

· 临床研究 ·

结直肠腺癌中差分化细胞群和肿瘤出芽相关性及其MUC1的表达

杨路路, 苟思琪, 张 前, 王劲松, 黄文斌*

南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)病理科, 江苏 南京 210006

[摘要] 目的:分析结直肠腺癌中差分化细胞群(poorly differentiated clusters, PDC)与肿瘤出芽(tumor buddings, TB)之间的关系,以及MUC1在PDC和TB中的表达,探讨结直肠腺癌中PDC和TB的相关性,阐明两者的生物学特征。方法:183例结直肠腺癌中PDC的识别和分级采用HE染色下观察,TB的识别和分级采用CK免疫组化染色,MUC1在PDC与TB中的表达采用免疫组化EnVision方法检测。结果:183例结直肠腺癌中,PDC的检出率为56.8%(104/183),肿瘤内出芽(intratatumoural budding, ITB)的检出率为54.1%(99/183),肿瘤浸润前沿出芽(peritumoural budding, PTB)检出率为62.3%(114/183)。结直肠腺癌中PDC与ITB、PDC与PTB的检出率均呈正相关($P < 0.001$);结直肠腺癌中PDC分级与PTB分级呈正相关($P < 0.05$),而与ITB的级别无关($P > 0.05$);在瘤体主体MUC1主要呈腔缘和(或)胞质表达,而在PDC和TB中MUC1呈反向表达模式即(inside-out, I/O)模式,MUC1在PDC、ITB和PTB中反向表达率分别为55.8%、58.6%和54.4%。结论:结直肠腺癌中PDC和TB密切相关,特别是与PTB有关,提示两者生物学行为具有密切相关性;MUC1在PDC和TB中的反向表达模式提示两者具有微乳头状癌特征,可能是微乳头状癌发生过程中的不同形成阶段。

[关键词] 结直肠腺癌;差分化细胞群;肿瘤出芽;MUC1;微乳头

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)04-539-05

doi:10.7655/NYDXBNS20190413

Correlation of poorly differentiated clusters and tumor buddings and MUC1 expression in colorectal adenocarcinoma

Yang Lulu, Gou Siqi, Zhang Qian, Wang Jinsong, Huang Wenbin*

Department of Pathology, the Affiliated Nanjing Hospital of NMU(Nanjing First Hospital), Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** To analysis the relationship of poorly differentiated clusters (PDC) and tumor buddings (TB) in colorectal adenocarcinoma and MUC1 expression in PDC and TB. To explore the correlation and biologic characteristic of PDC and TB in colorectal carcinoma. **Methods:** The identification and grading of PDC in 183 cases of colorectal adenocarcinoma were observed by HE staining. The identification and grading of TB were examined by CK immunohistochemical staining. MUC1 expression of PDC and TB was detected by EnVision immunohistochemical method. **Results:** Among 183 cases of colorectal adenocarcinoma, the detection rate of PDC was 56.8%(104/183), intratumoural budding (ITB) was 54.1%(99/183), and peritumoural budding (PTB) was 62.3%(114/183). There was a positive correlation between PDC and ITB, PDC and PTB in colorectal adenocarcinoma ($P < 0.001$). PDC grade was positively correlated with PTB grade ($P < 0.05$), but not with ITB grade ($P > 0.05$). MUC1 was mainly expressed in the lumen margin and/or cytoplasm in the main body of the tumors, while in PDC and TB, MUC1 was expressed in the reverse mode, i.e. I/O mode. The reverse expression rates of MUC1 in PDC, ITB and PTB were 55.8%, 58.6% and 54.4%, respectively. **Conclusion:** PDC and TB, especially PTB, were closely related in colorectal adenocarcinoma which suggested that their biological behaviors were closely related. Reverse expression patterns of MUC1 in PDC and TB suggested that they may have the characteristics of micropapillary carcinoma, which may be different stages of micropapillary carcinogenesis.

[Key words] colorectal adnocarcinoma; poorly differentiated cluster; tumor budding; MUC1; micropapillary

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04): 539-543]

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目(2015-WSN-068)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wbhuang348912@126.com

结直肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,严重威胁着人类的健康,随着生活环境、饮食习惯的变化,其发病率已居恶性肿瘤第3位,死亡率居恶性肿瘤第4位,呈逐年上升和年轻化趋势^[1]。目前,美国癌症联合委员会(AJCC)制定的pTNM分期系统是公认的反映结直肠癌生物学行为、患者预后及指导临床治疗“金标准”^[2]。然而,即使是同一分期的患者,给予同种手术治疗及辅以放、化疗等治疗方案,患者临床结局也不相同。因此,寻找一些能更好地反映结直肠癌生物学行为及预后的形态学和生物标志物,结合到AJCC分期中是当前个体化治疗和精准医学的客观要求。

分化细胞群(poorly differentiated cluster, PDC)和肿瘤出芽(tumor budding, TB)是Ueno等^[3-4]首先在结直肠癌中描述的一种特殊组织学形态,PDC是指肿瘤内或肿瘤浸润前沿间质中由5个或5个以上肿瘤细胞组成、且无腺腔结构的细胞群,而TB是指肿瘤内或浸润前沿间质中单个的癌细胞或少于5个癌细胞组成的细胞簇,分为肿瘤内出芽(intra-tumoural budding, ITB)和肿瘤浸润前沿肿瘤出芽(peritumoural budding, PTB)^[5]。研究发现PDC和TB与结直肠癌侵袭性临床生物学行为密切相关^[6-7]。我们前期的研究结果也发现结直肠腺癌中PDC、TB及其分级与肿瘤的淋巴结转移、脉管侵犯以及TNM分期密切相关(另文发表)。

HE染色下,PDC除了细胞数量多于TB外,它们的细胞形态学比较相似,如细胞明显异型、胞质嗜酸性和周围促纤维反应显著等,而且在同一肿瘤中能同时观察到两种形态,这些表现提示PDC和TB之间可能存在一定联系,是同一发病机制的连续性事件,但关于这方面的研究,目前国内外文献尚未见报道。MUC1是一种黏蛋白,正常情况下表达于肿瘤细胞的腔缘和胞质内,但在微乳头状癌中,MUC1呈现特征性的朝向间质的膜阳性即反向表达模式,目前被认为是诊断微乳头癌的一种重要免疫标志物^[8]。本研究通过分析结直肠腺癌中PDC与ITB、PTB之间的关系,同时检测PDC和TB中MUC1的表达,旨在探讨二者之间是否存在联系以及它们是否具有微乳头状癌的特征。

1 对象和方法

1.1 对象

收集南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)病理科2017年1—12月间行结直肠癌根治术手术标本183例。所有患者均为腺癌,术前均无任

何放疗、化疗或免疫治疗史。患者年龄42~89岁,平均68.0岁,其中男122例,女61例。肿瘤大小2.0~14.0 cm,平均4.8 cm。左半结肠67例,右半结肠57例,直肠59例。

1.2 方法

1.2.1 病理学染色

由2名高级病理医师复习每例的所有HE切片,评估HE染色差异化细胞群,并行免疫组化辅助肿瘤出芽评估。免疫组化采用EnVision两步法,主要步骤如下:组织4 μm厚切片,常规脱蜡,梯度酒精脱水,3% H₂O₂灭活内源性生物素,高温高压下进行抗原修复,抗原修复液为pH6.0枸橼酸盐缓冲液,然后滴加一抗,4℃冰箱中过夜,滴加二抗孵育,DAB显色,镜下控制显色时间,苏木精复染,镜下观察。一抗鼠抗人MUC1单克隆抗体(ZM-0391)、广谱细胞角蛋白(CK)抗体及二抗均购自北京中杉生物技术开发公司,所有操作均按试剂说明书进行。当评估意见存在不一致时,在多头显微镜下同时观察分析并达到统一。

1.2.2 结果判断

PDC评价及分级:PDC在HE染色的病理切片中容易识别,无需免疫组化辅助辨识。先在低倍镜下(40倍)浏览每个病例的肿瘤切片,确定有无PDC,当有PDC时,转到中倍镜(200倍)下计数PDC的数量,PDC的分级参照文献^[4]进行,PDC<5个为G1,5~9个为G2,≥10个为G3。

TB评价及分级:TB的判断及分级参照文献^[5],具体操作为先在低倍镜下(40倍)浏览每个病例的肿瘤免疫组化切片,确定有无TB免疫染色,当有TB时,然后寻找TB染色最密集的区域后转到高倍镜(200倍)下计数TB的数量,无TB为G0,<5个为G1,5~9个为G2,≥10个为G3。

MUC1表达的判断:MUC1的判断参照文献进行^[8],将MUC1表达模式分为腔缘膜阳性、反向表达(I/O)、弥漫胞质阳性、阴性,分别记录瘤体主体、PDC、TB中MUC1表达。

1.3 统计学方法

采用SPSS23.0软件进行统计学分析。结直肠癌中PDC及TB之间的关系采用 χ^2 检验,PDC及TB级别之间的关系采用非参数Spearman等级相关分析法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

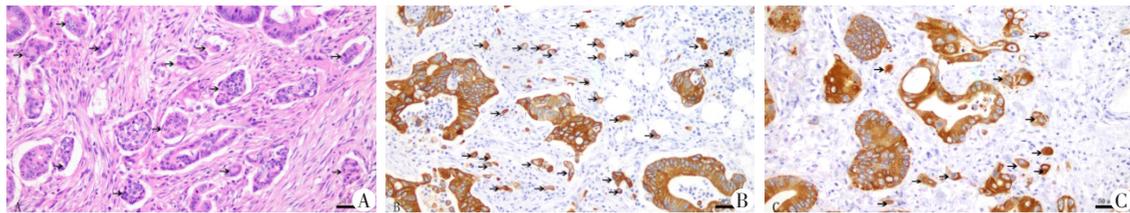
2 结果

2.1 结直肠腺癌中PDC与TB之间的关系

PDC的病理学形态表现为肿瘤间质或浸润前

沿内小巢状分布的高度异型细胞群, 而ITB则表现为肿瘤间质内散在分布的单个或数个(<5个)细胞簇, PTB是肿瘤浸润前沿间质内散在单个或小簇的肿瘤细胞群(<5个)(图1)。由表1可知, 183例结直

肠癌中, PDC的检出率为56.8%(104/183), ITB的检出率为54.1%(99/183), PTB检出率为62.3%(114/183)。结直肠腺癌中PDC与ITB、PDC及PTB的检出率均呈正相关($P < 0.001$)。



A: PDC(HE, ×200); B: ITB(EnVision法, ×200); C: PTB(EnVision法, ×200)。

图1 结直肠癌中PDC、ITB和PTB

Figure 1 PDC, ITB and PTB in colorectal carcinoma

表1 结直肠癌中差分化细胞群与肿瘤出芽之间的关系
Table 1 Correlation of poorly differentiated clusters and tumour buddings in colorectal carcinoma

类型	例数	差分化细胞群(n)		阳性率 (%)	P值
		阳性	阴性		
ITB					<0.001
阳性	99	82	17	82.8	
阴性	84	22	62	26.2	
PTB					<0.001
阳性	114	89	25	78.0	
阴性	69	15	44	21.7	

表2 结直肠癌中PDC级别与TB级别之间的关系
Table 2 Correlation of PDC grading and TB grading in colorectal carcinoma

分级	例数	差分化细胞群(n)			r值	P值
		G1	G2	G3		
ITB					0.185	0.097
G1	33	13	9	11		
G2	23	7	3	13		
G3	26	4	10	12		
PTB					0.272	0.010
G1	21	10	5	6		
G2	32	10	10	12		
G3	36	6	10	20		

2.2 结直肠腺癌中PDC分级与TB分级之间的关系

我们在分析结直肠腺癌PDC级别与TB分级之间的关系时发现, PDC级别越高, TB的分级尤其是PTB的分级也越高。根据表2可知, 随着结直肠腺癌中PDC分级增高, ITB的分级也逐渐增加, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。但PTB随着结直肠腺癌中PDC分级增高而增高, PDC与PTB分级呈正相关($P < 0.05$)。

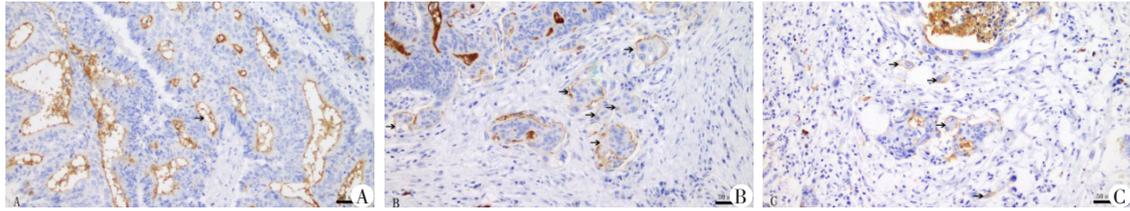
2.3 MUC1在结直肠腺癌瘤体主体、PDC和TB中的表达

MUC1在结直肠腺癌瘤体主体、PDC和TB的表达模式不同。在瘤体主体MUC1主要呈腔缘和(或)胞质表达(图2A), 而在PDC和TB中MUC1无腔缘膜阳性和胞质表达, 而呈反向表达模式即I/O模式(图2B、C)。MUC1在结直肠腺癌瘤体主体、PDC和TB中的表达情况见表3。

3 讨论

结直肠癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类的健康, 其发病率和死亡率呈逐年上升

趋势^[1]。结直肠癌的临床分期主要是基于肿瘤浸润深度、淋巴结转移和远处转移来确定的。根据NCCN指南, 临床分期I、II期结直肠癌可不进行术后辅助化疗, 因此, 癌症分期有利于疾病预后评估和治疗方案的选择。然而, 由于个体肿瘤具有异质性, 同一肿瘤分期内的结直肠癌患者的预后差异很大, 10%~25% I期结直肠癌患者在后续阶段发生了恶性进展^[3]。因此, 需要一些新的形态学和分子标志物结合到pTNM分期中, 更加合理和准确地对患者进行不同的风险分类。已有研究表明肿瘤浸润前沿的去分化肿瘤细胞具有重要的预后意义。去分化的肿瘤细胞既可以是单个细胞, 也可以是无腺腔的细胞簇, 根据肿瘤细胞的数量将肿瘤浸润前沿或间质内的这些细胞簇分为肿瘤出芽和差分化肿瘤细胞群。国内外已有较多研究证实肿瘤出芽是包括结直肠癌在内的其他恶性肿瘤如肺癌、喉癌、胰腺癌、食管癌等具有高度侵袭性及预后不良的危险因子^[9]。Rogers等^[7]Meta分析显示肿瘤出芽是结



A: MUC1主要呈腔缘和(或)胞质表达;B: MUC1在PDC中呈反向表达;C: MUC1在TB中呈反向表达(EnVision法, ×200)。

图2 MUC1在结直肠癌瘤体主体、PDC和TB中的表达

Figure 2 MUC1 expression in the main body, PDC and TB of colorectal carcinoma

表3 MUC1在结直肠癌瘤体主体、PDC和TB中的表达情况

Table 3 MUC1 expression in the main body, PDC and TB of colorectal carcinoma (n)

表达类型	瘤体主体	PDC	ITB	PTB
腔缘表达	105	0	0	0
反向表达	0	58	58	62
胞质表达	32	21	20	34
阴性表达	46	25	21	18

直肠癌淋巴结转移、癌症复发和5年癌症相关死亡率的强力不良预后因子,并提出将其纳入CRC分期中有利于结直肠癌有效的风险分层。PDC是继肿瘤出芽后提出的第二种具有预测肿瘤侵袭性临床生物学行为的组织学特征。Uneo等^[10]进行的一项多中心研究发现PDC分级与结直肠癌TNM分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、AJCC分期、脉管侵犯密切相关。我们前期研究也证实PDC及其分级与侵袭性临床病理参数包括浸润深度、淋巴结转移、脉管侵犯、临床分期等显著相关。

PDC和TB在HE染色下除了细胞数量不同外均具有相似的形态学特征,在同一肿瘤中常可同时观察到两种形态,而且它们都与侵袭性生物学行为有关,以及EMT参与二者的形成,这些特点提示PDC与TB可能具有内在的联系,是肿瘤发生发展过程中同一形态学变化的不同阶段。Kim等^[11]分析235例结直肠癌中PDC分级与临床病理参数之间的关系,发现PDC与TB密切相关。Eanna等^[12]在错配修复缺陷型(dMMR)结直肠癌中发现PDC与TB有相同的组织学谱系及相同的生物学意义,PDC分级与TB分级密切相关。本研究中,首先分析了结直肠癌中PDC与TB之间的关系,结果发现PDC与ITB和PTB均密切相关,进一步分析PDC分级与TB分级之间的关系,结果显示PDC分级与PTB分级呈正相关,但与ITB分级无关,结果表明PDC与TB尤其是PTB之间存在密切关系,其分子机制尚有待进一步研究。

微乳头状癌是2010版消化系统肿瘤WHO分类中新命名的一种结直肠腺癌的亚型,定义为肿瘤间质内存在无纤维血管轴心的细胞簇,细胞簇周围有拟似血管腔隙的收缩裂隙,而不管细胞数量^[13]。免疫标志特征性表现为MUC1的反向表达。微乳头特征不仅见于结直肠癌,也常见于乳腺癌、肺癌、膀胱癌和胃癌等,研究表明微乳头状结构与恶性肿瘤的侵袭性特征密切相关^[14-15]。PDC和TB在形态学上和临床生物学行为上与微乳头非常相似,提示它们之间可能存在发病机制上的重叠,可能是浸润性生长有关的同一致病事件中的顺序表现。我们研究结果也发现结直肠癌中PDC与ITB和PTB均密切相关,Barresi等^[16]研究发现所有PDC和TB都存在MUC1的反向表达,所有PDC均存在E-cadherin失表达和异常表达,TB中全部失表达。Hong等^[17]比较研究了 β -catenin、E-cadherin、EpCAM、MUC1和EMA在PDC、TB和瘤体中央分化性肿瘤腺体的表达,结果发现 β -catenin核阳性在PDC和TB中表达明显高于瘤体中央的肿瘤性腺体,MUC1和EMA的内-外表达模式常见于PDC和TB中。本研究中,也发现MUC1的内-外表达模式主要见于PDC和TB,而瘤体主体未见表达,这些研究均高度提示TB、PDC和微乳头可能为肿瘤侵袭生长过程中的一种顺序生长模式。

总之,PDC和TB是结直肠癌TNM临床分期参数之外的一种重要的病理学特征,具有相似的形态学特点,均与侵袭性临床生物学行为密切相关。PDC和TB都具有MUC1反向表达的特征,提示它们与微乳头结构具有相同的发病机制,可能为肿瘤侵袭生长过程中的一种顺序生长模式。

[参考文献]

- [1] Millker KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289
- [2] Hari DM, Leung AM, Lee JH, et al. AJCC Cancer Staging Manual 7th edition criteria for colon cancer; do the com-

- plex modifications improve prognostic assessment? [J]. *J Am Coll Surg*, 2013, 217(2): 181-190
- [3] Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer [J]. *Am J Surg Pathol*, 2012, 36: 193-201
- [4] Ueno H, Murphy J, Jass JR, et al. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer[J]. *Histopathology*, 2002, 40(2): 127-132
- [5] Rieger G, Koelzer VH, Dawson HE, et al. Comprehensive assessment of tumor budding by cytokeratin staining in colorectal cancer[J]. *Histopathology*, 2017, 70(7): 1044-1051
- [6] Barresi V, Reggiani Bonetti L, Branca G, et al. Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading[J]. *Virchows Arch*, 2012, 461(6): 621-628
- [7] Rogers AC, Winter DC, Heeney A, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(7): 831-840
- [8] Nassar H, Pansare V, Zhang H, et al. Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(9): 1045-1050
- [9] Lugli A, Kirsch R, Bosman F, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (IT-BCC)2016[J]. *Mod Pathol*, 2017, 30(9): 1299-1311
- [10] Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, et al. Site-specific tumor grading system in colorectal cancer: multicenter pathologic review of the value of quantifying poorly differentiated clusters[J]. *Am J Surg Pathol*, 2014, 38(2): 197-204
- [11] Kim JW, Shin MK, Kim BC. Clinicopathologic impacts of poorly differentiated cluster - based grading system in colorectal carcinoma[J]. *J Korean Med Sci*, 2015, 30(1): 16-23
- [12] Ryan É, Khaw YL, Creavin B, et al. Tumor budding and PDC grade are stage independent predictors of clinical outcome in mismatch repair deficient colorectal cancer [J]. *Am J Surg Pathol*, 2018, 42(1): 60-68
- [13] Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum [M] // Bosman T, Carneiro F, Hruban RH, et al, eds. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon: IRAC, 2010: 137-138
- [14] Bertz S, Wach S, Taubert H, et al. Micropapillary morphology is an indicator of poor prognosis in patients with urothelial carcinoma treated with transurethral resection and radiochemotherapy [J]. *Virchows Arch*, 2016, 469(3): 339-344
- [15] Vingini A, Maisonneuve P, Dell'orto P, et al. The clinical relevance of micropapillary carcinoma of the breast: a case-control study[J]. *Histopathology*, 2013, 63(2): 217-224
- [16] Barresi V, Branca G, Vitarelli E, et al. Micropapillary pattern and poorly differentiated clusters represent the same biological phenomenon in colorectal cancer: a proposal for a change in terminology [J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 142(3): 375-383
- [17] Hong M, Kim JW, Shin MK, et al. Poorly differentiated clusters in colorectal adenocarcinomas share biological similarities with micropapillary patterns as well as tumor buds[J]. *J Korean Med Sci*, 2017, 32(10): 1595-1602

[收稿日期] 2018-11-21

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。