

· 基础研究 ·

膀胱副神经节瘤组织中SDHB、EPAS1及Ki-67表达的研究

朱逸之¹,周晓莉¹,顾文贤¹,张力峰²,孙阳阳^{1*}¹南京医科大学附属常州市第二人民医院病理科,²泌尿外科,江苏 常州 213000

[摘要] 目的:探讨膀胱副神经节瘤临床病理特征以及琥珀酸脱氢酶B(succinate dehydrogenase B,SDHB)、内皮PAS区域蛋白1(EPAS1)及Ki-67在膀胱副神经节瘤中的表达情况,以及三者作为预测恶性副神经节瘤指标的意义。方法:回顾性分析本院收治的43例膀胱副神经节瘤患者的临床病理资料,对43例标本行SDHB、EPAS1、CgA、Ki-67免疫组化检测,并分析其作为预测恶性副神经节瘤指标的意义。结果:43例中,男24例,女19例;年龄26~81岁,中位年龄68岁;随访时间2~84个月,中位随访时间51.3个月;3例死亡,9例术后转移,4例术后反复复发,无转移;其余无复发及转移。良性30例,镜下表现为肿瘤细胞呈经典的巢状排列,核分裂及坏死罕见,瘤细胞巢周围有支持细胞包绕。SDHB阴性(-)4例,EPAS1强阳性(+++)14例,CgA强阳性(+++)18例,2例Ki-67 \geq 3%。恶性13例,镜下表现为肿瘤细胞呈弥漫浸润性生长或大巢状分布,核分裂多见,可见肿瘤性坏死及脉管内瘤栓。SDHB阴性(-)8例,EPAS1强阳性(+++)9例;CgA强阳性(+++)10例;11例Ki-67 \geq 3%。SDHB阴性(-)肿瘤中66.7%为恶性,SDHB阳性(+)的肿瘤中16.1%为恶性,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。SDHB阴性(-)肿瘤中EPAS1、CgA表达强度以及Ki-67 \geq 3%的比例明显高于SDHB阳性(+)肿瘤。恶性膀胱副神经节瘤中EPAS1、CgA、Ki-67阳性表达率明显高于良性膀胱副神经节瘤。结论:恶性膀胱副神经节瘤组织中SDHB免疫组化阴性率为66.7%,SDHB阴性的膀胱副神经节瘤组织中EPAS1过表达,EPAS1阳性表达强度与CgA及Ki-67高表达呈正相关。SDHB、EPAS1、Ki-67是预测恶性膀胱副神经节瘤的生物学指标。

[关键词] 副神经节瘤;琥珀酸脱氢酶B;内皮PAS区域蛋白1;肾上腺**[中图分类号]** R737.14**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)12-1774-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20201206

Expressions of SDHB, EPAS1 and ki-67 in paraganglioma of bladder

ZHU Yizhi¹, ZHOU Xiaoli¹, GU Wenxian¹, ZHANG Lifeng², SUN Yangyang^{1*}¹Department of Pathology, ²Department of Urology Surgery, Changzhou NO.2 People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou 213000, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the clinicopathological features of paraganglioma of the bladder and the expression of succinate dehydrogenase B (SDHB), EPAS1 and Ki-67 in pheochromocytoma of the bladder, and its significance for predicting the clinical malignant behavior. **Methods:** The clinical and pathological data of 43 patients with cystoparaganglioma admitted to our hospital were retrospectively analyzed, and the immunohistochemical tests of SDHB, EPAS1, CgA and Ki-67 were performed on 43 samples, and their significance as indicators for the prediction of malignant paraganglioma was analyzed. **Results:** There were 43 cases of bladder paraganglioma in 19 females and 24 males. Ages 26-81, median age 68. The follow-up time was 2-84 months, with a median follow-up time of 51.3 months. There were 3 deaths, 9 cases with postoperative metastasis, and 4 cases with recurrent recurrence without metastasis. The rest had no recurrence or metastasis. Microscopically, the neoplastic cells in 30 patients presented classic nest-like arrangement, with rare nuclear division and necrosis, and supporting cells surrounding the nests of neoplastic cells. SDHB expression was negative(-) in 4 cases, EPAS1 expression was strongly positive(+++) in 14 cases, CgA expression was strongly positive(+++) in 18 cases, and Ki-67 expression was \geq 3% in 2 cases. Microscopically, there were 13 cases of malignancy. The tumor cells showed diffuse invasive growth or large nests, and nuclear division was common. Neoplastic necrosis and intracascularly neoplastic thrombus were seen. SDHB expression was negative(-) in 8 cases, EPAS1 expression was strong positive(+++) in 9 cases. There were 10 cases with strong positive CgA(+++) expression, 11 cases with Ki-67 \geq 3%. Among the SDHB negative tumors, 66.7% was

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81902565)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sunyangyang527111@163.com

malignant, and among the SDHB positive tumors, 16.1% was malignant. The difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). The expression intensity of EPAS1 and CgA and the proportion of Ki-67 $\geq 3\%$ in SDHB negative tumors were significantly higher than that in SDHB positive tumors. The positive expression rates of EPAS1, CgA and Ki-67 in malignant cystoparaglioma were significantly higher than that in benign cystoparaglioma. **Conclusion:** The negative rate of SDHB immunohistochemistry in the tissues of malignant cystoganglioma was 66.7%. In the tissues of cystoganglioma with negative SDHB expression, EPAS1 was overexpressed, and the positive expression intensity of EPAS1 was positively correlated with the high expression of CgA and Ki-67. SDHB, EPAS1 and Ki-67 are the biological indicators for the prediction of malignant cystoparaglioma.

[Key words] paraganglioma; succinate dehydrogenase B; EPAS1; adrenal glands

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(12): 1774-1778]

膀胱副神经节瘤是一种起源于膀胱壁交感神经系统神经节细胞的肿瘤,组织学形态类似于发生在其他部位的副神经节瘤^[1]。膀胱副神经节瘤临床罕见,约占所有副神经节瘤的6%,约占膀胱肿瘤的0.1%。发病年龄广泛,患者可出现典型的临床三联征,即持续性或突发性高血压、间歇性肉眼血尿和排尿性发作(阵发性头痛、焦虑、颤抖、视物模糊、出汗),有些患者甚至会因为儿茶酚胺代谢产物分泌增多而发生晕厥,部分病例有家族史^[2-3]。近年来研究发现,膀胱副神经节瘤可以为散发病例,也可以是某些遗传性疾病如 Von Hippel-Lindau (VHL) 综合征、琥珀酸脱氢酶(SDH)综合征等的部分表现,特别是琥珀酸脱氢酶B(SDHB)的胚系突变,与肿瘤侵袭性增强及转移密切相关^[4]。国外有研究认为,在膀胱恶性副神经节瘤中,超过半数病例存在SDHB基因的突变^[5],在中国人群中尚无类似报道。本研究用免疫组织化学染色的方法研究膀胱副神经节瘤组织中SDHB、内皮PAS区域蛋白1(EPAS1)和Ki-67的表达及其作为预测恶性副神经节瘤指标的意义。

1 对象和方法

1.1 对象

采用回顾性队列研究方法。收集43例膀胱副神经节瘤患者的临床病理资料,男28例,女15例,年龄26~81岁,中位年龄68岁,43例患者均行手术治疗,术后均行病理学组织检查。本研究通过本院伦理委员会审批,患者及家属均签署知情同意书。

1.2 方法

选取正常肾上腺髓质10例作为对照组。所有手术标本均经4%中性福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm 厚切片,HE染色,光镜观察。免疫组化采用SP法,一抗CK、EMA、CD56、vim、SDHB、EPAS1、Syn、CgA、S-100、Ki-67、HMB45、MelanA、二抗

及DAB显色液均购自丹麦Dako公司。所有切片均设置阴性及阳性对照片,由2位中级及以上职称病理医生同时做出诊断。

免疫组化结果判读:SDHB、EPAS1和CgA以胞质内有棕黄色细颗粒为阳性,高倍镜下($\times 400$)对每张切片选10个视野,计数阳性肿瘤细胞的百分比, $< 1\%$ 为阴性(-), $1\% \sim 10\%$ 为弱阳性(+), $> 10\% \sim < 50\%$ 为中等强度阳性(++), $\geq 50\%$ 为强阳性(+++)。Ki-67核增殖指数=(Ki-67阳性肿瘤细胞数/肿瘤细胞总数) $\times 100\%$,以3%作为分化程度的指标, $\geq 3\%$ 表示分化较差。

1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0统计软件处理数据,计数资料以绝对数或百分比表示,两组率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

本研究43例患者中,10例因体检发现膀胱占位入院,9例因间歇性无痛性肉眼血尿入院;23例有典型高儿茶酚胺分泌症状(排尿后头痛、心悸、血压升高);20例有高血压病史;20例术前尿儿茶酚胺检测升高;B超实性占位11例,低回声团块23例,混合性回声团块9例;膀胱镜下显示结节状隆起9例,带蒂息肉样隆起13例,菜花样肿块5例,球形隆起16例;28例行经尿道膀胱肿瘤电切术(TURBT),15例行肿块切除+部分膀胱壁切除术;肿瘤单发34例,多发9例;肿瘤最大径为0.9~8.0 cm。

2.2 病理检查

2.2.1 组织学形态

瘤组织位于黏膜下层或肌层。19例肿瘤边界清,在黏膜下层或肌层中推挤性生长(图1B);10例肿瘤组织边界不清,在黏膜下层和肌壁间浸润性生

长(图1C),2例突破膀胱壁浸润周围脂肪组织(图1D);14例因组织较为破碎,电灼伤或挤压伤严重,难以判断肿瘤的边界和生长方式。27例肿瘤细胞形态相对一致,排列呈典型的巢状结构(图1A),瘤细胞多边形或圆形,细胞境界不清,细胞质丰富,嗜碱性,细胞核小,圆形或椭圆形,核分裂象及肿瘤性坏死罕见,间质富于薄壁血窦,形成血管网,肿瘤细胞巢周围见支持细胞。17例肿瘤细胞有异型性、多形性,细胞大小不一,形态不规则,肿瘤细胞呈弥漫性或大巢状(典型细胞巢的3倍)排列,肿瘤细胞巢周围无支持细胞或少量支持细胞包绕,肿瘤细胞大多数呈梭形,核分裂多见,细胞质嗜酸性,可见多灶凝固性坏死及脉管内瘤栓(图1D)。最终病理诊断良性副神经节瘤30例,恶性副神经节瘤13例。

2.2.2 免疫组化

取正常肾上腺髓质做对照。正常肾上腺髓质嗜铬细胞经SDHB免疫组化染色表现为胞质内棕黄色颗粒状着色,即SDHB阳性(+),EPAS1不着色,即EPAS1阴性(-)。SDHB缺陷型表现为细胞质内无着色,即SDHB阴性(-)。43例膀胱副神经节瘤中,SDHB阴性(-)12例,SDHB阳性(+)31例;EPAS1强阳性(+++)23例,EPAS1弱~中等阳性(+~++)18例,EPAS1阴性(-)2例;CgA强阳性(+++)28例,CgA弱~中等阳性(+~++)15例;Syn阳性(+)43例;16例Ki-67 \geq 3%,27例Ki-67<3%。30例肿瘤细胞巢周围支持细胞S-100强阳性(+++),13例散在阳性(+)或阴性(-);43例肿瘤细胞上皮性标记物CK、CK7、CK20均阴性(-),黑色素标志HMB45、Melan-A均阴性(-)。

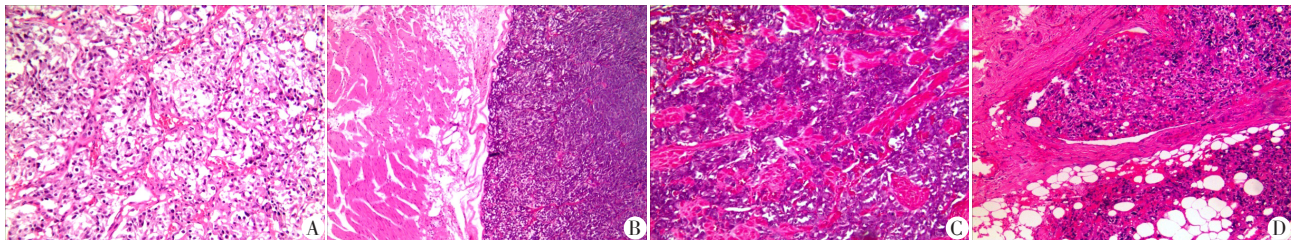


图1 膀胱嗜铬细胞瘤组织学形态(HE,×200)
A:良性膀胱嗜铬细胞瘤,肿瘤细胞排列呈典型的巢状结构,巢周围围绕纤细的脉管束;B:良性膀胱嗜铬细胞瘤推挤式生长方式,与周围组织界限清楚;C:恶性膀胱嗜铬细胞瘤,瘤细胞在膀胱肌壁间穿插浸润性生长;D:恶性膀胱嗜铬细胞瘤,脉管内瘤栓,瘤细胞浸润至膀胱周围脂肪组织中。

Figure 1 Histological morphology of pheochromocytoma of bladder (HE, × 200)

2.2.3 SDHB、EPAS1、Ki-67作为预测恶性副神经节瘤指标的意义

43例患者,良性30例,恶性13例,SDHB阴性(-)肿瘤中66.7%(8/12)为恶性,该比例显著高于SDHB阳性(+)的肿瘤[16.1%(5/31) $P < 0.05$]。SDHB阴性(-)肿瘤中去甲肾上腺素升高更常见(58.3% vs. 6.5%, $P < 0.05$),高血压、肿瘤最大径与

SDHB蛋白表达无明确相关性,而肿瘤多发与SDHB蛋白表达有关(33.3% vs. 16.1%, $P < 0.05$)。SDHB阴性(-)肿瘤组织中EPAS1、CgA表达强度以及Ki-67 \geq 3%的比例明显高于SDHB(+)组(66.7% vs. 51.6%,83.3% vs. 51.6%,91.7% vs. 12.9%, $P < 0.05$)。恶性膀胱副神经节瘤中EPAS1、CgA、Syn、Ki-67阳性表达率明显高于良性膀胱副神经节瘤(表1)。

表1 SDHB、EPAS1及Ki-67免疫组化与患者临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between immunohistochemistry of SDHB, EPAS1, Ki-67 and clinicopathological characteristics of patients [n/N(%)]

组别	例数	EPAS1		CgA		Ki-67	
		(+++)	(+~++)	(+++)	(+~++)	\geq 3%	<3%
SDHB(-)	12	8/12(66.7)	4/12(33.3)	10/12(83.3)	2/12(16.7)	11/12(91.7)	1/12(8.3)
SDHB(+)	31	16/31(51.6)	13/31(41.9)	16/31(51.6)	14/31(45.1)	4/31(12.9)	27/31(87.1)

组别	高血压	肿瘤最大径		尿儿茶酚胺升高			肿瘤多发	恶性
		\geq 3 cm	<3 cm	去甲肾上腺素	肾上腺素	多巴胺		
SDHB(-)	6/12(50.0)	6/12(50.0)	6/12(50.0)	7/12(58.3)	2/12(16.7)	3/12(25.0)	4/12(33.3)	8/12(66.7)
SDHB(+)	14/31(45.1)	13/31(41.9)	18/31(58.1)	2/31(6.5)	3/31(9.7)	3/31(9.7)	5/31(16.1)	5/31(16.1)

2.3 随访

43例患者均获得随访资料,随访时间2~84个月,中位随访时间51.3个月。1例就诊时已经发生肺转移,术后2个月死亡;4例术后6个月~4年反复复发,无转移;4例术后肺转移;4例术后肝转移;1例术后腰椎转移;2例分别于术后34、49个月死亡;其余无复发及转移。

3 讨论

嗜铬细胞瘤是起始于原始神经嵴交感神经的肿瘤,主要发生于肾上腺髓质,约6%发生于肾上腺外,以颈部和后腹膜多见,膀胱少见,膀胱肿瘤中其发生率<1%。有报道显示该肿瘤好发于成年人,男女比例约1.6:1,约10%肾上腺外副神经节瘤为恶性^[6]。

膀胱副神经节瘤是交感神经髓质细胞发生的肿瘤,可表现为功能性和非功能性^[7]。非功能性膀胱副神经节瘤主要临床表现为无痛性间歇性肉眼血尿,部分患者无症状,因体检发现。功能性膀胱副神经节瘤主要表现为高儿茶酚胺分泌症状(阵发性高血压、头痛、排尿晕厥、心悸或心动过速,也可表现为出汗、排尿困难等),术前无内分泌症状者术中也可能会出现高血压危象,实验室检查24h尿儿茶酚胺代谢产物(去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺)会升高,也可正常。本研究发现SDHB阴性(-)肿瘤中去甲肾上腺素升高更常见,高血压、肿瘤最大径与SDHB蛋白表达无明确相关性,而肿瘤多发与SDHB蛋白表达有关。

关于膀胱副神经节瘤良恶性的判断,《泌尿系统和男性生殖器官肿瘤病理学和遗传学》^[8]肿瘤分类中建议恶性诊断标准为转移和/或肿瘤局部侵犯,瘤细胞异型性和多形性、核分裂增多、肿瘤性坏死、肿瘤细胞巢的增大、瘤细胞弥漫性生长可作为恶性的辅助诊断。对于基于病理形态不能明确生物学行为的病例应结合临床和影像学综合评估,由于肿瘤转移可以发生在疾病数年后,因此对于生物学行为不能确定的病例应该长期随访。

研究发现在散发及家族性副神经节瘤中均存在SDHB基因突变^[9]。SDHB存在于所有有氧呼吸细胞的线粒体膜上,SDHB基因1~7号外显子突变使线粒体复合物II结构失去稳定性,氧化磷酸化的缺陷使琥珀酸-泛醌的活性被抑制,激活了超氧化物等活性氧自由基和低氧诱导因子,继而诱导核内抗凋亡基因的产生,激活了低氧/血管生成途径,导致肿

瘤生成,进而发生转移^[10-12]。这可能是膀胱副神经节瘤的病因之一,也可能是其复发和转移的原因。EPAS1蛋白质内存在依赖氧压的降解域,正常氧压条件下EPAS1蛋白迅速降解,而缺氧能够提高其稳定性,使其含量升高^[13]。本研究对比了膀胱副神经节瘤恶性肿瘤组织、良性肿瘤组织及正常肾上腺髓质中SDHB、EPAS1蛋白表达情况,结果显示,恶性组66.7%的病例SDHB蛋白缺失,且SDHB蛋白缺失患者的组织标本中Ki-67阳性比例明显升高,这与膀胱副神经节瘤的恶性浸润和转移密切相关。EPAS1在恶性膀胱副神经节瘤中呈高表达,SDHB基因突变者中EPAS1也为高表达,同时CgA在恶性组织中也明显高表达,因此我们认为SDHB、EPAS1、Ki-67是预测恶性膀胱副神经节瘤的生物学指标。

关于膀胱副神经节瘤的治疗,目前以手术治疗为主,手术方式主要包括经尿道膀胱肿瘤电切术、肿块切除+部分膀胱壁切除^[14-15]。近来有研究提出SDHB缺陷型肿瘤可能对于某些靶向治疗药物更为敏感^[16]。因此,SDHB的表达对患者治疗策略的选择有重要的指导意义

【参考文献】

- [1] LENDERS J M, DUH Q Y, EISENHOFER G, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(6): 1915-1942
- [2] 杨晓群,王素英,王朝夫. 膀胱副神经节瘤11例临床病理分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2013, 29(8): 840-843
- [3] 石 穿,曾正陪,赵大春,等. 琥珀酸脱氢酶B/C免疫组化在鉴别良恶性嗜铬细胞瘤和副神经节瘤中的应用[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2018, 6(34): 472-477
- [4] 吴 恺,张 杨,张 纪,等. 嗜铬细胞瘤/副神经节瘤患者RET, VHL, SDHD, SDHB遗传基因变异的检测[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2018, 50(4): 634-639
- [5] TURKOVA H, PRODANOV T, MALY M, et al. Characteristics and outcomes of metastatic SDHB and sporadic pheochromocytoma/ paraganglioma: an national institutes of health study [J]. *Endocr Pract*, 2016, 22(3): 302-314
- [6] 朱国栋,汤 聪,宋文斌,等. 肾上腺嗜铬细胞瘤/副神经节瘤患者137例手术疗效分析[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2017, 22(8): 598-602
- [7] FAVIERR J, AMAR L, GIMENEZ - ROQUEPLO A P. Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(2): 101-111

[8] 埃布尔. 泌尿系统及男性生殖器官肿瘤病理学和遗传学[M]. 冯晓莉,译. 北京:人民卫生出版社,2006:147-149

[9] VARGHESE F, BUKHARI A B, MALHOTRA R, et al. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples[J]. PLOS One, 2014, 9(5):e96801

[10] SRIPHRARADANG C, CHOOPUN K, TUNTEERATUM A, et al. Genotypephenotype correlation in patients with germline mutations of VHL, RET, SDHB, and SDHD genes: Thai experience[J]. Clin Med Insights Endocrinli Diabetes, 2017, 10: 1-7

[11] HANSEN M S S, JACOBSEN N, FREDERIKSEN A L, et al. Systematic genetic screening in a prospective group of Danish patients with pheochromocytoma[J]. Res Rep Urol, 2017, 27(9): 113-119

[12] 邓建华,李汉忠,纪志刚,等. 琥珀酸脱氢酶B和核增殖指数 MIB 在嗜铬细胞瘤/副神经节瘤中表达的意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2018, 5(39): 529-532

[13] 蒋丽,殷维瑶,刘建,等. EPAS1 基因多态性与藏族运动员的有氧运动能力[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(20): 2957-2963

[14] 中华医学会内分泌学分会肾上腺学组. 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32(3): 181-187

[15] ANGELOUSI A, KASSI E, ZOGRAFOS G, et al. Metastatic pheochromocytoma and paraganglioma[J]. Eur J Clin Invest, 2015, 45(9): 986-997

[16] DHIR M, LI W, HOGG M E, et al. Clinical predictors of malignancy in patients with pheochromocytoma and paraganglioma[J]. Ann Surg Oncol, 2017, 24(12): 3624-3630

[收稿日期] 2020-05-30



欢迎关注本刊微博、微信公众号!