

免疫组化在原发性和转移性卵巢黏液性肿瘤鉴别诊断中的应用

本文由江苏省南京军区南京总医院病理科 周晓军教授 校译

摘要

卵巢原发性和转移性黏液性肿瘤的鉴别比较困难，多数情况可通过肉眼和镜下观察并结合疾病的分布情况来鉴别，而某些疑难情况则需要借助免疫组化的帮助。本文将探讨免疫标记物在鉴别二者中的作用。常见的原发部位包括来自结直肠、阑尾、胰腺、胆道、胃和宫颈。原发性卵巢黏液性肿瘤和转移性胃肠道黏液性癌之间存在部分免疫表型的重叠，尤其是上胃肠型，这是因为大多数原发性卵巢黏液性癌和交界性肿瘤具有所谓的肠道内或肠道表征，会表现出一定程度的肠道标记物阳性，而卵巢Müller型与肠型黏液性肿瘤在免疫表型上则差异明显。

引言

原发性卵巢黏液性癌是除浆液性癌外最常见的原发性卵巢癌，近期研究表明其发病率仅占卵巢原发恶性上皮性肿瘤的3%。早期和新近的研究中关于发病率的情况存在一些差异，这可能是用于诊断（在鉴别范围上限的）黏液性交界性肿瘤和伴有膨胀性浸润生长的高分化黏液性癌的标准不同。发病率下降的主要原因在于以往很多转移性黏液性癌可能被误诊为原发性肿瘤；尽管临床、肉眼和镜下特点会提示转移（此点仍尚在讨论）。需要指出

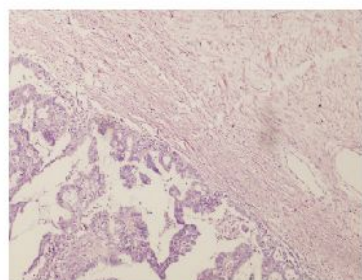
的是，当卵巢中可见显著的成熟效应和一些继发黏液性癌时，转移性黏液性癌仍有时被误诊为原发性黏液性癌或黏液性交界性肿瘤。但作者认为目前有夸大转移性黏液性癌可能性的倾向，即便其病理特点具有明显原发性卵巢肿瘤的特点。多数病例是可以透过肉眼和镜下特点并结合疾病的分布情况来鉴别的。目前被诊断为卵巢黏液性癌后，需行进一步检查，如结肠镜和上腹部的影像学检查，以排除其他部位的转移。但我认为这是不必要的，多数病例通过基本的病理学检查就可以达到鉴别目的。

卵巢转移性肿瘤拥有大量的原发部位，本文中探讨的主要是伴有丰富的胞浆内黏液的转移性腺癌，也称之为黏液性腺癌。转移癌通常不包含显著的胞浆内黏液，如乳腺癌，就不在本文讨论范围之内。卵巢转移性黏液性腺癌拥有大量的原发部位，主要包括结直肠、胰腺、胆道、阑尾、胃和宫颈。如果肿瘤的原发部位不明，推断来源于卵巢或其他部位就主要依靠形态学特征，如本篇其余章节所讨论的一样。而免疫组化这时可以提供较大帮助（表1），有助于确定弥散性黏液性癌的原发部位。大多数原发性黏液性癌常为单侧发生且处于I期（病变局限于卵巢），因此女性的弥散性黏液性癌不太可能原发于卵巢。

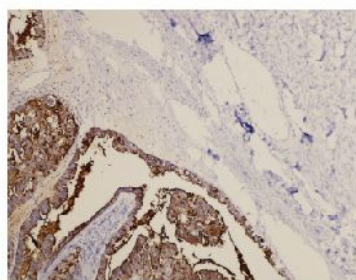
表1.不同器官黏液性癌的常见免疫表型

	CK7	CK20	CEA	CA19.9	CDX2	CA125	ER	DPC4	P16
卵巢肠型	D 或 F	F 或 D	F 或 D	D	F	N	N	D	N
卵巢Müller型	D	N	N	N 或 F	N	D	D	D	N
结肠（含阑尾）	N*	D	D	D	D	N	N	D	N 或 F
胰腺	D 或 F	N 或 F	D 或 F	D	F	F 或 D	N	D 或 N	N
胆道	D 或 F	N 或 F	D 或 F	D	F	F 或 D	N	D 或 N	N
胃	D 或 F	N 或 F	D 或 F	D	F	N	N	D	N
宫颈	D	N 或 F	D 或 F	N	N 或 F	D	N 或 F	D	D+

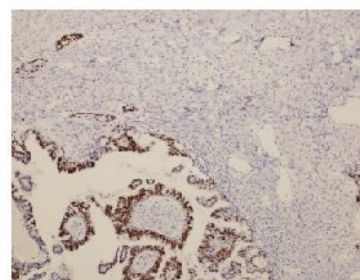
这些代表了最经典的免疫模式，但是个别肿瘤可能出现异常染色
*直肠腺癌可能为CK7阳性
+非HPV相关的宫颈腺癌可能为p16阴性
CEA, 癌胚抗原; D, 弥漫阳性; ER, 雌激素受体; F, 局灶阳性; HPV, 人乳头状瘤病毒; N, 阴性。



卵巢粘液腺癌HE染色



卵巢粘液腺癌CA125染色，胞质阳性



卵巢粘液腺癌ER染色，胞核阳性

需要强调的是，大多数原发性卵巢黏液性癌（和交界性肿瘤）都具有所谓的肠道内或肠道表征（后文讨论）。这些肠型肿瘤几乎都为ER、PR、WT1及CA125阴性。激素受体阴性意味着ER和PR在鉴别原发性和继发性卵巢黏液性肿瘤方面不具有价值。新近的研究发现部分原发性卵巢黏液性肿瘤过表达HER2并呈现出HER2基因的扩增，同时研究发现少数复发性卵巢黏液性癌对曲妥单抗治疗有反应，这种情况下的靶向治疗价值有待今后进一步的研究。

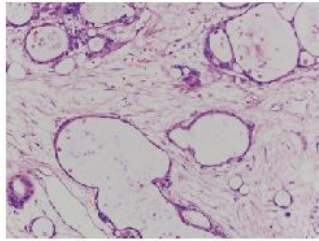
转移性结肠腺癌

免疫组化在鉴别卵巢原发性和转移性黏液性癌中最明确的作用是有助于证实或排除结肠癌的转移。然而，多数卵巢的转移性结肠腺癌，尽管含有一些胞浆内粘蛋白，但没有明显的粘液，更像原发性卵巢巢子宫内腺癌，而不是黏液性癌，称之为具有伪子宫内腺样外

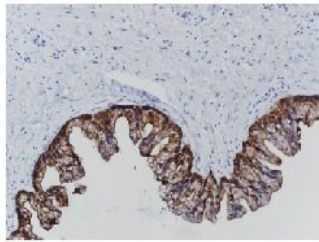
呈CK20、CEA和CDX2弥漫阳性，CK7、CA125和ER为阴性。CEA的染色有时较难解释，因为可能存在坏死物质和炎症细胞的着色，从而影响肿瘤细胞着色的评估。

在鉴别原发性卵巢黏液性肿瘤（交界性肿瘤或癌）和伴有明显的黏液外观的转移性结肠腺癌时，免疫组化的作用有限。如前所述，多数原发性卵巢黏液性癌和交界性肿瘤具有肠内或肠道特征。它们通常表达肠道标记物，如CK20、CEA、CA19.9和CDX2，其中CA19.9往往呈弥漫阳性，而CK20、CEA和CDX2则多呈局灶阳性，个别病例由于反应重叠可能呈阴性或弥漫阳性。这些标记物阳性可能反映了在原发性卵巢黏液性肿瘤患者血清中CEA及CA19.9的升高。研究表明，原发性卵巢肠型黏液性肿瘤患者血清中CA19.9可能会大量升高，但这在预测卵巢黏液性肿瘤是良性、交界性还是恶性上是却并无太大帮助。有用的是，原发性卵巢肠型黏液性肿瘤往往呈CK7弥漫阳性，尽管也可能表达肠道表型。因此，CK7和CK20的染色分布情况比绝对阳性或阴性染色结果更重要。虽然大多数的结肠癌，包括这些伴有明显的黏液外观的，常为CK7阴性或局灶阳性，但应明确的是，直肠比大肠内其它部位更易表达CK7阳性，这是一个潜在的陷阱。研究发现，74%的直肠腺癌表达CK7阳性，分化越差的结直肠腺癌可能表现出一定程度的CK7阳性和异常染色。综上所述，免疫组化尽管有助于鉴别，但原发性卵巢黏液性癌、肠型交界性肿瘤和伴有黏液的结直肠腺癌仍存在部分免疫表型的重叠。

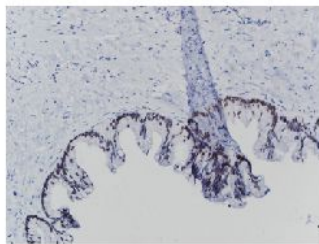
已证实一些其它的标记物如villin、 α -甲酰辅酶A消旋酶、meprin α 、鸟苷酸环化酶C、MUC2、二肽酶1和 β -catenin相较于原发性



结肠高分化癌卵巢转移HE染色

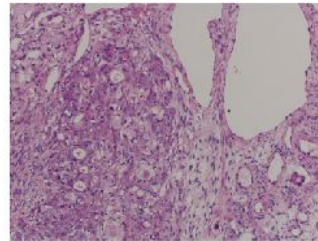


结肠高分化癌卵巢转移villin染色，胞质阳性

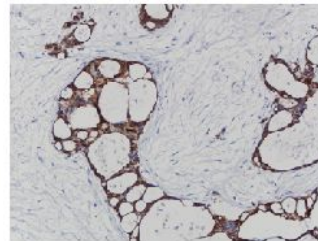


结肠高分化癌卵巢转移CDX-2染色，胞核阳性

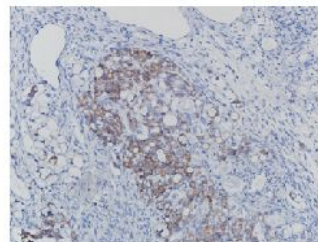
观。原发性卵巢巢子宫内腺样腺癌的三个特征是：出现腺纤维瘤的生长模式、鳞状结构和子宫内腺异位症。转移性结肠腺癌的特征是存在污秽性或节段性坏死，没有上述的三个特征，与子宫内腺样腺癌相比，细胞核和腺体的异型性更明显。然而，这仍然可能存在形态学的重叠，在这种情况下，角蛋白（CK7和CK20）、CA125、ER、CEA、CDX2就可以起到鉴别作用。原发性卵巢巢子宫内腺样腺癌通常呈CK7、CA125和ER弥漫阳性，而CK20、CEA和CDX2阴性（一些原发性卵巢巢子宫内腺样腺癌可呈现出CDX2局灶核阳性，伴广泛鳞化则呈弥漫阳性）。与此相反，伴有伪子宫内腺样外观的转移性结肠腺癌通常



结肠低分化癌卵巢转移 HE染色



结肠低分化癌卵巢转移villin染色，胞质阳性



结肠低分化癌卵巢转移CEA染色，胞质阳性

卵巢癌更易在结肠癌中表达。在基因表达分析后选用部分标记作免疫组化染色发现, 相较卵巢黏液性腺癌, 它们在结肠癌中的表达是不受约束的。然而, 鉴于原发性卵巢黏液性肿瘤中存在肠型, 可能存在相当大的免疫表型重叠, 而且这些标记大多没有得到广泛应用, 因此在单个病例中并没有鉴别意义。一项原发性卵巢黏液性癌和转移性结肠癌的研究显示, 83%的转移性结肠癌呈现出 β -catenin核阳性, 而原发性卵巢黏液性癌仅9%阳性。应当指出的是, 由于 β -catenin基因突变, 卵巢子宫内膜样腺癌可能会表现出 β -catenin核阳性, 尤其是伴有广泛鳞化的。

一些原发性卵巢黏液性肿瘤起源于畸胎瘤且呈现出明显的肠道表型

少数原发性卵巢肠型黏液性肿瘤起源于畸胎瘤。尽管镜下可以看到的畸胎成分, 但在某些病例中它们会被黏液覆盖。这些肿瘤中部分表现出与原发性卵巢肠型黏液性肿瘤相似的免疫表型, 即CK7和CA19.9弥漫阳性和CK20、CEA和CDX2局灶阳性(这可能代表上胃肠型黏液性肿瘤起源于畸胎瘤), 其它则表现出明显的肠型免疫表型: CK7阴性以及CK20、CEA和CDX2弥漫阳性。

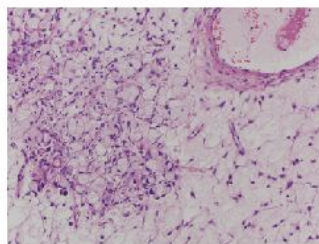
转移性阑尾肿瘤

免疫组化可用来明确阑尾是多数腹膜假黏液瘤(PMP)的原发部位, 阑尾的低级别粘液细胞、卵巢、大网膜和腹膜病变表达肠道标记物CK20、CEA、CDX2和MUC2, 而CK7通常阴性。一个例外是起源于畸胎瘤的原发性卵巢黏液性肿瘤, 表现出明显的肠道表型, 这些大的低级别肠型黏液上皮细胞, 可能继发成PMP。

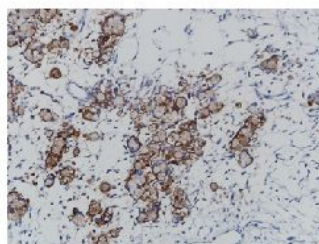
超出PMP范围, 卵巢内转移性阑尾腺癌可能由印戒细胞和小黏液腺组成, 更类似于转移性胃腺癌, 而不是常见的结肠腺癌。从作者的经验来看, 对这样的形态, 阑尾通常不是原发部位, 这时免疫组化是有帮助的, 如果CK20、CEA和CDX2弥漫阳性, CK7阴性, 则提示是转移性阑尾腺癌, 而不是胃腺癌。

转移性胰腺癌、胆管癌和胃腺癌

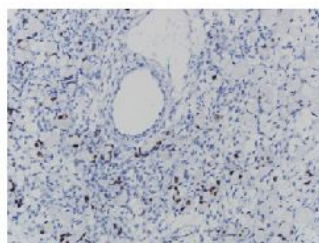
比较少见和疑难的是, 卵巢中转移性胰腺癌或胆道黏液性肿瘤和原发性卵巢黏液性癌或交界性肿瘤间的鉴别。胰腺癌和胆管癌由于免疫表型相似放在一起讨论。原发性卵巢肠型黏液性肿瘤和转移性胰腺癌或胆管癌之间有更多的免疫表型重叠, 通常为CK7和CA19.9弥漫阳性, 以及CK20、CEA和CDX2阴性、弥漫或局灶阳性。令人困惑的是, 目前是否存在可靠的免疫标记物来鉴别原发性肠型黏液性肿瘤和转移性胆道黏液性癌, 因为前者在组织化学、免疫组化和超微结构研究方面, 已经证实含有胰腺、胆道或胃型粘蛋白(尤其是胃型), 这些粘蛋白统称为胃肠型粘蛋白。然而, 一些标记物还是有用的, 胰腺癌和胆管癌常为CA125阳性, 而多数原发性卵巢肠型黏液性肿瘤为阴性或局灶阳性。因此, 黏液性肿瘤中CA125的明显着色不认为是原发性卵巢癌(只有一个例外: Müller型原发性卵巢黏液性肿瘤可能为CA125阳性, 后文讨论), 而是更符合胰腺癌或胆管癌。然而, 我们最近发现一个不寻常的现象, 即复发性或转移性卵巢肠型黏液性癌可能表达CA125阳性, 即使原发肿瘤为阴性。如前所述, 肠型黏液性肿瘤几乎总呈ER、PR和WT1阴性, 胰腺癌和胆道腺癌也通常呈阴性, 少数胰腺癌出现PR局灶阳性。



胃印戒细胞癌卵巢转移HE染色



胃印戒细胞癌卵巢转移CEA染色, 胞质阳性



胃印戒细胞癌卵巢转移CDX-2染色, 胞核阳性

黏液性癌通常存在PR胞浆的非特异性着色, 在低倍视野下, 可能会被误判为阳性, 因此需要在高倍视野下确认细胞核为阴性。鉴别原发性卵巢肠型黏液性肿瘤和胰腺癌或胆道腺癌的一个可能有用的标记是DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma 4, 也称为MADH4或SMAD4), 它在原发性卵巢黏液性肿瘤中几乎全部阳性, 而在大约50%的胰腺癌和一些胆道腺癌中为阴性。这是因为这个抑制基因在约50%的胰腺癌和某些胆道腺癌的18q染色体上存在等位基因的缺失, 而DPC4并没有被广泛使用。其它标记物如间皮素(mesothelin)、fascin和PSA更容易在胰腺癌而不在卵巢黏液性癌中表达, 但仍有部分表型重叠, 也未得到广泛应用。

其它上消化道癌, 如胃癌转移到卵巢时, 常包含印戒细胞和明确的形态学特征, 多数情况下不易与原发性卵巢黏液性肿瘤混淆。胃癌在CK7、CK20、CA19.9、CEA、CA125和CDX2的免疫表型上类似于胰腺癌和胆道腺癌。

转移性宫颈腺癌

卵巢转移性宫颈腺癌可能与交界性或恶性的原发性卵巢黏液性癌或子宫内膜样肿瘤混淆; 在这种情况下, 宫颈原发灶可能会很小或甚至看不到浸润。由于HPV的存在, 多数宫颈腺癌p16弥漫阳性, 而原发性卵巢黏液性和子宫内膜样肿瘤为阴性或局灶阳性。HPV分子生物学研究(PCR或原位杂交)比p16免疫组化更有用, HPV更具明确宫颈原发的价值。然而, 形态特殊的原发性宫颈腺癌, 如伴有黏液的恶性腺癌, 可能为HPV阴性。ER和CEA有助于原发性卵巢子宫内膜样肿瘤和转移性宫颈腺癌之间的鉴别, 原发性卵巢子宫内膜样肿

瘤通常为ER阳性和CEA阴性，而转移性宫颈腺癌反之。但它们对鉴别原发性卵巢肠型黏液性肿瘤和转移性宫颈腺癌无益，它们通常都为ER阴性和CEA阳性。

原发性卵巢Müller型黏液性肿瘤的免疫表型

以上关于原发性卵巢黏液性肿瘤的免疫表型的讨论仅局限于肠型或肠道内型和最常见的原发性和交界性黏液性肿瘤。Müller或宫颈内膜型也有，交界性比较少见，而癌则更罕见。目前卵巢Müller黏液性肿瘤的免疫表型还没有得到广泛研究，研究主要集中在交界性肿瘤，但肠型和Müller型黏液性肿瘤之间免疫表型存在显著差异，两者都呈CK7弥漫阳性，如前所述，肠型肿瘤仅少数病例局灶阳性或阴性。肠型肿瘤通常表达局灶性或弥漫性的肠道标记，如CK20、CEA、CA19.9和CDX2，而Müller型黏液性肿瘤常为阴性（虽然可能呈CA19.9和鳞状成分阳性，而这些也存在于肿瘤中，也可能CEA阳性），通常它表达苗勒氏管标志阳性，如CA125、ER和PR，而WT1则为阴性，肠型黏液性肿瘤中CA125、ER和PR常为阴性。一项研究中描述了储备细胞样细胞，形态类似宫颈储备细胞，存在于Müller型黏液性交界性肿瘤中，这些细胞常为P63、34βE12和CK17阳性。

免疫组化问与答——技术篇

Q: CK7和CK20在迈新公司的产品说明书中建议用胃酶进行抗原修复，可是我们现在这里没有这个条件进行胃酶修复，是否能够使用EDTA高温修复来替代？

A: 从石善溶教授发现抗原修复（AR）技术以来，其根本原理尚未被完全揭晓，通常情况下某个抗原的最佳暴露条件是根据实验结果来进行建议。我们在多种抗原修复（热、酶修复和不修复）的条件下用CK7和CK20在多肿瘤组织芯片下进行免疫组化实验，结果显示：EDTA等其他抗原修复条件下，CK7和CK20可以表达，但胃酶修复条件下表达率最高，所以我们的建议是胃酶修复。因此，在不具备胃酶修复条件的情况下，CK7和CK20也可以使用EDTA热修复，但有可能敏感性会比胃酶修复低。

Q: 迈新公司现有一抗能否做免疫荧光实验？

A: 可以使用，免疫荧光实验（IF）同免疫组化实验（IHC）类似，只是所用的显色物不同所以结果观测条件也不同而已。不管是IF还是IHC，因为敏感性问题都已经不大使用直接法——即在抗体末端直接标记荧光或色原的实验方式，现一般采用具有放大效应的间接法进行实验——即先用抗体同抗原结合，再用检测放大系统（有人称为二抗的物质，对一抗有链接放大作用），如果是IF实验，通常人们是在检测放大系统的末端标记有荧光束。所以未做标记、可同抗原结合的一抗可以进行免疫荧光实验。

Q: 在免疫组化实验中是否一定要使用非免疫血清进行封闭？

A: 不一定，主要要看抗体是使用何种稀释液。如果用pbs作为

稀释液对浓缩抗体进行稀释，恐组织片上的电荷对抗体会有吸附作用，所以建议使用非免疫血清进行封闭；如果是即用型抗体，用TBS或牛血清作为稀释液的抗体，其抗体被吸附的几率极低，所以在染色步骤中可以不再使用非免疫血清进行封闭。

Q: 准备进行狗组织免疫组化实验，一抗是鼠抗狗抗体，请问要如何选择检测放大系统（二抗）？

A: 检测放大系统的原则是：1.对一抗有链接放大能力；2.检测放大系统中的各种成份不能和受测组织有交叉反应。基于这两个原则，我们产品中所有抗鼠的检测放大系统都适用，但是为了防止非生物素造成的假阳性，建议使用聚合物法的抗鼠检测放大系统。



本期涉及抗体的相关信息

抗体名称	迈新产品编号	克隆号
CK7	MAB-0166	OV-TL 12/30
CK17	MAB-0181	E3
CK20	MAB-0057	Ks20.8
CEA	Kit-0008-2	Co1-1
CA19.9	MAB-0005	TA888
CDX2	RMA-0631	EPR2746Y
CA125	MAB-0007	TA347
ER	Kit-0012-2	SP1
P16	MAB-0673	MX007
P63	MAB-0365	4A4

抗体名称	迈新产品编号	克隆号
WT1	MAB-0277	WT49
PR	Kit-0013-2	SP2
C-erbB-2	RMA-0555	SP3
Villin	MAB-0540	CWMB1
AMACR/p504s	RMA-0546	13H4
Mucin-2 Glycoprotein	MAB-0075	M53
β-catenin	MAB-0259	CAT-5H10
Fascin	MAB-0228	FCN01
PSA	MAB-0146	ER-PR8
Cytokeratin(HMW)	MAB-0052	34βE12