

- 9 Sanchez – Cespedes JS, Marti SM, *et al.* Two chromosomally located qnrB variants, qnrB6 and the new qnrB16 in *citrobacter* spp isolates causing bacteraemia[J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15 (12) :1132 – 1138
- 10 Cattoir V, Nordmann P, Silva – Sanchez J, *et al.* ISEcp1 – mediated transposition of qnrB – like gene in *escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52 (8) :2929 – 2932
- 11 Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, *et al.* Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (2) :801 – 803
- 12 Yue L, Jiang HX, Liao XP, *et al.* Prevalence of plasmid – mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. Vet Microbiol, 2008, 132 (3) :414 – 420
- 13 Torpdahl M, Hammerum AM, Zachariassen C, *et al.* Detection of qnr genes in *salmonella* isolated from humans in Denmark [J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63 (2) :406 – 408
- 14 Wang M, Guo Q, Xu X, *et al.* New plasmid – mediated quinolone resistance gene qnrC found in a clinical isolate of *proteus mirabilis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53 (5) :1892 – 1897
- (收稿:2011 – 11 – 23)
(修回:2011 – 12 – 05)

恶性嗜铬细胞瘤临床病理特征分析及标志物研究

王 宁 蔡菊芳 卢洪胜

摘 要 目的 探讨恶性嗜铬细胞瘤的形态学特征、免疫表型,进一步探讨病理诊断问题。**方法** 分析 15 例恶性嗜铬细胞瘤临床病理资料,对标本行光镜观察、免疫组织组化 EliVision 法染色,并对患者进行 2 ~ 63 个月随访。**结果** ①研究表明,肿瘤大小、梭形细胞类型、含多形细胞、大细胞巢结构在良性与恶性嗜铬细胞瘤中差异有统计学意义 ($P < 0.05$),恶性嗜铬细胞瘤具有体积大、梭形细胞类型常见、含多形细胞明显、常具有大细胞巢结构;②Ki – 67、S – 100、CXCR4、C – erbB2 免疫组化结果显示在良性与恶性嗜铬细胞瘤中表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$),恶性嗜铬细胞瘤具有 Ki – 67 指数高、S – 100 标记支持细胞缺失、CXCR4 与 C – erbB2 标记阳性率高,具有辅助诊断意义。**结论** 肿瘤大小、梭形细胞类型、含多形细胞、大细胞巢结构与嗜铬细胞瘤的生物学行为有关,可作为诊断的标准, Ki – 67 指数高、S – 100 支持细胞缺失可作为辅助诊断指标, CXCR4、C – erbB2 基因可能参与恶性嗜铬细胞瘤的发生发展,联合应用可提高诊断的准确性。

关键词 嗜铬细胞瘤 恶性 病理特征 CXCR4 C – erbB2

Malignant Pheochromocytoma: A Clinicopathologic Analysis and Diagnostic Markers' Study of 15 Cases. Wang Ning, Cai Jufang, Lu Hongsheng. Zhejiang Province Shaoxing People's Hospital/Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To study the morphologic features, immunophenotypes and prognosis of malignant pheochromocytoma, and further study the problem of the pathological diagnosis. **Methods** The clinical and pathologic finding of 15 cases of malignant pheochromocytoma were reviewed. Immunohistochemical assay (Envision staining) was also performed. Follow – up information was available in 10 patients. **Results** ①The pathologic features of tumor size, spindle cell pattern, including pleomorphic cell pattern and large cell nests were differentiated between benign and malignant pheochromocytomas, which were with statistical meaning ($P < 0.05$). Malignant pheochromocytomas, in general, were obviously advantage in large size, spindle cell pattern, including pleomorphic cell pattern and large cell nests' numbers. ②There was a statistically significant relationship between Ki – 67, S – 100, CXCR4 and C – erbB2 staining of the tumor cells and the malignant behavior of the pheochromocytomas ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining of malignant pheochromocytomas showed that Ki – 67 – positive, CXCR4 – positive and C – erbB2 – positive was higher than benign pheochromocytomas, while S – 100 – positive was lower than that. **Conclusion** Tumor size, spindle cell pattern, including pleomorphic cell pattern and large cell nests are significantly associated with tumor behavior. In addition, Ki67 positivity, S – 100 negativity and CXCR4, C – erbB2 expression can be used as immunohistochemical markers for predicting the malignant behavior of pheochromocytomas.

Key words Pheochromocytoma; Malignant; Clinicopathologic; CXCR4; C – erbB2

作者单位:312000 浙江省绍兴市人民医院/浙江大学绍兴医院
(王宁);317000 台州恩泽医疗中心(集团)台州医院(蔡菊芳);
318000 台州恩泽医疗中心(集团)台州市中心医院(卢洪胜)

通讯作者:王宁,电子邮箱:tzdoctor@163.com

嗜铬细胞瘤是来源于肾上腺髓质和肾上腺外嗜铬组织的肿瘤,是继发性高血压的重要病因。目前诊断认为,恶性嗜铬细胞瘤必须有转移,肿瘤本身良恶

性病灶在 B 超,CT 等影像学上的表现没有特异性,组织学和超微结构方面相似,临床表现复杂,常常导致误诊,恶性嗜铬细胞瘤的预后较差,5 年生存率为 40% 左右,目前为止,很难在出现局部浸润或远处转移灶之前作出恶性肾上腺嗜铬细胞瘤的诊断,也不能对其随访做出早期转移的预测,本研究将从临床病理学及分子标志物的角度探讨恶性嗜铬细胞瘤的诊断问题。

材料与方法

1. 材料:1998 年 4 月 ~ 2011 年 4 月绍兴市人民医院、台州医院、台州市中心医院手术收治的恶性嗜铬细胞瘤 15 例(肾上腺 12 例,肾上腺外 3 例),为术中发现有周围淋巴转移(4 例)或通过随访发现术后有转移(11 例)的患者,均行手术或穿刺病理确诊为转移,良性嗜铬细胞瘤 66 例(肾上腺 51 例,肾上腺外 15 例)。标本经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,切片厚 3 ~ 4 μ m。

2. 免疫组织化学染色方法:采用 EnVision 二步法:病理切片常规脱蜡至水,在 pH 为 6.0 的 0.01mol/L 枸橼酸溶液中进行抗原修复,加入一抗,湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜,加 EnVision 复合物室温 30min,DAB 显色,苏木精对比染色、脱水、透明、封固,以 PBS 缓冲液代替第一抗体做阴性对照,已知的阳性组织作为阳性对照。所有抗体均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

3. 随访情况:随访 2 ~ 63 个月,13 例获随访资料。

4. 结果判定方法:S - 100、Ki - 67 细胞核阳性,CXCR4 细胞核和(或)质阳性,C - erbB2 细胞膜和(或)质阳性,Syn、CgA 细胞质阳性,Ki - 67 按阳性细胞占全部肿瘤细胞的百分率进行计数,其余抗体观察 5 个以上高倍镜视野,计数不少于 1000 个细胞中的阳性细胞数,阳性细胞数 < 10% 为阴性, $\geq$ 10% 为阳性。

5. 统计学方法:采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 临床情况:15 例恶性嗜铬细胞瘤,男性 9 例,女性 6 例,年龄 30 ~ 65 岁,中位年龄 47 岁,平均 45.4 岁,发生肾上腺 12 例,膀胱 2 例,左股 1 例,主要临床表现有:头晕、头痛、心悸、胸闷等高血压症状 8 例,血压波动在 150/85 ~ 220/110mmHg 之间,症状及高血压呈持续性,血压波动性升高;腰腹部胀痛不适 4 例;血尿 2 例;头晕、头痛伴股肿块 1 例。术前 CT 检查,15 例均有远处转移伴或不伴周边组织浸润表现,其中 8 例伴有包膜及周边组织浸润,淋巴结转移 3 例,2 例骨转移,2 例肝脏转移(图 1A),1 例肠系膜肠壁转移;7 例包膜完整,其中淋巴结转移 1 例,4 例骨转移,1 例肾脏转移,1 例膀胱种植。

2. 组织形态特点:根据良恶性肿瘤不同组织形态学特征及文献依据,我们选择细胞类型(上皮样、梭形、多形)、组织结构(小巢/梁状、大巢、其他)(图 1B)、包膜浸润、组织坏死、核分裂作为研究切入点,结果表明,肿瘤大小:良性肿瘤 4.80 $\pm$ 2.13cm,恶性肿瘤 7.60 $\pm$ 2.44cm,两者之间具有统计学差异(*t* = 4.47, *P* = 0.000);细胞类型:梭形细胞类型良性 11 例,恶性 7 例,两者具有统计学差异(χ^2 = 4.75, *P* = 0.029),含多形细胞良性 10 例,恶性 10 例,两者具有统计学差异(χ^2 = 14.78, *P* = 0.000);组织结构:大细胞巢结构良性 15 例,恶性 10 例,两者之间具有统计学差异(χ^2 = 5.51, *P* = 0.019);其他参数见表 1,差异无统计学意义。

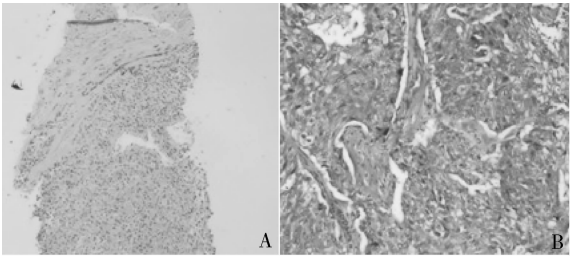


图 1 肾上腺恶性嗜铬细胞瘤病理形态

A. 肝脏转移穿刺组织(HE, $\times$ 100);B. 大细胞巢结构(HE, $\times$ 40)

表 1 良恶性嗜铬细胞瘤临床病理特征

项目	良性	恶性
病人(男性/女性)	66(39/127)	15(9/6)
年龄(岁)	39.40 $\pm$ 8.23	45.40 $\pm$ 8.95
大小(最大径,cm)	4.80 $\pm$ 2.13	7.60 $\pm$ 2.44
细胞类型(<i>n</i>)		
上皮样	55	9
梭形	11	7
多形(含)	10	10
组织结构		
小巢/梁状	47	4
大巢	15	10
其他	4	1
包膜浸润	20	8
肿瘤坏死	0	2
核分裂(>1/10HPF)	0	1

3. 免疫组织化学结果:Ki67 根据 > 5% 为高增殖指数,< 5% 为低增殖指数,良性高增殖指数 3 例,恶性高增殖指数 4 例(图 2),两者具有统计学差异(χ^2 = 5.03, *P* = 0.025);S - 100 标记肿瘤细胞周围支持细胞,良性支持细胞 59 例,恶性支持细胞 1 例(图 3),两者具有统计学差异(χ^2 = 39.35, *P* = 0.000);C - erbB2 标记良性嗜铬细胞瘤 18 例阳性,恶性嗜铬细胞瘤 9 例阳性(图 4),两者具有统计学差异(χ^2 =

5.89, $P = 0.015$); CXCR4 标记良性嗜铬细胞瘤 12 例阳性, 恶性嗜铬细胞瘤 7 例阳性(图 5), 两者具有统计学差异($\chi^2 = 4.05$, $P = 0.044$)。

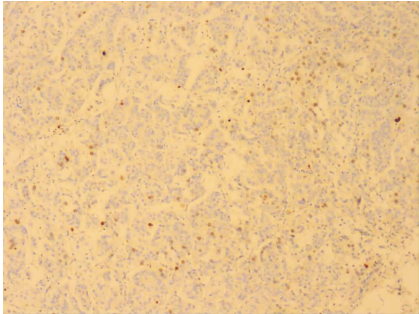


图 2 Ki-67 在恶性嗜铬细胞瘤细胞核中表达 ($>5\%$) (HE, $\times 100$)

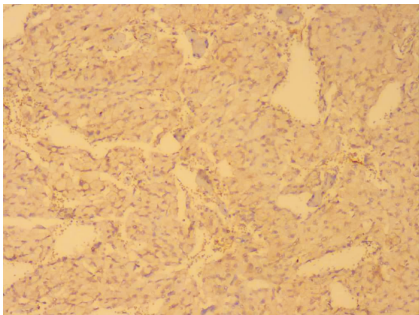


图 3 恶性嗜铬细胞瘤中缺乏支持细胞 S-100 不表达 (HE, $\times 100$)

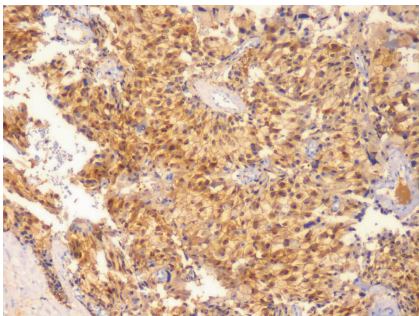


图 4 CXCR4 在恶性嗜铬细胞瘤细胞核中强阳性表达 (EnVision 二步法, $\times 100$)

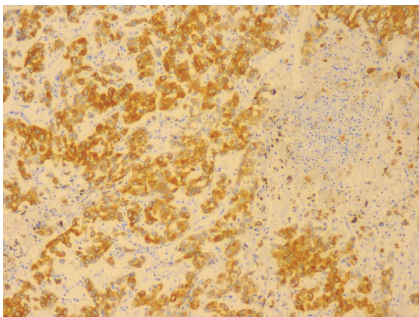


图 5 C-erbB2 在恶性嗜铬细胞瘤胞质、胞膜中强阳性表达 (EnVision 二步法, $\times 100$)

表 2 良恶性嗜铬细胞瘤免疫组化结果

项目	良性			恶性		
	阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)
Ki67 ($\geq 5+$, $< 5-$)	3	63	4.5	4	12	25.0
S-100 (支持细胞)	59	7	89.4	1	14	6.7
C-erbB2	18	48	27.3	9	6	60.0
CXCR4	12	54	18.2	7	8	46.7

4. 随访结果: 13 例恶性嗜铬细胞瘤获得随访结果, 3 例患者确诊转移后失访, 余 10 例随访时间分别 2~63 个月, 其中 3 例肾上腺嗜铬细胞瘤分别于 13 个月、22 个月、29 个月死于椎骨转移, 1 例 21 个月死于肝脏转移; 1 例 9 个月膀胱种植, 1 例 13 个月肾脏转移经二次手术存活, 余 4 例转移患者仍存活。

讨 论

恶性嗜铬细胞瘤临床上较为罕见, 在原发的肾上腺嗜铬细胞瘤中占 13%~29%, 在肾上腺外的比例高达 43%, 恶性嗜铬细胞瘤表现为, 在第一次手术时出现淋巴结、骨骼或内脏转移, 或第一次手术经过一段时间后, 出现原位复发或其他部位转移^[1]。对嗜铬细胞瘤生物学行为的判断一直是临床医生及病理诊断的难点, 原因主要是良恶性嗜铬细胞瘤在临床上及组织学上没有明确的鉴别点, 由于诊断标准对早期恶性嗜铬细胞瘤的诊断及嗜铬细胞瘤术后随访几无价值, 因此, 有必要讨论新的诊断途径。

目前有文献报道肿瘤大小与恶性嗜铬细胞瘤有关, Brown 等认为与 Ki-67 指数有关, 另外也有一些大样本侧重于形态学方面的研究, 表明肿瘤坏死与恶性有关, Thompson 曾提出肾上腺嗜铬细胞瘤 PASS 评分, 但该评分系统过于复杂, 且临床符合度不高, 因此没有推广应用^[2-4]。本组研究选择了国外报道及 Thompson 分类系统中的一些指标, 重点分类观察后发现, 恶性嗜铬细胞瘤与肿瘤大小、梭形细胞类型、含多形细胞、大细胞巢结构关系非常密切, 而国外报道的其他一些结构、包膜浸润、坏死、核分裂, 笔者并没有发现相关性, 传统的观点认为, 包膜浸润是恶性诊断的标准之一, 这在其他内分泌肿瘤诊断中具有重要地位, 如甲状腺滤泡癌诊断的标准就是包膜浸润, 而在嗜铬细胞瘤中良性病例也可出现浸润, 这是一个重要发现, 由于肿瘤性坏死与核分裂出现概率较少, 与文献报道不一致可能与本文的样本量少有关^[5]。近年来, Ki-67 检测变得越来越重要, 尤其在内分泌肿瘤, 在嗜铬细胞瘤中, Ki-67 与恶性程度呈明显相关性, 这和之前报道的完全一致, S-100 蛋白标志支持

细胞,理论研究表明恶性嗜铬细胞瘤支持细胞缺失,我们研究后发现恶性和良性均存在支持细胞缺失,但恶性缺少比较明显,可以解释为支持细胞缺失在良性转化的过程中出现。

C - erbB2 基因是人类肿瘤中发生改变频率最高的原癌基因之一,在细胞增殖、分化的调控中起重要作用^[6]。最初国外学者进行嗜铬细胞瘤的免疫组化研究发现 C - erbB2 高表达与家族性嗜铬细胞瘤相关,并发现 C - erbB2 阳性率与肿瘤发展、侵袭和远处转移密切相关^[7]。最近 C - erbB2 基因在嗜铬细胞瘤中研究存在争议,Castilla - Guerra 等^[8]认为 C - erbB2 基因表达与肿瘤行为有关,表达越高,恶性可能越大,相反,Gupta 等^[9]认为 C - erbB2 过表达并不能说明良恶性,本研究发现良恶性嗜铬细胞瘤中 C - erbB2 表达分别为 21.0%、47.4%,两者之间具有统计学差异。

肿瘤血管形成是恶性肿瘤发生、发展、转移和浸润的重要前提,越来越多的研究证明血管生成在肿瘤生长和转移过程中的重要作用,现已在多种恶性肿瘤中证明基质细胞衍生因子 1(SDF-1)/CXCR4 对肿瘤细胞生长、浸润和转移起关键性作用,封闭 CXCR4 能有效地抑制肿瘤细胞的生长和转移,CXCR4 在 23 种不同类型肿瘤中均有表达,是肿瘤细胞表达最为普遍的趋化因子受体,并且和患者的预后相关^[10-12]。目前 CXCR4 在嗜铬细胞瘤当中的研究还未见相关报道,本研究发现,恶性、良恶性嗜铬细胞瘤中 CXCR4 表达分别为 25.8%、57.9%,具有统计学差异。以上 C - erbB2、CXCR4 基因表达差异性为我们鉴别诊断提供了机会,以上结果还提示,CXCR4 与 C - erbB2 均参与了嗜铬细胞瘤的发生与发展,但具体机制如何,需要研究进一步深入。

综上所述,肿瘤转移仍是诊断恶性嗜铬细胞瘤的金标准,但如果肿瘤体积较大,术后病理形态出现梭形细胞类型、含多形细胞、大细胞巢结构,我们就要考虑恶性的可能性,需要进行 Ki - 67、S - 100、CXCR4、C - erbB2 免疫组化检测,如 Ki - 67 指数较高、S - 100 蛋白支持细胞缺失、CXCR4 与 C - erbB2 表达阳性率较高,则要做出倾向恶性诊断,进一步做全身骨扫描和影像学检查,并密切随访,必要时进行预防性的治疗。根据本组随访结果显示,死亡数为 5/10 例,由于统计量较少,不能做出病死率统计,文献报道 5

年生存率为 40% 左右,结果需引起对恶性嗜铬细胞瘤高度重视^[13]。

参考文献

- 1 Harari A, Inabnet WB. Malignant pheochromocytoma: a review[J]. American Journal of Surgery, 2011, 201(5): 700 - 708
- 2 Van der Harst E, Bruining HA, Bonjer HJ, *et al.* Proliferative index in pheochromocytomas; does it predict the occurrence of metastases? [J]. J Pathol, 2000, 191(2): 175 - 180
- 3 Brown HM, Komorowski RA, Wilson SD, *et al.* Predicting metastasis of pheochromocytomas using DNA cytometry and immunohistochemical markers of cell proliferation, a positive correlation between MIB - 1 staining and malignant tumor behavior[J]. Cancer, 1999, 86(8): 1583 - 1589
- 4 Thompson LD. Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms. A clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases[J]. Am J Surg Pathol, 2002, 26(5): 551 - 566
- 5 Tischler AS. Pheochromocytoma and extra - adrenal paraganglioma: updates[J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(8): 1272 - 1284
- 6 San Miguel Fraile P, Dos Santos JE, Pelaez Boismorand E, *et al.* Expression of the cerbB - 2 (HER - 2/neu) oncoprotein in prostatic adenocarcinoma[J]. Actas Urol Esp, 2005, 29(1): 64 - 69
- 7 Evers BM, Rády PL, Tying SK, *et al.* Amplification of the HER - 2/neu protooncogene in human endocrine tumors[J]. Surgery, 1992, 112(2): 211 - 217
- 8 Castilla - Guerra L, Moreno AM, Fernández - Moreno MC, *et al.* Expression and prognostic value of c - erbB - 2 oncogene product in human pheochromocytomas[J]. Histopathology, 1997, 31(2): 144 - 149
- 9 Gupta D, Shidham V, Holden J, *et al.* Prognostic value of immunohistochemical expression of topoisomerase alpha II, MIB - 1, p53, E - Cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER - 2/neu in adrenal and extra - adrenal pheochromocytomas[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2000, 8(4): 267 - 274
- 10 Su LP, Zhang JP, Xu HB, *et al.* Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non - small lung cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(10): 8273 - 8280
- 11 Schrader A, Lechner O, Templin M, *et al.* CXCR4/CXCL12 expression and signaling in kidney cancer[J]. Br J Cancer, 2002, 86(8): 1250 - 1256
- 12 Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, *et al.* T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti - metastatic agents in the treatment of breast cancer[J]. FEBS Lett, 2003, 550(1 - 3): 79 - 83
- 13 Strong VE, Kennedy T, Al - Ahmadi H, *et al.* Prognostic indicators of malignancy in adrenal pheochromocytomas: clinical, histopathologic, and cell cycle/apoptosis gene expression analysis[J]. Surgery, 2008, 143(6): 759 - 768

(收稿: 2011 - 11 - 14)