

外阴、阴道和尿道原发黑色素瘤的基因突变谱： 聚焦于肿瘤原发部位的37个病例回顾性研究

Shabnam Zarei, M.D., Jesse S. Voss, M.D. C.T. (A.S.C.P.), Long Jin, M.D., Sarah M. Jenkins, M.S., Alan H. Bryce, M.D., Lori A. Erickson, M.D., Debra A. Bell, M.D., Benjamin R. Kipp, Ph.D., and Thomas J. Flotte, M.D.

关键词：外阴黑色素瘤-黏膜黑色素瘤-突变-分期

(IJGP.2020 Nov.;39(6):587-594)

摘要：女性生殖道黑色素瘤是一种罕见且预后差的肿瘤。**BRAF-V600E** 是日光暴露部位皮肤黑色素瘤中最常见的致病突变，黏膜和肛门生殖器黑色素瘤通常缺乏 **BRAF** 突变而具有 **KIT** 改变。美国癌症分期联合委员会指南 (AJCC 第八版) 推荐使用皮肤黑色素瘤分期标准对外阴黑色素瘤进行分期，但未对阴道黑色素瘤分期给予建议。本研究分析了 37 例女性下生殖道不同解剖部位 (有毛发外阴皮肤、无毛发外阴皮肤、阴道和尿道) 的侵袭性黑色素瘤的基因突变情况。在本研究中我们所采用的是一个基于 DNA 水平的包含黑色素瘤中最常见发生突变的 21 个基因及其突变热点的二代测序套餐。下生殖道侵袭性黑色素瘤最常见的基因改变是 **KIT** (32%)、**TP53** (22%) 和 **NF1** (19%)。66% (21/32) 的病例显示出至少一个 MAPK 通路基因的致病性突变。不同部位和致癌突变率之间无统计学差异，其基因突变状态也无显著差异。只有 1 例尿道黑色素瘤显示 **BRAF** 非 **V600E** 突变 (D594G)。我们的研究结果显示，无论其原发部位在哪里，女性下生殖道黑色素瘤均具有相似的分子发病机制和总生存期。黑色素瘤分类应考虑将外阴黑色素瘤归入黏膜型而非皮肤黑色素瘤中。

黑色素瘤是起源于皮肤、口咽黏膜、胃肠、葡萄膜、泌尿道和肛门外生殖器的黑色素细胞的恶性肿瘤。女性下生殖道黑色素瘤占有黑色素瘤的不足 3%，占有外阴肿瘤的 5%-10%^[1]。最常见的发生部位为大阴唇、小阴唇和阴道。虽然对女性下生殖道的解剖学没有充分认识，但显微镜下大阴唇的特征是具有毛囊和皮脂腺，而小阴唇 (外阴无毛皮肤) 有皮脂腺无毛囊，两者向中间和后中线相互移行，直至大阴唇达到 Hart 线^[2]。由于诊断较晚和常规治疗无效，外阴阴道黑色素瘤 (vulvar vaginal melanoma, VVM) 常可致命。多见于 60 岁年龄组，比日光暴露相关皮肤黑色素瘤晚 10 年。外阴和阴道的黑色素瘤 5 年生存率分别为 58% 和 27%^[3]。研究显示黏膜黑色素瘤与皮肤黑色素瘤具有不同的分子特征，前者缺乏 **BRAF V600** 激活突变而具有 **KIT** 基因改变^[4]。伴有 **CDKN2A** 缺失的家族性黑色素细胞肿瘤，就是家族性非典型性痣黑色素瘤综合征，也有报道^[5]。其它家族性黑色素瘤包括 **BRCA1** 相关蛋白 (**BAP1**) 胚系突变的黑色素瘤^[6]。早期黑色素瘤主要是手术治疗，晚期的黑色素瘤则需手术或放疗、化疗、免疫治疗联合治疗。FDA 已批准的 **BRAF** 靶向治疗临床试验，如维莫非尼正在用于皮肤黑色素瘤患者^[7] (www.clinicaltrials.gov)。不同病例报道显示，**KIT** 基因在外阴阴道黑色素瘤突变率 30%-44%，在口腔和头颈部黏膜黑色素瘤突变率 8.3%-12%^[8, 9]。黏膜黑色素瘤的总体突变率为 25%，甲磺酸伊马替尼靶向治疗进展期不可切除的肢端和黏膜黑色素瘤正处于临床试验阶段^[10]。目前 FDA 还没批准 **KIT** 或 **BRAF V600E** 靶向药治疗外阴或阴道黑色素瘤的临床试验；然而，这类患者可能入组其它非妇科黏膜黑色素瘤的临床试验。多个研究 VVMs 分子改变的单中心和多中心实验^[11-16] 均未能找到不同部位 (有毛发外阴皮肤、无毛发外阴皮肤和阴道) 黑色素瘤之间的分子差异。由于超过一半的黏膜黑色素瘤 (> 55%) 发生在头

From the Department of Pathology and Laboratory Medicine, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio (S.Z.); Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic (J.S.V., L.J., L.A.E., D.A.B., B.R.K., T.J.F.); Department of Health Sciences Research, Division of Biomedical Statistics and Informatics, Mayo Clinic (S.M.J.), Rochester, Minnesota; and Department of Internal Medicine, Division of Hematology/Oncology, Mayo Clinic, Phoenix, Arizona (A.H.B.).

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence and reprint requests to Thomas J. Flotte, MD, Hilton 11-04, Mayo Clinic, 200 First Street SW, Rochester, MN 55905. E-mail: flotte.thomas@mayo.edu.

颈部, 先前 AJCC (第七版) 推荐头颈部黏膜黑色素瘤分期系统适用所有黏膜黑色素瘤, 包括阴道黑色素瘤^[17]。新版 AJCC 分期指南 (第 8 版) 推荐外阴黑色素瘤分期参考皮肤黑色素瘤分期系统, 而对阴道黑色素瘤分期没有给以建议^[18]。本研究中, 我们运用二代测序技术检测黑色素瘤中常见的 21 个致癌基因和抑癌基因, 分析了 37 例外阴、阴道和尿道黑色素瘤的基因改变, 以期发现不同部位 (有毛发外阴皮肤、无毛发外阴皮肤、阴道) 黑色素瘤的基因差异, 以及与患者总生存期的差异。本研究旨在明确原发部位明确的黏膜黑色素瘤与皮肤黑色素瘤分子改变的差异。

材料和方法

经机构审查委员会 (Institutional Review Board, IRB) 批准, 对梅奥诊所 2006-2016 年确诊的 109 例外阴、阴道、尿道或直肠黏膜侵袭性黑色素瘤患者进行了复习, 并选择 45 例有首次就诊资料的患者。通过临床记录、手术记录和术前临床照片来确定原发肿瘤的部位。并复阅原发性肿瘤手术切除后的 H&E 切片, 通过识别组织学特征 (毛囊和皮脂腺) 来确认原发肿瘤的部位。

共 37 例有充足肿瘤含量百分比病例进行了分子检测。这些病例包括: 大阴唇 (11 例)、大阴唇/小阴唇交界处 (3 例)、小阴唇 (6 例)、阴道 (8 例)、尿道 (7 例), 直肠/直肠阴道黏膜 2 例 (各组显微照片见图 1-3)。肿瘤经福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 组织块, 每个病例选取一个肿瘤细胞 >20% 的蜡块。每个组织块均以 5 μ m 厚度制作 1 张 H&E 和 10 张未染色的切片, 手术刀片刮取 4mm² 的肿瘤组织。

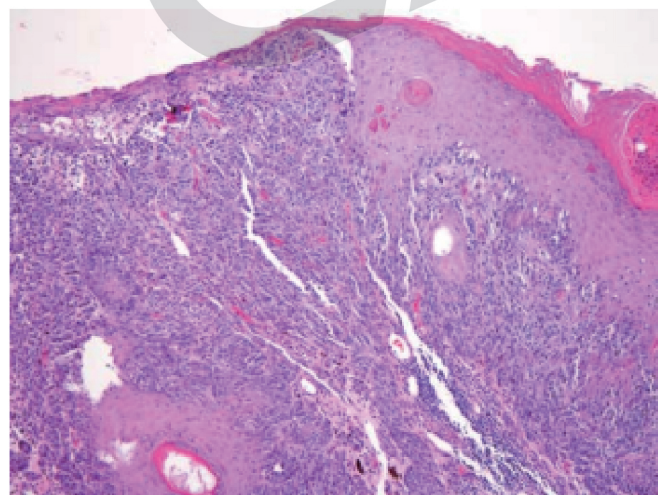


图1. 外阴黑色素瘤, 有毛发皮肤 (大阴唇), 10 \times

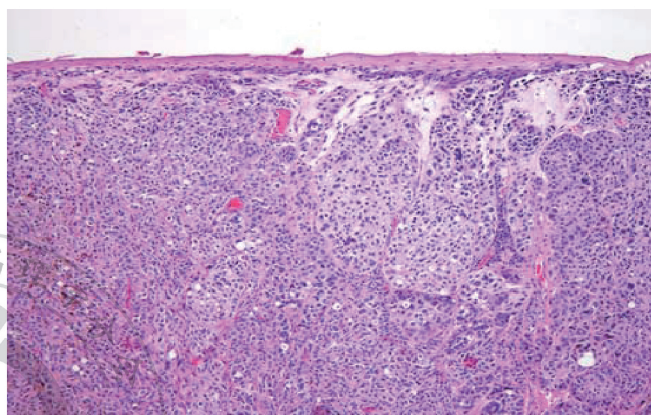


图2. 外阴黑色素瘤, 无毛发皮肤 (小阴唇), 10 \times

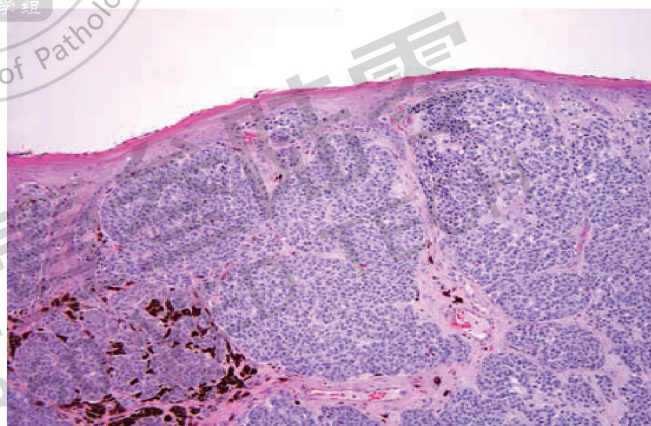


图3. 阴道黑色素瘤, 10 \times

采用 QIAamp dsDNA FFPE 试剂盒 (QIAGEN) 进行 DNA 提取, Qubit dsDNA HS 检测试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 测定提取 DNA 的含量。10-50ng 的 DNA (浓度 0.597-2.98 ng/ μ L) 进行 QIAseq 靶向 DNA 文库制备 (QIAGEN)。采用安捷伦 2100 生物分析仪和 Qubi 2.0 荧光仪对 PCR 产物进行质量评估。NGS MiSeq 仪器 (Illumina) 一次运行 10 个样本, 序列读取分析采用 CLCbio 服务器和梅奥诊所生物信息学流程进行。我们的 21 个靶基因 NGS panel 包括 9 个基因的全外显子区以及 12 个基因的热点区 (表 1)。等位基因变异频率高于 8% 认为具有致病性。使用 Alamut 2.7.2 软件、突变在线数据库如 COSMIC, Cbioportal JAX-CKB, 及文献检索进行致病性分析。根据公开发布的可用数据将所有突变分为 3 个主要类型: 致病型 (pathogenic, P)、可能致病型 (likely pathogenic, LP)、未知意义型 (variant of unknown significance, VUS)。移码

突变导致肿瘤抑制基因中蛋白截断和无义突变，以及致癌基因中的错义突变在黑色素瘤中首次被发现，被称为可能致病型 (LP)。患者生存数据从电子病历中提取。用 Fisher 精确检验法比较不同原发部位肿瘤的分子改变类型百分比。采用 Cox 风险回归对比伴有和不伴有常见基因突变 (*KIT*、*TP53*、*NRAS*、*NF1*) 患者总生存期。采用 Kaplan-Meier 法评估 5 年生存率和 95% 置信区间。所有分析均使用 SAS 9.4。

结果

年龄特征，生存数据和原发肿瘤部位

诊断时患者的平均年龄为 68.9 岁 (范围: 50.6-85.6 岁)。92% (34/37) 的患者通过临床或手术记录能明确原发部位, 19% (7/37) 的患者需追加临床照片来确定原发部位。在 37 例患者中, 30% (11/37) 的肿瘤位于有毛发的外阴, 8% (3/37) 的肿瘤位于有毛发区和无毛发区的交界处, 16% (6/37) 位于外阴无毛发的皮肤, 22% (8/37) 位于阴道, 19% (7/37) 位于尿道, 5% (2/37) 位于直肠和直肠阴道黏膜 (表 1)。

87% (32/37) 的患者获得有效生存数据, 小部分患者 (13%, 5/37) 失随访, 中位随访时间 574 天 (范围: 3-6192 天)。共有 21 名患者死于疾病, 8 名患者无病存活, 2 名患者转移 (其中 1 名患者因复发转移而接受化疗)。死亡率最高的三者为: 尿道黑色素瘤 (6/7), 中位随访时间 634 天; 阴道黑色素瘤 (6/8), 中位随访时间 623 天; 外阴有毛区和无毛区交界处黑色素瘤 (2/3), 中位随访时间为 396 天。所有患者的 5 年总生存率估计为 38.6% (95% 置信区间: 20.7%-56.5%)。更多关于患者生存和人口统计数据见表 2。

表1. NGS 套餐: 基因转录本和覆盖范围 (n=21)

基因	转录本	覆盖类型	覆盖的外显子区域	
1	BAP1	NM_004656.3	所有外显子	所有外显子
2	BRAF	NM_004333.4	热点	11, 15
3	CDKN2A	NM_000077.4	所有外显子	所有外显子
4	CTNNB1	NM_001904.3	热点	3
5	GNA11	NM_002067.4	热点	5
6	GNAQ	NM_002072.4	热点	5
7	HRAS	NM_005343.2	热点	2,3,4
8	KIT	NM_000222.2	热点	2, 3, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19
9	KRAS	NM_033360.3	热点	2, 3, 4
10	MAP2K1	NM_002755.3	热点	2, 3, 6, 7
11	NF1	NM_001042492.2	所有外显子	所有外显子
12	NRAS	NM_002524.4	热点	2, 3, 4
13	PDGFRA	NM_006206.4	热点	12, 14, 15, 18
14	PIK3CA	NM_006218.3	热点	2, 5, 7, 8, 10, 14, 19, 21
15	SDHA	NM_004168.3	热点	所有外显子
16	SDHB	NM_003000.2	热点	所有外显子
17	SDHC	NM_003001.3	热点	所有外显子
18	SDHD	NM_003002.3	热点	所有外显子
19	SETD2	NM_014159.2	热点	所有外显子
20	TERT	NM_198253.2	热点	启动子
21	TP53	NM_000546.5	所有外显子	所有外显子

表2. 患者随访数据 (n=37)

	外阴-H (N=11)	外阴-HG连接 (N=3)	外阴-G (N=6)	阴道 (N=8)	尿道 (N=7)	直肠 (N=2)	总计 (N=37)
生存 (无病)	2	0	3	1	1	1	8
转移稳定期	0	1	0	0	0	0	1
化疗稳定期	1	0	0	1	0	0	2
失访	4	0	1	0	0	0	5
死亡(死于疾病)	4	2	2	6	6	1	21

DF (disease free), 表示无病; G (glabrous skin) 无毛发皮肤; H (hair-bearing) 有毛发皮肤; HG (hair-bearing glabrous skin junction), 有毛发与无毛发交界处

分子改变，包括致病性突变和未知意义型突变：新报道外阴、阴道和尿道黑色素瘤的 20 个致病性突变

总体来说，使用我们的特定 21 基因二代测序套餐，对 37 个肿瘤进行检测，共检测出 48 个变异体和 1 个黑色素瘤易感等位基因。少数病例（14%，5/37）未检测出 21 基因的异常，此结果经涵盖实体瘤 50 个常见基因和突变热点的 NGS 复测。37 例患者中最常见的基因改变是 *KIT* 致病性突变，占 32%（12/37），其次是 *TP53* 占 22%（8/37），*NF1* 占 19%（7/37）。*KIT* 变异型包括 12 个致病型（10 个错义突变和 2 个缺失突变）和 1 个 *VUS*（错义突变）。*KIT* 致病变异型中，75%（9/12）的患者不伴有其它致病突变，25%（3/12）的患者出现 *KIT* 突变并伴有 *TP53*、*CTNNB1*、或者 *NF1* 基因改变。*TP53* 基因变异包括 6 个致病突变（5 个错义突变和 1 个移码缺失）和 1 个 *VUS*（错义突变）。大多数 *NF1* 变异（63%，5/8）是无意义的或伴有蛋白质截断的移码突变，只有 38%（3/8）是错义突变。所有 21 个基因的致病突变和 *VUS* 详见列表（表 3）。有些突变之前在黑色素瘤中已有报道，包括 10/13 *KIT* 突变，1/7 *TP53* 突变，6/6 *NRAS* 突变，2/8 *NF1* 突变，1/1 *CDKN2A*，2/2 *TERT* 启动子突变，1/1 *MAP2K*，1/2 *GNA11*，1/1 *SDHB*，1/1 non-V600 *BRAF* 突变。此前黑色素瘤中 *SDHA*（0/2）、*CTNNB1*（0/1）或 *HRAS*（0/1）致病变异未见报道（表 4）。我们还发现 1 例之前报道过的黑色素瘤易感性等位基因 *CDKN2A* 基因（c.442G>a; A148T, 43.1%）（病例 #7），其在正常人群 ExAC 数据库（rs3731249）中平均等位基因频率为 2.27%。该患者同时有 *NRAS* 基因突变（G12A）和未知意义的 *SDHB* 基因突变（S163P）。该患者的外阴黑色素瘤发生于大阴唇和阴蒂，随访 426 天后死亡。值得注意的是，本研究中所具有 *NRAS* 致病性突变位于最常见的 12 密码子（4/6，67%），其次为 13 密

码子（1/6）和 61 密码子（1/6）。*NF1* 变异可单独发生（2/5）或伴有其他突变（3/5 伴有 *GNA11*、*TP53*、和 *KIT* 致病性突变）。2 例具有 *NF1* 基因 *VUSs* 的患者，其中之一伴有 *KIT* 基因 *VUS*，另一伴有 *TP53* 基因 *VUS*。

除较常见的突变外，少数病例仅表现为以下致病性突变：*TERT* 启动子（2/37，c.-124C>T、*TP53*[3/37，c.816_817delinsCT;R273C（LP），c.641A>G;H214R（LP），c.770T>C;L257P（P）]，*SDHA*[1/37，c.91C>T;R31*（LP）]，*SDHD*（1/37，c.34G>A;G12S）；只有 *TP53*[1/37，c.527G>T;C176F（LP）]，或 *CTNNB1* 和 *KIT* 共突变[2/37，c.101G>T;G34V（P）和 c.1679T>A;V560D（LP）]。

我们的大多数病例至少存在 MAPK 通路中一个基因的一种致病性突变，包括 *RAS*、*RAF*、*MAPK*、*GNA11* 和 *KIT*（66%，21/32），只有少数病例出现非 MAPK 通路改变，包括 *TP53*、*CTNNB1*（34%，11/32）。MAPK 改变组和非 MAPK 改变组的总生存率无统计学差异（*p* 值=0.28）。

原发肿瘤位置、突变状态与生存的相关性

有毛发外阴皮肤黑色素瘤最常见的致病性突变是 *KIT*（46%，5/11），其次是 *NF1*、*NRAS* 和 *SDHA*（各 18%，2/11）。无毛发外阴皮肤黑色素瘤最常见为 *KIT*（50%，3/6）和 *NF1*（33%，2/6）突变。阴道黑色素瘤是 *KIT*、*NF1* 和 *TP53* 突变（各 25%，2/8）。1 例尿道黏膜黑色素瘤显示非 *V600E* 的 *BRAF* 突变（D594G）（表 5），同时伴有 *GNA11*（c.627G>T，Q209H 突变，随访期 634 天无病生存。*KIT*、*NF1*、*TP53* 和 *NRAS* 突变频率在不同部位黑色素瘤之间无显著差异。*KIT*、*NF1*、*TP53* 和 *NRAS* 突变状态与患者总生存期之间没有显著差异，尽管如此，我们确实发现 *NRSA* 突变患者的死亡率（5/6 死亡，5 年生存率为 0%），比无突变患者的死亡率（16/31 死亡，5 年生存率为 46.3%）更高（*P*=0.08）。

表 4. COSMIC 数据库中既往未报道过的黑色素瘤突变类型

基因	<i>KIT</i>	<i>TP53</i>	<i>NF1</i>	<i>GNA11</i>	<i>HRAS</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>SDHA</i>
	N822Y	R282W	Q1399*	Q209H	G12S	G34V	R31*
	R634W	L257P	M1461K				L649Efs*4
	S476I	I195T	G1090*				
		H214R	E196K				
		C176F	V1453D				
		H179Q	E1387Gfs*8				

表3. 患者临床、人口统计学和突变数据 (N=37)

序号	年龄 (岁)	部位	随访时间 (天)	随访结果	变异型	类型
1	80	大阴唇	3	失访	KIT (N822Y) TP53 (R282W)	错义突变-LP 错义突变-LP
2	80	阴道	83	死于疾病	TP53 (L257P)	错义突变-P
3	65	大阴唇	991	死于疾病	KIT (V560D) KIT (R634W) CTNNB1 (G34V)	错义突变-LP 错义突变-VUS 错义突变-P
4	79	阴道	255	死于疾病	NRAS (Q61K) CDKN2A(W110*)	错义突变-P 无义突变-LP
5	81	阴道	97	死于疾病	NF1 (Q1399*) GNA11 (Q209L)	无义突变-P 错义突变-LP
6	81	阴道	689	死于疾病	HRAS (G12S) NF1 (M1461K)	错义突变-P 错义突变-VUS
7	74	大阴唇	426	死于疾病	NRAS (G12A) SDHB (S163P)	错义突变-P 错义突变-VUS
8	53	大阴唇	2822	稳定化疗	NF1 (G1090*)	无义突变-P
9	57	大阴唇	2743	无病生存	TP53 (I195T) NF1 (Q1055*)	错义突变-P 无义突变-P
10	71	阴道	588	死于疾病	KIT (Y823D)	错义突变-LP
11	67	大阴唇	2168	无病生存	KIT (K642E)	错义突变-LP
12	79	大阴唇	641	失访	KIT (S476I)	错义突变-P
13	60	阴道	1172	生存 (复发)	TP53 (H214R)	错义突变-P
14	61	阴道	672	死于疾病	KIT (K558delinsNP)	框内插入-LP
15	68	大阴唇	780	无病生存	无	不适用
16	58	大阴唇	17	失访	TERT (c.-124C> T) SDHA (R352Q) MAP2K(P105_A106del)	启动子-P 错义突变-VUS 缺失-LP
17	59	大阴唇	341	死于疾病	KIT (V559D)	错义突变-LP
18	51	大阴唇	210	无病生存	NRAS (G12C) SDHA(c.1945_1946delTT, L649Gfs*4)	错义突变-P 移码缺失-LP
19	77	阴蒂包皮	547	失访	无	不适用
20	65	大阴唇	168	死于疾病	NRAS (G12C)	错义突变-P
21	82	大小阴唇交界处	369	死于疾病	TP53 (C176F) SDHD (G12S)	错义突变-P 错义突变-VUS
22	76	大阴唇	325	死于疾病	KIT (K642E) NF1(c.4157dupA,E1387Gfs*8)	错义突变-LP 框内重复-P
23	58	大阴唇	6192	无病生存	KIT (V560D)	错义突变-LP
24	83	大阴唇	730	死于疾病	NRAS (G13V)	错义突变-P
25	66	大小阴唇交界处	5214	无病生存	SDHA (R32*)	无义突变-P
26	51	大阴唇	1138	死于疾病	NF1(c.5878dupT,C1960Lfs*4)	移码重复-P
27	86	大阴唇	70	失访	KIT(c.1679_1680delinsAG,V560E)	框内缺失-LP
28	51	阴道	3714	无病生存	无	不适用
29	80	尿道	2385	死于疾病	KIT (L576P)	错义突变-LP
30	78	尿道	200	死于疾病	KIT (V560D)	错义突变-LP
31	77	尿道	266	死于疾病	TERT (c.-124C> T)	启动子-P
32	72	尿道	2032	死于疾病	TP53(H179Q) NF1 (E196K)	错义突变-VUS 错义突变-VUS
33	65	尿道	83	死于疾病	TP53(c.816_817delinsCT,R273C)	框内插入-LP
34	56	尿道	634	无病生存	BRAF (D594G) GNA11 (Q209H)	错义突变-P
35	83	尿道	1600	死于疾病	NRAS (G12D) NF1 (V1453D)	错义突变-P 错义突变-LP
36	51	阴道直肠	132	死于疾病	无	不适用
37	69	直肠	2309	无病生存	无	不适用

变异类型包括致病型 (pathogenic,P)、可能致病型 (likely pathogenic,LP) 和未知意义突变型 (variant of unknown significance,VUS), NA (not applicable) 表示不适用。

表5. 不同部位黑色素瘤的基因突变发生率

	N(%)						
	Vulvar-H (N=11)	Vulvar-HG Junction (N=3)	Vulvar-G (N=6)	Vaginal (N=8)	Urethral (N=7)	Rectal (N=2)	Total (N=37)
KIT	5(46)	0	3(50)	2(25)	2(29)	0	12(33)
TP53	1(9)	1(33)	1(17)	2(25)	3(43)	0	8(22)
NF1	2(18)	0	2(33)	2(25)	1(14)	0	7(19)
NRAS	2(18)	1(33)	1(17)	1(13)	1(14)	0	6(16)
SDHA	2(18)	1(33)	0	0	0	0	3(8)
HRAS	0	0	0	1(12)	1(14)	0	2(5)
TERT promoter	1(9)	0	0	0	1(14)	0	2(5)
GNA11	0	0	0	1(13)	1(14)	0	2(5)
KRAS	0	1(33)	0	0	0	0	1(3)
BRAF(non-V600)	0	0	0	0	1(14)	0	1(3)
MAP2K1	1(9)	0	0	0	0	0	1(3)

讨论

女性下生殖道黑色素瘤可发生于有毛发外阴皮肤、无毛发外阴皮肤、阴道或尿道周围黏膜。不同部位肿瘤生物学行为差异存在争议。确定肿瘤的原发部位是有挑战性的，因为这个部位的黑色素瘤可以表现为相邻部位多个原发结节，有时主瘤体位于大阴唇和小阴唇的交界处。有时即使非常仔细地在显微镜下观察，寻找毛囊或皮脂腺也是具有挑战性的，因为这些组织学标志的数量会受到年龄的影响。最新的AJCC癌症病理分期指南（第八版）推荐外阴黑色素瘤的分期类似于皮肤（日光暴露部位）黑色素瘤，但没有推荐阴道黑色素瘤的分期。

本文37例女性下生殖道和尿路上皮黑色素瘤研究中，最常见的致癌突变是KIT基因（32%），这一发现与之前研究KIT突变率13%-27.6%^[12-16]是相似的。但不同于Hou等人对51例VVM的研究结果，其结果显示BRAF（26%）、KIT（22%）和APC（10%）是最常见的突变类型，仅一半的BRAF突变发生在密码子V600上。我们的结果显示BRAF突变率为3%（1/37，非V600E），远低于Hou及同事的实验结果，但与其它报道突变率为0%^[12,16]、6%-7.6%和10%的结果相似^[15]。VVM的BRAF突变率范围广泛可能是由于不同的检测方法或检测组织类型（原发还是转移）造成的。

总的来说，致病突变最常位于11号外显子（50%）和13号外显子（25%）的密码子560[V560D（3/12），V560E（1/12），V559D（1/12）]和密码子642[K642E（2/12）]。我们发现仅1例尿道黑色素瘤发生KIT L576P突变（1/12，8%）。与Hou检测VVMs患者的KIT突变40%位于L576P突变

（11外显子）的结果不一致，但与Omholt等^[13]的研究结果相似。本组纳入病例2/3均具有KIT突变，是最常见的单基因突变，提示它可能是驱动突变。

本研究中，外阴黑色素瘤KIT突变率高于阴道，这与另一项研究结果相似^[12]；然而，我们的结果并没有显示不同部位（外阴和阴道）的肿瘤KIT突频率差异存在统计学意义，这与上述提到Hou等人^[11,12]的研究结果不一致，Hou等人研究结果显示外阴黑色素瘤的KIT突变明显高于阴道部位。我们还发现外阴黑色素瘤的NRAS突变多于阴道，这与其它研究结果不一致^[12,13,16]，后者显示阴道黑色素瘤中NRAS突变率高于外阴，与食道黑色素瘤更相似。

Hou等人^[11]的研究也显示VVMs中TP53突变率比较低（5%），不同于我们的实验结果（22%）。本研究中TP53总突变率为22%，这与Saglam等人^[15]的研究结果相似，他们检测显示外阴和阴道黑色素瘤的TP53与KIT突变率相同（各25%）。与其他研究相比，我们检测TP53突变率较高的一个原因是NGS覆盖TP53基因全部外显子。

在我们的研究中，大多数肛门生殖器和尿道黑色素瘤出现MAPK通路相关基因中的一种或多种异常，包括RAS、RAF、MAPK、GNA11和KIT（21/32，66%），只有少数病例出现非MAPK通路基因改变，包括TP53和NF1（11/32，34%）。这一发现对于那些耐受MAPK通路一线靶向药的患者具有潜在治疗意义，例如，可以将MEK抑制剂曲美替尼（Trametinib）添加到KIT抑制剂中，以抑制更多MAPK通路的下游信号激活。MAPK突变组和非MAPK突变组的总生存率

的差异没有统计学意义 (p 值=0.28), 需要声明的是每组的病例数量较少 (21/32, 11/32)。

5 个病例 (5/37, 13.5%) 肿瘤细胞占比尚可且色素不多, 但未检测出任何突变。并采用涵盖 50 个实体肿瘤最常见基因的 NGS 检测验证。突变阴性可解释为其基因并未在我们的基因组套中, 或存在不同发病机制, 如我们 NGS 平台无法检测的基因扩增或大片段重排。

由于我们使用的是经临床验证的肿瘤相关 NGS 检测, 仅检测点突变, 而没有肿瘤拷贝数或正常组织 DNA 检测。因此, 尽管少见但仍不能完全排除特殊病例胚系突变的可能性 (如 SDH 基因家族)。我们研究的所有家族性 SDH 基因突变都伴有其它基因突变 (如 TP53、NRAS), 除了 1 例仅存在 SDHA 无义突变 (见病例 25)。

黑色素瘤可以分为 4 大类, 它们具有临床和分子的相关性^[19]。分为皮肤型, 肢端型, 黏膜型和葡萄膜型。皮肤黑色素瘤通常是指发生在有毛发的皮肤, 最常见的类型, 最常见于欧洲人。这些肿瘤中大多数有双嘧啶 C 碱基变为 T 碱基, 被认为是紫外线照射的特征。此外, 皮肤黑色素瘤有非常高基因突变率。根据癌症基因组图谱 (TCGA) 将黑色素瘤分为 4 类: BRAF 突变型、NRAS 突变型、NF1 突变型和三者野生型^[20]。皮肤黑色素瘤前 3 种类型较常见, 且约 50% 是 BRAF 突变型。与皮肤黑色素瘤相比, 黏膜黑色素瘤患者在欧洲人中并不占优势。黏膜黑色素瘤基因突变发生较低, 而染色体结构畸变发生率较高^[21]。黏膜黑色素瘤通常为 TCGA 野生型, 常缺乏紫外线照射。BRAF 突变比较少见, 而 GNAQ 和 SF3B1 突变较为频繁。尽管存在这些差异, 但在形态学上, 皮肤和黏膜肿瘤有相似的特征。

综上所述, 我们实验支持之前关于 VV 黑色素瘤最常见 KIT 突变的结论。最常见 KIT 基因的 11 号外显子突变, 与其原发部位无关, 因此基因检测可以帮助明确是否适合 KIT 或 MAPK 靶向治疗。我们还发现起源于女性下生殖道的不同部位的黑色素瘤, 包括大阴唇、小阴唇、阴蒂、后阴唇系带、阴道或尿道周围, 其分子特征和总生存期非常相似。这一发现提示未来女性下生殖道黑色素瘤的分类应考虑将外阴黑色素瘤与黏膜黑色素瘤分为一组, 而不是与皮肤黑色素瘤分为一组。

参考文献

- Kurman RJ. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
- Mills SE. Histology for Pathologists, 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- Sanchez A, Rodriguez D, Allard CB, et al. Primary genitourinary melanoma: epidemiology and disease-specific survival in a large population-based cohort. Urol Oncol 2016;34:166.e7-14.
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D, et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. J Clin Oncol 2006;24:4340-6.
- Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. Nat Genet 1994;8:15-21.
- Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. Nat Genet 2011;43:1018-21.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med 2011;364:2507-16.
- Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. Clin Cancer Res 2008;14:6821-8.
- Satzger I, Schaefer T, Kuettler U, et al. Analysis of c-KIT expression and KIT gene mutation in human mucosal melanomas. Br J Cancer 2008;99:2065-9.
- Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. JAMA 2011;305:2327-34.
- Hou JY, Baptiste C, Hombalegowda RB, et al. Vulvar and vaginal melanoma: a unique subclass of mucosal melanoma based on a comprehensive molecular analysis of 51 cases compared with 2253 cases of nongynecologic melanoma. Cancer 2017;123:1333-44.
- Aulmann S, Sinn HP, Penzel R, et al. Comparison of molecular abnormalities in vulvar and vaginal melanomas. Mod Pathol 2014;27:1386-93.
- Omholt K, Grafstrom E, Kanter-Lewensohn L, et al. KIT pathway alterations in mucosal melanomas of the vulva and other sites. Clin Cancer Res 2011;17:3933-42.
- Rouzbahman M, Kamel-Reid S, Al Habeeb A, et al. Malignant melanoma of vulva and vagina: a histomorphological review and mutation analysis—a single-center study. J Low Genit Tract Dis 2015;19:350-3.

15. Saglam O, Naqvi SMH, Zhang Y, et al. Female genitourinary tract melanoma: mutation analysis with clinicopathologic correlation: a single-institution experience. *Melanoma Res* 2018;28:586–591.
16. Udager AM, Frisch NK, Hong LJ, et al. Gynecologic melanomas: a clinicopathologic and molecular analysis. *Gynecol Oncol* 2017;147:351–7.
17. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471–4.
18. Gibb RK, Olawaiye AB, Chen L-M, et al. Vulva. In: Amin MB, ed. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed. New York: Springer International Publishing; 2017:633–40.
19. Rabbie R, Ferguson P, Molina-Aguilar C, et al. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J Pathol* 2019;247:539–51.
20. Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015;161:1681–96.
21. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 2017;545: 175–80.



(王正 翻译 丁永玲 审校)



玖壹叁陆零
91360 MED TECH