydrase IX expression in cancer patients; a meta-analysis [J]. Front Oncol, 2016, 6: 69.

[4] Klatte T, Seligson D B, Rao J Y, *et al.* Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker [J]. Cancer, 2009, 115 (7): 1448 - 1458.

[5] Turner K J, Crew J P, Wykoff C C, *et al.* The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer [J]. Br J Cancer, 2002, 86 (8): 1276 - 1282.

[6] Urquidi V, Goodison S, Kim J, *et al.* Vascular endothelial growth factor, carbonic anhydrase 9, and angiogenin as urinary biomarkers for bladder cancer detection [J]. Urology, 2012, 79 (5): 1185, e1 - e6.

[7] Ord J J, Streete E H, Roberts I S, *et al.* Comparison of hypoxia transcriptome in vitro with in vivo gene expression in human bladder cancer [J]. Br J Cancer, 2005, 93 (3): 346 - 354.

[8] Ord J J, Agrawai S, Thamboo T P, *et al.* An investigation into the prognostic significance of necrosis and hypoxia in high grade and invasive bladder cancer [J]. J Urol, 2007, 178 (2): 677 - 682.

[9] 赵孟文. 碳酸酐酶 IX 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义 [D]. 长沙: 中南大学, 2009.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.018.html>

肺癌所致恶性胸腔积液中 Survivin、Ki-67 的表达及意义

权春姬¹, 李文浩¹, 林贞花²

摘要:目的 探讨 Survivin 蛋白、Ki-67 在肺癌所致恶性胸腔积液中的表达及临床意义。方法 采用细胞块结合免疫组化染色检测 72 例恶性胸腔积液和 12 例良性积液中 Survivin 蛋白和 Ki-67 的表达, 分析比较两者在良、恶性胸腔积液中的表达及与临床病理特征的关系。结果 72 例恶性胸腔积液中 Survivin、Ki-67 的阳性率分别为 66.7% (48/72)、72.2% (52/72), 12 例良性积液中均无表达; Survivin、Ki-67 在小细胞癌组中阳性率为 88.9% (16/18)、94.4% (17/18), 明显高于非小细胞癌组 59.3% (32/54) 和 64.8% (35/54), 两组比较差异有显著性 ($P < 0.05$); Survivin、Ki-67 表达与有无淋巴结转移相关 ($P < 0.01$), 而与患者性别、年龄、有无吸烟及远处转移无关 ($P > 0.05$); 恶性胸腔积液中 Survivin 与 Ki-67 的表达呈正相关 ($r = 0.680, P < 0.001$)。结论 肺癌所致恶性胸腔积液中 Survivin、Ki-67 的表达明显增高, 且在小细胞癌与非小细胞癌间差异有显著性; 细胞块结合免疫组化技术检测 Survivin、Ki-67 表达可作为肺癌诊断参考指标, 两者在恶性胸腔积液发展中起协同作用。

关键词: 肺肿瘤; Survivin; Ki-67; 胸腔积液; 免疫组织化学; 细胞块

中图分类号: R 735.2 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0319-03

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.018

胸腔积液是呼吸系统常见疾病之一, 分为良性和恶性。恶性胸腔积液中以肺癌为首位。恶性胸腔积液的诊断主要通过细胞学检查, 但敏感性较低。随着细胞蜡块的成熟和发展, 免疫细胞化学染色技术倍受重视, 人们试图通过检测肿瘤相关蛋白表达为恶性细胞的诊断提供更大帮助。Survivin 蛋白是目前发现最强的凋亡抑制因子, 在大多数肿瘤中均表达^[1-3], 并与预后相关。因具有独特的抑制细胞凋亡功能, 在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用, 成为关注的热点。Ki-67 是反应癌细胞增殖情况的指标。本实验应用胸水细胞块结合免疫组化 EnVision 法观察 Survivin、Ki-67 在恶性胸水中的表达水平, 分析其相互关系及可能机制。

接受日期: 2018-01-22

基金项目: 延边大学科技计划项目[延大科合字(2015)第 23 号]

作者单位: ¹ 吉林省延边大学附属医院病理科, 吉林 133000

² 吉林省延边大学医学院病理学教研室, 吉林 133000

作者简介: 权春姬, 女, 硕士, 主治医师。E-mail: chunjiqian@163.com

林贞花, 女, 博士, 教授, 通讯作者。E-mail: zhlin720@ybu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 收集延边大学附属医院 2012 年 3 月~2016 年 5 月因肺癌引起胸腔积液住院患者 72 例, 其中小细胞癌 18 例、非小细胞癌 54 例, 男性 39 例, 女性 33 例, 患者年龄 42~81 岁, 平均 (65 ± 10.8) 岁。所有病例均为首次经细胞学确诊。另选良性积液(主要为炎性引起)12 例作为对照(男性 8 例, 女性 4 例), 年龄 49~78 岁, 平均 (62 ± 8.4) 岁。

1.2 方法

1.2.1 标本处理及细胞蜡块制作 取新鲜胸腔积液标本 200 mL, 尖底塑料管中离心 $(3\ 000\ r/min, 5\ min)$, 弃上清, 加入 95% 乙醇, 混匀后重复离心, 去上清液, 用手术剪从试管底端开始以 0.2 cm 厚度剪去, 将装有沉淀物的试管放入包埋盒中, 置于 10% 中性福尔马林固定 2 h, 进行石蜡包埋切片, HE 染色, 镜检。

1.2.2 免疫组化 Survivin、Ki-67 抗体购自北京中杉金桥公司。免疫组化染色采用 EnVision 法: 每张石蜡切片厚 3.5 μm , 脱蜡至水, 2% EDTA 溶液煮沸抗原高压热修复, 滴加 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶, 室温 15 min, 滴加一抗 4 $^{\circ}C$ 过夜, 其他步骤严格按照试剂盒说明书进行, DAB 显色, 苏木精复染, 封固。以乳腺癌组织作为 Survivin、Ki-67 阳性对照; 以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定 Survivin 和 Ki-67 在切片中阳性染色比例 $< 10\%$ 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 相关分析运用 Spearman 等级资料相关性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin、Ki-67 在恶性与良性积液中的表达 Survivin 在 72 例恶性胸腔积液中 48 例阳性(图 1、2), 阳性率为 66.7% (48/72)。其中胞核阳性 35 例(72.9%), 胞质、胞核共同阳性 13 例(27.1%); Survivin 在良性积液中阴性 ($P < 0.0001$); Ki-67 表达于细胞核, 在 72 例恶性胸腔积液中 52 例阳性(图 3、4), 其阳性率为 72.2% (52/72), 在良性积液中仅有少量炎症细胞及间皮细胞弱表达, 且阳性细胞数 $< 10\%$ ($P < 0.0001$)。

2.2 Survivin、Ki-67 表达与恶性胸水患者临床病理特征的关系 Survivin、Ki-67 表达与恶性胸水患者性别、年龄、有无吸烟史及远处转移无明显相关, 但与有无淋巴结转移有显著相关 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 Survivin、Ki-67 的表达与恶性胸腔积液临床病理特征的关系

临床病理参数	n	Survivin		χ ² 值	P 值	Ki-67		χ ² 值	P 值
		+	-			+	-		
性别									
男	39	25	14	0.252	0.616	27	12	0.380	0.538
女	33	23	10			25	8		
年龄(岁)									
≥65	41	28	13	0.113	0.736	30	11	0.043	0.839
<65	31	20	11			22	9		
吸烟史									
有	31	19	12	0.708	0.400	20	11	1.611	0.204
无	41	29	12			32	9		
淋巴结转移									
有	42	35	7	12.6	0.000 *	36	6	9.146	0.002 *
无	30	13	17			16	14		
远处转移									
有	23	16	7	0.128	0.721	18	5	0.614	0.433
无	49	32	17			34	15		
病理类型									
小细胞癌	18	16	2	4.083	0.043 *	17	1	4.523	0.033 *
非小细胞癌	54	32	22			35	19		

* P<0.05

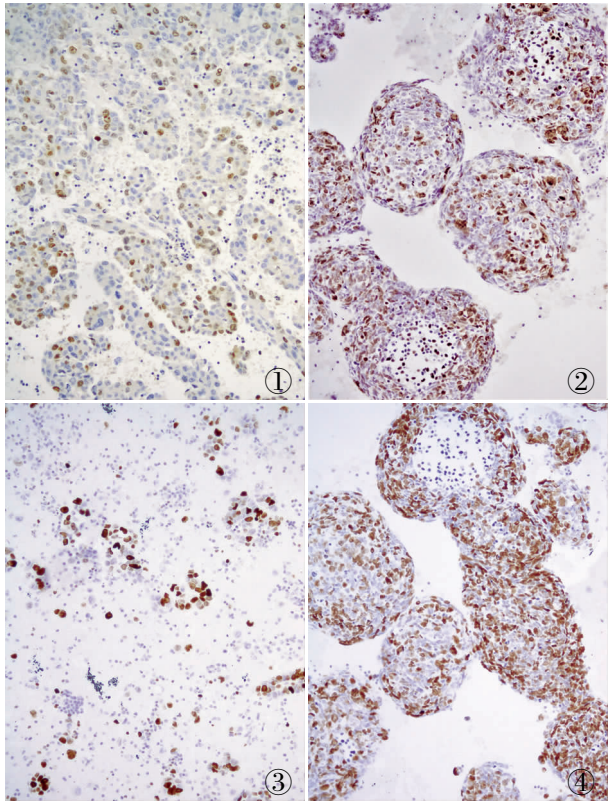


图 1 Survivin 在腺癌胸水中表达,胞核、胞质呈阳性,EnVision 法
图 2 Survivin 在小细胞癌胸水中表达,胞核呈阳性,EnVision 法
图 3 Ki-67 在 腺癌胸水中表达,胞核呈阳性,EnVision 法
图 4 Ki-67 在小细胞癌胸水中表达,胞核呈阳性,EnVision 法

2.3 Survivin、Ki-67 在小细胞癌与非小细胞癌胸水中的表达
Survivin 在小细胞癌和非小细胞癌胸水中阳性率分别为

88.9% (16/18) 和 59.3% (32/54),两组间比较差异有显著性($P<0.05$)。Ki-67 在小细胞癌和非小细胞癌胸水中阳性率分别为 94.4% (17/18) 和 64.8% (35/54),两组间差异有显著性($P<0.05$,表 1)。

2.4 恶性胸水中 Survivin、Ki-67 表达的关系 Survivin 和 Ki-67 在恶性胸水中 45 例共同阳性,17 例共同阴性,采用 Spearman 等级相关分析,两者之间表达呈正相关($r=0.680$, $P<0.001$,表 2)。

表 2 Survivin 与 Ki-67 在恶性胸腔积液中表达相关性

Survivin	Ki-67		合计	r 值	P 值
	-	+			
-	17	7	24	0.680	<0.001
+	3	45	48		
合计	20	52	72		

3 讨论

Survivin 又称为存活素,是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protection, IAP)家族中重要成员,具有最强的抗细胞凋亡功能,它由 142 个氨基酸组成,编码基因定位于人类染色体 17q25^[4],包含 3 个内含子和 4 个外显子。Survivin 在正常组织中仅表达于成人的胸腺、睾丸、分泌期子宫内膜,特异地高表达于各种恶性肿瘤,且其表达水平与高侵袭性有关,被认为是判断肿瘤发生和预后的新生物^[5]。在肺癌领域 Survivin 表达研究多采用对组织病理定性分析,随着细胞学日趋发展近几年还利用肺泡灌洗液、痰液等标本检测 Survivin^[6-7],分析其在肺癌早期诊断中的应用价值。胸腔积液

是晚期肺癌患者的一个常见并发症,关于胸腔积液 Survivin 表达的研究较少见,均采用 ELISA 或 RT-PCR 法检测,但其方法比较复杂。本实验采用细胞块结合免疫组化 EnVision 染色法检测 Survivin 蛋白表达,国内外尚未见报道。本实验结果表明 72 例肺癌所致恶性胸腔积液中有 48 例阳性,而良性积液中均不表达,两组阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$),因此细胞块结合免疫组化染色法检测恶性胸腔积液中 Survivin 表达,可成为肺癌诊断的可靠标志物,尤其适用于晚期肺癌具有胸腔积液而无法做手术或活体组织检查的患者。Survivin 表达与患者性别、年龄、吸烟史、淋巴结及远处转移等临床病理特征的相关性报道较多,但意见不一^[6-8],本实验结果显示其表达与淋巴结转移有显著相关性,而与其他临床病理特征无明显相关性,表明 Survivin 存在肺癌发展不同阶段,可成为临床预后判断指标。Görgün 等^[9]利用 ELISA 法检测恶性胸水中 Survivin 的表达水平,认为其高表达与患者生存预后有关,但细胞块结合免疫组化法检测 Survivin 蛋白表达是否影响患者生存期,有待于进一步分析。

以前大多数研究认为 Survivin 主要表达在细胞质中,但最新研究表明其可在细胞质和胞核中均表达,甚至核表达更有意义^[10-12]。本实验 48 例 Survivin 阳性中有 35 例 (72.9%) 在细胞核中表达,余 13 例在胞质、胞核共表达,但胞质表达弱一些。恶性胸水中 Survivin 亚细胞定位是否真正影响患者预后,需加大样本数进一步证实。另外,本实验显示 Survivin 在小细胞癌中的阳性率明显高于非小细胞癌组,两组间比较差异有显著性 ($P < 0.001$),与张军等^[13]报道一致,可能是由于小细胞癌与非小细胞癌其生物学特性不同,其恶性、侵袭程度更高有关。

肿瘤的发生、发展不仅与细胞凋亡丧失有关,而且与细胞异常增殖有关。Ki-67 抗原属于细胞增殖相关蛋白,能可靠的反映肿瘤增殖率,在 G_0 期以外的所有细胞周期均有不同程度的表达,因此与多种肿瘤的发生、发展、转移和预后有关。本实验表明 Ki-67 在恶性胸水中高表达,尤其高表达在小细胞癌中,且其高表达与淋巴结转移相关,提示 Ki-67 高表达是肺癌恶性进展重要因素。Survivin 与 Ki-67 表达之间的关系尚有争议^[14-15],为进一步证实胸腔积液中两者表达是否一致,本实验利用胸水细胞块结合免疫组化法对两者做了共同研究,Spearmen 等级相关分析发现两者在恶性胸腔积液中表达水平呈显著正相关 ($r = 0.680, P < 0.001$),提示两者之间可能存在协同作用,抑制肿瘤细胞凋亡,诱导细胞异常分裂,导致肿瘤的发生、发展,其具体调节机制有待于进一步分析。

综上,细胞块结合免疫组化方法检测胸水脱落细胞 Survivin 和 Ki-67 在肺癌胸腔积液诊断中有一定临床意义,可成为恶性胸腔积液患者的生物学标志物。Survivin 和 Ki-67 在恶性胸水中的表达呈正相关,两者可能协同促进肺癌的发生、发展。

参考文献:

- [1] Li Y, Zhou Y, Zheng J, *et al.* Downregulation of survivin inhibits proliferation and migration of human gastric carcinoma cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015,8(2):1731-1736.
- [2] Kang S, Kim E O, Kim S H, *et al.* Morusin induces apoptosis by regulating expression of Bax and Survivin in human breast cancer-cells[J]. *Oncol Lett*, 2017,13(6):4558-4562.
- [3] Eslami M, Khamechian T, Mazoochi T, *et al.* Evaluation of Survivin expression in prostate specimens of patients with prostate adenocarcinoma and benign prostate hyperplasia underwent transurethral resection of the prostate or prostatectomy[J]. *Springerplus*, 2016,14(5):621-626.
- [4] Skagias L, Politi E, Karameris A, *et al.* Survivin expression as a strong indicator of recurrence in urothelial bladder cancer predictive value of nuclear versus cytoplasmic staining[J]. *Anticancer Res*, 2009,29(10):4163-4167.
- [5] Soleimanpour E, Banaei E. Survivin as a potential target for cancer therapy[J]. *Asian Pac J cancer Prev*, 2015,16(15):6187-6191.
- [6] 桑纯利, 刘向群, 吴晓进, 等. 肺癌患者肺泡灌洗液中 survivin mRNA 表达及其与吸烟相关性的临床研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2013,22(24):2623-2626.
- [7] Ungvári I, Hadadi E, Virág V, *et al.* Implication of BIRC5 in asthma pathogenesis[J]. *Int Immunol*, 2012,24(5):293-301.
- [8] 郭丽霞, 兰竞丽, 胡兆鹏, 等. 甲状腺乳头状癌中 VEGF、SI00A4、Survivin 的表达及其意义[J]. *中国现代医学*, 2016,26(21):62-65.
- [9] Görgün D, Seçik F, Midilli K, *et al.* Diagnostic and prognostic significance of survivin levels in malignant pleural effusion[J]. *Respir Med*, 2013,107(8):1260-1265.
- [10] Jakubowska K, Pryczynicz A, Dymicka-Piekarska V, *et al.* Immunohistochemical expression and serum level of survivin protein in colorectal cancer patients[J]. *Oncol Lett*, 2016,12(5):3591-3597.
- [11] Liu W W, Zheng Y, Xia Z L, *et al.* The study of the expression and the prognostic value of Survivin and Ki67 in pancreatic endocrine tumors[J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2015,31(1):72-75.
- [12] 张炜明, 宋国新, 王 聪, 等. Survivin 在结肠癌中的不同表达定位与预后的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010,26(5):587-589.
- [13] 张 军, 刘璐斌, 赵喜娃, 等. 子宫颈小细胞癌的临床病理特征和预后分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016,32(3):278-282.
- [14] Pei S G, Wang J X, Wang X L, *et al.* Correlation of survivin, p53 and Ki-67 in laryngeal cancer Hep-2 cell proliferation and invasion[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015,8(8):636-642.
- [15] 郭秀芳. P53 和 Ki-67 及 Survivin 在乳腺癌中的表达研究[J]. *河北医药*, 2014,36(22):3425-3426.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.019.html>

ARMS 法检测非小细胞肺癌 EGFR 基因位点不同的比较性分析

陈顺平, 苏海燕, 翁剑鸣, 吴文乔, 沈洪武

摘要:目的 分析扩增阻滞突变系统 (ARMS) 法检测 EGFR 基因不同位点数的突变检出率差异。方法 回顾性分析 ARMS 法对非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 石蜡包埋组织标本 EGFR 基因 4 位点突变及 29 位点突变检测情况。结果 ARMS 法检测 NSCLC EGFR 基因 (19、20、21 号外显子) 4 位点突变的突变率为 29.14%, EGFR 基因 (18、19、20、21 号外显子) 29 位点突变率为 44.60%。NSCLC 中 EGFR 基因突变率在 4 位点与 29 位点差异具有显著性 ($P < 0.001$); EGFR 基因 4 位点在 NSCLC 腺癌中的突变率为 32.23%, 而 29 位点的突变率为 46.88%, 两者突变率差异有显著性 ($P < 0.001$); 但 19Del 与 L858R 点突变各自在两种不同位点试剂检测中 NSCLC 突变率及腺癌突变率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。EGFR 29 位点试剂检测中女性患者与男性患者的突变率差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 但 4 位点试剂检测差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 男性患者检测 EGFR 基因 29 位点的突变率高于 4 位点突变率, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 女性患者表现出更高的突变率, 且 29 位点与 4 位点突变率差异有显著性 ($P < 0.001$)。结论 艾德公司设计 EGFR 基因 29 种检测位点在 NSCLC 或腺癌或女性患者中的突变率明显高于 EGFR 基因 4 位点突变率; 同时, 通过了解这两种不同位点检测试剂所体现出不同突变检出率, 还有助于不同情况下不同人群 EGFR 靶点检测选择提供了数据支持, 具有较高的临床意义。

关键词: 肺肿瘤; 非小细胞肺癌; EGFR; ARMS

中图分类号: R 734.2 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0322-04

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.019

EGFR 被认为是最有效的肺癌靶点之一, 它是一种跨细胞膜糖蛋白, 属于酪氨酸激酶, 其突变及过表达与肿瘤细胞的增殖、活动性、粘连性、侵袭性、凋亡抑制和血管生成相关^[1]。近年来, 以吉非替尼 (Gefitinib) 为代表的酪氨酸激酶抑制剂在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 靶向药物抑制肿瘤细胞生长起了积极的疗效^[2-3], 得助于近年来以 EGFR 基因为首的信号传导通路在 NSCLC 发生、发

展机制的深入研究。目前检测 EGFR 基因突变状态的试剂广泛应用于临床, 其不但可以有效指导分子靶向药物的使用, 也可以为肺癌发生机制的研究及 EGFR 基因突变状况提供重要的信息。目前艾德 EGFR 基因突变检测试剂已被我国批准用于临床 EGFR 基因突变检测, 在市场上有 2 种不同位点检测试剂盒供临床使用, 即 EGFR 基因 4 位点及 29 位点检测, 前者费用低, 后者费用较高, 但检测位点较多。本文回顾分析 NSCLC 石蜡包埋组织 ARMS 法检测 EGFR 基因突变情况, 旨在了解艾德 EGFR 基因 4 位点及 29 位点试剂突变检出率的差异性, 以供临床参考。

1 材料与方法

1.1 材料 收集漳州市医院 2015 年 5 月~2016 年 12 月行原发肺癌手术切除或活检连续检测病例 373 例。其中男性 247 例, 女性 126 例; 年龄 30~83 岁, 中位年龄 57 岁。行 EGFR 基因 4 位点检测病例 151 例, 行 EGFR 基因 29 位点检测病例 222 例。所有标本均经 10% 中性缓冲福尔马林固定, 常规石蜡包埋。病理类型: (1) 行 EGFR 基因 4 位点检测病例病理类型包括: 肺腺癌 121 例 (包括原位腺癌)、肺鳞癌 18 例, 腺鳞癌 9 例, 神经内分泌癌 3 例; (2) 行 EGFR 基因 29 位点检测病例病理类型包括: 肺腺癌 192 例 (包括原位腺癌)、肺鳞癌 15 例, 腺鳞癌 10 例, 神经内分泌癌 5 例。

1.2 主要试剂与仪器 DNA 提取试剂盒 (厦门艾德公司) 及 EGFR 4 种热突变检测试剂盒及 EGFR 29 种突变检测试剂盒 (厦门艾德公司)。Cobas Z480 PCR 仪; 微型干式恒温器 (GY2101); ND2000 微型紫外分光光度仪。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 严格按照 DNA 提取试剂盒说明书操作, 紫外分光光度仪测定提取样本 DNA 的纯度和浓度, 纯度在 1.8~2.0 之间的样本为好。

1.3.2 ARMS 法 采用 EGFR 基因突变 4 种及 29 种检测试剂盒 (厦门艾德公司), 提取 DNA 产物为模板, DNA 稀释浓度为 2~3 ng/ μ L; 其中, EGFR 基因热点突变 4 种, 包括 EGFR 基因的 19、20 及 21 外显子, 位点包含 Ex19 Del (2235-2249del15、2236-2250del15)、Ex20-T790M 及 Ex21-L858R 4 个热点突变; EGFR 基因突变 29 位点, 包括 EGFR 基因的 18、19、20 及 21 外显子, 位点包含除了含有 2235-2249del15 和 2236-2250del15, 还有其他 17 种 Ex19Del 以及 Ex20-T790M、Ex21-L858R、3 种 Ex20-ins、Ex18-G719X (G719A、G719S、G719C)、Ex20-S768I、Ex21-L861Q 等 29 种突变, 具体碱基变化及 Cosmic ID 可以参考说明书。4 种热点突变及 29

接受日期: 2018-01-12

基金项目: 福建漳州市自然科学基金 (ZZ2012J33)

作者单位: 福建医科大学附属漳州市医院病理科, 漳州 363000

作者简介: 陈顺平, 男, 主管技师。E-mail: 471231682@qq.com

苏海燕, 女, 副主任医师, 通讯作者。E-mail: sujinh000064@163.com

种突变探针由 FAM 信号指示,内控由 HEX(VIC)信号指示,外控管由 FAM 信号指示;所有实验均设阴、阳性对照;EGFR 的 PCR 反应程序:95 ℃ 5 min,1 个循环;95 ℃ 25 s,64 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,15 个循环;93 ℃ 25 s,64 ℃ 35 s(采集荧光),72 ℃ 20 s,31 个循环。

1.4 结果判断 (1)EGFR 基因突变结果判定:严格按照试剂盒说明书提供检验结果解释进行。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,组间比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 基因 4 位点检测情况 NSCLC 石蜡包埋组织共检测 151 例,ARMS 技术检测 EGFR 基因(19、20、21 外显子)4 位点突变率为 29.14% (44/151),其中 19Del 和 L858R 点突变分别占 13.25% (20/151) 和 14.57% (22/151);2 例 L858R 和 T790M 双突变。151 例 NSCLC 中腺癌为 121 例,突变率为 32.23% (39/121),包括 19 Del 有 18 例,突变率为 14.88% (18/121),L858R 突变 19 例,突变率为 15.70% (19/121),以及 2 例 L858R 和 T790M 双突变;鳞癌 18 例突变率为 0(图 1);9 例腺鳞癌中 1 例 19 Del,3 例 L858R 突变;内分泌癌 3 例中 1 例 19 Del。

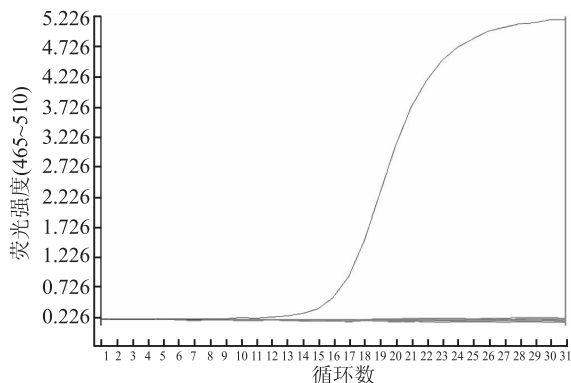


图 1 EGFR 基因为野生型,扩增曲线只有呈 S 型外控扩增曲线,ARMS 法

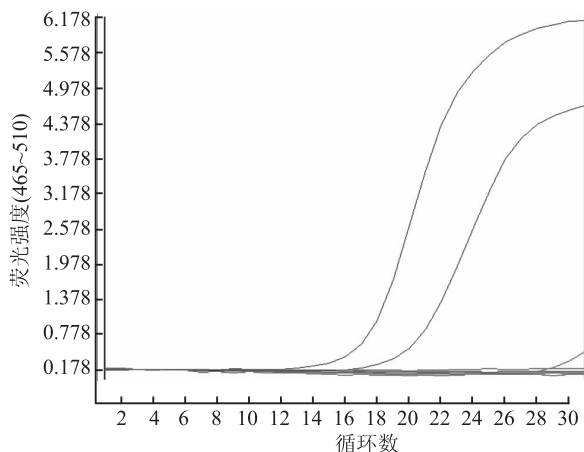


图 2 EGFR 基因为突变型,扩增曲线有呈 S 型外控及样本扩增曲线,ARMS 法

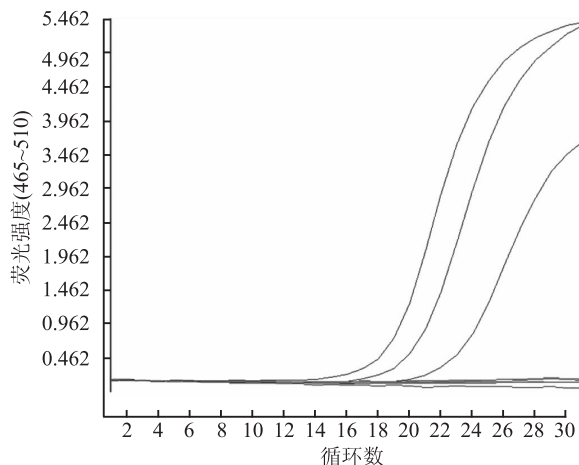


图 3 EGFR 基因为双突变型,扩增曲线有呈 S 型外控及 2 条样本扩增曲线,ARMS 法

2.2 EGFR 基因 29 位点检测情况 NSCLC 石蜡包埋组织共 222 例,ARMS 法检测 NSCLC 石蜡包埋组织 EGFR 基因(18、19、20、21 外显子)29 位点突变率为 44.60% (99/222),其中 19Del 和 L858R 点突变分别占 16.22% (36/222) 和 22.07% (49/222);稀有突变为 4.95% (11/222)(图 2)。222 例 NSCLC 中腺癌为 192 例,突变率为 46.88% (90/192),包括 32 例 19 Del 和 47 例 L858R 点突变,突变率分别为 16.67% (32/192)、24.48% (47/192),4 例 G719X 突变,3 例 20-ins,1 例 G719X 和 20-ins 双突变(图 3),1 例 19Del 和 T790M 双突变,2 例 L858R 和 T790M 双突变;鳞癌 15 例,突变率为 20% (3/15),包括 2 例 19 Del,1 例 20-ins;10 例腺鳞癌,突变为 5 例,包括 2 例 19Del,2 例 L858R 突变,1 例 20-ins;5 例内分泌癌突变率为 0。

2.3 EGFR 基因两种不同的检测位点试剂其突变率不同 EGFR 基因 4 位点共检测 NSCLC 151 例,总突变率为 29.14%;29 位点共检测 222 例,总突变率为 44.60%;EGFR 基因突变率在前两者中差异具有显著性(44.60% vs 29.14%, $\chi^2 = 9.08, P < 0.001$);EGFR 基因 4 位点在腺癌突变率为 32.23%;29 位点突变率为 46.88%,两者突变率差异具有显著性(46.88% vs 32.23%, $\chi^2 = 15.96, P < 0.001$);但 19Del 与 L858R 点突变各自在两种不同位点试剂检测中在 NSCLC 突变率及腺癌突变率中差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1、2)。

EGFR 29 位点试剂检测中女性患者与男性患者的突变率差异有统计学意义($\chi^2 = 18.12, P < 0.001$),但 4 位点试剂检测男性患者与女性患者 EGFR 基因突变率差异无统计学意义($\chi^2 = 3.48, P > 0.05$);男性患者检测 EGFR 基因 29 位点突变率高于 4 位点突变率,但差异无统计学意义(34.69% vs 24.00%, $\chi^2 = 3.21, P > 0.05$),而女性患者表现出更高的突变率,且 29 位点与 4 位点突变率差异有显著性(39.22% vs 64.86%, $\chi^2 = 8.57, P < 0.001$,表 3)。

3 讨论

EGFR 属于表皮生长因子家族(erbB 家族),该家族包括

表1 EGFR 基因检测 4 位点与 29 位点突变率的比较

检测位点数	<i>n</i>	总突变率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	19Del 突变率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	L858R 突变率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
4	151	29.14(44/151)	9.08	<0.001	13.25(20/151)	0.62	0.43	14.57(22/151)	3.28	0.07
29	222	44.60(99/222)			16.22(36/222)			22.07(49/222)		

表2 EGFR 基因 4 位点与 29 位点在 NSCLC 各类型中突变率的差异

组织类型	EGFR 4 位点各类型突变率(%)				EGFR 29 位点各类型突变率(%)				
	<i>n</i>	突变率(%)	19Del(%)	L858R(%)	<i>n</i>	突变率(%)	19Del(%)	L858R(%)	稀有突变(%)
腺癌	121	32.23	14.88	15.70	192	46.88	16.67	24.48	4.17
鳞癌	18	0	0	0	15	20.00	13.33	0	6.67
腺鳞癌	9	44.44	11.11	33.3	10	50.00	20.00	20.00	10.00
神经内分泌癌	3	33.33	33.33	0	5	0	0	0	0

稀有突变是指除了 19Del 与 L858R 突变外的突变

表3 EGFR 基因检测 4 位点与 29 位点男女患者突变率的比较

检测位点数	性别	<i>n</i>	突变率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
4	男	100	24.00(24/100)	3.48	0.06
	女	51	39.22(20/51)		
29	男	147	34.69(51/147)	18.12	<0.001
	女	75	64.00(48/75)		

EGFR、Cerb-2(HER-2)、Cerb-3、Cerb-4^[4]。EGFR 位于人类 7 号染色体的短臂,是一种细胞膜表面的糖蛋白受体,具有酪氨酸激酶活性,是原癌基因,其主要通过传导信号方式进入细胞核,可引起细胞核内基因转录水平增加,其表达水平的增加可引起其下游信号传递过程异常,引起细胞生长加快,细胞生存期延长,同时抑制细胞凋亡,与肿瘤的发生发展、预后以及治疗反应等相关^[5]。目前国内 EGFR 突变的检测方法较多,且各有特点,直接测序法为 EGFR 基因突变检测的金标准,但其操作复杂,时间长,灵敏性较低。由此以 RT-PCR 技术检测 EGFR 基因成为临床主要检测方法,国内厦门艾德公司产品的探针设计来自 ARMS 法,该方法是基于 PCR 平台结合特异引物和双环探针两种技术,以达到对稀有突变类型高检测能力,且该方法对标本肿瘤细胞的数量及质量要求较低,检测灵敏度低至 1% 的突变^[6-7],且操作简便,目前大量用于国内临床 EGFR 基因检测,已被我国食品药品监督管理局(SFDA)批准用于临床 EGFR 基因突变检测。

本组利用 AMRS 法连续检测 NSCLC 石蜡包埋组织病例 373 例,共包括 EGFR 基因 3 个外显子 4 位点突变检测 151 例和 EGFR 基因 4 个外显子 29 位点突变检测 222 例。前者突变率为 29.14%,后者突变率为 44.60%,两者突变率差异具有显著性($P<0.001$),提示 EGFR 基因 29 位点检测试剂总体突变率显著高于 4 位点检测试剂的突变率。EGFR 基因 29 位点检测 19Del 和 L858R 点突变,分别占 16.22% 和 22.07%,与 4 位点试剂相比,19Del 与 L858R 的突变率相对提高,但差异无统计学意义($P>0.05$),可知 EGFR 基因 29 位点中 19 Del 除了 2235-2249del15 和 2236-2250del15 两种外,其突变率与 EGFR 基因 4 位点检测中 2 种热点突变的 19Del 的检出率只多出约 3%,说明其他 17 种 Del 突变检出率并不高。29 位点检测结果还显示了包含 19Del、L858R 除

外的稀有突变 11 例,其突变率 4.95%,占总突变率的 11.11%(11/99)。另外表 2 显示 222 例 NSCLC 29 位点检测中腺癌为 192 例,突变率为 46.88%,包括 32 例 19 Del 和 47 例 L858R 突变,突变率分别为 16.67%、24.48%;稀有突变率为 4.17%。EGFR 两种位点检测试剂检测结果显示在腺癌中 19 Del 和 L858R 点突变检出率差异无统计学意义。但这两种位点的检测结果腺癌 EGFR 基因突变率明显高于鳞癌突变率;女性突变率高于男性,与前期观察相一致,也符合相关文献报道^[8-9]。同时 EGFR 基因 4 位点试剂检测男性患者与女性患者突变率差异无统计学意义($\chi^2=3.48, P>0.05$,表 3),提示 4 位点检测试剂男女患者基因突变率差异无统计学意义;女性则在 29 位点检测方面则表现更高突变检出率,差异有统计学意义(39.22% vs 64.86%, $\chi^2=8.57, P<0.001$),同时男性检测 29 位点比男性检测 4 位点突变检出率高,但差异无统计学意义($P>0.05$),说明 NSCLC 中 EGFR 高突变率的女性患者和腺癌患者更应选择检测位点更加齐全的检测试剂,获得更高的突变检出机会。

综上所述,通过对艾德产品 EGFR 基因 4 位点及 29 位点的比较分析,可以有助于全面了解这两种不同位点检测试剂所体现出不同突变检出率,以供不同情况下不同人群 EGFR 靶点检测选择提供了数据支持,具有较高的临床意义。

参考文献:

[1] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutation non-small cell lung cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010,10(11):760-774.

[2] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839(Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor[J]. Clin Cancer Res, 2000,6(5):2053-2063.

[3] Zhang W Q, Li T, Li H. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer patients with/without EGFR-Mutation: evidence based on recent phase III randomized trials [J]. Med Sci Monit, 2014,15(20):2666-2676.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.020.html>

子宫颈 Mullerian 腺肉瘤 1 例并文献复习

邵少慰¹, 赵燕芬², 陈绍宇³

摘要:目的 观察子宫颈 Mullerian 腺肉瘤的临床病理特征, 探讨其免疫表型、分子遗传学、诊断和鉴别诊断。方法 对 1 例子宫颈 Mullerian 腺肉瘤进行组织病理学观察、免疫标记和分子遗传检测, 并复习文献。结果 子宫颈液基细胞学查见轻~中度异型性梭形细胞; 组织学可见肿瘤由肉瘤细胞成分和增生的子宫颈良性腺体构成, 浸润至宫颈深肌层。免疫表型: 肉瘤细胞 vimentin(+)、CD10、CD34、CD99、DOG1、PR、ER 局灶(+)、Ki-67 增殖指数约 40%、p53(+, 10%); CK、EMA 仅腺上皮(+); S-100、actin、desmin、MyoD1、CD117、BCL-2、CD56、CEA、p16、CD31、HMB-45 均呈(-)。患者行全子宫+双侧附件切除术, 未行放、化疗, 随访 2 年一般情况良好。结论 子宫颈 Mullerian 腺肉瘤具有良性苗勒管型上皮及肉瘤性间质成分, 可根据细胞、组织学形态、免疫表型和分子遗传学特征确诊, 需与其他梭形细胞肿瘤或上皮和间叶混合性肿瘤鉴别。

关键词: Mullerian 腺肉瘤; 免疫组织化学; 分子遗传学; 鉴别诊断

中图分类号: R 737.33 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0325-03

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.020

Mullerian 腺肉瘤是一类起源于女生殖道苗勒管上皮及间叶组织的罕见恶性肿瘤, 该肿瘤于 1974 年由 Clement 和

Scully 首次报道并命名^[1]。国内外的文献报道 Mullerian 腺肉瘤^[2-10]主要发生在子宫体, 其次为卵巢、盆腔, 发生于子宫颈者罕见。本文现报道 1 例子宫颈 Mullerian 腺肉瘤, 观察其临床病理特征、复习相关文献并展开讨论。

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集肇庆市妇幼保健院 2014 年 3 月存档的有完整病理资料的子宫颈 Mullerian 腺肉瘤 1 例。患者女性, 49 岁, 因阴道排液 3 个月, 少量不规则阴道流血 10 天就诊; 妇科常规检查: 外阴正常, 阴道见少量血污, 宫颈外口突起一个 5 cm×4 cm×1 cm 大小息肉状肿物, 宫体及附件未及异常。子宫颈液基细胞学检查回报: 梭形细胞肿瘤, 倾向为恶性, 建议组织活检。B 超示: 宫颈管至子宫体下段见大小 4.5 cm×2.6 cm×1.8 cm 类圆形稍低回声区, 边界可辨, 内回声欠均匀。CT 示: 子宫颈处见一团块状稍低密度软组织影, 边界欠清, 大小 4.0 cm×3.9 cm, CT 值 25 Hu, 向上累及子宫腔下段。双侧附件区未见包块形成; 盆腔内未见肿大淋巴结。考虑子宫颈癌或子宫颈肉瘤。

1.2 方法 标本来自宫颈脱落细胞取材、局部活检术和全子宫+双侧附件切除。子宫颈脱落细胞标本取材后投入子宫颈液基保存液中, 摇匀; 宫颈局部活检和全子宫+双侧附件切除标本均经 10% 中性缓冲福尔马林固定, 广泛取材, 石蜡包埋、切片和常规 HE 染色, 取肿瘤组织块进行免疫组化检测, 一抗包括 vimentin、CD10、CD34、CD99、DOG1、PR、ER、Ki-67、p53、CK、EMA、S-100、actin、desmin、MyoD1、CD117、BCL-2、CD56、CEA、p16、CD31、HMB-45。另取肿瘤组织采用膀胱癌细胞染色体检测试剂盒和基因异常检测试剂盒进行分子遗传学检测: (1) 荧光原位杂交法, 杂一: 包括 CSP3、CSP7、CSP17 三种染色体探针; 杂二: 包括 CSP3、9p21 (p16) 两种染色体探针。 (2) 子宫内间质细胞肿瘤的 YWHAE

接受日期: 2017-11-09

作者单位: ¹ 肇庆市第二人民医院/肇庆市妇幼保健院病理科 526000

² 肇庆医学专科学校基础部, 肇庆 526000

³ 安必平医药科技股份有限公司, 广州 510520

作者简介: 邵少慰, 女, 主任医师。Tel: (0758) 2701474, E-mail: shaoweishao@163.com

- [4] Wood E R, Truesdale A T, McDonald O B, *et al.* A unique structure for epidermal growth factor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate and receptor activity in tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (18): 6652-6659.
- [5] Jorissen R N, Walker F, Pouliot N, *et al.* Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 284 (1): 31-53.
- [6] Liu Y, Liu B, Li X Y, *et al.* A comparison of ARMS and direct sequencing for EGFR mutation analysis and tyrosine kinase inhibitors treatment prediction in body fluid samples of non-small-cell-lung

- cancer patients [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30 (1): 111.
- [7] Ellison G, Donald E, Mcwaller G, *et al.* A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples [J]. *J Exp Cancer Res*, 2010, 29 (1): 132.
- [8] 陈顺平, 苏海燕, 吴文乔, 等. 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变与扩增及蛋白表达的相关性分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31 (6): 657-661.
- [9] 李迎雪, 温文娟, 韩琳, 等. 应用 ARMS 检测不同类型的肺腺癌标本 EGFR 基因突变 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31 (6): 700-702.

基因断裂检测(荧光原位杂交法)。子宫颈液基保存液和相应制片染色耗材、分子遗传学检测试剂盒,均由安必平医药科技股份有限公司提供。免疫组化一抗、二抗均购自福州迈新公司,免疫组化采用 MaxVision 两步法, DAB 显色, 设阳性及阴性自制芯片作对照。

2 结果

2.1 眼观 第一次子宫颈局部活检标本为碎块状组织, 共 7.5 cm × 4 cm × 2 cm 大小, 切面灰白、灰红色, 质脆, 鱼肉状(图 1)。第二次为切除全子宫标本, 子宫颈外口增大, 直径约 4 cm, 子宫颈内、外口交界至子宫体下段峡部下方见一个宽基的灰白色肿物隆起并突向宫颈外口, 大小 4.5 cm × 4 cm × 1.4 cm, 切面灰白、灰黄色, 质脆, 肿物水平扩展 4.3 cm, 浸润深度 1.4 cm(图 2); 子宫体内膜和肌层无明显病变, 其余双侧输卵管和卵巢未见异常; 另送盆腔各组淋巴结各一袋。

2.2 镜检

2.2.1 细胞学改变 宫颈液基细胞学可见较多轻、中度异型性梭形细胞团, 呈胖梭形或星形, 成分较单一, 核增大深染呈梭形或棒状, 染色质较粗, 核分裂象易见(图 3), 其余宫颈鳞状上皮和腺上皮均未见上皮内病变及恶性病变。

2.2.2 组织学特点 肿瘤的主要成分为间叶性肉瘤细胞。肉瘤细胞形似子宫颈间质细胞, 为梭形、多角形, 胞质较丰富, 其核呈长梭形或胖梭形, 核仁较明显, 核分裂象约 10/10 HPF; 肉瘤细胞呈编织状、束状密集排列(图 4); 其间散在一些大小不等, 裂隙状、囊状或分支状的良性腺体, 形似子宫颈管内膜固有腺体, 有的腺腔内有黏液性分泌物, 并见肉瘤细胞围绕着腺体呈袖套状浸润性生长(图 5); 肉瘤组织中可见出血及坏死灶。

2.3 免疫表型 vimentin 在肉瘤细胞中(+), 在宫颈腺上皮中(-); CD10、CD34、CD99、DOG1、PR、ER 在肉瘤细胞中仅局灶+; Ki-67 增殖指数约 40%; p53(+, 10%); CK、EMA 仅在宫颈腺上皮中(+); S-100、actin、desmin、MyoD1、CD117、BCL-2、CD56、CEA、p16、CD31、HMB-45 均呈(-)。

2.4 分子遗传学 采用膀胱癌细胞染色体及基因异常检测, 第一次送检肿瘤样本, FISH 荧光检测, 杂一的 3 号探针(绿色)信号显示染色体为多体(比例为 39%)(图 6), 17 号探针(红色)及 7 号探针(青色)信号正常; 杂二的 p16 探针信号单缺失 63%, 双缺失 22%, 另一探针信号正常。第二次送检肿瘤样本, 仅杂一的 3 号探针(绿色)信号显示染色体呈多体阳性(比例为 18%), 其余探针信号均正常。两次肿瘤样本均行子宫内间质细胞肿瘤 YWHAE 基因断裂检测, 结果均为阴性, 提示未发现肿瘤细胞 t(10;17)(q22;p13) 基因重排。

2.5 病理诊断 子宫颈 Mullerian 腺肉瘤, 低级别肉瘤成分为主, 病变限于子宫颈外口至子宫颈管上段, 累及宫颈管肌层深部; 未见肿瘤累及子宫体、双侧附件、两侧宫旁和阴道壁组织, 盆腔各组淋巴结也未见肿瘤转移。临床病理分期为 pT1b2N0M0。

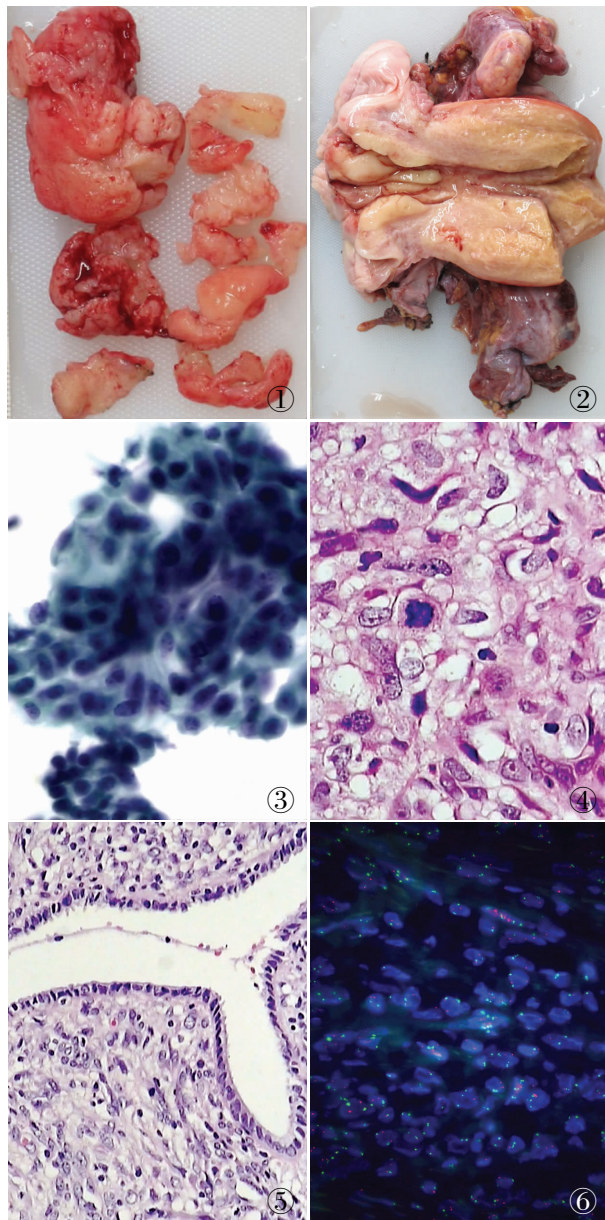


图 1 子宫颈局部活检标本: 肿物呈灰白、灰红色, 质脆, 鱼肉状

图 2 全子宫 + 双侧附件切除标本: 宫颈外口增大, 宫颈内、外口交界至子宫体下段峡部下方见宽基的灰白色肿物呈息肉状隆起

图 3 宫颈液基细胞学: 轻、中度梭形细胞, 可见核分裂象; 梭形细胞围绕着一个宫颈腺体

图 4 肿瘤性间质细胞中度异型性, 核分裂象可见

图 5 肿瘤性间质细胞围绕在子宫颈良性腺体周围生长

图 6 FISH 检测, 绿色 3 号探针信号显示为染色体多体阳性

2.6 治疗与随访 本例患者行全子宫 + 双侧附件切除 + 盆腔淋巴结清扫。术后未行放、化疗, 随访 36 个月, 一般情况良好。

3 讨论

据国内外有关文献报道^[3-10], 子宫颈 Mullerian 腺肉瘤患者发病年龄 10 ~ 72 岁, 平均 36 岁, 其中发病高峰人群为青春前期少女及绝经后期老年妇女; 患者首发症状多为阴道

不规则出血,子宫颈肿物直径 1.5 ~ 10 cm 不等,为息肉状突起新生物。本例患者 49 岁,绝经 1 年后出现阴道排液、少量不规则阴道流血等症状,肿块位于宫颈管区,宽基底,隆起并突向宫颈外口。

子宫颈 Mullerian 腺肉瘤的组织学结构与乳腺叶状肉瘤相似,由恶性间叶成分和良性腺上皮构成。大多数腺肉瘤的间叶成分属于同源性;也有报道肿瘤组织含有多少不等的异源性分化成分^[3-4,8],如横纹肌肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤或脂肪肉瘤等。有文献还提到,子宫颈 Mullerian 腺肉瘤除了腺肉瘤成分外,若无腺体的肉瘤成分大于整个肿瘤的 25%,被称为肉瘤过度生长^[3,9]。

本例病变以子宫颈间质细胞同源性肉瘤成分为主,伴有少量宫颈良性的黏液性腺体,肉瘤细胞呈袖套状围绕在腺体周围,肉瘤细胞的核分裂象易见,且肿瘤 Ki-67 增殖指数达到 40%,表明该肿瘤具有较强的分裂增殖能力,故本例符合伴有肉瘤过度生长现象的子宫颈 Mullerian 腺肉瘤。其免疫组化标记腺上皮(CK+),间叶性肉瘤成分 vimentin(+),S-100、actin、desmin、MyoD1、CD117、CD31 等均呈(-),肉瘤成分的免疫表型无特异性,为同源性分化的双相性恶性肿瘤。

本例经 FISH 法检测,p16 探针信号有单缺失和双缺失现象,提示有肿瘤发生、发展的早期事件,3 号(染色体)呈多倍体阳性,也提示该肿瘤为恶性病变。两次送检肿瘤样本的 YWHAE 基因断裂检测均呈阴性,提示未发现类似子宫内黏膜间质肿瘤 t(10;17)(q22;p13)基因重排的现象。对于该肿瘤的分子遗传学表型尚未见有详细的文献报道,本实验所做的分子遗传学检测旨在探索其分子遗传学特征。

目前子宫颈 Mullerian 腺肉瘤的最佳手术和后续治疗方案尚不确定,多数报道建议采用全子宫+双侧附件切除+盆腔淋巴结清扫,对于临床分期为 I A 期的患者,不推荐进一步化疗和放疗;对 I B 期以上的患者,则建议进一步化疗和(或)放疗;对于一些未生育的年轻女性^[3-4],则采取子宫颈局部切除+化疗,或加以局部放疗。

由于该肿瘤罕见,病理医师往往认知不足,易造成漏诊或误诊,故需与以下主要疾病鉴别。(1)子宫颈息肉:是育龄期妇女多见的慢性宫颈炎的一种继发性炎性病变。由子宫颈黏膜上皮、腺体和间质结缔组织呈外向性局限性增生形成的赘生物,息肉肉内的上皮及间质均为非肿瘤性炎性增生,故与腺肉瘤不同。(2)非典型息肉样腺肌瘤:多见于育龄期妇女,多发生于子宫下段和宫颈管上段,其子宫内黏膜腺体和平滑肌均增生,腺上皮可有轻~中度非典型性,平滑肌成分无异型性增生,故有别于腺肉瘤。(3)子宫颈恶性中胚叶混合瘤(癌肉瘤):见于绝经后妇女,其肿瘤性上皮及间叶成分均为恶性。而子宫颈腺 Mullerian 肉瘤的上皮成分为

良性。(4)子宫内黏膜间质肉瘤:多见于绝经期前后妇女,常伴有子宫内黏膜异位症病史。肿瘤性上皮为子宫内黏膜腺上皮,肉瘤成分为子宫内黏膜间质细胞,并见间质细胞围绕螺旋小动脉增生现象,免疫组化标记 CD10、PR、ER 常呈弥漫阳性。本例肿瘤成分为子宫颈间质细胞同源性肉瘤成分和良性黏液性腺上皮,免疫组化标记其肉瘤成分的 CD10、PR、ER 仅局灶表达。(5)平滑肌肉瘤:肉瘤细胞形态大小不一,排列紊乱,核异型明显,核分裂象常大于 10/10 HPF,有肿瘤性坏死。免疫组化标记 SMA、desmin 均弥漫阳性。本例肉瘤成分免疫组化标记 SMA、desmin 均阴性。

参考文献:

- [1] Clement B P, Scully E. Mullerian adenosarcoma of the uterus: a clinicopathologic analysis of ten cases of a distinctive type of mullerian mixed tumor[J]. Cancer, 1974,34(4):1138-1149.
- [2] Versechraegen C F, Vasuratna A, Edwards C, et al. Clinicopathological analysis of mullerian adenosarcoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience[J]. Oncol Rep, 1998,5(4):939-944.
- [3] Patrelli T S, Gizzo S, Di Gangi S, et al. Cervical Mullerian adenosarcoma with heterologous sarcomatous overgrowth: a fourth case and review of literature[J]. BMC Cancer, 2011,11(236):2-6.
- [3] 张安民,王 啸,张兰仙. 子宫 Mullerian 腺肉瘤伴肉瘤过度生长分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2006,22(6):654-658.
- [4] 李新霞,马明福,常 彬,等. 子宫苗勒腺肉瘤 6 例分析并文献复习[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012,28(6):1107-1111.
- [5] 刘 静,张 锐,朱正龙,曹 鹏. 子宫腺肉瘤分析及文献复习[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015,23(22):3306-3309.
- [7] 徐 铨,章芳芳,吴 波,等. 宫颈原发性 Mullerian 腺肉瘤 4 例临床病理分析[J]. 诊断病理学杂志, 2012,19(6):427-430.
- [8] Seagle B L, Falter K J, Lee S J, et al. Mullerian adenosarcoma of the cervix: report of two large tumors with sarcomatous overgrowth or heterologous elements[J]. Gynecol Oncol Rep, 2014,9:7-10.
- [9] Duggal R, Nijhawan R, Aggarwal N, et al. Mullerian adenosarcoma (heterologous) of the cervix with sarcomatous overgrowth: a case report with review of literature[J]. Gynecol Oncol, 2010,21(2):125-128.
- [10] Chin P S, Chia Y N, Lim Y K, et al. Diagnosis and management of Müllerian adenosarcoma of the uterine cervix[J]. Int J Gynecol Obstet, 2013,121:229-232.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.021.html>

三阴性乳腺癌中 IGFBP2 的表达及临床意义

许增祥¹, 卢林明¹, 胡浩然¹, 吕大伦², 张帆², 吴海龙³, 孙燃⁴, 谢 闯⁴

摘要:目的 探讨胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2) 在三阴性乳腺癌 (triple-negative breast carcinoma, TNBC) 中的表达及其与临床病理特征的关系。方法 选取 45 例 TNBC 和 40 例非 TNBC 病例采用组织芯片方法进行免疫组化 SP 法染色, 观察 IGFBP2 在两组中的表达情况, 并分析其与临床病理特征的关系。结果 在 TNBC 组和非 TNBC 组中, IGFBP2 的阳性率分别是 35.6% 和 85.0%; 与非 TNBC 组相比, TNBC 组 IGFBP2 的表达明显降低 ($P < 0.05$), 且与患者的淋巴结转移存在相关性 ($P = 0.030$), 与患者年龄、肿瘤直径、组织学分级、CK5/6 或 EGFR 表达、Ki-67 增殖指数、脉管侵犯均无明显相关性。结论 与非 TNBC 相比, TNBC 组患者 IGFBP2 表达下降, 且 IGFBP2 表达与 TNBC 患者淋巴结转移之间存在明显相关性。

关键词: 乳腺肿瘤; 三阴性乳腺癌; IGFBP2; 表达

中图分类号: R 737.9 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0328-04

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.021

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast carcinoma, TNBC) 分子表型具有“三阴征”, 即 ER、PR 及 HER-2 均呈阴性, 是目前临床治疗效果最差的乳腺癌。研究发现, 胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2) 在乳腺癌等多种肿瘤组织中呈过表达状态^[1], 它通过依赖或不依赖胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 的作用方式发挥诱导细胞增殖和抵抗凋亡的作用。但 IGFBP2 在乳腺癌中的研究较少, 尤其是 TNBC。本实验采用组织芯片和免疫组化法检测分析 TNBC 和非 TNBC 中 IGFBP2 的表达情况, 并分析 IGFBP2 表达与 TNBC

临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集 2010 年 1 月~2015 年 12 月皖南医学院附属弋矶山医院和芜湖市第二人民医院病理确诊为非特殊型浸润性乳腺癌, 并进行手术治疗, 术前均未行新辅助化疗或放疗。随机选择非特殊型浸润性乳腺癌 85 例, 分为 TNBC 组 45 例, 非 TNBC 组 40 例, 均无其他恶性肿瘤病史。所有病例 ER、PR 和 HER-2 均经免疫组化再次验证, 其中 9 例 HER-2 (2+) 者经荧光原位杂交 (FISH) 技术证实该基因无扩增。

1.2 方法 组织标本均经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, HE 染色。采用组织芯片仪制作 6×8 组织点阵, 打孔直径 1.2 mm。组织芯片蜡块切片 4 μm 厚, 经常规 HE 染色。免疫组化染色均在全自动免疫组化仪上进行 (SP 法), 技术操作严格按照国家卫计委 PQCC 要求进行病理质控。兔抗人单克隆抗体 ER、PR、HER-2、CK5/6、EGFR、Ki-67 工作液均购自北京中杉金桥公司。兔抗人单克隆抗体 IGFBP2 (稀释 1:500) 购自北京博奥森生物公司。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 以组织内对照作为阳性对照。

1.3 结果判定 免疫组化染色结果判读由两名高年资病理专科医师采用双盲法独立阅片。ER、PR 表达于细胞核, 着色 ≥1% 判为阳性^[2] (以周边正常乳腺导管上皮细胞作阳性对照)。HER-2 判定参照 2014 版乳腺癌 HER-2 检测指南进行^[3]。IGFBP2 主要表达于细胞质和 (或) 细胞膜, 表达的阳性细胞 ≥10% 判为阳性^[1], 染色强度判读依据文献^[4]进行: 每个组织选 5 个高倍视野, 每个视野计数 100 个细胞, 观察癌细胞着色情况; 无着色为阴性, 浅黄或浅褐色为弱阳性, 棕黄或褐色为中等阳性, 深褐色为强阳性。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 数据比较均采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法, 以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征 TNBC 患者 45 例, 年龄 32~71 岁, 平均 52 岁, ≥50 岁者 25 例, <50 岁者 20 例; 肿瘤直径 1.2~6.5 cm, 平均 3.7 cm; 17 例组织学 I~II 级, 28 例组织学 III 级; 24 例出现 1 枚以上的淋巴结转移, 18 例可见脉管内癌栓。40 例非 TNBC 患者年龄 35~74 岁, 平均 57 岁, ≥50 岁者 28 例, <50 岁者 12 例; 肿瘤直径为 0.7~6.0 cm, 平均 2.8 cm; 22 例组织学 I~II 级, 18 例组织学 III 级; 有 23 例出现 1 枚以上的淋巴结转移, 有 9 例出现脉管内癌栓。TNBC 组与非 TNBC 组在上述临

接受日期: 2017-12-26

基金项目: 安徽省高校自然科学重点项目 (KJ2017A273)、皖南医学院重点项目 (WK2016Z08)

作者单位: ¹ 皖南医学院病理解剖学教研室, 芜湖 241001

² 皖南医学院附属弋矶山医院皮肤科, 芜湖 241001

³ 安徽师范大学生命科学院安徽省重要生物资源保护与利用重点实验室, 芜湖 241001

⁴ 芜湖市第二人民医院病理科, 芜湖 241002

作者简介: 许增祥, 男, 硕士, 讲师。Tel: (0553) 3932474, E-mail: xuzx1980@126.com

谢 闯, 女, 博士, 副主任医师, 通讯作者。Tel: (0553) 3907115, E-mail: 76206423@qq.com

床病理特征差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 IGFBP2 的表达 IGFBP2 在 TNBC 组和非 TNBC 组的阳性率分别为 35.6% (16/45) 和 85.0% (34/40), 组间差异具有明显统计学意义($P<0.05$, 表 1, 图 1)。

2.3 IGFBP2 表达与乳腺癌临床病理特征的关系 IGFBP2 表达与 TNBC 淋巴结转移相关($\chi^2=4.683, P=0.030$, 表 1), 而在非 TNBC 组中无显著相关性($P=0.067$)。在两组中, IGFBP2 表达与患者年龄、肿瘤直径、组织学分级、CK5/6 或 EGFR 表达、Ki-67 增殖指数和脉管侵犯均无相关性($P>0.05$)。

3 讨论

IGFs 家族包括 2 种配体(IGF-1、IGF-2)、2 种表面受体(IGF-1R、IGF-2R)和 6 种高亲和力结合蛋白(IGFBP1-6)等。IGFBPs 是 IGFs 家族中一组重要的调节蛋白, 以 IGFs 依赖性和非依赖性两种作用方式, 增强或阻断 IGFs 生物学作用, 影响细胞的生长、生存和分化。IGFBP/IGFs 信号通路可能在多种肿瘤的发生和发展中起调节作用, IGFBP2 在卵巢、前列腺、神经胶质细胞等多种肿瘤组织中都有过度表达, 表明与这些肿瘤的发生、发展有关。在乳腺癌, IGFs 可结合并刺激 IGF1R, 通过激活 PI3K/AKT 通路而导致癌细胞增殖和发挥抗凋亡作用^[5]; 因此, IGFs 信号通路在乳腺癌的发病和进展过程中起重要作用。但目前关于 IGFBPs 在乳腺癌中的作用研究非常有限, 在 TNBC 中的研究更少。据报道, 在美国

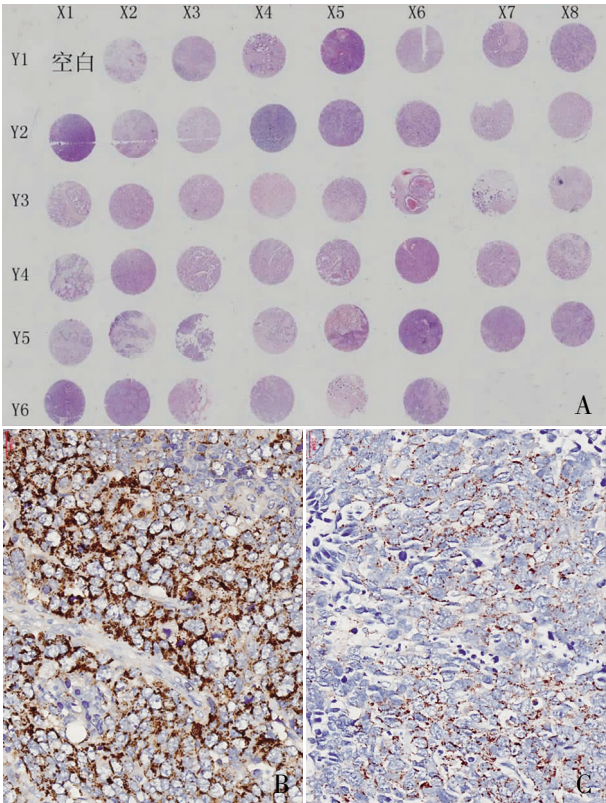


图1 组织芯片 HE 染色及免疫组化标记染色: A. 病理组织芯片扫描, HE 染色; B. 肿瘤细胞呈 IGFBP2 胞质强阳性, SP 法; C. 部分肿瘤细胞呈 IGFBP2 胞质弱至中等阳性, SP 法

表1 IGFBP2 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

临床病理 参数	TNBC 组 IGFBP2				非 TNBC 组 IGFBP2			
	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	<i>P</i> 值	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	<i>P</i> 值
年龄(岁)								
≥50	25	8	32	0.577	28	23	82.1	0.648
<50	20	8	40		12	11	91.7	
肿块直径(cm)								
≥2	32	10	34.5	0.494	21	19	90.5	0.398
<2	13	6	37.5		19	15	78.9	
组织分级								
I + II	17	3	17.6	0.051	22	17	77.3	0.197
III	28	13	46.4		18	17	94.4	
CK5/6 或 EGFR								
阳性	13	7	53.8	0.169	5	4	80	1.000
阴性	32	9	28.1		35	30	85.7	
Ki-67 增殖指数								
<14%	3	0	0	0.542	4	4	100	1.000
≥14%	42	16	38.1		36	30	83.3	
淋巴结转移								
有	24	12	48.1	0.030	23	22	95.7	0.067
无	21	4	16.7		17	12	70.6	
脉管侵犯								
有	18	9	33.3	0.098	9	9	100	0.306
无	27	7	36.7		31	25	80.6	

非洲裔人群比白人患 TNBC 的风险更高,可能是由于 TNBC 中的 IGFs/IGFBPs 通路的作用^[6]。由于 TNBC 缺乏治疗的靶点,因此研究 IGFs/IGFBPs 通路在 TNBC 的作用具有重要的意义,期望将来能发现更有价值的乳腺癌治疗靶点。

综合现有的研究显示,与乳腺癌发生和临床预后最为相关的是 IGFBP2 和 IGFBP3^[1]。本文在乳腺癌组织芯片组织中检测 IGFBP2 表达,结果显示 IGFBP2 在非 TNBC 患者组织中高表达(85.0%),在 TNBC 组阳性率出现明显下降(阳性率为 35.6%, $P < 0.05$),这与先前的研究基本一致。Sohn 等^[7]报道 IGFBP2 在乳腺癌组织中呈高表达,尤其是在 HER-2 阴性乳腺癌。Dean 等^[8]报道,IGFBP2 在 TNBC 组织中的阳性率达 32%,且其表达与 PTEN 表达缺失有关。Mountzios 等^[6]对乳腺癌的各分子类型比较中发现,IGFBP2 在 TNBC 中的表达是最低的。IGFBP2 在 TNBC 组织中表达下降,有研究者认为是由于 TNBC 患者 ER 表达缺失,而 IGFBP2 又与 ER 的表达存在协同效应所导致^[9]。IGFBP2 在 TNBC 中表达下降的原因仍需更多的研究支持。

关于乳腺癌 IGFBP2 表达意义的研究仍受到数量的限制,先前的研究对象多为患者血清、乳腺癌细胞或实验动物。乳腺癌患者血液循环中 IGFBP2 水平与较差的生存率和预后存在相关性^[1,10]。当 TNBC 患者接受新辅助化疗,发现 IGFBP2 可被用来预测无复发生存期^[10],但 Hawsawi 等^[11]却得出相反的结论。本实验基于组织点阵和免疫组化 SP 法,发现在 TNBC 中 IGFBP2 表达与淋巴结转移具有明显相关性,而与患者年龄、肿瘤直径、组织学分级、EGFR 或 CK5/6、Ki-67 增殖指数、脉管侵犯均无相关性。Wang 等^[12]对 164 例 T1 期乳腺癌患者进行研究,发现 IGFBP2 和 IGFBP5 表达与淋巴结转移呈正相关。IGFBP2 高表达促进淋巴结转移的机制可能与 β -catenin 调节有关^[9]。Probst-Hensch 等^[1]对 855 例乳腺癌组织的研究发现,IGFBP2 表达与患者总生存率相关,IGFBP3 则与高的组织学级别和体重指数相关。Dean 等^[8]发现 IGFBP2 表达与 TNBC 患者生存率有关,但差异无统计学意义。IGFBP2 表达和意义在乳腺癌、TNBC 分子亚型和其他恶性肿瘤间的报道仍存在差异。这种差异可能部分由于种族/族裔群体间差异所导致^[10]。也可能是由肿瘤的异质性、体内激素状态等决定,或有待对 TNBC 更大样本量的观察。

IGFBP2 免疫组化染色大部分着色于癌细胞胞质内,少部分定位细胞核,染色呈颗粒状;本实验乳腺癌组织则呈胞质粗颗粒状着色,这可能与标本处理或选用的试剂盒有关。对于 IGFBP2 阳性阈值的选择,本实验采用大部分文献采用的标准,以阳性细胞数 $\geq 10\%$ 作为阳性阈值。另外,St Gallen 乳腺癌会议国际专家共识对乳腺癌分子分型中 Ki-67 采用的阈值是 14%,但由于 TNBC 是一类具有高度异质性的肿瘤,癌细胞增殖活跃,Ki-67 普遍偏高。因此有学者提出采用 Ki-67 表达的中间数 35% 作为研究阈值^[13],这可能仍需要更多的研究支持。由于标本量和组织点阵技术缺陷的限制,且 IGFBP2 在 TNBC 中表达分析报道仍太少,故有待于进一步更多样本的研究验证。

TNBC 缺乏有效的治疗手段和预测或评价预后标记,IGFs/IGFBPs 是否能成为 TNBC 治疗的新靶点和预后评价的标志物,可能需要更多的研究支持。已有临床观察发现,对非糖尿病乳腺癌患者服用降糖药物二甲双胍,发现 IGF1、IGF-1/IGFBP3 比值和胰岛素等降低,并可明显减少乳腺癌的转移^[14]。因此,对 IGFs/IGFBPs 及其相关信号通路进行调节干预是否会为 TNBC 患者治疗带来新的希望呢?研究已发现可通过抑制 IGFBP2 活化来影响胶质细胞瘤的进展^[15]。随着对 IGFs/IGFBPs 和 TNBC 关系的研究,期待 IGFs/IGFBPs 在指导 TNBC 治疗方面发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] Probst-Hensch N M, Steiner J H, Schraml P, *et al.* IGFBP2 and IGFBP3 protein expressions in human breast cancer; association with hormonal factors and obesity[J]. Clin Cancer Res, 2010,16(3):1025-1032.
- [2] Hammond M E, Hayes D F, Dowsett M, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(16):2784-2795.
- [3] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)[J]. 中华病理学杂志, 2014,43(4):262-266.
- [4] 秦 艳,周东华,陈 莹,等. 三阴性乳腺癌中 DBC2 的表达及其临床病理意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015,31(1):75-77.
- [5] Wang C, Gao C, Meng K, *et al.* Human adipocytes stimulate invasion of breast cancer MCF-7 cells by secreting IGFBP-2 [J]. PLoS One, 2015,10(3):e0119348.
- [6] Mountzios G, Aivazi D, Kostopoulos I, *et al.* Differential expression of the insulin-like growth factor receptor among early breast cancer subtypes[J]. PLoS One, 2014,9(3):e91407.
- [7] Sohn J, Do K A, Liu S, *et al.* Functional proteomics characterization of residual triple-negative breast cancer after standard neoadjuvant chemotherapy[J]. Ann Oncol, 2013,24(10):2522-2526.
- [8] Dean S J, Perks C M, Holly J M, *et al.* Loss of PTEN expression is associated with IGFBP2 expression, younger age, and late stage in triple-negative breast cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2014,141(3):323-333.
- [9] Foulstone E J, Zeng L, Perks C M, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) promotes growth and survival of breast epithelial cells; novel regulation of the estrogen receptor [J]. Endocrinology, 2013,154(5):1780-1793.
- [10] Hernandez B Y, Wilkens L R, Le Marchand L, *et al.* Differences in IGF-axis protein expression and survival among multiethnic breast cancer patients [J]. Cancer Med, 2015,4(3):354-362.
- [11] Hawsawi Y, Matthew P, Humphries, *et al.* Deregulation of IGF-binding proteins -2 and -5 contributes to the development of endocrine resistant breast cancer in vitro [J]. Oncotarget, 2016,7(22):32129-32143.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.022.html>

乳腺癌中 INHBA 表达及与临床预后的关系

茅育蕾¹, 蔡宜玲²

摘要:目的 检测 INHBA(inhibin- β A)在乳腺癌及癌旁乳腺组织中的表达,探讨其与乳腺癌临床病理特征的关系及对乳腺癌患者预后的意义。**方法** 应用免疫组化法检测 85 例乳腺浸润性导管癌及 35 例癌旁乳腺组织中 INHBA 的表达。**结果** INHBA 在乳腺癌和癌旁组织中的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。INHBA 高表达和肿瘤较低的分化程度、淋巴结转移及较高的 Ki-67 增殖指数具有相关性($P < 0.05$)。INHBA 高表达乳腺癌患者的生存期明显短于低表达组($P < 0.05$)。多因素 Cox 比例风险回归模型分析显示,INHBA 表达可以作为判断乳腺癌患者的独立危险因素($P < 0.05$)。**结论** INHBA 表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移及 Ki-67 增殖指数密切相关,可能参与乳腺癌的发生发展,可以作为乳腺癌患者预后的判断指标。

关键词: 乳腺癌; INHBA; 预后; 免疫组织化学

中图分类号: R 737.9 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0331-03

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.022

抑制素是由性腺分泌的一种水溶性蛋白,由不同的亚基组成二聚体。这些不同亚基在体内由不同的基因编码,即抑制素 α 亚基基因(INHA)、 β A 亚基基因(INHBA)、 β B 亚基基因(INHBB)等。 α 亚基同 β A 亚基构成的抑制素称为抑制素 A(inhibin A), α 亚基同 β B 亚基构成的抑制素为抑制素 B(inhibin B),两个 β A 亚基通过二硫键连接则构成激活素 A。INHBA 基因编码 β A 亚基,通过形成抑制素和激活素参与调节机体的生殖和发育过程^[1]。另有研究表明,INHBA 还在多种恶性肿瘤中过表达,参与肿瘤的发生、发展并与临床预后相关^[2]。乳腺癌术后复发与转移是导致患者死亡的主要原因,建立有效的检测手段,及早进行干预治疗,对改善

患者预后具有重要意义^[3]。本文采用免疫组化法检测 INHBA 蛋白在乳腺癌及癌旁组织中的表达,分析 INHBA 表达与乳腺癌患者临床病理特征及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集 2005 年 1 月~2011 年 12 月绍兴市文理学院附属医院病理科存档的 85 例乳腺浸润性导管癌石蜡组织标本及 35 例对应的癌旁组织(距离肿瘤边缘 2 cm 以外)标本。所有患者术前均未经放、化疗或免疫治疗。患者年龄 20~83 岁,中位年龄 46 岁;肿瘤直径 ≤ 2 cm 13 例,2~5 cm 47 例, > 5 cm 25 例;根据 WHO(2012 版)乳腺肿瘤分级标准: I 级 7 例, II 级 52 例, III 级 26 例;腋窝淋巴结无转移 31 例, 1~3 枚转移 29 例, > 3 枚 25 例;根据国际抗癌联盟 TNM 乳腺肿瘤分期标准: I + II 期 44 例, III + IV 期 41 例;ER 阴性 30 例,阳性 55 例;PR 阴性 36 例,阳性 49 例;HER-2 阴性 61 例,阳性 24 例。随访从手术之日开始,85 例患者中失联 24 例。

1.2 方法 所有标本均经 10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,免疫组化染色采用 EnVision 两步法,操作步骤按说明书进行,抗体效价为 1:100。阳性对照为人体胃癌组织,阴性对照为人扁桃体组织。INHBA(AF338)多克隆抗体购自上海长岛生物公司。

1.3 判断标准 INHBA 以胞质呈现棕黄色为阳性。由两名资深病理医师根据染色强度和染色细胞百分比分别进行评定和分析,结果判断均采用统一评分标准和双盲法。按照阳性细胞数目的比例分为:0 分:无阳性细胞着色;1 分:阳性细胞数 $\leq 25\%$;2 分:26%~50%;3 分:51%~75%;4 分: $> 75\%$ 。染色强度依据阳性细胞的平均染色强度分为:0 分:无阳性着色;1 分:弱阳性;2 分:中等强度;3 分:强阳性。将两项评分结果相乘得出最终评分范围:0~12 分。评分 < 8 分为无或低表达, ≥ 8 分为高表达。Ki-67 阳性定位于细胞核,镜下计数 1 000 个肿瘤细胞,其中阳性细胞的比例即为 Ki-67 增殖指数,由两名病理医师计数,取其平均值。

接受日期:2017-9-15

作者单位:¹ 绍兴市文理学院附属医院病理科,绍兴 312000

² 浙江省诸暨市中医医院病理科,诸暨 312000

作者简介:茅育蕾,女,主管技师。E-mail: 86163005@qq.com

[12] Wang H, Arun B K, Wang H, *et al.* IGFBP2 and IGFBP5 over expression correlates with the lymph node metastasis in T1 breast carcinomas[J]. Breast J, 2008,14(3):261-267.

[13] Hao S, He Z X, Yu K D, *et al.* New insights into the prognostic value of Ki-67 labeling index in patients with triple-negative breast cancer[J]. Oncotarget, 2016,7(17):24824-24831.

[14] El-Haggag S M, El-Shitany N A, Mostafa M F, *et al.* Metformin

may protect nondiabetic breast cancer women from metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2016,33(4):339-357.

[15] Phillips L M, Zhou X, Cogdell D E, *et al.* Glioma progression is mediated by an addiction to aberrant IGFBP2 expression and can be blocked using anti-IGFBP2 strategies[J]. J Pathol, 2016, 239(3):355-364.

1.4 统计学方法 使用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。采用 χ^2 检验比较样本阳性率的差异。采用 Kaplan-Meier 生存曲线法及 Log-rank 检验比较组间生存率。采用 Cox 比例风险回归模型分析影响患者预后的独立危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌及癌旁组织中 INHBA 的表达 INHBA 定位于肿瘤细胞胞质。85 例癌组织中, INHBA 高表达 45 例 (52.9%, 45/85) (图 1), 而癌旁组织中高表达 5 例 (14.3%, 5/35)。INHBA 在乳腺癌和癌旁组织中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

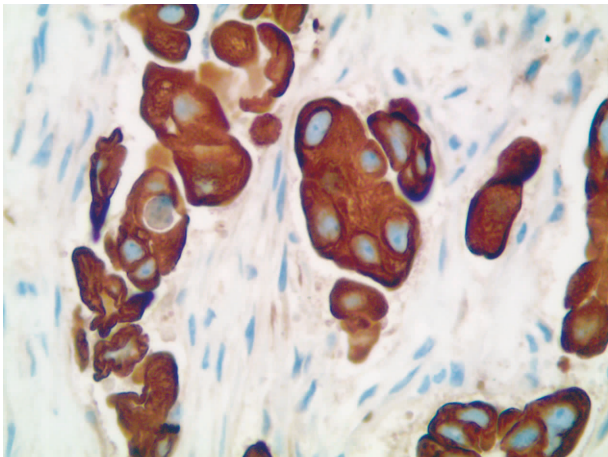


图 1 INHBA 在肿瘤细胞中高表达, EnVision 两步法

2.2 INHBA 表达与乳腺癌各临床病理特征的关系 INHBA 高表达和肿瘤较低的分化程度、淋巴结转移及 Ki-67 增殖指数 $> 14\%$ 具有相关性 ($P < 0.05$), 而与患者年龄、肿瘤大小、TNM 分期、ER、PR 及 HER-2 表达无显著相关性 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.3 INHBA 表达与乳腺癌患者预后的关系 乳腺癌肿瘤细胞 INHBA 高表达组中位生存时间为 61 个月, 低表达组中位生存时间 70 个月。INHBA 高表达患者的生存期明显低于低表达组 ($\chi^2 = 4.573, P < 0.05$, 图 2)。多因素 Cox 比例风险回归模型分析显示, 淋巴结转移、肿瘤 TNM 分期及 INHBA 表达可以作为判断乳腺癌患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

β A 是激活素及抑制素的一个亚基, 激活素及抑制素具有相反的生物学功能, 同属于转化生长因子 β 家族的成员^[1]。通过作用于下丘脑-垂体-性腺轴, 激活素及抑制素在细胞生长、增殖及分化的不同阶段产生相反的生物学效应^[2]。已有研究表明激活素 A 在多个生物学过程中发挥作用, 例如: 激活素 A 调控造血的多个方面^[4], 在器官形成过程中起着十分重要的作用^[5], 和伤口愈合也有关^[6]。激活

素 A 在肿瘤形成中也具有非常重要的作用。在食管的鳞状细胞癌中, 长期暴露于激活素 A 可以促进肿瘤细胞形成、浸润及对凋亡的抵抗^[7]。许多研究已报道激活素 A 在食管、肺、胃、胰腺、前列腺、结肠、卵巢、子宫内膜及宫颈肿瘤中过表达^[8]。

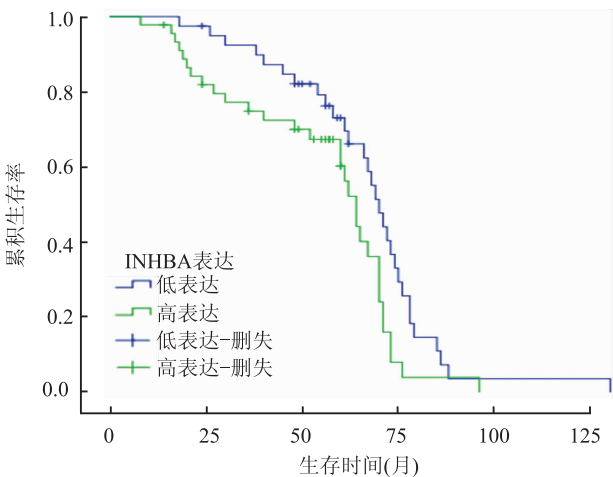


图 2 INHBA 表达与乳腺癌患者 5 年总体生存期的关系

表 1 乳腺癌中 INHBA 表达与临床病理特征的关系

临床病理参数	n	INHBA		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
年龄(岁)					
<60	55	28	27	0.927	>0.05
≥60	30	12	18		
肿瘤直径(cm)					
≤2	13	8	5	1.295	>0.05
2~5	47	21	26		
>5	25	11	14		
组织学分级					
I	7	6	1	7.148	<0.05
II	52	26	26		
III	26	8	18		
淋巴结转移					
0	31	18	13	7.61	<0.05
1~3	29	16	13		
>3	25	6	19		
TNM 分期					
I + II	44	22	22	0.317	>0.05
III + IV	41	18	23		
ER					
阴性	30	11	19	2.01	>0.05
阳性	55	29	26		
PR					
阴性	36	16	20	0.171	>0.05
阳性	49	24	25		
HER-2					
阴性	61	32	29	2.53	>0.05
阳性	24	8	16		
Ki-67 增殖指数					
>14%	35	10	25	8.16	<0.05
<14%	50	30	20		

表2 乳腺癌临床病理特征与 Cox 回归多因素分析结果

临床病理 参数	B	SE	Wald	P 值	RR	95% CI	
						下限	上限
年龄	0.11	0.06	2.75	0.07	1.12	0.98	1.27
肿瘤大小	0.65	0.36	2.43	0.08	1.92	0.93	4.00
组织学分级	-0.019	0.19	0.96	0.81	0.18	0.21	8.56
淋巴结转移	0.05	0.02	5.61	0.02	1.05	1.01	1.10
TNM 分期	1.11	0.38	7.15	0.00	3.04	1.41	6.53
ER 表达	0.01	0.20	1.07	0.75	0.19	0.86	11.60
PR 表达	0.07	0.22	1.32	0.61	0.21	0.26	2.55
HER-2 表达	0.32	0.25	1.78	0.31	0.61	0.31	3.12
INHBA 表达	1.46	0.54	6.25	0.01	4.28	1.49	12.41

在食管腺癌中,INHBA mRNA 水平显著高于 Barrett 食管及食管上皮异性增生^[9]。在胃癌中,肿瘤组织中 INHBA mRNA 水平亦显著高于癌旁正常组织^[10]。本文采用免疫组化法,在 85 例乳腺浸润性导管癌组织中,INHBA 高表达 52.9%,显著高于癌旁正常组织。基于已有的报道及本实验结果,INHBA 高表达和肿瘤的形成具有相关性。

本实验进一步分析了 INHBA 表达与乳腺浸润性导管癌患者临床病理特征及预后的相关性。INHBA 高表达和肿瘤较低的分化程度、淋巴结转移及 Ki-67 增殖指数 >14% 具有相关性,而与患者年龄、肿瘤大小、TNM 分期、ER、PR 及 HER-2 表达无显著相关性。Wang 等^[10]的研究认为,胃癌中 INHBA mRNA 高表达与瘤体较大及瘤体浸润较深相关,同时 INHBA 高表达患者的无瘤生存期及总体生存期均显著低于低表达者。在头颈部鳞状细胞癌中,INHBA 过表达与淋巴结转移相关,且高表达者无病生存期显著低于低表达者^[9]。本实验 INHBA 高表达患者 5 年总体生存期显著低于低表达患者,Cox 比例风险回归模型分析 INHBA 过表达是乳腺癌浸润性导管癌患者一个独立的危险因素。但 INHBA 表达在不同的肿瘤之间存在差异。例如在肾上腺皮质腺癌中,INHBA 是低表达^[11]。这项研究是通过免疫组化方法分别检测肾上腺皮脂腺瘤及肾上腺皮质腺癌中 INHBA 的表达,研究发现腺瘤中 INHBA 阳性率为 33%,腺癌中阳性率为 15%。虽然肾上腺皮质腺癌中的阳性率低于腺瘤,但两者无统计学意义。因此,INHBA 在不同肿瘤中的表达,还需要更多的实验来验证。

使用 5-氮-2'-脱氧胞苷处理食管癌细胞可以上调 INHBA mRNA 及蛋白质水平。因此他们认为 INHBA 过表达受到启动子甲基化及组蛋白的乙酰化调节^[9]。另有研究发现转染 INHBA 的食管癌细胞中 N-cadherin 表达水平高于对照组,进一步分析显示 N-cadherin 高表达患者的预后比低表达患者预后差。因此认为 INHBA 的同源二聚体-激活素 A,

可以调节 N-cadherin 的表达,从而影响患者的预后^[7]。

INHBA 在乳腺癌组织中的表达揭示了其在乳腺癌发生、发展中的促进作用。检测 INHBA 表达有望成为检测乳腺癌侵袭、转移及预后的重要手段。

参考文献:

- [1] Brown C W, Houston-Hawkins D E, Woodruff T K, *et al.* Insertion of inhbb into the inhba locus rescues the inhba-null phenotype and reveals new activin functions[J]. Nat Genet, 2000,25(4): 453-457.
- [2] Lotinun S, Pearsall R S, Horne W C, *et al.* Activin receptor signaling; a potential therapeutic target for osteoporosis[J]. Curr Mol Pharmacol, 2012,5(2):195-204.
- [3] 甘 艺,吴正升,吴 强. 乳腺癌组织中 SOX4、EZH2 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017,33(5):477-481.
- [4] Worbs S, Shabani N, Mayr D, *et al.* Expression of the inhibin/activin subunits (-alpha, -betaA and -betaB) in normal and carcinogenic endometrial tissue; possible immunohistochemical differentiation markers[J]. Oncol Rep, 2007,17(1):97-104.
- [5] Okano M, Yamamoto H, Ohkuma H, *et al.* Significance of INHBA expression in human colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2013, 30(6):2903-2908.
- [6] Oshima T, Yoshihara K, Aoyama T, *et al.* Relation of INHBA gene expression to outcomes in gastric cancer after curative surgery [J]. Anticancer Res, 2014,34(5):2303-2209.
- [7] Yoshinaga K, Yamashita K, Mimori K, *et al.* Activin a causes cancer cell aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. Ann Surg Oncol, 2008,15(1):96-103.
- [8] Mylonas I. Inhibin-βA subunit immunolabeling as a prognostic factor in endometrioid adenocarcinomas: a matter of evaluation? [J]. Arch Gynecol Obstet, 2011,284(2):467-476.
- [9] Seder C W, Hartojo W, Lin L, *et al.* INHBA overexpression promotes cell proliferation and may be epigenetically regulated in esophageal adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2009,4(04):455-462.
- [10] Wang Q, Wen Y G, Li D P, *et al.* Upregulated INHBA expression is associated with poor survival in gastric cancer[J]. Med Oncol, 2012,29(1):77-83.
- [11] Hofland J, van Nederveen F H, Timmerman M A, *et al.* Expression of activin and inhibin subunits, receptors and binding proteins in human pheochromocytomas: a study based on mRNA analysis and immunohistochemistry[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2007,6(3):335-340.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.023.html>

胃癌中 HP DNA 定量检测与美兰染色半定量检测的相关性及优劣性

曹冲^{1,2}, 李秀明³, 王晓军^{1,2}, 赵瑾^{1,2}, 张文杰^{1,2}

摘要:目的 探讨胃癌患者 HP DNA 定量检测与美兰染色半定量检测两种检测 HP 方法的相关性及优劣性。方法 应用实时荧光定量 PCR 及美兰染色检测 118 例胃癌患者 HP 感染情况。结果 HP DNA 定量分析与美兰染色半定量分析呈显著正相关($r=0.749, P<0.001$);美兰染色等级越高, HP 相对感染量越多($P<0.001$);HP DNA 定量分析阳性率(74.6%)显著高于美兰染色半定量分析(阳性率 62.7%)。结论 美兰染色操作简单、快速、结果可靠;实时荧光定量 PCR 检测精确、定量、客观、不易漏诊;两种检测 HP 方法呈显著正相关,实时荧光定量 PCR 较美兰染色检测阳性率更高,更敏感。

关键词:胃肿瘤;幽门螺杆菌;实时荧光定量 PCR;美兰染色

中图分类号:R 735.2 **文献标志码:**B

文章编号:1001-7399(2018)03-0334-03

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.023

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)不仅是慢性胃炎、消化性溃疡的主要病原菌,也是引起胃癌的危险因子,世界卫生组织国际癌症研究机构已将 HP 纳入第一类致癌原,故检测人体 HP 感染情况对胃癌的诊断和研究以及临床指导药物治疗均有重要意义。目前临床检测 HP 的方法很多,美兰染色作为一种组织学检查,稳定可靠,实用性强,已普遍适用于临床。实时荧光定量 PCR,具有灵敏度高、特异性强、准确快速、实时定量的特点,适用于快速检测,其闭管式操作减少了污染与假阳性的机率。目前,实时荧光定量 PCR 检测已应用于多种微生物的检测^[1-2]。本实验应用实时荧光定量 PCR 及美兰染色分别检测 118 例胃癌患者 HP 感染情况并对两种 HP 检测方法进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料 收集石河子大学医学院第一附属医院病理科存

接受日期:2017-12-10

基金项目:国家科技部科技支撑计划(2009BAI82B02)

作者单位:¹ 石河子大学医学院病理系/第一附属医院病理科,石河子 8320023

² 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,石河子 8320023

³ 太原市中心医院病理科,太原 030009

作者简介:曹冲,女,硕士研究生。E-mail: 290334168@qq.com

张文杰,男,教授,硕士生导师,通讯作者。E-mail: 1939453950@qq.com

档的石蜡包埋胃癌组织标本 118 例,每例标本均经两位主治医师以上的病理学专家诊断,病理资料齐全,所有患者术前均未行放疗或化疗,所有标本均经 10% 中性福尔马林固定。

1.2 方法 (1)提取 DNA:取石蜡组织 5 μm 厚切片 15 张装于 2 mL 灭菌 Ep 管中,应用 QIAGEN 试剂盒提取 118 例胃癌组织标本 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(2)设计引物:HP 引物序列(GenBank Accession G32165)^[3] 为:5'-GAGCCCTCAAAGA ACTGCAC-3', 5'-AATTGGACAGCAGCTTCTGG-3', PCR 产物大小为 173 bp;内参基因 β -globin 引物序列为:5'-CAGACACCATGGTGCACCTGAC-3', 5'-CCAATAGGCAGAGAGAGT-CAGTG-3', PCR 产物大小为 210 bp,上述 2 个引物均经过 BLAST 软件验证;均由上海生工公司合成。(3)实时荧光定量 PCR:反应体系(共 25 μL):2 $\times$ Quantifast SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μL , 10 μmol 引物各 2.5 μL , 模板 DNA 2 μL , RNase-free water 5.5 μL ;反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s, 40 个循环;其中模板 DNA 浓度不超过 100 ng 每体系,实时荧光定量 PCR 试剂盒购于 QIAGEN 公司;以下为 HP 相对感染量计算公式:HP 相对感染量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的}} - \text{Ct}_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{目的}} - \Delta\text{Ct}_{\text{空白}}$, 空白组的相对感染量为 1,即 <1 为 HP 阴性, >1 为 HP 阳性,实验重复 3 次取平均值。(4)美兰染色法:每例组织均取 1 张 4 μm 厚石蜡组织切片,经脱蜡和水化、消除内源性过氧化物酶活性、抗原修复、50 μL 美兰染液染色、中性树脂封固等步骤;美兰染液购于上海科兴生化试剂公司。

1.3 结果判定 HP 感染美兰染色结果评分标准为 HP 感染面积与 HP 积聚程度的乘积。HP 感染面积计分:0 为 0 分; $\leq 1/3$ 为 1 分; $\leq 2/3$ 为 2 分; $> 2/3$ 为 3 分。HP 积聚程度计分:无为 0 分;散在为 1 分;少量积聚为 2 分;大量积聚为 3 分。两项得分结果相乘:0 分为(-);1 分为(+);2~4 分为(++);6~9 分为(+++);(-)为阴性组,(+)为阳性组,(++~+++)为强阳性组。

1.4 统计学方法 Spearman 等级相关分析,两组间的比较采用配对 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HP DNA 定量分析 胃癌中 HP 相对感染量在 0.02 ~ 26.76 之间,均数为 8.73,标准差为 6.50;HP 实时荧光定量 PCR 扩增产物大小为 173 bp,内参基因 β -globin PCR 扩增产物大小为 210 bp,胃癌中 HP DNA 定量分析阳性率为 74.6% (图 1)。

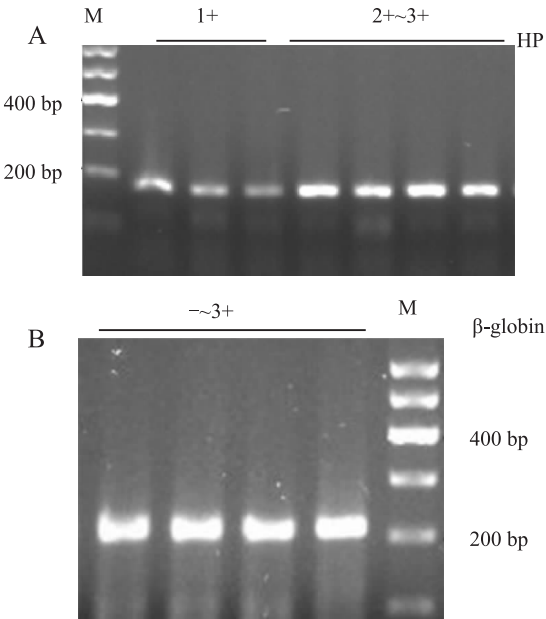


图1 实时荧光定量PCR产物电泳图

A. HP 扩增;B. β -globin 扩增;-、1+、2+、3+代表美兰染色等级

2.2 HP 美兰染色结果 镜下观察到 HP 多位于胃小凹和胃腺腔中,呈典型的深蓝色棒状杆菌;118 例胃癌患者 HP 感染阳性率为 62.7% ,“+”、“++”、“+++”阳性率分别为 45.7%、13.6%、3.4%(图 2)。

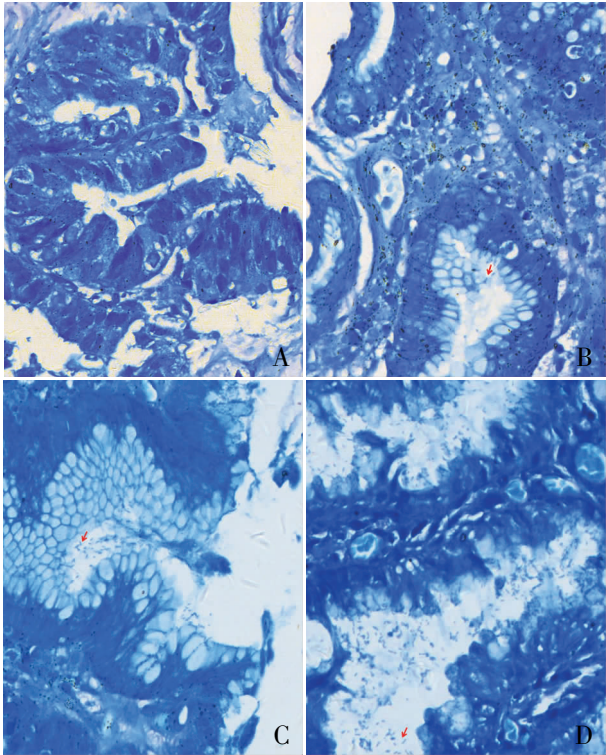


图2 A. 中分化腺癌 HP(-);B. 中分化腺癌 HP(+);C. 低分化腺癌 HP(++);D. 低分化腺癌 HP(+++),美兰染色

2.3 HP DNA 定量与美兰染色半定量相关性分析 HP DNA 定量分析与美兰染色半定量分析呈显著正相关($r =$

$0.749, P < 0.001$);美兰染色等级越高,HP 感染量越多($P < 0.001$,表 1,图 3)。

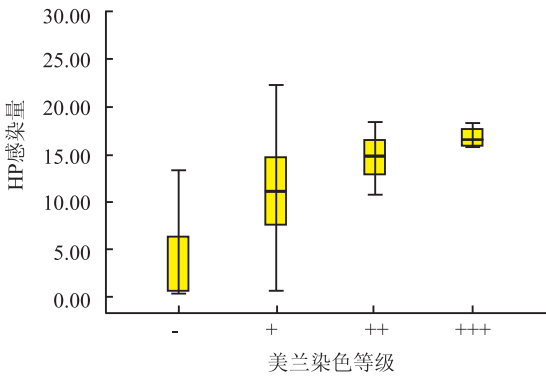


图3 HP 相对感染量与美兰染色等级的相关性

表1 HP DNA 定量分析与美兰染色半定量分析的相关性

美兰染色等级	n	HP 相对感染量		P 值
		均数	标准差	
-	44	2.92	0.58	<0.001
+	54	11.04	0.70	
++	16	14.90	1.06	
+++	4	16.84	0.55	

2.4 HP DNA 定量与美兰染色阳性率比较 HP DNA 定量分析阳性率(74.6%)显著高于美兰染色半定量分析(阳性率 62.7%),差异有统计学意义($P = 0.001$,表 2)。

表2 HP 定量分析与美兰染色半定量分析之间的关系

HP DNA 定量分析	美兰染色半定量分析		总计	P 值
	+	-		
+	73	15	88	0.001
-	1	29	30	
总计	74	44	118	

3 讨论

我国属于 HP 感染率较高的国家,自然人群的感染率为 50%^[4]。有调查结果显示胃癌中 HP 感染率为 17.5% ~ 86.2%^[5],胃癌是与慢性 HP 感染密切相关的恶性肿瘤,研究表明,HP 感染参与了从正常胃黏膜→肠上皮化生→非典型增生→早期胃癌病变的整个过程。杨志^[6]对 2 654 例随机人群进行血清学及胃镜普查并随访 10 年,结果表明 HP 阳性患者发生胃癌及胃上皮内瘤变的概率高于 HP 阴性者。牟海军等^[7]认为胃癌患者临床实际生存与 HP 临床相对感染量之间呈负相关性,HP 可将其作为评估胃癌进展和预后的一个潜在性标志。因此早期诊断 HP 感染并积极有效的根除治疗,对胃癌的预防有重大意义。

美兰染色可将 HP 染为蓝紫色,优点是染色耗时短、操作简单、价格低廉、染色细菌形态清晰;缺点是格兰阴性菌亦

可着色,特异性较差,存在一定假阳性^[8],且评判结果主观性强,不同病理医师可能出现不同检测结果,对于一些 HP 低感染或经过 HP 治疗的患者,复诊时美兰染色易漏诊、误诊,不利于 HP 根除治疗。实时荧光定量 PCR 应用基因分型技术,不仅可以定性检测是否感染 HP,还能对 HP 感染进行量化分析,且此方法快速、客观、准确,不易漏诊^[9-10]。

本实验中美兰染色癌中 HP 感染较癌旁不易识别,易出现假阴性,相反,DNA 定量分析检测阳性率显著高于美兰染色,其中有 15 例胃癌患者 DNA 定量分析阳性而美兰染色显示为阴性,提示 HP DNA 定量分析检测较美兰染色更敏感。总之,HP 感染与胃癌的关系及其治疗是当今 HP 研究的两大焦点,通过根除 HP 预防胃癌将面临时机的选择,我们认为应高度重视 HP 的检测方法及其在胃癌治疗中的作用。

参考文献:

- [1] 王旭洲,谢飞来,郑智勇. 荧光定量 PCR 检测结核/非结核分枝杆菌在肉芽肿病理诊断中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013,29(8):884-887.
- [2] 张辉,吴冬生,方敏,等. 荧光定量 PCR 法与酶联免疫吸附法在乙型肝炎病毒检测中的应用[J]. 解放军预防医学杂志, 2017,11:1459-1461.
- [3] Cox J M, Clayton C L, Tomita T, *et al.* cDNA array analysis of

cag pathogenicity island-associated *Helicobacter pylori* epithelial cell response genes[J]. Infect Immun, 2001,69(11):6970-6980.

- [4] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010,15(5):265-270.
- [5] Wang F, Sun G, Zou Y, *et al.* Protective role of *Helicobacter pylori* infection in prognosis of gastric cancer: evidence from 2,454 patients with gastric cancer[J]. PLoS One, 2013,8(5):e62440.
- [6] 杨志. 探析幽门螺杆菌(HP)在胃癌发生进程中的作用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016,16(A5):70.
- [7] 牟海军,陈小燕,化伟利,等. 胃癌患者幽门螺杆菌的感染与预后的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2016,26(16):3643-3647.
- [8] 徐东娟,李国富,张红梅,等. 不同方法检测胃黏膜活检标本中幽门螺杆菌感染状况的价值[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014,30(6):622-624.
- [9] 于新娟,陈爱萍,董全江,等. 一种新的检测胃黏膜幽门螺杆菌荧光定量 PCR 法[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015,31(2):226-228.
- [10] 石建玲,程波,刘珊,等. 基于 TaqMan 探针的幽门螺杆菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国实验诊断学, 2013,17(6):986-989.

· 简 讯 ·

《肿瘤防治研究》杂志 2018 年征订征稿启事

《肿瘤防治研究》是我国第一本独立的全国性肿瘤专业学术期刊,连续入选中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)、RCCSE 中国核心学术期刊(A)、美国《化学文摘》(CA)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JST)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)、英国《全球健康》(Global Health)。

《肿瘤防治研究》主要报道肿瘤基础研究及临床诊疗方面的新理论、新成果、新技术、新实验、新进展。以肿瘤临床、科研工作者为主要读者对象。主要栏目有专家论坛、专题研究、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、综述、技术交流、短篇论著、研究简报、病例报道、指南与解读、消息会讯等。

2018 年我们将组织更多优秀的文章回馈广大读者,希望朋友们能一如既往地给予本刊以热忱的关注,将优秀稿件投往《肿瘤防治研究》以支持我国学术期刊的发展;订阅《肿瘤防治研究》以关注我国肿瘤事业的进步。

邮发代号:38-70;国外代号:MO6482 定价:15.00 元/册;出版周期:月刊

中国标准连续出版物号:ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R CODEN:ZFYHAB

官方网站:<http://www.zlfzyj.com>;E-mail:zlfzyjzz@vip.163.com

编辑部电话:027-87670126

通信地址:430079 武汉市洪山区卓刀泉南路 116 号



杂志官网



微信公众号

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.024.html>

24 例年轻人结外 NK/T 细胞淋巴瘤(鼻型)的临床病理特征分析

王明华, 罗志飞, 陈明净, 吴文婷, 郑艺菲, 袁振亚, 翁 阳

摘要:目的 探讨一组年龄 ≤ 40 岁结外 NK/T 细胞淋巴瘤(鼻型)(extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type, ENKTL)的临床病理特征。**方法** 收集海南医学院第一附属医院、海南省人民医院和海口市人民医院病理科 2004 年 1 月~2017 年 2 月收治的年龄 ≤ 40 岁 ENKTL 病例共 24 例,应用免疫组化检测 CD20、CD3、CD5、CD56、TIA-1、Granzyme B 和 Ki-67 在 ENKTL 中的表达,应用 EBER 原位杂交检测 EBV 表达,同时收集临床数据,分析该组病例的临床病理特征及预后。**结果** 本组年龄 ≤ 40 岁的 ENKTL 病例中,患者年龄 15~40 岁,中位年龄 29 岁,男女比为 2:1。免疫表型:CD20、CD5(-),CD3、CD56、TIA-1 和 Granzyme B(+),Ki-67 增殖指数 30%~95%,EBER 原位杂交肿瘤细胞均阳性;肿瘤原发部位主要位于上呼吸道,尤其多见于鼻腔及鼻咽部;中位生存期 21 个月,预后与病变部位(鼻或鼻外)、是否同时伴有其他疾病及是否接受治疗相关。**结论** 本组 ≤ 40 岁 ENKTL 病例具有与其他年龄组相似的临床病理特征,伴有较高的 HBV 感染率,中位生存时间 21 个月,预后与病变部位(鼻或鼻外)、是否同时伴有其他疾病及是否接受治疗相关。

关键词:结外 NK/T 细胞淋巴瘤(鼻型);HBV 感染;预后

中图分类号:R 733 **文献标志码:**B

文章编号:1001-7399(2018)03-0337-04

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.024

结外 NK/T 细胞淋巴瘤(鼻型)(extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type, ENKTL)的分布具有明显的地域和种族差异,多见于亚洲人、墨西哥人和南美土著人,而其在西方人群的发病率不到 1.5%^[1]。国内 5 所医院对 4 638 例淋巴瘤的统计分析结果提示 ENKTL 占我国所有淋巴瘤的 11%^[2]。临床上,ENKTL 是一种高侵袭性淋巴瘤,几乎只发生于成年人,中位年龄 49 岁,男性多见,预后差,5 年生存率 30%~46%^[1,3]。本文报道一组年龄 ≤ 40 岁的年轻人 ENKTL 的临床病理特征及预后。

接受日期:2017-11-27

基金项目:海南省自然科学基金项目(817327、814288)、海南医学院附属医院科研培育基金项目(hyfykyp201401)

作者单位:海南医学院第一附属医院病理科,海口 571101

作者简介:王明华,女,主任医师。E-mail: minghuawang2015@hotmail.com

翁 阳,男,教授,通讯作者。E-mail: wengyang01@126.com

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集海南医学院第一附属医院、海南省人民医院和海口市人民医院 2004 年 1 月~2017 年 2 月存档的具有完整临床和随访资料且年龄 ≤ 40 岁的 ENKTL 病例 24 例,年龄 15~40 岁,中位年龄 29 岁,男女比为 2:1,病变原发部位主要见于上呼吸道(鼻咽部、鼻腔、鼻窦、扁桃体)、回肠、盲肠等。

1.2 免疫组化 所有标本均经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m 厚切片,常规 HE 染色,同时采用免疫组化检测肿瘤细胞相关蛋白质表达。免疫组化染色采用 EnVision 两步法,操作根据说明书进行,DAB 显色。所用抗体 CD20、CD3(SP7)、CD5、CD56、TIA-1、Granzyme B、Ki-67 和 EnVision 试剂盒购自福州迈新公司。

1.3 原位杂交 EBER 原位杂交试剂盒购自北京中杉金桥公司。操作步骤按试剂盒说明书进行,DAB 显色。

1.4 结果判读 CD20、CD3、CD5 和 CD56 阳性染定位于细胞膜,呈棕黄色;TIA-1、Granzyme B 阳性染色定位于细胞质,呈棕黄色颗粒状;Ki-67 阳性染色定位于细胞核,呈棕黄色颗粒状。EBER 原位杂交阳性染色定位于细胞核,呈棕褐色。

1.5 统计学方法 所有数据 SPSS 16.0 软件进行 Cox 回归分析和 Kaplan-Meier 生存分析。 $P < 0.05$ 为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征 该组患者年龄 15~40 岁,中位年龄 29 岁,男女比为 2:1。病变原发部位主要见于上呼吸道(鼻咽部、鼻腔、鼻窦、扁桃体)、回肠和盲肠等部位。临床表现以鼻塞和发热为主,部分患者伴 HBV 感染和其他病变,临床分期以 III~IV 期为主,个别病例复发,累及皮肤,治疗以化疗为主(表 1)。

2.2 镜检 本组病例均表现为中等大小到大淋巴样细胞弥漫增生,细胞核不规则,染色质颗粒状,部分可见核仁,胞质中等,淡染或透明;凝固性坏死见于大部分病例(18/24),血管中心性生长较凝固性坏死少见(9/24)(图 1~3)。

2.3 免疫表型 24 例中,23 例肿瘤细胞免疫表型为 CD3、CD56、细胞毒分子(+),EBER 原位杂交(+)(图 4~6);仅 1 例病例免疫表型为 CD3、细胞毒分子(+),CD56(-),EBER 原位杂交(+);所有例病例 CD5(-)。

2.4 随访 24 例 ENKTL 中,17 例获得随访资料,随访时间 4 天~156 个月(图 7)。17 例中 11 例患者死亡,死亡原因主

表 1 17 例具有完整临床和随访资料的年轻人 ENKTL

病例	年龄 (岁)	性别	临床表现	首发 部位	复发 部位	B 症状	伴随 情况	HBV 感染	临床 分期	治疗	随访	预后
1	27	M	发热伴颈部淋巴结肿大 1 个月	鼻咽	无	有	无	无	ⅣB	未治疗	4 天	死亡
2	24	M	右鼻腔疼痛伴鼻塞 1 个月	右鼻腔	无	无	无	无	ⅡB	化疗	17 个月	PR
3	15	M	鼻塞 1 年,发热 1 个月	左鼻腔	无	有	无	无	ⅣB	化疗 + 放疗	18 个月	PR
4	21	M	反复发热伴颈前肿块 1 月	鼻咽/双颈部	无	有	无	有	ⅣB	化疗	1 个月	死亡
5	38	F	头痛伴发热 40 天	左下鼻甲、右侧鼻咽	右大腿皮肤	有	无	有	ⅣB	化疗 + 放疗	34 个月	PR
6	23	F	左鼻塞半年,加重伴反复发热 1 个月	左鼻腔	无	有	无	无	ⅢB	化疗	10 个月	死亡
7	35	F	左鼻塞伴脓涕 2 个月	右下鼻甲/左鼻腔	无	有	无	无	ⅣB	化疗	9 个月	死亡
8	27	F	鼻面部疼痛伴反复发热、左鼻出血 2 年	左鼻腔	无	有	α-地中海贫血	有	ⅡEB	化疗	1 个月	死亡
9	21	M	双鼻塞伴脓涕 1 年,加重半年	双鼻腔	无	无	无	有	Ⅲ	化疗 + 放疗	3 个月	失访
10	32	M	咽痛 4 个月,加重 1 周	左鼻腔	无	无	结核	无	ⅡB	化疗	15 个月	PR
11	28	M	便血 1 个月	扁桃体	无	无	贫血	有	ⅣB	化疗	12 个月	死亡
12	17	M	反复口腔溃疡 1 月	口腔	左上臂/腹部	无	无	有	ⅡB	化疗	110 个月	死亡
13	40	M	反复发热 10 天	左鼻腔/左上颌窦	无	有	全血减少	有	ⅣB	化疗	2 个月	死亡
14	36	F	进行性右侧鼻塞半年	右鼻腔	无	无	全血减少	有	Ⅳ	化疗	3 个月	死亡
15	16	F	黑便 5 天	盲肠	无	无	无	无	ⅠEA	化疗	156 个月	CR
16	40	F	左面部肿胀伴麻木 15 天	左面部	无	无	无	有	ⅡA	化疗	2 个月	死亡
17	29	F	鼻塞 1 个月	左鼻腔、鼻窦	无	有	无	无	ⅣB	未治疗	1 个月	死亡

PR. 部分缓解;CR. 完全缓解

要为嗜血综合征和化疗后副反应(骨髓抑制导致继发性感染);5 例患者存活,其中 1 例原发于盲肠的ⅠEA 期患者化疗 7 次后完全缓解;1 例随访 3 个月后失访。Kaplan-Meier 生存分析提示本组患者中位生存时间为 21 个月,Cox 回归分析结果显示,病变部位(鼻腔或鼻外)、伴随疾病及是否接受治疗与患者预后相关。

3 讨论

ENKTL 通常发生于成年人,中位年龄 49 岁,年轻人少见^[3]。Huang 等^[4]曾报道一组 17 例儿童和青少年 ENKTL,年龄 2 ~ 17 岁,中位年龄 13 岁,仅占同期诊断 ENKTL 的 5.9%,这组病例的临床病理特征与发生于成年人的 ENKTL 相似。本文报道这组发生于年轻人 ENKTL,患者年龄 15 ~ 40 岁,中位年龄 29 岁,男女比为 2 : 1。

根据 WHO(2008 版)造血与淋巴组织肿瘤分类,ENKTL 典型的免疫表型为肿瘤细胞 CD3ε +、CD56 +、细胞毒分子(TIA-1、GranzymeB 或 perforin) + 或肿瘤细胞 CD3ε +、CD56 -、细胞毒分子(TIA-1、GranzymeB) + 及 EBER +^[5]。若肿瘤细胞 CD3ε +、CD56 -、细胞毒分子(TIA-1、GranzymeB) +、EBER - 则可能为外周 T 细胞淋巴瘤(PTCL,NOS),而非 ENKTL^[5]。

ENKTL 的形态学变化较大,肿瘤细胞可以表现为大、中和小淋巴样细胞增生,或大小细胞混合增生,细胞形态从温和到明显异型,病变背景单一或多种炎细胞混合。本组病例的形态学较为一致,均表现为中等大小到大淋巴样细胞弥漫

增生,细胞核不规则,染色质颗粒状,部分可见核仁,胞质中等,淡染或透明,凋亡易见;凝固性坏死见于大部分病例(18/24),血管中心性生长较凝固性坏死少见(9/24)。此外,上呼吸道 ENKTL 由于表皮下肿瘤的刺激,表面被覆柱状上皮鳞化,并出现假上皮瘤样增生,或伴有细胞轻度异型,易误诊为上皮性肿瘤。本组病例中,有 1 例患者鼻咽部第一次取材时诊断为“高分化鳞状细胞肿瘤,因送检组织少且表浅,不排除反应性改变”,再次活检才明确诊断。

文献报道,20% ~ 30% 的 ENKTL 病例不表达 CD3ε 和 CD56,个别病例可异常表达 B 细胞标记 CD20^[3,6-9]。本组 24 例肿瘤细胞均表现为典型的 ENKTL 免疫表型特征,即 CD3 +、CD56 +、细胞毒分子(TIA-1 和 GranzymeB) +、Ki-67 增殖指数 30% ~ 95%,无异常表达免疫表型。本实验中所用 CD3 抗体克隆号为 SP7(福建迈新)。一般而言,ENKTL 肿瘤细胞表达胞质型 CD3(CD3ε),而不表达胞膜 CD3。本组 24 例 ENKTL 均表达 CD3,本科室在日常病理诊断工作中使用的亦是同一克隆号的 CD3 抗体,肿瘤细胞均阳性表达。Huang 等^[4]报道的一组儿童和青少年 ENKTL 病例中,肿瘤细胞亦表达 CD3(SP7)。推测该克隆号 CD3 可能是一种广谱抗体或其本身就是胞质型 CD3。

虽 EBV 阴性的 ENKTL 可见于文献报道^[10],但 EBV 与 ENKTL 发生密切相关已是共识^[5,11-12]。EBER 原位杂交显示本组病例肿瘤细胞 EBER 均 +,再次证实 EBV 感染在 ENKTL 发生中的重要作用。EBV 在 ENKTL 中的感染模式为Ⅱ型潜伏感染,表达病毒核心抗原 EBNA-1 和 LMP-1,不表达病

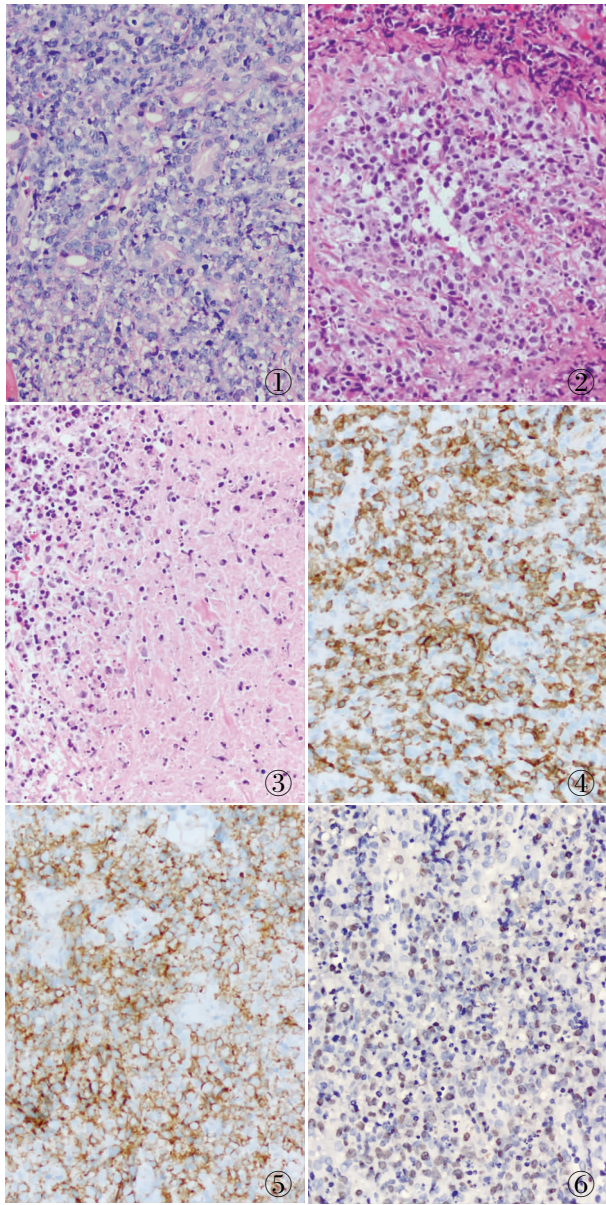


图1 肿瘤细胞中等大小,核不规则,异型明显 图2 肿瘤细胞血管中心性浸润 图3 肿瘤细胞大片凝固性坏死 图4 肿瘤细胞 CD3 阳性,EnVision 两步法 图5 肿瘤细胞 CD56 阳性,EnVision 两步法 图6 肿瘤细胞 EBER 阳性,原位杂交

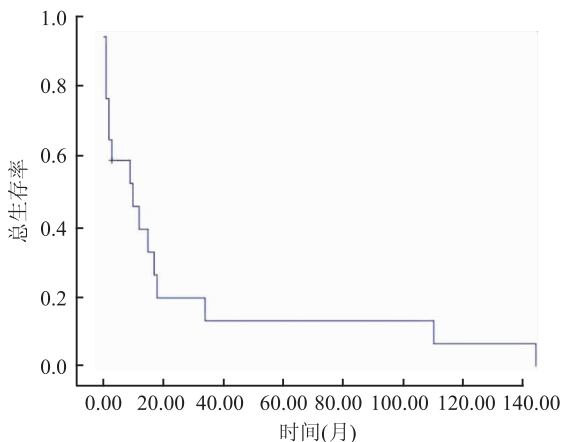


图7 17例 ENKTL 患者的生存曲线,患者中位生存时间 21 个月

毒核心抗原 EBNA-2。

本组病例的临床病理特征与同期收集的 40 岁以上 ENKTL 病例(资料未显示)相似。两组病例的病理变化和免疫表型无明显差别。后者中位年龄 63 岁,男性多见,首发部位仍以鼻咽部为主。伴发病变以高血压和脂肪肝等疾病多见,HBV 感染相对少见。因后者随访例数太少且临床资料不完整,两组病例未做统计学分析。查阅相关文献,该组年轻患者 ENKTL 的临床病理特征与文献报道亦相似^[3-5,8-9,11]。该组病例除 2 例发生于回盲部外,其余 22 例均以上呼吸道为首发部位,尤其多见于鼻腔及鼻咽部(90.9%)。其中 17 例具有完整的临床及随访资料,临床分期 I + II 期 6 例(35.3%), III + IV 期 11 例(64.7%), B 症状见于 9 例(52.9%)患者,9 例(52.9%)患者伴有 HBV 感染,5 例(29.4%)患者伴有贫血、结核或全血减少等其他疾病,2 例(11.8%)患者分别在治疗缓解后 1 年和 8 年复发累及皮肤。17 例患者随访时间 4 天~156 个月,除 1 例完全缓解、4 例部分缓解和 1 例失访外,其余 11 例(68.8%)患者死亡。死亡原因主要与病变初期发生的嗜血综合征和化疗后 BM 抑制继发感染及多器官功能衰竭有关。

Kaplan-Meier 生存分析结果提示本组具有随访资料的 17 例患者的中位生存时间为 21 个月。本组病例原发部位除 2 例发生于肠道外,其余 14 例均发生于鼻腔鼻窦,生存时间与文献报道相似^[3]。文献报道,发生于鼻外部位的 ENKTL 中位生存时间仅为 4.32 个月,而发生于鼻部的 ENKTL 预后明显好于鼻外部位者,中位生存时间为 19.2 个月^[3]。本组病例因病例数少,未能进行比较分析,但 Cox 回归分析结果显示病变部位(鼻或鼻外)、是否同时伴有其他疾病及是否接受治疗与患者生存时间相关。

本组 24 例 ENKTL 患者,13 例(54.2%)患者伴有 HBV 感染(HBsAg 阳性),远高于我国 HBV 在普通人群的感染率和 HBV 在非霍奇金淋巴瘤(non Hodgkin lymphoma, NHL)中的感染率^[13-14]。但因病例数少,因此 HBV 在 ENKTL 的感染率具有一定局限性;另外,文献报道 HBV 与 NHL 的资料多来自 HBV 与 B-NHL(尤其是弥漫大 B 细胞淋巴瘤)之间的关系,HBV 与 T-NHL 的研究较少报道。因此,ENKTL 中 HBV 感染率的确切数据尚不得而知。淋巴瘤与 HBV 感染之间互为因果,一方面,HBV 感染使 NHL 的发病风险增加了 2~3 倍;另一方面,NHL 的免疫功能紊乱可能是其对 HBV 易感的原因之一^[14]。而淋巴瘤治疗过程中患者可能发生 HBV 再激活,HBV 再激活一方面增加了乙型肝炎的发病率及相关死亡率,另一方面可导致淋巴瘤治疗中断,间接影响患者生存及预后^[15]。虽然 Cox 回归分析并未提示本组病例 HBV 感染与患者生存时间相关,但因病例数少,尚不能否定二者之间的关系。

临床分期、国际预后指数和 Ki-67 增殖指数 > 50% 等是 ENKTL 的不良预后因素^[3,5],虽然本组病例统计结果分析未显示上述因素与不良预后相关,但本组病例数较少,不能据此否定 ENKTL 其它相关的不良预后因素。综上所述,本组

≤40 岁 ENKTL 病例的临床病理特征与其他文献报道相似。本组病例伴有较高的 HBV 感染率,患者中位生存时间 21 个月,病变部位(鼻或鼻外)、是否同时伴有其他疾病及是否接受治疗与预后相关。

(本文承蒙海南省人民医院病理科和海口市人民医院病理科在病例收集过程中提供的帮助,特此鸣谢!)

参考文献:

- [1] Lim S T, Hee S W, Quek R, *et al.* Comparative analysis of extranodal NK/T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma: significant differences in clinical characteristics and prognosis[J]. *Eur J Haematol*, 2008,80(1): 55–60.
- [2] Sun J, Yang Q, Lu Z, *et al.* Distribution of lymphoid neoplasms in China: analysis of 4,638 cases according to the World Health Organization Classification[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012,138(3): 429–434.
- [3] Au W Y, Weisenburger D D, Intragumtornchai T, *et al.* Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project[J]. *Blood*, 2009,113(17):3931–3937.
- [4] Huang Y, Xie J, Ding Y, Zhou X. Extranodal natural killer/T-cell lymphoma in children and adolescents a report of 17 cases in china[J]. *Am J Clin Pathol*, 2016,145(1):46–54.
- [5] Campo E, Swerdlow S H, Harris N L, *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. 4th ed. Lyon: IARC, 2008.
- [6] Jiang Q P, Liu S Y, Yang Y X, *et al.* CD20-positive NK/T-cell lymphoma with indolent clinical course: report of case and review of literature[J]. *Diagn Pathol*, 2012,7:133.
- [7] Kim H J, Kim S H, Oh S H. CD56-negative extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type, with extranasal cutaneous involvement[J]. *Ann Dermatol*, 2015,27(5):618–620.
- [8] Li S, Feng X, Li T, *et al.* Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: a report of 73 cases at MD Anderson Cancer Center[J]. *Am J Surg Pathol*, 2013,37(1):14–23.
- [9] Huang Y H, Wu Q L, Zong Y S. Nasopharyngeal extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: retrospective study of 18 consecutive cases in Guangzhou, China[J]. *Int J Surg Pathol*, 2011,19(1): 51–61.
- [10] Tian C, Wang Y, Zhu L, *et al.* Primary bone natural killer/T cell lymphoma, nasal type without EBV infection: a case report[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015,8(11):14836–14839.
- [11] 陈定宝,王颖,宋秋静,沈丹华. 结外鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤 28 例临床病理分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015,31(4):404–408.
- [12] Wang H, Li H, Xing X, *et al.* Genotypic analysis and latent membrane protein 1 expression of Epstein-Barr virus in extranodal NK/T-cell lymphoma from Northern Chinese patients[J]. *Arch Viro*, 2015,160(8):2071–2074.
- [13] 李兰娟,任红. 传染病学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:22–33.
- [14] Dalia S, Chavez J, Castillo J J, *et al.* Hepatitis B infection increases the risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies[J]. *Leuk Res*, 2013,37(9):1107–1115.
- [15] 中华医学会血液学分会,中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会,中华医学会肝病学会. 中国淋巴瘤合并 HBV 感染患者管理专家共识[J]. *中华血液学杂志*, 2013,34(11):988–993.

· 国外期刊文摘 ·

15 例起源于外周神经的滑膜肉瘤

Chrisinger J S A, Salem U I, Kindblom L G, *et al.* Synovial sarcoma of peripheral nerves: analysis of 15 cases. *Am J Surg Pathol*, 2017,41(8):1087–1096.

起源于外周神经的滑膜肉瘤(SSPN)极其罕见,英文文献仅报道 26 例。SSPN 通常被临床和病理医师误诊为良性或恶性的外周神经鞘膜瘤(PNST)。从 3 个医疗机构获得 15 例 SSPN 的病理资料。所有肿瘤在影像和(或)术中所见都表现为起源于神经,并通过组织学确诊此诊断。11 例女性和 4 例男性患者神经症状突出,发病年龄 19~62 岁(中位年龄 39 岁),肿瘤累及尺神经 5 例,正中神经 3 例,腓神经 3 例,坐骨神经 2 例,L4 或 T1 神经根 2 例。肿瘤大小 2~13 cm(中位大小 3.8 cm)。9 例最初临床诊断为 PNST,14 例接受外科手术切除,其中 8 例术后辅以放疗,6 例术后辅以化

疗。14 例是单相型 SS,1 例是双相型 SS;4 例局灶低分化(1 例具有横纹肌样形态)。12 例通过荧光原位杂交、逆转录聚合酶链反应或者应用两种方法证实了 SSPN 的诊断。14 例患者获得随访(中位随访时间 32 个月),结果显示 4 例伴低分化的肿瘤中,2 例死于肺转移,1 例局部复发 2 次,继续随访无病存活,第 4 例无病存活。与此相反,10 例没有低分化肿瘤的患者中 9 例存活,其中 7 例无病存活,1 例 12 个月时死于肺浸润。由于 SSPN 与良性和恶性 PNST 相似,因此很容易被临床和病理误诊。需要运用分子分析证实 SSPN 的诊断。局灶呈低分化,包括横纹肌样区域,此与非神经源性肿瘤相似,可能提示预后较差。

(赵芳¹摘译,魏建国²审校/¹浙江省绍兴市中心医院妇产科,绍兴 312030;²浙江省绍兴市人民医院病理科,绍兴 312000)

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.025.html>

免疫组化染色在幽门螺旋杆菌病理检测中的优势与意义



刘洪波¹, 祁晓莉¹, 张 勇², 李 悦¹

关键词: 幽门螺旋杆菌; 活检; 免疫组织化学

中图分类号: R 446.6 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0341-02

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.025

幽门螺旋杆菌(*helicobacter pylori*, HP)是消化道疾病的重要致病因子,尤其是慢性胃炎和消化性溃疡,还与十二指肠溃疡、萎缩性胃炎、胃腺癌及胃黏膜相关性淋巴瘤的发病相关^[1-3]。1994年世界卫生组织国际癌症中心(IARC)将HP列入第一类致癌因子。近年来,大量的研究表明HP感染与胃癌相关^[4-5]。因此,临床上对HP进行准确检测显得尤为重要。本实验通过对比HE染色、美蓝染色、银染(Wartha-Starry, WS)、免疫组织化学(immunohistochemical, IHC)染色在检测病理标本中HP的灵敏度、特异度和准确度,为HP临床检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 随机选取北京市大兴区人民医院2016年1~6月诊断为HP阳性和阴性的胃黏膜活检标本各100例。HP阳性和阴性判定标准为快速尿素酶试验和C13、C14呼吸试验均为阳性或阴性结果。

1.2 方法 (1)HE染色:对待测蜡块进行连续4~5 μm厚切片,进行常规HE染色。(2)美蓝染色:美蓝染色液配制:硼酸1 g、亚甲蓝1 g溶于100 mL蒸馏水,染色5~10 min,水洗,风干后中性树胶封固。检测结果解释:胃幽门螺杆菌呈蓝色,背景为蓝色。(3)WS染色:染液配制,酸性水溶液(取蒸馏水100 mL,逐滴加入1%枸橼酸调pH 4.0),1%硝酸银(1 g硝酸银加酸性水100 mL),2%硝酸银(2 g硝酸银加酸性水100 mL),5%明胶水溶液(明胶5 g加酸性水100 mL),0.15%对苯二酚水溶液(对苯二酚0.15 g加酸性水100 mL)。步骤:组织切片经脱蜡、水化、蒸馏水洗3次,1%硝酸银水溶液43℃浸泡孵育2~4 h,2%硝酸银、0.15%对苯二酚、5%明胶按1:2:4的比例混匀,滴加在切片上2~8 s(切片呈黄色至浅褐色),蒸馏水洗2次,乙醇脱水、透明液透明、中性树胶封固。检测结果解释:胃幽门螺杆菌呈棕黑

色,背景为棕黄色。(4)IHC:组织切片经脱蜡、水化后,将切片置于柠檬酸抗原修复液中高压2 min,自然冷却,PBS冲洗;滴加50 μL即用型HP鼠抗人单克隆抗体(MX014,福州迈新公司),室温孵育1 h,PBS冲洗3 min×3;滴加50 μL即用型MaxVision 3二抗检测系统(福州迈新公司),室温孵育30 min,PBS冲洗3 min×3;滴加50 μL DAB显色液(福州迈新公司),室温孵育5 min,PBS冲洗3 min×3;苏木精复染、PBS返蓝、梯度乙醇脱水、透明液透明、中性树胶封固。

1.3 统计学方法 数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 20.0软件进行统计学处理。多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

HE染色需观察HP形态来判定,菌体和背景均呈蓝紫色,肉眼难以区分,需在高倍镜下仔细观察,检测出来的菌体数较少,检测结果为(+);美蓝染色HP和背景均呈蓝色,肉眼难以区分,需在高倍镜下仔细观察,检测出来的菌体数较少,检测结果为(+);WS染色HP呈棕黑色,背景呈棕褐色,需在高倍镜下仔细观察,检测出来的菌体数相对较多,检测结果为(++);IHC染色HP呈棕褐色,背景呈蓝色,菌体和背景颜色对比鲜明,阳性极易观察,且检测出来的菌体数最多,检测结果为(++)(图1)。4种染色方法检测HP的灵敏度、特异度和准确度差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

3 讨论

HP生存于人体胃幽门部位,是目前所知能够在人胃中生存的唯一微生物。HP寄生在胃黏膜组织中,67%~80%的胃溃疡和95%的十二指肠溃疡是由HP引起的^[6-7]。目前HP检测已是慢性胃、十二指肠消化道疾病必备检测项目。检测HP的方法有很多,主要有血清学检测、C13和C14呼吸试验、胃镜及胃黏膜活检、唾液测试板检测等,其中胃黏膜活检方法主要有革兰氏染色、HE染色、姬姆萨(Giemsa)染色、美蓝染色、WS染色、IHC染色。随着内窥镜的广泛应用,HP组织学检测已成为常规检测项目,因此,采用一种敏感度、特异度、准确度高的检测方法尤为重要。

本文采用HE、美蓝、WS、IHC染色4种方法检测了HP阳性和阴性病例各100例,结果显示,4种方法的敏感度分别为94%、93%、97%、100%;特异度分别为100%、100%、99%、100%;准确度分别为97%、96.53%、98%、100%。

接受日期:2017-11-06

作者单位:¹北京市大兴区人民医院病理科,北京 102600

²首都医科大学附属北京同仁医院病理科,北京 100730

作者简介:刘洪波,男,主管技师。E-mail:13601290083@139.com

表1 4种检测HP染色方法的灵敏度、特异度和准确度对比

HP	n	HE 染色		美蓝染色		WS 染色		IHC 染色	
		HP(+)	HP(-)	HP(+)	HP(-)	HP(+)	HP(-)	HP(+)	HP(-)
+	100	94	6	93	7	97	3	100	0
-	100	0	100	0	100	1	99	0	100
敏感度(%)		94		93		97		100	
特异度(%)		100		100		99		100	
准确度(%)		97		96.5		98		100	

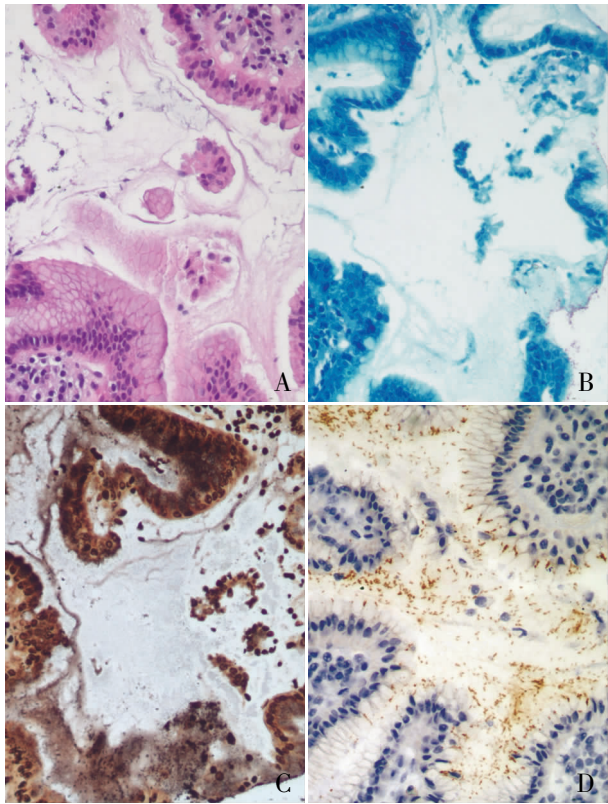


图1 胃黏膜组织HP染色方法对比:A:胃黏膜HE染色(+);B:胃黏膜美蓝染色(+);C:胃黏膜WS染色(++);D:胃黏膜IHC染色(++),MaxVision3法

其中,HE染色步骤简单、操作时间短、成本低廉,但出现6例假阴性,这6例感染的HP数量极少,不易观察。美蓝染色步骤简单、无需分化液分化、染色时间短、试剂价格低廉、不受温度影响、可长期使用,但出现7例假阴性,这7例感染的HP数量极少,不易观察,其中6例与HE染色假阴性的6例相同。WS很长一段时间被认为是诊断HP的“金标准”,WS银染颗粒附着在菌体上,与组织容易区分、敏感度也较高,但经常出现银染颗粒太多,与菌体混在一起,不易观察^[8]。可能出现假阳性,本实验检测100例HP阴性病例中,有1例假阳性。而且WS较为耗时,试剂较贵、操作麻烦、需现配现用、对染色技术要求较高。IHC染色与上述3种方法相比,最大的缺点是试剂昂贵、染色时间长,但最大的优点是敏感度、特异度和准确度最高,均为100%,阳性极易判断,拍照效

果好。

在4种方法均检测出阳性的病例当中,随机抽取某阳性病例,从诊断结果上看,4种检测方法均阳性,但HE染色显示阳性结果为(+),美蓝染色为(+),WS染色为(++),IHC染色为(++),其中,IHC染色检出的细菌数量最多,且菌体与组织色差明显,极易观察。其它方法虽然均能检测到菌体,但检测出的菌体量偏少,且菌体与组织颜色基本一样,需通过观察菌体形态来区分,不易观察。本院病理科每年近2000例HP检测标本,虽然4种方法的敏感度、特异度、准确度差异均无统计学意义,但漏诊或误诊无论对患者的健康还是病理科声誉都是极大的危害。

综合上述4种染色方法利弊,IHC染色敏感度、特异度、准确度最高,阳性极易判断,对医师阅片水平要求降低,易在基层医院病理科推广。

参考文献:

[1] Hwang J J, Lee D H, Lee A R, *et al.* Characteristics of gastric cancer in peptic ulcer patients with *Helicobacter pylori* infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2015,21(16):4954-4960.

[2] Yu X H, Zhang Q, Yang X P, *et al.* Expression of macrophage migration-inhibitory factor in duodenal ulcer and its relation to *Helicobacter pylori* infection [J]. *Genet Mol Res*, 2015,14(4):13860-13867.

[3] Schaberg K B, Evans M F, Wilcox R, *et al.* Antisecretory medication is associated with decreased *Helicobacter pylori* detection in gastric marginal zone lymphoma [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2015,19(6):397-402.

[4] Correa P, Piazuelo M B. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma [J]. *US Gastroenterol Hepatol Rev*, 2011,7(1):59-64.

[5] Herrera V, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009,15(11):971-976.

[6] Khan K J. *Helicobacter pylori* and gastric or duodenal ulcer [J]. *Prescrire Int*, 2016,25(167):18-23.

[7] 贺 华,郑美蓉,王鑫平,等. HP感染、miR-191表达与胃癌的相关性[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016,32(4):455-457.

[8] 俞训彬,唐秀如,陈小岩. 胃幽门螺旋杆菌感染检测的4种特殊染色方法比较[J]. *福建医药杂志*, 2011,33(4):97-98.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.026.html>

改良 PAS 染色法在冷冻切片中的应用

杨伟平, 吴文乔, 邹宗楷, 洪少君, 黄春妹, 苏海燕



关键词:改良 PAS; 冷冻切片; 石蜡切片; 肺真菌感染, 病理技术; 病理诊断

中图分类号:R 361⁺2 **文献标志码:**B

文章编号:1001-7399(2018)03-0343-02

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.026

在日常病理诊断和技术工作中,我们经常会遇到临床怀疑为肺部真菌感染的病例。如果等常规石蜡组织切片来进行诊断,因组织处理时间长,临床等候结果需要花费很多时间。为缩短临床等候病理诊断的时间,本科室在组织冷冻切片上行改良 PAS 染色,并与石蜡切片 PAS 染色对比,提高了对真菌的快速检出率,现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集福建医科大学附属漳州市医院 2016 年度接收的术中怀疑真菌感染病例 41 例,术后常规石蜡病理明确真菌感染 29 例,未见真菌感染病例 12 例。

1.2 主要试剂 (1)1% 高碘酸配置:高碘酸 1 g,蒸馏水 100 mL,溶解后保存于 4 ℃ 冰箱中备用。(2)Schiff 液配置:碱性品红 1 g、蒸馏水 200 mL,浓盐酸 2 mL,偏重亚硫酸钠 3 g,木炭粉 3 g。先将 200 mL 蒸馏水煮沸,稍有火焰,加入 1 g 碱性品红再煮沸 1 min,熄火待冷却至 50 ℃ 时加入 2 mL 浓盐酸,待冷却至 35 ℃ 时加入 3 g 偏重亚硫酸钠。待室温时加入 3 g 木炭粉至变成无色液体。用棕色瓶子装好,放于 4 ℃ 冰箱内备用。

1.3 主要设备 LEICA CM1950 冷冻切片机、YT-6C 生物组织摊烤片机。

1.4 改良 PAS 染色 标本冷冻防脱切片厚 5~6 μm,切后立即放入 95% 乙醇固定 30 s 水洗 1 遍;在切片上滴加 1% 高碘酸置于 50 ℃ 摊烤片机中 3 min(传统方法室温染色 10~20 min),蒸馏水洗 1 遍;滴加 1 mL Schiff 液置于 50 ℃ 摊烤片机内暗处加盖 5 min(传统方法室温染色 10 min);流水冲洗 2~3 min(2 min 后需镜下观察着色深度,必要时可稍增加时间);苏木精染色 10 s;无水乙醇脱水;二甲苯透明后中性树脂封固。

1.6 统计学分析 数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,配对 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

改良 PAS 染色中可见真菌细胞壁染成深红色,组织细胞质呈浅红色,细胞核呈蓝色,真菌结构显示清晰,且总制片时间短 10~11 min,再结合 HE 染色形态可较好的区别毛霉菌(图 1)、曲霉菌(图 2)、隐球菌(图 3)等。

对 41 例可疑真菌感染的肺冷冻组织切片 PAS 染色与常规石蜡切片 PAS 染色对真菌诊断率通过统计学分析,冷冻切片 PAS 染色相比石蜡切片 PAS 染色对真菌检出率差异无统计学意义($P = 1.000$,表 1)。

表 1 41 例肺组织石蜡切片 PAS 染色与冷冻切片

PAS 染色对真菌诊断符合率对比表

石蜡切片 PAS 染色	冷冻切片 PAS 染色		敏感度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)	P 值
	+	-				
+	26	3	89.7	83.3	87.8	1.000
-	2	10				

3 讨论

深部真菌感染具有病情进展快、预后差、病死率高等特点,单纯依靠血清学及病原体培养检查真菌感染可能缺乏可靠依据。目前,真菌染色的方法包括革兰氏染色等,但均不如 PAS 对真菌的特异性强^[1],PAS 染色显色的原理是由于真菌细胞壁中含有明角质及纤维素,两者均富含多糖类,PAS 染色中高碘酸将组织糖类中的醇基(CHOH-CHOH)氧化成 2 个游离的醛基(-CHO),醛基在与 Schiff 试剂反应生成紫红色产物而显色,染色结果清楚。通常用石蜡切片 PAS 染色检出真菌是最为常见的染色方法之一,然而制片前常需进行组织的固定、脱水、脱蜡、切片等前期处理,为此,我们设想是否存在无需对组织进行繁琐的前期处理,又可在一定程度上接近常规石蜡切片 PAS 染色法对真菌检出的阳性率,基于此,我们对 PAS 染色进行适当改良,联合组织冷冻切片方法行 PAS 染色与石蜡切片 PAS 染色对比以提高对真菌的快速检出率。

本组实验通过石蜡切片 PAS 与冷冻切片 PAS 染色两种方法进行比较分析,发现冷冻切片 PAS 染色不仅具有石蜡切片 PAS 染色的优势,如真菌包膜染色对比度鲜艳,胞质分明等,相比传统石蜡切片 PAS 染色法,制片前需要对标本进行组织固定、脱水、脱蜡等前期处理,耗时较长,而冷冻

接受日期:2017-11-09

作者单位:福建医科大学附属漳州市医院病理科 363000

作者简介:杨伟平,男,技师。E-mail: yang6657188@163.com

苏海燕,女,硕士,副主任医师,通讯作者。E-mail: su-jin000064@163.com

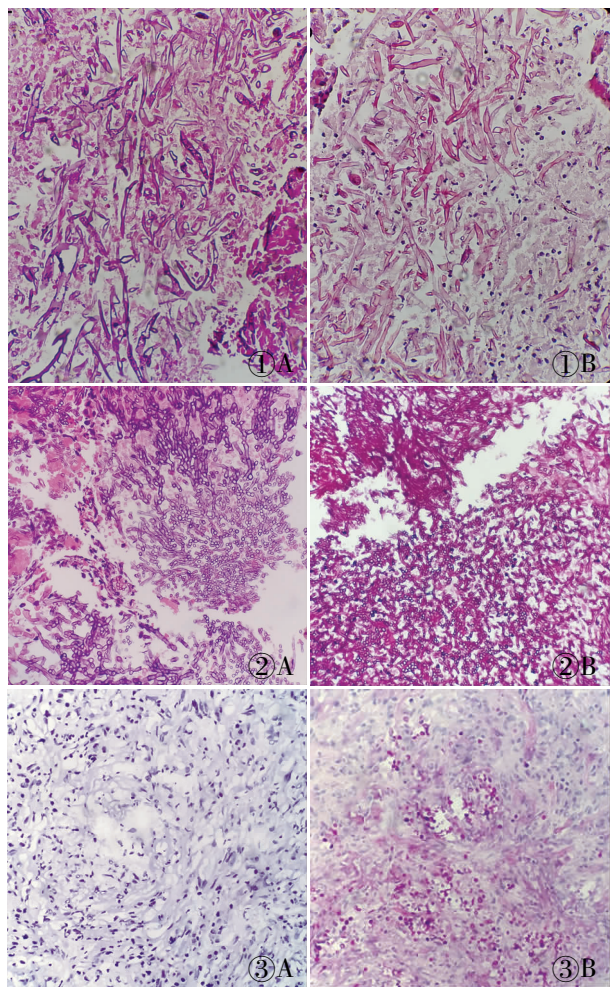


图1 毛霉菌感染:A.肺冷冻切片 HE 染色;B.肺冷冻切片 PAS 染色

镜下见菌丝被染成紫红色,菌丝呈宽而不分支,部分菌丝分支呈直角

图2 曲霉菌感染:A.肺冷冻切片 HE 染色;B.肺冷冻切片 PAS 染色镜下见菌丝被染成紫红色,镜下见菌丝呈杆状,分支呈锐角,菌丝宽度中等

图3 隐球菌感染:A.肺冷冻切片 HE 染色;B.肺冷冻切片 PAS 染色镜下见真菌细胞壁染成紫红色并结合其形态学

切片 PAS 染色法避免了组织较繁琐的前期处理,从而提高了 PAS 的染色时效性,并取得较为稳定的染色结果,因此冷冻切片 PAS 染色具有速度快、节约时间等优势,必要时可作

为快速诊断方法运用于术中冷冻切中作为特殊类型感染的鉴别。

糖原是由葡萄糖和带分支的大分子的多糖组成,易溶于水,组织冷冻切片固定液时需选择可对糖原保存作用的固定液,如 Gendre 液、Carnoy 液、乙醇等,本组实验冷冻切片法于 95% 乙醇固定,避免了糖原流动到细胞一侧的极化现象^[3],取得较为满意的染色效果。

高碘酸的氧化在整个染色中起着至关重要的步骤,高碘酸浓度与反应环境的温度会影响高碘酸的作用时间^[2],笔者通过改变高碘酸浓度由传统的 0.5% 提升至 1%,同时适当改变染色环境的温度,将染色置于 50 ℃ 的摊烤片机中进行,由于高温下可使高碘酸与某些物质成分发生非特异反应,使染色结果可能出现假阳性,为此笔者通过多次改变高碘酸作用时间,探索后得出染色时间从原本的 10 min 减少至 3 min 时非特异性反应最少,染色效果最稳定。

Schiff 液与醛基接触越充分染色效果越佳,染色时间和反应效率是染色质量的直接保证^[4],而染色环境的温度可影响染液的 Schiff 作用时间,置于 50 ℃ 摊烤片机内暗处加盖 5 min Schiff 液作用时需加盖,保证充足反应,提高反应效率,减少作用时间。

作者通过冷冻切片进行抗酸 PAS 染色,包膜染色对比度鲜艳,胞质分明,相比传统石蜡切片 PAS 染色法,制片前需要对标本进行组织固定、脱水、脱蜡切片等前期处理,耗时较长,而冷冻切片 PAS 染色法避免了组织较繁琐的前期处理,从而提高了 PAS 的染色时效性,是一个较好的方法。

参考文献:

- [1] 曾秋林,陈灵敏,闵志刚. PAS 染色在显示真菌中的应用和体会[J]. 医学检验与临床, 2010,7(21):24-25.
- [2] 龚志锦,詹容洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:361.
- [3] 祁珊珊. 过碘酸-Schiff(PAS)染色方法的改进及其在病理诊断中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016,7(32):825-826.
- [4] 王伯云,李云松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:998.

· 简 讯 ·

敬告作者

本刊编辑部收到作者的投稿后,经初审符合本刊征稿内容者编辑部将及时回复作者稿件编号;对通过专家审核的稿件,在进行文字和撰写规范编辑加工后,发送“退修意见单”给第一作者;如作者的修回稿件符合退修要求,则进入待用状态。编辑部将根据各期中心内容遴选稿件,并在排版后用 E-mail 发送校对样稿和缴纳版面费通知。编辑部咨询电话:0551-65161102,投稿邮箱:lcsybl@163.com。

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.027.html>

病理大蜡块及大切片的制作



于洁,季昌华,管冰心,杨京彦,杨洋,王海涛,乌肖林,张璐璐,周成军

关键词:大蜡块;大切片;病理诊断**中图分类号:**R 364 **文献标志码:**B**文章编号:**1001-7399(2018)03-0345-02**doi:**10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.027

病理大型切片能够最大程度保留标本组织结构的完整性,可以在一张切片上无拼接的显示肿瘤整体结构及肿瘤分布情况、范围及与周围正常组织的关系,更方便测量肿瘤大小,避免常规多张小切片拼接时产生的误差,更好的保留组织完整的形态结构,有助于精确病理诊断。选取2016年1~8月间的前列腺腺泡腺癌根治标本、子宫内膜癌根治标本、消化道黏膜下剥离(ESD)标本等观察大切片在诊断中的作用和优势,总结大切片制作及相关取材和蜡块制作等的体会。

1 材料与方法

1.1 材料 滑动式切片机(REM-710,大和公司),标本类型(前列腺癌根治标本、眼球肿瘤标本、子宫内膜癌根治标本、肝癌标本、消化道黏膜下剥离(ESD)标本,标本固定液(10%中性缓冲福尔马林,百博公司),组织颜色标剂(生物色标剂,七色,50 mL×7,北京中杉金桥公司),薄海绵(0.3 cm厚),2种规格脱水盒(6.5 cm×5.0 cm×1.0 cm和5.5 cm×2.5 cm×0.8 cm),“L钩型”不锈钢包埋模具,不锈钢板底托,载玻片(7.5 cm×5.0 cm),盖玻片(5.6 cm×4.8 cm)。

1.2 方法

1.2.1 标本固定 手术标本离体30 min内及时固定,固定前病理医师需将标本进行剖开,胃肠等空腔器官标本需充分展平,用不锈钢细针将标本完整固定于泡沫板上,组织面向下完全浸泡于固定液中,实质性组织如肺、肝、肾、乳腺等标本每隔1.0 cm作一个剖开面然后固定,以保证固定液充分的渗入,固定12~48 h。

1.2.2 取材装盒与脱水 6.5 cm×5.0 cm×0.3 cm规格:适用于制作组织完整的切面,如前列腺要求整体完整切面取

材,子宫内膜癌要求肿瘤浸润最深处完整肌层带外膜全层取材,取材厚度均要求0.3~0.5 cm,切面平整,取材医师在组织块上进行切缘颜色标记,最后装入此规格脱水盒通过大组织块脱水程序进行脱水处理(图1A)。5.5 cm×2.5 cm×0.3 cm规格:适用于制作观察局部全层结构,如ESD标本,在病变部位距病灶旁侧1 mm垂直切割,按2~3 mm的距离向两侧平行切割^[1],组织较薄的需在脱水盒底部放置裁剪与脱水盒大小相一致的薄层海绵(0.3 cm厚),组织上方同样加盖相同大小的薄层海绵进行固定,减少脱水过程中对组织块收缩扭曲的影响,确保组织经脱水处理后维持原有取材形态及位置不变,每个脱水盒内放置组织块数一般不超过4条(图1B)。大组织块的专用脱水程序,总时间18 h,脱水处理良好,切片完整(表1)。

表1 大组织块脱水程序

试剂	时间 (min)	温度 (℃)	压力/ 负压	搅拌器
10%中性福尔马林	90	37	常压	中速
70%乙醇	60	37	常压	中速
75%乙醇	60	37	常压	中速
80%乙醇	60	37	常压	中速
90%乙醇	60	37	常压	中速
90%乙醇	60	37	常压	中速
95%乙醇	60	37	常压	中速
95%乙醇	90	37	常压	中速
无水乙醇	60	37	常压	中速
无水乙醇	90	37	常压	中速
二甲苯Ⅰ	30	37	常压	中速
二甲苯Ⅱ	60	37	常压	中速
二甲苯Ⅲ	90	37	常压	中速
石蜡Ⅰ	30	65	循环	中速
石蜡Ⅱ	90	65	循环	中速
石蜡Ⅲ	90	65	循环	中速

1.2.3 包埋 规格为6.5 cm×5.0 cm×0.3 cm包埋方法:采用L钩型模具,根据组织大小调节L钩放置于不锈钢底板上形成蜡槽,先向蜡槽内注入1/2石蜡,夹取组织放入蜡槽内,用底部平整的金属器具(如100 g天秤砝码)轻压组织,确保组织全部处在同一水平面上,再次注满石蜡,待冷却后分离蜡块和L钩模具。规格为5.5 cm×2.5 cm×0.3 cm包埋方法:以消化道ESD标本为例:包埋模具注入石蜡,左手持模具一侧微倾先接触冷台面,待包埋盒底部一侧凝固,右手持镊子同时翻转组织90°快速放入包埋盒内(黏膜与肌层

接受日期:2018-01-25

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2015HM036)

作者单位:山东大学第二医院病理科,济南 250033

作者简介:于洁,女,技师。Tel: (0531) 85875340, E-mail: yujie_369@126.com

周成军,男,博士,副主任医师,通讯作者。Tel: (0531) 85875340, E-mail: chengjunzhou@126.com



图1 A. 前列腺癌根治标本取材装盒;B. 消化道黏膜下剥离(ESD)标本取材装盒 图2 A. 前列腺癌根治标本大切片; B. 消化道黏膜下剥离(ESD)标本大切片;C. 眼球标本大切片;

D. 肝癌标本大切片;E. 子宫内膜癌标本矢状面大切片,红色标记肿瘤范围;▲示子宫颈,■示宫体,●示宫底

垂直于包埋盒底部),调整包埋盒角度,按照组织相同的翻转方向将脱水盒内组织依次放入包埋盒,使包埋盒内组织放入与石蜡凝固时间保持同步,确保全部组织处在同一水平面上,待冷却后将蜡块分离包埋盒。

1.2.4 切片 使用滑动式切片机,特点是切片范围大,完整性好,可装2个刀片,切片之前蜡块先在冷冻台上(或冰盒里)冷冻片刻,更利于修片、切片,右手握推拉手柄,左手持扁木片,同时木片沾少许水(接触组织就会贴附在一起),切片从右上角向左下角方向切片,轻挑组织片先放置于凉水展片盒里初步展片(由于组织较大,直接放入热水,皱折不易被展开),选取规格大小合适的载玻片,捞片并再次放入40~50℃热水展片仪,待组织完全展开皱折消失将其捞片,晾干干燥后置于烤片,常规HE染色。

2 结果

大组织块使用专用脱水程序脱水处理良好,切片完整。大切片较常规切片完整保留了组织器官大切面全貌,前列腺横断面大切片可以直观的显示肿瘤大小、位置、边界、形状,便于观察肿瘤与尿道、精阜、精囊、输精管等结构的关系(图2A),避免小切片拼接造成的损伤和误差,如常规小切片以尿道为中心将前列腺断面分成若干块,除了拼接困难外,还会造成尿道切面破损,不易观察肿瘤对尿道的侵犯及与尿道的关系;消化道ESD大切片显示黏膜层次清晰完整,能够观察全层结构及切缘侵犯关系(图2B);眼球肿瘤大切片可以直观的显示肿瘤大小、位置与晶状体、视神经等组织结构的关系(图2C);肝脏肿瘤大切片可以直观的显示肿瘤大小、界限、切缘及肝被膜、周围组织侵犯情况(图2D);子宫内膜癌矢状面大切片可以直观的显示肿瘤位置、浸润深度、对子宫颈管的侵犯关系(图2E)。

3 讨论

滑动式切片机特点刀口长,切片范围大,适合制作完整的大切片。文献报道^[2-3]以往大组织块脱水处理耗时较长(30~40 h),针对上述问题,通过实践摸索总结出适用于大组织块的专用脱水程序,总时间18 h,脱水处理良好,切片完整,在保证脱水质量的同时节省脱水时间,提高工作效率,此程序要求标本及时剖开固定,取材厚0.3~0.5 cm,组织脱水的环境温度以37~45℃为宜,脱水机脱水缸底部配置磁力搅拌器,以保证试剂循环流动温度均匀,组织渗透良好,达到最佳脱水状态。

病理大型切片能够最大程度的保留标本的完整性,为病理医师诊断提供完整全貌的组织结构清晰的病理切片,本实验通过大蜡块和大切片的制作,观察大切片在诊断中的作用和优势,大切片较常规切片,视野清晰,观察范围大,完整性好,可以在一张切片上无拼接的显示肿瘤整体结构及与组织器官的关系,诊断医师能更全面观察组织结构、肿瘤面积、累及范围及边界情况等,避免常规多张小切片拼接时产生的误差,更好的保留组织完整的形态结构,有助于精确病理诊断。

参考文献:

- [1] 杨京彦,管冰心,王海涛,等.胃ESD标本的病理取材及切片制作方法[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(8):939-941.
- [2] 张蕾蕾,吕心瑞,史鸿云,等.食管癌48例病理大切片的病理学特征[J].临床与实验病理学杂志,2013,29(3):343-344.
- [3] 王德田,董建强.实用现代病理学技术[M].北京:中国协和医科大学出版社,2012:19-61.

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.028.html>

诊刮组织过少的原因分析及病理取材方法改进



钱红, 赵娟霞, 曹桂明

关键词: 诊刮; 病理取材; 方法改进

中图分类号: R 332 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0347-02

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.028

诊断性刮宫术(诊刮术)是妇产科医师对女性子宫内膜及宫颈管疾病最常用的诊断和诊疗方法, 诊刮的内膜组织也是病理科常见的活检标本。然而, 在日常取材过程中, 有时会遇到送至病理科的诊刮标本中组织过少(肉眼难以见到有形的组织, 无法取材; 或将标本瓶的物质全部过滤, 但经脱水后找不到可供包埋的组织), 导致病理诊断难以完成, 因此常引起临床与病理科及医患之间的矛盾。为更好地服务于临床和患者, 本科室分析了发生这种现象的原因, 并对此类标本的取材方法进行探索, 取得较好效果, 查询文献未见同类报道, 现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集2016年1月~11月南华大学附属南华医院妇科送检的诊刮标本及临床资料。使用仪器和耗材包括: 大容量离心机、50 mL离心管、裁剪好的纱布块、镊子、脱水盒、病理号标签纸等。

1.2 方法 诊刮标本瓶中无可钳取的有形组织, 只见絮状、云雾状或粉末样物质漂浮或沉淀在固定液中。标本处理: (1) 将所有含组织的固定液转至大容量离心管内, 一般选取50 mL离心管; (2) 根据离心管内溶液体积, 用等体积的自来水做对侧离心管的配平; (3) 使用3 500 r/min离心5 min。处理后标本的取材: (1) 离心后的标本其固定液与刮取物呈分层状态, 倒掉上清液, 留取沉渣; (2) 若沉渣较少, 将裁剪好的纱布按照对边进行2次对折, 用镊子夹紧纱布的对折角上0.5 cm处, 伸入离心管底部, 轻柔的将沉渣物质擦拭在纱布上, 将擦拭后的纱布打开, 按照对角方向反方向对折1次, 放入脱水盒内; (3) 若沉渣较多, 则用镊子挑出或吸管自制软匙舀出, 纱布包裹, 放入脱水盒内; (4) 放入病理号标签纸, 盖上盖子, 常规固定; (5) 后续步骤按照日常组织标本处理

流程进行。

1.3 统计学 所有数据使用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 方法采用Friedman χ^2 检验。

2 结果

共收集送检诊刮标本及临床资料387例, 其中23例刮出组织过少, 标本瓶中无可钳取的有形组织。按病因分类, 送检组织过少的诊刮主要见于宫腔粘连、绝经后阴道出血、原发性不孕、月经不调、子宫内膜增厚。其中宫腔粘连者诊刮标本过少的百分比最高, 达60%, 其次为绝经后阴道出血者, 占37.5%。各组间百分比结果差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。所有23例诊刮标本过少的病例中, 绝经后出血者12例, 占比52%。

所有诊刮组织过少的标本(图1), 经离心处理后, 离心管内可见沉底或附壁的小凝块(图2), 方便取材; 经常规脱水、石蜡包埋、切片, 镜下组织或细胞集中、无退变或收缩现象, 染色亦清晰, 对比度好(图3), 可明确判断子宫内膜周期状态及细胞形态, 能够完成病理诊断。

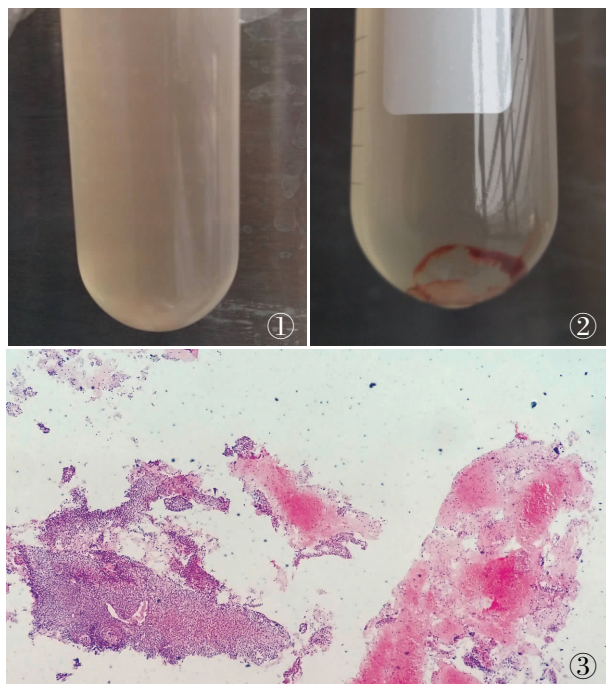


图1 处理前标本, 肉眼难以见到有形的组织, 无法取材

图2

离心处理后, 管底可见组织凝块, 方便取材

图3 镜下组织或细胞集中、无退变或收缩现象, 染色亦清晰, 对比度好

接受日期: 2017-12-30

作者单位: 南华大学附属南华医院病理科, 衡阳 421002

作者简介: 钱红, 女, 硕士, 主治医师。E-mail: hyriaqh@qq.com

曹桂明, 男, 主任医师, 教授, 通讯作者。E-mail: blk415@163.com

表1 387例妇科诊刮标本原因及比例分布

诊刮原因	n	诊刮物 过少	百分比 (%)	Friedman 检验	
				χ^2 值	P 值
不规则阴道流血查因	211	4	1.9	18.750	0.005
宫腔占位	75	0	0		
先兆流产或停经查因等	45	0	0		
妊娠相关诊刮					
绝经后阴道出血	32	12	37.5		
子宫内膜增厚	11	2	18.2		
月经紊乱或原发不孕查因	8	2	25		
宫腔粘连	5	3	60		
合计	387	23	5.9		

3 讨论

诊刮术是妇产科医师获取宫腔或子宫颈管内组织以明确其功能状态或相关疾病的重要方法,而一定量的刮取组织是作出病理诊断的基础。本组23例送检组织过少的诊刮病例,其诊刮病因分别为不规则阴道流血、绝经后阴道出血、子宫内膜增厚、月经紊乱、原发性不孕及宫腔粘连,其中宫腔粘连者出现诊刮组织过少的几率最高,达60%;其次是绝经后出血患者,占37.5%。宫腔粘连多半是由于宫腔创伤性手术或宫内感染之后引起的并发症^[1],其子宫内膜多被纤维组织取代,而绝经后的子宫内膜亦呈萎缩状态^[2],因此,诊刮时获取组织较困难,有些送至病理科的标本往往见不到可钳取的有形组织。所以遇见此类标本,病理科医师应认真细致地处理好这类标本。我科以往都是将标本瓶中内容物全部用纱布过滤,这种方法不会丢掉有形组织,但有时有些极小的组织及细胞可能会通过纱布网眼丢失或黏附在纱布上无法钳取,或勉强钳取后往往带有棉纱纤维而影响切片,有时也因此导致医患纠纷或病理科与妇产科医师之间的矛盾。越来越多的病理工作者意识到,优质的病理切片是作出精准诊断的前提,并提出采用PDCA循环法改进病理切片质量^[3]。

本科室采用离心的方法,将所有组织过少的诊刮标本进行处理,离心管内的组织微粒及细胞由于离心作用而沉积在离心管底,形成沉淀物团块,取出沉淀物团块用纱布或擦镜纸包裹脱水、包埋、切片。结果所制作的切片组织或细胞集中,结构清晰,染色效果好,并且可进行连续切片,也可根据需要行免疫组化染色,与大块组织切片质量无差异,可以完成病理诊断,亦受到妇产科医师的赞许。此操作方法简单,关键是标本瓶内的微细组织或细胞均可能被收集用于病理诊断,避免了传统取材方法导致的无法制片现象,值得推广使用。需要注意的是:(1)取材过程中必须仔细核对患者姓名和标本,防止张冠李戴;(2)取材器械一定要清洗,防止标本的交叉污染;(3)遇到所有这类标本一定要及时与妇产科医师沟通,尽可能详细地了解临床情况及诊刮过程。本组2例子宫内膜增厚者,1例是低年资医师因经验不足而未刮出组织,另1例是助手在术后清洗器械时才想起未留取组织。因此及时有效的沟通,既可以相互了解对方的情况,纠正工作,也能避免误诊、漏诊或其他矛盾,形成临床与病理工作之间的共同进步。

总之,用离心方法处理送检组织过少、难于取材的诊刮标本,能够最大限度地留取标本中的组织和细胞,方便简捷;制作的切片细胞形态保持完好,组织结构清晰,甚至可连续切片、行免疫组化,是可推广的实用方法。

参考文献:

[1] 冯淑英, 杨冬梓. 人工流产后宫腔粘连问题[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012,28(9):657-659.
[2] Tariq M U, Idrees R, Raheem A, et al. Spectrum of Histopathological Findings in Postmenopausal Bleeding[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2015,25(11):794-797.
[3] 刘学影, 陈 森, 薛 娣, 等. PDCA 循环法持续提高病理切片优良率[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017,33(4):460-461.

• 国外期刊文摘 •

睾丸原发性囊性滋养细胞肿瘤 14 例临床分析

Gondim D D, Ulbright T M, Cheng L, et al. Primary cystic trophoblastic tumor of the testis: a study of 14 cases. Am J Surg Pathol, 2017,41(6):788-794.

睾丸生殖细胞肿瘤患者化疗后在腹膜后淋巴结内可发现囊性滋养细胞肿瘤(CTT)。CTT与畸胎瘤相似,在不含有其他成分时术后不需要进一步治疗。目前未见发生在睾丸部位CTT的报道。作者研究14例睾丸CTTs,均是混合性生殖细胞肿瘤。4例患者接受治疗,9例未接受治疗,1例未获得信息。患者年龄15~43岁(中位年龄25岁)。CTT占很少的成分(0~10%),14例均含有畸胎瘤成分,7例含有胚胎性癌,7例含有卵黄囊瘤,1例含有精原细胞瘤,1例含有绒

毛膜癌。随访过程中,有2例患者在随后切除的精索和盆腔肿块中也存在CTT和畸胎瘤。大体检查CTTs通常不明显,但在显微镜下可见囊实性结构,囊中通常含有纤维蛋白样物质,囊壁内衬单核样嗜酸至浅染的鳞状细胞,胞质通常空泡状,具有多形浓染的核,染色质粗糙,核分裂不明显。免疫组化标记hCG(6/6)、inhibin(6/6)和p63(2/6)局灶阳性。CTT的发病机制尚不完全清楚。不伴绒癌且未接受治疗的患者,其睾丸中可能存在CTT,推测睾丸CTT可能为绒毛膜癌的一种退化表现,或者是绒毛膜癌向畸胎瘤转化的一种后期形态学改变。

(赵 芳¹摘译,魏建国²审校/¹ 浙江省绍兴市中心医院妇产科,绍兴 312030;² 浙江省绍兴市人民医院病理科,绍兴 312000)

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.029.html>

· 病例报道 ·

H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤 1 例

刘 蕾¹, 陈 莉², 张立彦², 王丽华¹, 钟延丰¹

关键词: 弥漫中线胶质瘤; H3 K27M 突变; 临床病理; 病例报道

中图分类号: R 739.41 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0349-02

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.029

患者男性, 37 岁, 3 个月前无明显诱因自觉右侧面部麻木, 右侧舌头偶感麻木, 饮水有呛咳, 无刺痛感, 无头晕头痛。既往体健, 无家族病史。体检: 血压 160/100 mmHg, 浅感觉减退, 神清语利, 双瞳等大, 对光反射灵敏, 面纹对称, 伸舌居中, 颈软、无抵抗, 四肢肌力、肌张力正常, 病理征(-)。术前头颅核磁平扫及增强扫描(图 1): 脑干(桥脑至延髓颈髓水平)不规则肿大, 并向右侧桥小脑脚延伸, T1WI 呈低信号, T2WI 以及 T2-FLAIR 呈高信号, DWI 呈低等信号, 病变包绕基底动脉及左侧椎动脉, 增强扫描未见强化, 病变信号均匀, 周围脑实质未见水肿, 第四脑室及小脑蚓部受压改变; 大脑皮层下及双侧半卵圆中心可见多发点片状 T2WI 高信号, 部分病灶 FLAIR 呈高信号, 幕上脑室形态尚可, 脑沟、脑池未见明显增宽加深, 中线结构居中。脑干形态及信号异常, 考虑脑内肿瘤性病变, 以低级别胶质瘤伴包绕基底动脉可能性大; 脑内少量缺血灶。行颅内肿瘤活检术, 手术顺利, 术后生命体征平稳, 无明显特殊不适。考虑患者手术风险大, 有生命危险, 建议患者行放、化疗。术后 1 个月、6 个月分别入院行放、化疗。治疗后头部核磁增强扫描(图 2): 脑

干占位异常信号范围较前明显缩小; 脑内少量缺血灶; 第四脑室及小脑蚓部受压较前期明显改善。

病理检查 眼观: 不规则灰白色组织数块, 总体积 1.0 cm × 0.6 cm × 0.5 cm, 质软。组织全部取材。镜检: 送检少量穿刺脑组织, 肿瘤细胞弥漫浸润性生长, 轻度异型(图 3), 核圆形、可见少量分裂象, 背景多为神经纤维样结构, 神经髓鞘部分保留, 部分松解及脱失, 见少量吞噬细胞, 偶见残存神经元, 形态符合弥漫性星形细胞瘤。免疫表型: H3 K27M(+)(图 4), ATRX(缺失), Olig2、vimentin 和 S-100 均(+), GFAP(部分+), NeuN(神经元+), Syn(神经毡+), NF(神经纤维+), MBP(髓鞘+), PMP22(髓鞘+), CD68(少数+), CD34(血管+), p53、IDHR132H 和 EMA 均(-), Ki-67 增殖指数为 15%。

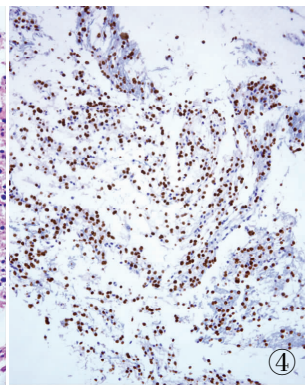
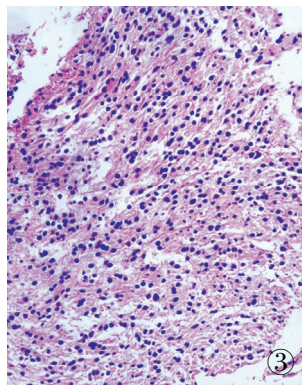


图 3 瘤细胞弥漫浸润性生长, 轻度异型 图 4 瘤细胞呈 H3 K27M 核阳性, EnVision 法

病理诊断: (脑干) 立体定向活检: 结合影像学及免疫组化标记 H3 K27M 呈阳性, 倾向于 H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤, WHO IV 级。建议必要时行 H3 基因测序以明确基因型。

讨论 WHO(2016) 中枢神经系统肿瘤分类在弥漫性星形细胞和少突胶质细胞肿瘤中新增 H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤^[1]。H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤是伴有组蛋白 H3 K27M 突变的浸润性生长的胶质瘤, 常位于中线结构(脑干、丘脑和脊髓), 少见第三脑室、下丘脑、松果体和小脑, 可伴有软脑膜播散及周围脑组织浸润, 类似大脑胶质瘤病症状。无明显性别差异, 主要发生儿童, 也可见于成人, 中位年龄 5~11 岁, 桥脑部位发生年龄较早, 平均约 7 岁, 丘脑部位发生年龄平均约 11 岁, 脊髓部位多发生于成人^[2]。临床病程较短(1~2 个月), 常见颅压增高、多颅神经病、长束征, 共济失调、运动减弱/偏瘫、步态失调^[3-4]。核磁检查通常 T1

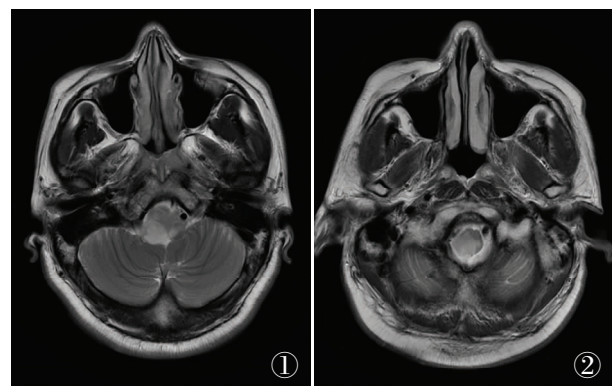


图 1 术前核磁增强扫描: 脑干不规则肿大, 增强扫描未见强化, 小脑蚓部受压改变 图 2 放化疗后核磁增强扫描: 脑干占位异常信号范围较前明显缩小, 小脑蚓部受压较前期明显改善

接受日期: 2017-11-13

作者单位: ¹ 北京大学国际医院病理科, 北京 102206

² 首都医科大学宣武医院病理科, 北京 100053

作者简介: 刘 蕾, 女, 主治医师。E-mail: leids_l@hotmail.com

低信号和 T2 高信号,对比增强后坏死或出血可显示,评测与周围血管、脑室及脑组织浸润的情况^[5]。本例肿瘤位于脑干,患者年龄较既往文献中位年龄偏大,肿瘤生长较缓慢、临床症状略轻,影像学检查对确定肿瘤位置及大体性状提供了初步诊断。

H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤组织形态较单一,瘤细胞体积较小,多呈星形细胞形态,也可见少突胶质细胞形态或大而多形细胞;核分裂象不是诊断的必需条件,小血管增生及坏死可见,也可缺乏核分裂象、小血管增生及坏死。本例活检标本异型性轻、可见少量核分裂象,但小血管增生及坏死均未见,考虑受临床取材限制、不排除在大体肿瘤内存在。已报道的肿瘤组织学改变可伴有巨细胞、上皮样细胞和横纹肌样细胞、原始神经外胚层肿瘤样区域、神经毡样结构、毛细胞黏液样特征、室管膜样区、肉瘤样变、神经节细胞分化以及多形性黄色星形细胞瘤样区域^[2]。组织学分级在判断预后方面意义有限^[6]。

H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤多具有组蛋白编码基因 H3F3A 或 HIST1H3B/C 突变外,约 50% 病例 TP53 突变、15% 病例 ATRX 突变^[1]。免疫组化表达 H3 K27M、Olig2、S-100,而 GFAP 表达不一。本例免疫组化标记 H3 K27M 阳性,另外 TP53 无义突变及 ATRX 表达缺失。虽然本例未行基因检测,但固定组织标本的 H3 K27M 的检测与基因型检测对诊断有一致性^[7]。

H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤的细胞起源尚不清楚,Nestin、Olig2 的表达提示可能来自脑干神经干细胞^[8]。虽然该肿瘤的组织学改变从低级到高级均可见,但生物学行为恶性(ICD-O:3),预后差^[9-10],WHO 分级为Ⅳ级,手术难以完整切除,即使常规放、化疗 2 年生存率仍小于 10%。本例患者放、化疗后随访半年一般情况尚可、生命体征平稳,有待继续随诊。

综上所述,H3 K27M 突变型弥漫中线胶质瘤的诊断需结合发生部位、病理形态及免疫表型特征,其中免疫组化标记 H3 K27M 是确诊及与其它类型胶质瘤鉴别诊断的重要依据。

(本例影像资料由北京大学国际医院放射科赵殿江老

师协助提供,特此致谢!)

参考文献:

- [1] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, *et al.* World Health Organization classification of tumours of the central nervous system[M]. Lyon: IARC Press, 2016:57-59.
- [2] Solomon D A, Wood M D, Tihan T, *et al.* Diffuse midline gliomas with Histone H3-K27M mutation: a series of 47 cases assessing the spectmm of morphologic variation and associated genetic alterations [J]. Brain Pathol, 2016,26(5):569-580.
- [3] Kramm C M, Butenhoff S, Rausche U, *et al.* Thalamic high-grade gliomas in children: a distinct clinical subset? [J]. Neuro Oncol, 2011,13(6):680-689.
- [4] Warren K E. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress [J]. Front Oncol, 2012,2:205.
- [5] Aboian M S, Solomon D A, Felton E, *et al.* Imaging characteristics of pediatric diffuse midline gliomas with histone H3 K27M mutation[J]. Am J Neuroradiol, 2017,38(4):795-800.
- [6] Herrlinger U, Jones D T W, Glas M, *et al.* Gliomatosis cerebri: no evidence for a separate brain tumor entity [J]. Acta Neuropathol, 2016,131(2):309-319.
- [7] Bechet D, Gielen G G, Korshunov A, *et al.* Specific detection of methionine 27 mutation in histone 3 variants (H3K27M) in fixed tissue from high-grade astrocytomas[J]. Acta Neuropathol, 2014, 128(5):733-741.
- [8] Monje M, Mitra S S, Freret M E, *et al.* Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011,108(11):4453-4458.
- [9] Buczkowicz P, Bartels U, Bouffet E, *et al.* Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: diagnostic and therapeutic implications [J]. Acta Neuropathol, 2014, 128(4):573-581.
- [10] Khuong-Quang D A, Buczkowicz P, Rakopoulos P, *et al.* K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas [J]. Acta Neuropathol, 2012,124(3):439-447.

· 简 讯 ·

敬告作者

作者收到编辑部的退修意见后,请按修改意见认真修改。稿件修改处宜采用不同颜色字体标识,以便编辑和审稿专家查看。修改完成后,请对专家审稿意见逐条说明修改情况,有异议者,可说明理由。欢迎您修改时参阅本刊相关文献。

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.030.html>

原发性系统性淀粉样变性 1 例

张亚丽¹, 谷永红²

关键词: 肠梗阻; 淀粉样变性; 原发性; 病例报道

中图分类号: R 597+.2 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-7399(2018)03-0351-02

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.030

患者男性, 56 岁, 因腹部持续性绞痛 4 个月余入院。腹部立位平片: 机械性不全性肠梗阻。小肠镜下于病变处取活检提示浅表溃疡形成。临床予以相关内科治疗后出院。出院一周后因持续性绞痛伴血便再次入院, 肾功能: 肌酐 122 $\mu\text{mol/L}$, 尿酸 446 $\mu\text{mol/L}$ 。内科保守治疗后患者仍感腹痛剧烈未缓解, 遂行腹腔镜探查术, 手术切除病变回肠, 送病理检查。之后患者无明显诱因出现口舌多发疱疹、腹泻及头皮片状瘀点瘀斑。心肌酶: 肌酸激酶 21 U/L, BNP 2 269.4 pg/mL。心脏彩超: 室壁增厚、细颗粒回声。心电图有低电压表现, 考虑淀粉样变性累及心肌可能, 建议心肌活检, 但患者拒绝。尿检: 24 h 尿蛋白 216 mg/24 h; 肾小管功能全套: 尿 β_2 微球蛋白 4.68 $\mu\text{g/mL}$, 尿 κ -轻链 0.01 mg/L, 尿 λ 轻链 84.89 mg/L, 尿酸 589 $\mu\text{mol/L}$, 尿视黄醇结合蛋白正常, 尿本周蛋白阴性。免疫固定电泳: λ 型 M 蛋白阳性, 重链型 M 蛋白阴性。综合检查结果提示肾功能受损, 超声引导下肾穿刺活检, 患者之后每隔 1 个月定期行 MP (马法兰 + 地塞米松) 化疗。骨髓穿刺细胞学检查: 骨髓增生活跃, 粒红两系各阶段细胞形态大致正常。病情未继续进展, 随访中。

病理检查 (1) 手术切除的病变回肠组织。眼观: 送检肠管一段, 长 69 cm, 管径 2.8 cm, 肠腔壁狭窄处为两段各长 2 cm 的节段性狭窄, 有糜烂, 浅表溃疡形成。镜检: 病变区肠管黏膜显慢性炎症, 有糜烂及多发性浅表溃疡形成, 伴充血出血水肿, 黏膜下层纤维及肉芽增生, 肠壁间质及血管壁内见粉染的团块状物质沉积 (图 1)。特殊染色: 刚果红染色阳性 (图 2)。(2) 胃镜检出物。眼观: 胃窦、胃角多发糜烂性质待定。镜检: 轻度慢性浅表性胃炎, 黏膜内及黏膜下可见粉染团块状物 (图 3)。特染: 刚果红染色阳性; 免疫表型: Kappa、Lambda 阳性。(3) 头部皮肤。眼观: 散在瘀点瘀斑。镜检: 送检皮肤组织, 表皮下见均质粉染团块状物, 真皮纤维增生伴胶原化。特染: 刚果红染色阳性 (图 4)。(4) 小肠活检标本经刚果红染

色确诊淀粉样变性后, 组织切片行偏振光显微镜检查, 结果显示: 淀粉样沉积物偏振光下呈现特殊的苹果绿 (图 5)。(5) 肾活检标本送电镜检查, 结果显示: 淀粉样蛋白沉积物电镜下表现为不分枝纤维丝样物质杂乱无章沉积 (图 6)。

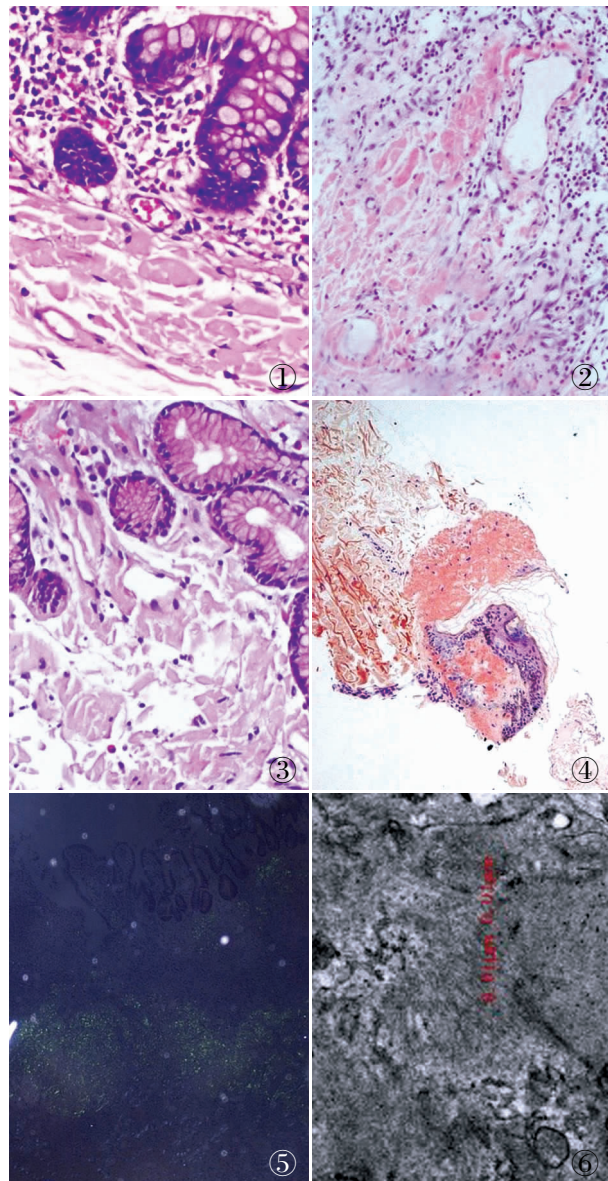


图 1 黏膜下层纤维及肉芽增生, 肠壁间质及血管壁内见粉染的团块状物质沉积 **图 2** 肠壁间质及血管壁粉染的团块状物质刚果红染色呈橘红色 **图 3** 轻度慢性浅表性胃炎: 黏膜内及黏膜下可见粉染团块状物 **图 4** 送检皮肤组织: 表皮下见均质粉染团块状物, 粉染物经刚果红染色呈现橘红色 **图 5** 淀粉样沉积物偏振光下呈现特殊的苹果绿 **图 6** 淀粉样蛋白沉积物电镜下表现为不分枝纤维丝样物质杂乱无章沉积

接受日期: 2017-09-14

基金项目: 中南大学资助项目 (2013-054)

作者单位: 中南大学湘雅三医院病理科, 长沙 410013

作者简介: 张亚丽, 女, 硕士研究生。E-mail: 1150292826@qq.com

谷永红, 女, 教授, 硕士生导师, 主任医师, 通讯作者。

E-mail: 1203396535@qq.com

病理诊断:原发性系统性淀粉样变性。

讨论 淀粉样变性是由多种原因造成的淀粉样蛋白在体内各脏器组织细胞间的沉积,继而引起受累脏器功能逐渐衰竭的一种临床综合征。淀粉样蛋白分为几种不同的化学类型:免疫球蛋白轻链蛋白(amyloid L, AL)、淀粉样蛋白 A(amyloid A, AA)等^[1]。淀粉样变性的诊断有赖于组织学,光镜下的淀粉样物质经过 HE 染色呈均质红染团块状物质,刚果红染色可观察到其最特异的表现:正常光下显示橘红色,而偏振光下为苹果绿^[2]。电镜观察淀粉样物质表现为不分枝的纤维丝样物质沉积。另外高锰酸钾对于区分 AL 型淀粉样蛋白和 AA 型淀粉样蛋白有意义,AL 蛋白经高锰酸钾氧化后刚果红染色会出现均质红染状,而 AA 型经氧化后刚果红染色不会出现特征性表现^[3]。AL 淀粉样变性的前体蛋白单克隆血清游离轻链(serum free light chain, sFLC),是异常浆细胞分泌的 M 蛋白,sFLC 检测有助于早期诊断^[4]。此外早期于牙龈、腹壁脂肪等部位的活检较为安全、方便,并且阳性率均在 40% 以上,故应作为首选^[5]。超声心动图可以及时了解心脏淀粉样变性的病变情况^[6]。原发性系统性淀粉样变性累及胃肠道,临床表现为腹泻、出血、梗阻、便秘^[7],综合分析该患者最初诊断应为“小肠假性梗阻”,发生机制为淀粉样物质沉积并渗入肠固有肌层或者肠系膜神经丛^[8]。临床医师在处理以“肠梗阻”为首发表现的患者时通常倾向于考虑“克隆恩病”或者“肿瘤”,但克隆恩病是一种淋巴组织相关性疾病同时伴肉芽肿性改变,其与淀粉样变性的发病机制不同,两者治疗和预后截然不同,提醒临床医师在处理反复腹痛不缓解,影像学提示肠梗阻时应该考虑到原发性淀粉样变性的可能。此外,单克隆免疫球蛋白轻链或重链沉积病,蛋白样沉积物常规 HE 染色会呈现均质粉染团块状物,但是该类蛋白质缺乏特征性的二级结构 β 折叠^[9],刚果红染色阴性,电镜下也不会呈现纤维样结构。AL 淀粉样变性患者合并胃肠道和心脏受累,长期预后较差,早期接受 MP(马法兰+地塞米松)化疗或者自体造血干细胞移植可明显提高生存率^[10]。本例患者确诊后予以规范化 MP 化疗,

病情缓解,目前尚未发现其他脏器受累。因此早期诊断、早期治疗对于改善原发性系统性淀粉样变性患者的预后至关重要。

参考文献:

- [1] Choi J H, Ko B M, Kim C, *et al.* A case of localized amyloid light-chain amyloidosis in the small intestine [J]. *Intest Res*, 2014,12(3):245-250.
- [2] Groisman G M, Cohen H I. Small intestinal amyloidosis: a rare cause of diverticular disease[J]. *Case Rep Pathol*, 2014,2014:362835.
- [3] 杨晓青,张秀辉,胡章学. 淀粉样变性肾病的临床病理研究[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2006,22(2):165-168.
- [4] 胡 飏,朱 平. 检测骨髓异常浆细胞有助于诊断原发性系统性轻链淀粉样变性[J]. *中国实验血液学杂志*, 2012,20(5):1251-1255.
- [5] 吕 红,杨立新,王志刚,等. 原发性系统性淀粉样变的消化系统临床表现和诊断[J]. *胃肠病学*, 2006,11(7):404-407.
- [6] Cacciapuoti F. The role of echocardiography in the non-invasive diagnosis of cardiac amyloidosis [J]. *J Echocardiogr*, 2015,13(3):84-89.
- [7] Gaduputi V, Badipatla K, Patel H, *et al.* Primary systemic amyloidosis with extensive gastrointestinal involvement[J]. *Case Rep Gastroenterol*, 2013,7(3):511-515.
- [8] Koppelman R N, Stollman N H, Baigori F, *et al.* Acute small bowel pseudo-obstruction due to AL amyloidosis: a case report and literature review [J]. *Am J Gastroenterol*, 2000,95(1):294-296.
- [9] 孟宇宏. 原发性淀粉样变性病的病理诊断[J]. *诊断病理学杂志*, 2013,20(6):321-325.
- [10] 黄湘华,蒋 松,史明君,等. 原发性系统性淀粉样变性的预后及危险因素分析[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2012,21(4):304-310.

· 简 讯 ·

统计学符号书写要求

统计学符号按 GB/T 3358.1-1993《统计学名词及符号》的规定一律采用斜体排印。(1)样本的算术均数用英文小写 $\bar{x}$,中位数用 M ;(2)标准差用英文小写 s ;(3)标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8) q 检验用英文小写 q ;(9)概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值,如 t 值、 F 值等);(10)比值比用英文大写 OR ;(11)95% 可信区间用 95% CI 表示。

网络出版时间:2018-3-29 14:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180329.1400.031.html>

男性肺原发性绒毛膜癌2例

彭燕,李传应,王志华,吴铃

关键词:肺肿瘤;肺原发性绒毛膜癌;男性;病例报道

中图分类号:R 734.2 **文献标志码:**B

文章编号:1001-7399(2018)03-0353-02

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.03.031

2例患者均为男性,年龄分别为46、54岁,均因咯血、咳嗽、胸痛等症状入院,发现肺部巨大占位,均行肺叶切除术,胸部CT示肺窗左肺上叶尖后段见团块状高密度影。病灶外缘以宽基底与临近胸膜相贴,内缘与同侧肺门分界欠清晰,左肺上叶支气管部分受压(图1),2例均伴周围淋巴结转移,均行肺叶切除+淋巴结清扫术,术中见肿瘤位于肺实质内,大小分别为6.0 cm×3.0 cm×4.0 cm和8 cm×7 cm×7 cm,暗褐色,境界清楚,质地脆。

病理检查 眼观:肿瘤有包膜,境界清楚,暗红色,出血明显,呈海绵状,质地软。例2肺叶切除标本:肿块突出肺组织表面,呈结节状,大小7.0 cm×7.0 cm×5.0 cm,切面见大部分区明显出血、坏死伴血凝块形成,易脱落,灰白色,区质地软(图2)。镜检:肿瘤细胞呈巢状及实片状排列,伴大片出血、坏死;瘤细胞由两种细胞组成,即细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞。细胞滋养层细胞呈多边形、圆形,部分呈梭形,体积小,胞质淡染,核圆形,位于中央,核仁明显;合体滋养层细胞体积大而不规则,胞质嗜酸性,核深染畸形,可见大量巨核细胞及多核巨细胞,病理性核分裂象多见(图3、4)。免疫表型:2例肿瘤细胞均表达 β -HCG(图5)、CK(图6)、CD10、SALL4,少数单核细胞滋养细胞表达p63;不表达PLAP、vimentin、CD117、CD30、TTF-1和Napsin A等;Ki-67增殖指数>70%。

病理诊断:肺原发性绒毛膜癌(primary pulmonary choriocarcinoma, PPC)伴周围淋巴结转移。

讨论 绒毛膜癌是一种分泌 β -HCG的高度恶性滋养细胞肿瘤。一般可分为妊娠性和非妊娠性两种,大多数绒毛膜癌是妊娠性绒癌,常继发于正常或异常妊娠后的滋养叶疾病^[1],育龄女性常见。非妊娠性绒癌又称为原发性绒癌,多见于青少年或儿童^[2]。男女均可发病,但男性原发性绒毛膜癌更少见。一般起源于性腺,如卵巢和睾丸,性腺外的绒毛膜癌更罕见,主要发生在机体中线部位,如肺^[3-4]、纵隔、腹

膜后等非妊娠部位^[5]亦可发生。

PPC发病年龄6个月~71岁不等,本组2例患者年龄分别为46、54岁。总结本组病例及文献中报道的PPC,最常见症状为持续性咳嗽、咳血、胸痛、呼吸困难及体重减轻等^[6]。男性患者出现乳房发育、睾丸萎缩、性欲减退,尿和血清的 β -HCG值升高有助于诊断^[7]。鉴于术前未考虑该肿瘤,失去术前检测血 β -HCG值的机会,术后检查 β -HCG值分别为98.8和3.46。影像学检查发现肺部单发伴广泛的大片出血、坏死,提示PPC可能。临床上肺原发性绒毛膜癌多为单发,体积较大,大部分有包膜,实性伴明显出血、坏死,切面质软而脆、多为棕红色或黑褐色。PPC是由单核细胞(细胞滋养层、中间滋养层细胞)及小灶状合体滋养细胞组成的一个双相性肿瘤,存活的肿瘤带之间见大片出血、坏死。合体滋养细胞比较容易识别,具有丰富的紫蓝色到嗜双色性胞质,嗜酸性核仁,有时可见奇异形细胞核。单核滋养细胞是由不同大小的细胞组成,伴有中等量及嗜酸性胞质,细胞核稍大,核仁清楚,染色质粗糙,非典型性比合体滋养细胞明显。一般不出现间质纤维组织增生和血管。免疫组化染色合体滋养细胞 β -HCG和CK均(+)。

需与PPC鉴别诊断病变有:(1)伴 β -HCG升高的肺巨细胞癌:其是非小细胞癌的一个类型,属高度恶性肿瘤。血清学检测时可发现 β -HCG水平升高,形态学表现为伴明显多核巨细胞并表达 β -HCG,巨细胞癌中多核巨细胞的数量和体积通常比PPC少而小,瘤细胞数量更丰富,成分更复杂,常伴有大量炎细胞背景,免疫组化标记可表达TTF-1及CEA。PPC是在出血和坏死的背景上有少量细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞样形态的肿瘤细胞浸润。免疫组化染色示瘤细胞表达HCG、SALL4及CK,不表达CEA和TTF-1。(2)低分化癌(肺低分化鳞状细胞癌、实性腺癌和肉瘤样癌)分化差及核异型明显时,甚至有时会出现瘤巨细胞,尤其肉瘤样癌易出现大片坏死,与绒毛膜癌相混淆。后者肿瘤细胞中无浸润性癌引起的间质纤维组织增生,残存的肿瘤细胞似漂浮在大片出血坏死组织中。免疫组化标记前者鳞状细胞癌CK5/6、p40、p63(+),腺癌:TTF-1、Napsin A(+);绒毛膜癌特异性标记HCG(+)有助于鉴别诊断。(3)纵膈胚胎性癌浸润转移至肺:前者部分细胞明显异型,部分瘤巨细胞形态类似于合体滋养细胞,免疫组化标记CD30和AFP(+),绒毛膜癌CD30和AFP均(-)。(4)肺转移性绒毛膜癌:绒毛膜癌最常见的发生部位是生殖系统,其他器官(如脑、大肠和胰腺等)也能发生,易通过血道发生肺转移,此时应结合影像学及病史进行综合判断生殖系统和其他部位是否有原发

接受日期:2017-11-10

作者单位:安徽省立医院病理科,合肥 230001

作者简介:彭燕,女,博士,主治医师。E-mail: pengyan321@163.com

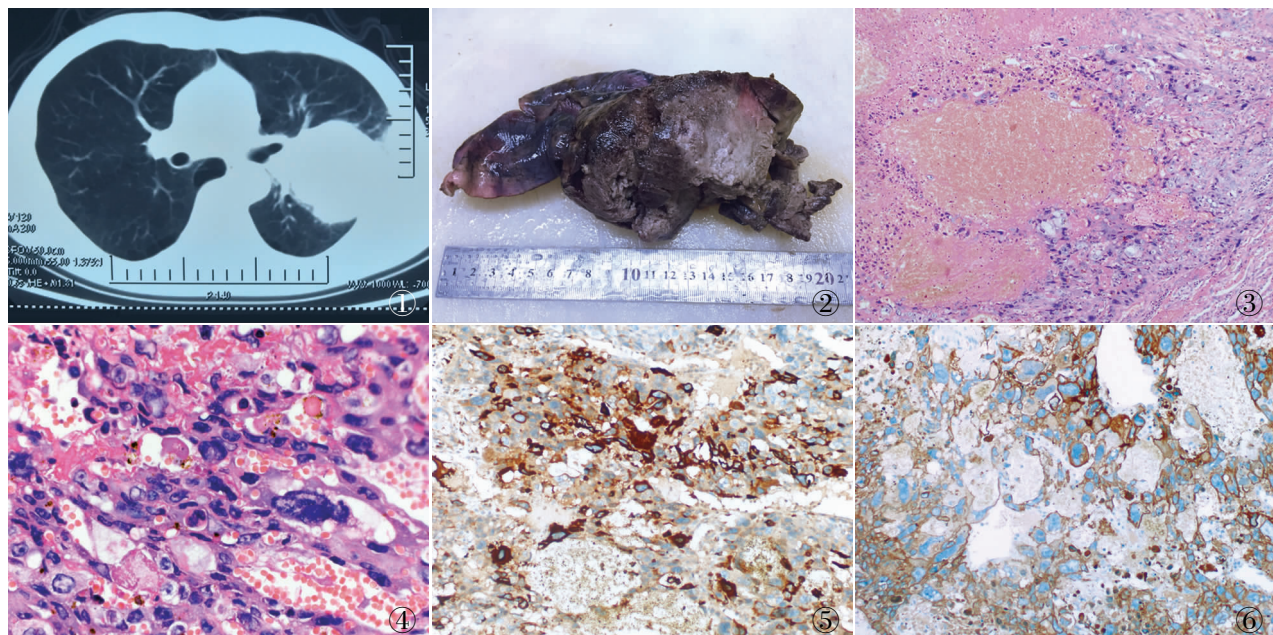


图1 肺窗示左肺上叶尖后段见团块状高密度影 图2 肿块突出肺组织表面,结节状,部分呈暗褐色,部分灰白色,质地软 图3 病灶内可见大片出血坏死的背景,周围存活的肿瘤细胞,边缘见残存的正常肺组织 图4 合体滋养层细胞明显异型,核大、深染及奇异形细胞 图5 肿瘤细胞 β -HCG(+) ,EnVision 法 图6 肿瘤细胞 CK(+) ,EnVision 法

性病灶。(5)包含有巨细胞的一些肿瘤,如肺孤立性纤维性肿瘤、间变大细胞淋巴瘤、恶性黑色素瘤、霍奇金淋巴瘤及转移性骨巨细胞瘤等,以上列举的肿瘤均有各自典型的组织形态学和免疫表型。在日常外检工作中,结合临床表现、血清学指标、病理形态及免疫表型可资鉴别。

PPC 恶性程度高,易侵犯血管,浸润周围器官,在生殖细胞肿瘤中预后最差。目前治疗尚无统一标准,主要治疗方案是手术切除+联合化疗。PPC 患者行手术切除取得成功的病例已有报道^[8]。2 例患者均行肺叶切除+淋巴结清扫术,例1 患者于手术切除明确诊断后4 个月后离世;例2 患者正在接受化疗和术后随访中,术后3 个月复查血 β -HCG 值786.54,提示出现复发和进展。

参考文献:

[1] 陈乐真. 妇产科诊断病理学[M]. 2 版. 北京:人民军医出版社,2010:378-379.

- [2] 雷冬梅,张威,张欢欢,等. 儿童非妊娠性绒癌临床病理分析[J]. 河南外科学杂志,2015,21(5):7-9.
- [3] 李琴,孔欣,古巧平,等. 原发性肺绒毛膜癌致血气胸例[J]. 实用妇产科杂志,2015,31(5):395-396.
- [4] Zhu R, Jia C, Yan J, *et al.* Primary pulmonary choriocarcinoma in a male that was successfully diagnosed and treated: a case report and review of the literature[J]. Medicine, 2016,95(52):e5693.
- [5] 赵媛,张春,陈昊. 4 例非妊娠性绒毛膜癌临床病理分析[J]. 重庆医学,2017,46(1):75-77.
- [6] 刘艳辉,庄恒国,谢亮,等. 肺原发性绒毛膜癌1 例报道及文献复习[J]. 临床与实验病理学杂志,2006,22(6):703-706.
- [7] 巩丽,赵建业,韩秀娟,等. 男性肺原发性绒毛膜癌3 例临床病理学特点[J]. 诊断病理学杂志,2008,15(1):8-11.
- [8] Kamata S, Sakurada A, Sato N, *et al.* A case of primary pulmonary choriocarcinoma successfully treated by surgery[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2017,65(6):361-364.



欢迎投稿,欢迎订阅,邮发代号 26-54

邮局漏订者可直接汇款至本刊编辑部补订,联系电话:0551-65161102