

子宫内膜浆液性癌p16免疫染色“缺失”模式： 一种尚未充分认识的重要异常染色模式

*Daniel R. Matson, M.D., Ph.D., Molly A. Accola, Ph.D., Les Henderson, B.A.,
Xiangqiang Shao, Ph.D., Leah Frater-Rubsam, Ph.D., Vanessa L. Horner, Ph.D., F.A.C.M.G.,
William M. Rehrauer, Ph.D., Paul Weisman, M.D., and Jin Xu, M.D., M.S.*

摘要：鉴于子宫内膜浆液性癌（serous carcinoma, SC）在预后和临床处理上和高级别子宫内膜腺癌不同，鉴别二者具有重要意义。在实际工作中，鉴别通常依赖 p53、p16 和错配修复蛋白免疫组化染色。SC p16 呈特征性弥漫强阳性表达，在多数高级别子宫内膜腺癌中则为弱和/或斑驳阳性。本文报道一组 SC p16 免疫染色完全阴性，称之为“p16 缺失”模式。在我们机构诊断的63例SC中发现2例，1例呈现经典的SC组织学特征，1例为不明确分型的高级别组织学特征。2例均显示了SC的免疫组化特征及基因突变模式，均未检测到 p16 基因/细胞周期依赖性激酶抑制因子 2A（CDKN2A）突变。然而，在2例中，均存在 p16 表达缺失的分子相关事件，1例

为 CDKN2A 纯合性缺失，1例存在 CDKN2A 半合子缺失以及存留等位基因启动子的超甲基化。据我们所知，本文首次报道 SC 中 p16 免疫组化染色完全阴性及其分子改变。在临床和组织形态为典型的 SC 时，不可忽视 p16 “缺失”染色也是 SC 的另一种异常染色模式。

关键词：p16；CDKN2A；子宫内膜浆液性癌；免疫组织化学染色；妇产科病理

(*IJGP.2022 Jul.;41(4):378-388*)

子 子宫内膜浆液性癌（serous carcinoma, SC）具有高级别形态学特征，常发生于绝经后，呈侵袭性临床经过^[1-6]。基因水平上，SC的特征是大量拷贝数改变和肿瘤蛋白 P53（TP53）的频繁突变^[7]。TP53 基因突变导致异常的 p53 “全或无”免疫组化染色模式，其特征为弥漫阳性或完全阴性（缺失）染色^[2, 8]。另外的异常染色模式，如胞浆染色（伴不同程度核染色）也已有报道^[9]。

SC 最棘手的鉴别诊断是高级别子宫内膜样腺癌（high-grade endometrioid adenocarcinoma, HGEC），因为二者不论是在临床预后还是在疾病处理上均显著不同^[1, 3-7]。形态学支持诊断 SC 的特征包括：一致性高级别形态，腺腔或乳头具有锯齿状腔缘，细胞核多形性和高核分裂数^[1, 10]。相反，HGEC 常见的形态特征是肿瘤分级的异质性，有低级别和高级别区域；如有腺体，其腔缘常为线性平直，肿瘤常有（粘液或鳞状）化生性改变以及肿瘤浸润性淋巴细胞^[1, 10]。然而，许多 HGEC 病例，几乎所有特征都与 SC 非常相似，导致诊断医生间即使专家之间也存在相当程度的分歧^[10, 11]。鉴于癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas, TCGA）提出的分子分型，SC 和 HGEC 之间的鉴别近年来受到越来越多的关注^[7]。TCGA 的数据以及其他后续研究工作已经揭示了 HGEC

From the Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health (D.R.M., V.L.H., W.M.R., P.W., J.X.); UW Health Clinical Laboratories, University of Wisconsin Hospitals and Clinics (M.A.A.); and Wisconsin State Laboratory of Hygiene, (L.H., X.S., L.F.-R., V.L.H.), Madison, Wisconsin.

The authors received financial support from the University of Wisconsin—Madison Department of Pathology and Laboratory Medicine. D.R.M. also received support from the University of Wisconsin-Madison Kirschstein National Research Service Award (T32 HL07899).

P.W. and J.X.: performed study concept and design. P.W., J.X., and D.R.M.: performed development of methodology and writing. P.W., J.X., D.R.M., W.M.R., M.A.A., L.H., X.S., L.F.-R., and V.L.H.: provided acquisition, analysis, and interpretation of the data. W.M.R. and V.L.H. provided technical support.

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to Jin Xu, MD, MS, UWHC—Rm A4/204, 600 Highland Ave., Madison, WI 53792-3224. E-mail: jxu3@uwhealth.org.

可分为 4 个预后明显不同组：DNA 聚合酶 ϵ 催化亚基 (*POLE*) 突变、错配修复蛋白 (MMR) 缺陷、p53 异常以及无特定分子特征^[7, 12]。在此种情况下，区分 SC 和 HGEC 推荐应用 p53 和 MMR 蛋白免疫组化染色及 *POLE* 突变热点区分子检测^[1, 12]。伴 *POLE* 突变和/或 MMR 缺陷的高级别子宫内膜肿瘤被认为是 HGEC。*POLE* 野生型和 MMR 完整型肿瘤进行 p53 免疫组化染色：如果 p53 显示野生型染色模式被认为是 HGEC，如果 p53 为异常染色模式则认为是 SC 或 SC 样肿瘤。

虽然文献广泛应用了此简单分类模型，但最新版 WHO 女性生殖器官肿瘤分类仍建议对子宫内膜癌进行特定的组织学分型^[1]。WHO 分类中有助于区分 SC 和 HGEC 的其他特征包括 (SC)：免疫组化 p16 弥漫强阳性表达，AT 丰富结构域 1A (AT-Rich Interaction Domain 1A, ARID1A) 和磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 的保留表达，以及分子检测无 PTEN 突变^[1, 2, 7, 13]。在这些特征中，p16 弥漫强阳性表达被认为是诊断 SC 的理想标准。另外一个理想的 SC 诊断标准是 p53 的异常表达。虽然 p16 完全缺失表达在评估子宫内膜癌的早期研究中曾有报道，但实际上这种染色模式在 SC 中非常罕见，近年来，在分子和免疫表型确诊的 SC 病例中，未见关于完全阴性的 p16 染色模式及其遗传基础的研究。

本研究报 2 例 p16 免疫组化染色完全阴性的 SC。我们发现 3% 的 SC 存在这种染色模式，类似在 SC 中存在的 p53 缺失表达模式^[8]。1 例呈现经典的 SC 形态学特征，另 1 例具有不明确分型的高级别形态学特征。按照 TCGA 和传统标准，这 2 例均明确分类为 SC：(1) 发生在绝经后，(2) 免疫组化染色显示 p53 异常表达 (分子检查证实有 *P53* 致病性突变)，(3) MMR 蛋白完整表达 (PCR 显示 MSI-S 分子类型)，(4) 免疫组化染色显示 ARID1A 保留表达，以及 (5) 无 *POLE* 或 *PTEN* 突变。

未检测到编码 p16 的基因/细胞周期依赖性激酶抑制因子 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A) 致病性突变。相反，1 例检测到 *CDKN2A* 纯合缺失，而第 2 例显示 9 号染色体单体 (1 个 *CDKN2A* 等位基因缺失) 和存留的 *CDKN2A* 等位基因的启动子超甲基化。

根据目前的分类标准，这 2 例肿瘤均为明确的 SC，同时有 p16 免疫组化完全阴性的分子基础，基于这样的事实，我们认为这种“缺失”表达模式可作为 p16 的一种罕见变型的

异常表达模式，类似于以前描述的 p53 表达模式^[8]。认识 p16 免疫染色缺失表达模式的重要意义在于避免对临床上、组织学及免疫表型经典的 SC 病例错误的分类。

材料和方法

伦理批准和知情同意

本研究已获威斯康星大学麦迪逊机构审查委员会批准 (IRB 注册号 IRB00003739; 参考号 2015-1622-CP003)。本研究符合赫尔辛基宣言。

病例选择

本研究中的病例筛选自威斯康星大学医院及诊所 10 年间诊断的没有发表的 63 例子宫内膜 SC。所有病例包括本研究的 2 个病例均由 2 名病理医生 (P.W. 和 J.X.) 复查。选取形态学最有代表性的蜡块，行免疫组化及分子研究。只有具有高级别形态、分子检查显示 *POLE* 野生型、免疫组化染色显示完整 MMR 蛋白表达以及免疫组化染色显示异常 p53 表达模式的病例列入研究队列。所有其他病例均被排除在外。

免疫组化 (IHC) 研究

对 63 例福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织的 4 μ m 切片行 IHC 染色。应用 Ventana Discovery XT BioMarker 平台 (Roche, Rotkreuz, Switzerland) 对切片进行染色。脱蜡、预处理、抗原修复、冲洗、阻断和孵育等步骤均针对每种抗体按照产品说明书进行。抗体包括：p53 (DO-7, predilute, Ventana, Tucson, AZ), p16 (E6H4, predilute, Ventana), ER (SP1, predilute, Ventana), PMS2 (A16-4, predilute, Ventana), MSH6 (44, predilute, Ventana) 和 ARID1A (EPR13501, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK)。实验过程设阳性和阴性对照。IHC 染色结果由 2 位病理医生 (P.W. 和 J.X.) 独立评分。p53 染色异常：(1) >75% 的肿瘤细胞呈强核免疫反应 (过表达)，(2) 未见任何肿瘤细胞染色 (缺失模式)，或 (3) 有弥漫胞浆染色 (不考虑核染色模式)。如果肿瘤细胞呈异质性斑驳核染色，则认为 p53 染色为野生型 (野生型模式)。如果任何肿瘤细胞有核染色，则认为 ER 染色阳性。至少 90% 的肿瘤细胞显示强的核和胞浆免疫反应，认为 p16 染色阳性 (过表达)^[15]，而缺失染色 (本研究中描述) 定义为无细胞核及胞浆染色，而内对照组织中散在的背景间质细胞、内皮细胞和/或淋巴细胞有染

色。MMR染色评价是基于是否有核染色。MMR缺陷定义为肿瘤细胞中没有任何核染色，而同时在内部阳性对照组织细胞中有完整核染色。根据有无核染色对 ARID1A 染色进行评分。

p16 免疫组化染色重复检测

本研究仅对 2 例 p16 初检完全阴性的病例重复 p16 IHC 检测 (E6H4、预稀释、Ventana)。重复检测的蜡块为 p16 初检时使用的同一蜡块。FFPE 组织块行 4 μ m 切片应用 BenchMark Ultra IHC/ISH 系统 (罗氏) 行 IHC 染色。脱蜡、前处理、抗原修复、冲洗、阻断、孵育等步骤均按说明书进行。p16 染色以上述相同的方式进行评分。

POLE 测序

63 例均行 *POLE* 测序。应用 Maxwell 仪器 (Promega, Madison, WI) 使用 Maxwell RSC DNA FFPE 试剂盒从 FFPE 组织卷中提取基因组 DNA。应用 Qubit 仪器 (ThermoFisher, Waltham, MA) 评估 DNA 浓度。应用 Roche LightCycler 480 Promega Gotag RT-PCR 得到包含外显子 9-14 的扩增子。应用下列引物集: 外显子 9 (FW, CCACAGACCCTGGGTTTTT; RV, GCCACCTGCTCACCTCACCTGGC), 外显子 10 (FW, TGGCTAGGCTACCTCATCA; RV, CTCCTTACCTCATCGGGGTTCA), 外显子 11 (FW, CTGCTGTGACTTGGTTCAG; RV, GGCTGAAACTCACTCACC), 外显子 12 (FW, CCCAGGCCATTTGTGGAG; RV, GCTCACG GACAGCAGTGA), 外显子 13 (FW, GGTGCCAGTTTTG-CCAG; RV, GCCTGGGG CTGCTCCGT), 外显子 14 (FW, CCTGCTCTCTGGCGTTCTC; RV, CTCCAGTG-CATTTGGAATGG)。所有引物包括 Illumina 接头 (FW, ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT; RV, GTGACTGGAGTTCAGACGTGTTCTTCCGATCT) 和 index PCR 使用标准的 Illumina i7 和 i5 条码 (Illumina, San Diego, CA)。在 Illumina MiSeq 上使用标准的 V22 \times 150 运行进行测序。使用 MuTect (Broad Institute, Boston, MA) 进行变异检测, 并通过 Sanger 测序确认所有检测到的变异。

50 基因 NGS 测序

仅对 2 例 p16 IHC 阴性的病例进行 50 基因 NGS 检测。2 位病理医生 (P.W. 和 J.X.) 在显微镜下评估, 对肿瘤富集区域进行组织切割。如上所述提取 DNA, 用于多重 PCR 和克隆

扩增获得下列 50 个基因特定区域的 207 个扩增产物: *ABL1*、*AKT1*、*ALK*、*APC*、*ATM*、*BRAF*、*CDH1*、*CDKN2A*、*CSF1R*、*CTNNB1*、*EGFR*、*ERBB2*、*ERBB4*、*EZH2*、*FBXW7*、*FGFR1*、*FGFR2*、*FGFR3*、*FIT3*、*GNA11*、*GNAS*、*GNAQ*、*HNF1A*、*HRAS*、*IDH1*、*IDH2*、*JAK2*、*JAK3*、*KDR*、*KIT*、*KRAS*、*MET*、*MLH1*、*MPL*、*NOTCH1*、*NPM1*、*NRAS*、*PDGFRA*、*PIK3CA*、*PTEN*、*PPTN11*、*RB1*、*RET*、*SMAD4*、*SMARCB1*、*SMO*、*SRC*、*STK11*、*TP53* 和 *VHL* (Ion AmpliSeq Kit Version 2.0; Life Technologies, Carlsbad, CA)。在 Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies) 上进行富集化扩增产物 NGS 测序。使用 Torrent Suite 软件 (v.5.4.0) 与参考 DNA 序列进行初始比对和分析并使用 GenomOncology Clinical Workbench (v.30; GenomOncology; Cleveland, OH), 应用 GRCh37.p13, DBSNP Build 151, 1000 Genomes phs3_shapeit2_Release_v5a, COSMIC v86 和 GRCh37 进一步注释和分析序列。应用了各种过滤器和标准去除假阳性并验证特定突变的证据。用于定义基因改变的术语来自人类基因组变异学会 (<http://www.hgvs.Org/muonomen/>)。

微卫星不稳定性 (MSI) 分析

仅对 2 例 p16 IHC 阴性的病例行 MSI 分析。FFPE 组织切片由 2 位病理医生 (P.W. 和 J.X.) 复查, 以选取肿瘤和非肿瘤区进行组织切割。如上所述, 对获取的肿瘤和非肿瘤组织分别进行 DNA 提取。对 5 个单核苷酸微卫星 (BAT25、BAT26、NR21、NR24 和 NR27) 和 2 个五核苷酸微卫星位点 (PentaC 和 Pentad) 进行多重 PCR。单核苷酸标记用于 MSI 评估, 而五核苷酸标记仅用于检测潜在的样品混淆和/或污染。荧光标记的扩增产物通过变性电泳法分离, 并使用荧光毛细管 3500 分析仪 (Life Technologies) 进行检测。将肿瘤的 BAT25、BAT26、NR21、NR24 和 NR27 的微卫星产物直接与非肿瘤 DNA 进行比较, 以确定 MSI。MSI 定义为与非肿瘤 (良性) 组织相比, 由于肿瘤微卫星内重复单位的插入或缺失而导致的任何长度的改变。高度 MSI (MSI-high) 定义为在所分析的 5 个微卫星单核苷酸标记中有 2 个或 2 个以上出现新的等位基因。在 5 个单核苷酸位点中只有 1 个位点出现不稳定性为低水平微卫星不稳定 (MSI-low)。在扩增的 5 个单核苷酸微卫星

中没有观察到任何一个不稳定性，定为微卫星稳定 (MSI-stable: MSS)。

CDKN2A Sanger 测序

仅对 p16 IHC 阴性的 2 例病例行 CDKN2A 测序。如上所述，从 FFPE 组织中提取基因组 DNA。应用 PCR 对 CDKN2A (NM_001195132.1) 基因外显子 1-4 进行扩增，使用下列引物集：外显子 1a (FW, TGAACGCACTCAAA-CACGCC; RV, CTTTCTTCTCCGGTGCTG)，外显子 1b (FW, GGTGCCATTTCGCTAAGTG; RV, CTGCAACTTC-GTCCATAG)；外显子 2a (FW, GTAATTAGACCTGG-GCTTG; RV, ATGGTTACTGCCTCTGGTGC)；外显子 2b (FW, AGGTCATGATGATGGGC AGC; RV, GTCTCCCG-GGCTGAACTTTC)；外显子 3 (FW, AGCCCATAGGCAA-CGAGATTAG; RV, TGGTCCAGCAGCTAGTCCAC)；外显子 4a (FW, TAGGGAC GGCAAGAGAGGAG; RV, TCCCTAGTTCACAAAATGCTTGTC)；外显子 4b (FW, AACGTAGATATATGCCTTCCCC; RV, AACAGTGT-CAGAAACGATGCTG)。应用 PCR 扩增 CDKN2A (NM_058195.3) 基因第 1 外显子使用下列引物集：外显子 1a (FW, CAGGCCGTTCCGGATC TTG; RV, GGTCTTCTAGGAAG CGGCTG)；外显子 1b (FW, GTGC-GCAGGTTCTTGGTGAC; RV, GCTAGAGA CGAATTATCT-GTTACG)。纯化的 PCR 产物进行正反向 Sanger 测序。使用 3500×L Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) 对测序产物进行毛细管电泳法。将序列与参考序列 (GRCh37/HG19) 进行比对，以识别变异，并使用 Mutation Surveyor 软件 (SoftGenetics, State College, PA) 进行分析。使用数据库 (如 ClinVar、gnomAD、COSMIC、cBioPortal 等)、已发表的文献、临床相关性和预测功能或剪接影响 (使用 PolyPhen、SIFT 等计算工具) 对每个变异进行评估。变异的分类遵循分子病理学协会、美国临床肿瘤学会和美国病理学家学会发表的指南^[17]。

CDKN2A 荧光原位杂交 (FISH) 检测

仅对 2 例 p16 IHC 阴性的病例进行 CDKN2A FISH 检测。用桔红光谱标记 9 号染色体短臂 DNA 探针 (LSI CDKN2A 位于 9p21)，同时用绿色光谱标记 9 号染色体着丝粒探针 (CEP9 位于 9p11-q11)，对间期细胞核进行 FISH。含有 FFPE 的切片在 CitrisolvHybrid (Decon Labs, King of

Prussia, IL) 中脱蜡，然后用 0.2N HCl、1M 硫氰酸钠、蛋白酶 I (Abbott Molecular)、10% 福尔马林和脱水乙醇系列 (70%、85% 和 95%) 顺序处理。使用 ThermoBrite 仪 (Abbott Molecular) 80°C 加热 2 分钟使组织和探针共变性。37°C IntelliFISH 杂交缓冲液 (Abbott Molecular) 中过夜杂交。最后，用含有 DAPI 的 Vectashield (Vector, Laboratories, Burlingame, CA) 封片。在与病理医生复查相应的 H&E 染色切片后，由 2 位检查者对目标区域的 200 个间期核进行分析。

亚硫酸氢盐测序法检测 CDKN2A 甲基化

仅对 p16 IHC 阴性的 2 例进行 CDKN2A 甲基化分析。如上所述，从 FFPE 组织切片中提取 500 ng 相同的纯化 gDNA，并使用甲基边缘亚硫酸盐转化系统 (Promega) 进行亚硫酸氢盐转化。使用以下甲基化 (FW, TTATTAGAGGGTGGG GG-CGGATCG; RV, GACCCCGAACCGC GACCGTAA) 和未甲基化 (FW, TTA TTAGAGGGGGGGGATTGT; RV, CAAC-CCCAAACCAACCATAA) CDKN2A 启动子，并在 Viia 7 仪器 (Life Technologies) 上使用 SYBR Green RT-PCR Master Mix (ThermoFisher) 进行技术复制。病例 1 经非亚硫酸氢盐处理的 DNA 作为阴性对照。

结果

p16 免疫组织化学

共计 63 例原发性 SC，是从十年间威斯康星大学医院和诊所档案中检索到符合纳入标准 (见材料和方法部分) 的病例。所有病例均行 p16 IHC，并由 2 名妇科病理医生独立进行评分。2 例 (占有 SC 的 3.2%) p16 IHC 完全阴性 (见表 1)。其余 61 例 (61/63) p16 呈弥漫强阳性。

临床病理特征

病例 1: 76 岁女性，阴道出血，行子宫内膜活检诊断为子宫内膜 SC。行腹部全子宫切除术和双侧输卵管卵巢切除术。大体检查：肿瘤最大径 6.7 厘米。组织学上，肿瘤显示子宫内膜 SC 典型组织学特征，包括乳头、微乳头、腺样和实性结构，高级别核有明显核仁以及高核分裂像数 (图 1A、B)。IHC 显示肿瘤细胞 p16 完全阴性 (图 1C)，p53 呈细胞核弥漫强阳性表达 (图 1D)，ER 呈弥漫中等强度免疫反应 (图 1E)，ARID1A 保留核表达 (图 1F)，MMR 蛋白表达也存在。

表1. 病例 1 和病例 2 临床病理参数总结

参数	病例 1	病例 2
诊断时年龄	76	79
肿瘤		
肿瘤形态	经典浆液性	不确定, 高级别
肿瘤大小 (cm)	6.7	6.5
肌层浸润	3/17 mm	全层浸润
宫颈间质浸润	存在	存在
淋巴管浸润	未发现	存在
淋巴结	未评估	阳性(6/14)
腹膜冲洗液	阴性	阴性
肿瘤分期	pT2NXMX	pT3bN1aMX
免疫组化		
p16	阴性	阴性
p53	弥漫强阳性	弥漫强阳性
ER	弥漫强阳性	阴性
ARID1A	保留	保留
MMR蛋白	保留	保留
细胞遗传学核型	9号染色体单体	<i>CDKN2A</i> 纯和性缺失
分子		
MSI	稳定	稳定
<i>PTEN</i>	野生型	野生型
<i>POLE</i>	野生型	野生型
病理性突变	<i>TP53</i> (G245S;c.733G > A)	<i>TP53</i> (C277F;c.830G > T)
意义不明变异	<i>APC</i> (K1454E;c.4360A > G)	<i>TP53</i> (V10F;c.28G > T) <i>KIT</i> (M541L;c.1621A > C) <i>STK11</i> (I35M;c.105C > G)
<i>CDKN2A</i> 启动子甲基化	存在	未知
预后		
术后治疗	无	未知
生存	第90个月死于无关疾病(心脏病)	1个月后死亡

APC, 大肠腺瘤性息肉病; ARID1A, AT 富集相互作用域 1A; CDKN 2A/P16, 细胞周期依赖性激酶抑制因子 2A; POLE, DNA 聚合酶 ϵ 催化亚基; MSI, 微卫星不稳定性; MMR, 错配修复蛋白; PTEN, 磷酸酶和张力蛋白同源物; KIT, 原癌基因 c-KIT; STK11, 丝氨酸/苏氨酸激酶 11; TP53, 肿瘤蛋白 P53。

为确认 p16 IHC 阴性结果, 在另一个实验室重复 p16 IHC, 得到相同的阴性结果。肿瘤浸润浅肌层 (3/17 mm), 宫颈间质有浸润。未见淋巴管浸润, 由于患者身体较差, 术中未行淋巴结清扫。腹腔冲洗液阴性。患者选择不接受辅助化疗及放射治疗。术后随访 90 个月仍无疾病存活, 病人死于无关的原因。

病例 2: 79 岁女性, 突发阴道大出血, CT 检查发现子宫内肿块。在非诊断性子宫内膜活检后, 患者接受了腹部全子宫切除术、双侧输卵管卵巢切除术以及淋巴结清扫术。大体,

肿瘤最大径 6.5 厘米。组织学上, 肿瘤呈现不明确分型但高级别组织特征, 生长方式从乳头状到实性, 伴有肿瘤细胞坏死。肿瘤细胞高度异型, 核仁明显, 局灶见多核瘤巨细胞, 核分裂指数高 (图 2A, B)。IHC 显示肿瘤细胞 p16 完全阴性 (图 2C), P53 核弥漫强阳性表达 (图 2D), ER 阴性 (图 2E), ARID1A 核表达保留 (图 2F), MMR 蛋白也保留表达。p16 IHC 阴性结果在另一家实验室得到了证实。肿瘤浸润子宫肌壁全层, 累及子宫浆膜表面。浸润宫颈间质, 宫颈旁切缘阳性。14 个淋巴结中 6 个有转移, 有广泛的淋巴管浸润。腹膜冲洗液阴性。患者术后伤口感染并得到恢复, 开始化疗前一个月去世。死亡原因未记录在现有医疗文件中。

分子分析

本文寻找更多的证据证明这些肿瘤确实代表 SC 而不是 HGEC。与 SC 不同, HGEC 通常是 MSI-H, 存在 *PTEN* 和 *POLE* 突变。因此, 对肿瘤进行了 MSI 和 *POLE260* 热点区域突变分析。从肿瘤和匹配的良性组织中提取基因组 DNA 并行 MSI 分析。结果显示 2 例均为微卫星稳定。NGS 测序没有发现 *POLE* 的热点区域突变。

为了进一步确定这 2 例肿瘤的特征及证实其 *TP53* 突变, 应用威斯康星大学医院和诊所内部的癌症基因突变检测方案, 进行了 NGS 测序研究 (详见材料和方法部分)。病例 1 肿瘤存在 *TP53* 致病错义突变 (G245S; C.733G>A), 以及结肠腺瘤性息肉病 (*APC*) 一个未知意义的变异 (K1454E; C.4360A>G)。病例 2 肿瘤也存在 *TP53* 致病错义突变 (C277F; C.830G>T) 以及 *TP53* (V10F; c.28G>T)、*KIT* (M541L; c.1621A>C) 和丝氨酸/苏氨酸激酶 11 (*STK11*) (I35M; c.105C>G) 不明意义的变异。2 例中均未检测到检测套餐中的 *PTEN*、*AKT1*、*PIK3CA*、*KRAS* 和 *CTNNB1* 基因热点区域的突变。

为了确定 p16 IHC 表达缺失的分子基础, 首先应用 FISH 确定是否存在位于 9 号染色体上编码 p16 *CDKN2A* 基因的缺失。FISH 结果显示在病例 1 中发现 9 号染色体单体 (图 3A), 而病例 2 显示 *CDKN2A* 纯合性缺失 (图 3B)。我们想知道为什么病例 1 尽管保留了一个完整的 *CDKN2A* 拷贝, 并且 Sanger 测序未发现 *CDKN2A* 任何致病突变, 但 p16 IHC 阴性。由于 *CDKN2A* 启动子的超甲基化, 可导致 p16 表达丢失^[18-23]。因此, 对病例 1 的 *CDKN2A* 启动子进行了甲基化分析, 以确定保留的拷贝是否在表观遗传上沉默, 结果揭示

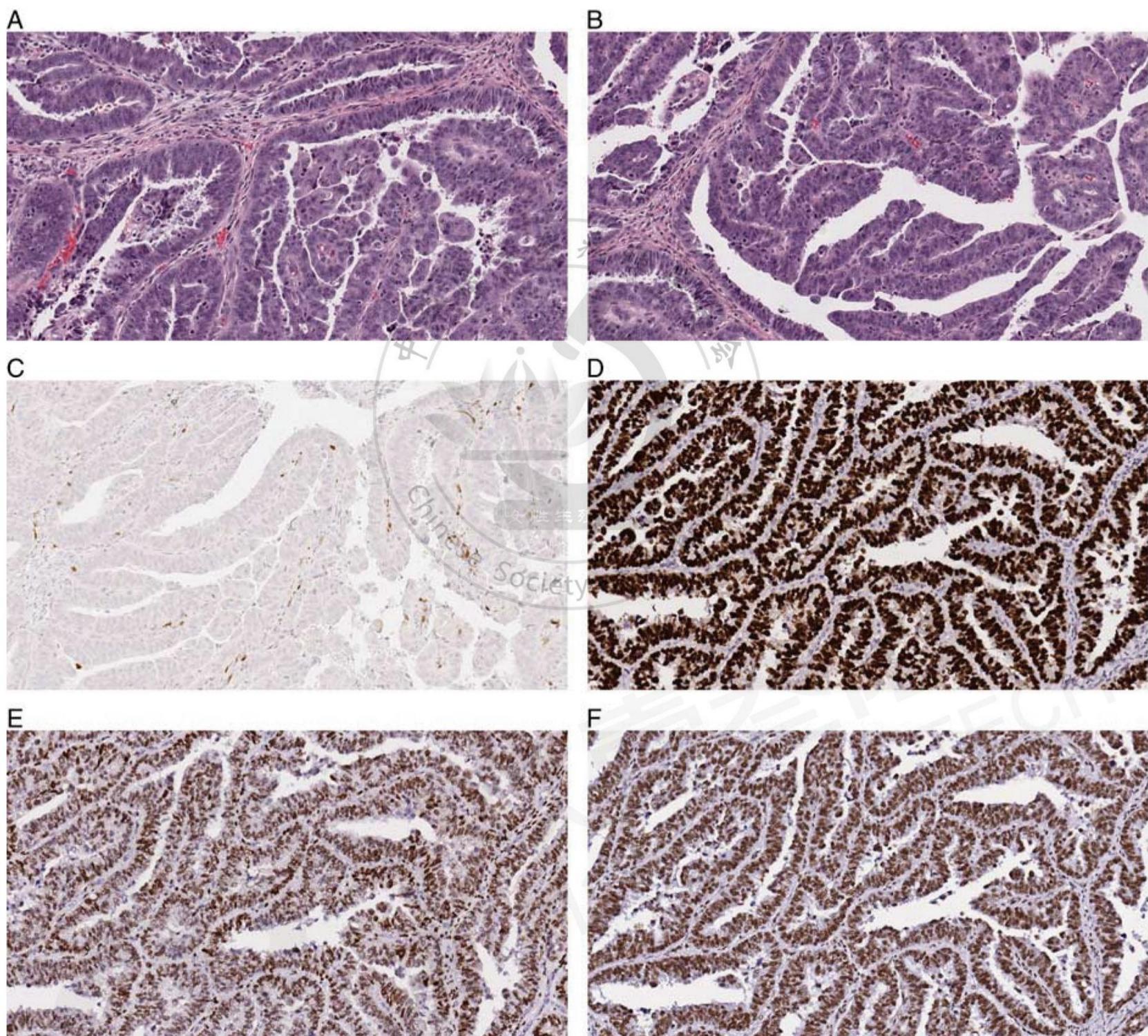


图1.病例 1, 浆液性癌。肿瘤显示子宫内膜浆液性癌的典型组织学特征, 包括实性、腺样、乳头状和微乳头状生长模式, 伴高级别核以及高核分裂像数 (A、B)。p16, 肿瘤细胞未见染色, 背景间质/内皮细胞有局灶免疫反应 (C)。p53, 肿瘤细胞弥漫强阳性染色 (D)。ER, 肿瘤细胞呈弥漫中等阳性染色 (E)。ARID1A, 肿瘤细胞显示核染色 (F)。

了保留的 *CDKN2A* 等位基因启动子超甲基化 (图 3C)。

讨论

p16 是一种细胞周期抑制因子, 通常在多种非肿瘤性成熟细胞中表达, 包括良性子宫内膜中的部分细胞^[24]。它也是一种真正的抑癌基因, 在高达 50% 的人类癌症中发生突变或下 p16 调^[25]。在这些肿瘤中, p16 缺失通常与不良预后相关^[26-28]。p16 表达的缺失至少可以通过 3 种方式发生: (1) 基因缺失, (2) 启动子甲基化, 或 (3) 点突变, 前两种机制占 *CDKN2A* 失活事件的绝大多数^[29, 30]。然而, 在包括 SC 在内

的一些类型的癌症中, p16 是过表达的^[2, 6, 15, 16, 31-33]。p16 在 SC 中过度表达没有显示与 *CDKN2A* 突变有关, *CDKN2A* 突变在子宫内膜癌中罕见^[7, 14]。相反, p16 过表达是 *CDKN2A* 基因完整, 因抑制了其他细胞周期调节抑癌基因的功能失活而导致的细胞增殖, 如 p53 和视网膜母细胞瘤蛋白 (pRB)^[25, 34]。鉴于 *TP53* 在几乎所有 SC 中发生了突变, 因而 p16 在这种肿瘤中常过表达^[2, 6, 7, 15, 16, 31-33, 35]。同样, 常见的无 *TP53* 突变的子宫内膜癌, 如子宫内膜样腺癌, 其 p16 的表达特征应该是与正常子宫内膜组织类似的非弥漫阳性表达模式^[15, 24]。

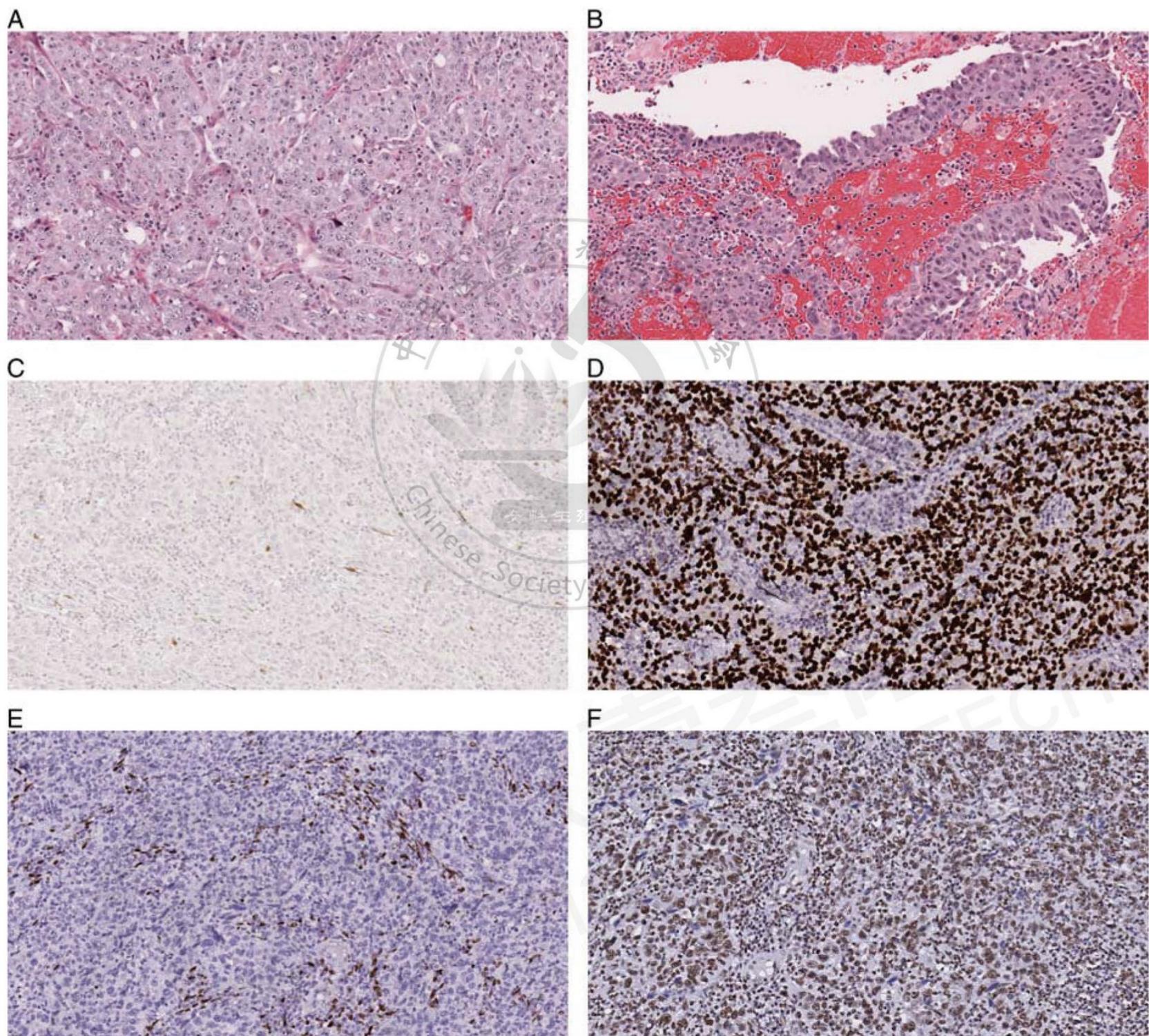


图2.病例 2，浆液性癌。肿瘤显示不明确分型但高级别的形态，伴实性及乳头状生长模式。核仁明显、局灶见多核瘤巨细胞和高核分裂像数，有坏死（A，B）。p16，肿瘤细胞无染色，背景间质/内皮细胞和淋巴细胞有局灶免疫反应（C）。p53，肿瘤细胞显示弥漫强阳性染色（D）。ER，肿瘤细胞未显示染色，背景间质细胞中呈阳性染色（E）。ARID1A，肿瘤细胞显示核染色（F）。

在 SC 等肿瘤中，p16 的过度表达是 *TP53* 突变的一种代偿机制，为了促进更多的细胞增殖，可能存在选择性地沉默 p16 表达的压力^[34]。如上所述，p16 沉默的机制包括基因缺失和启动子甲基化。在食管癌、结肠癌、膀胱癌、肺癌和其他多种肿瘤中，*CDKN2A* 启动子甲基化可抑制 p16 的表达，已证明（尽管并非总是）与不良预后有关^[18-23, 36]。然而，这在子宫内膜癌中非常罕见，在一项研究中 138 例子官内膜肿瘤中只有 1 例检测到甲基化^[37]。基因的缺失或启动子甲基化均会导致 p16 完全缺失表达^[14, 23, 36]。

本文报告的 2 例 p16 IHC 染色完全缺失的 SC，随后通过

同时进行 IHC 和分子检测，包括 p53，ARID1A 和 MMR 蛋白的 IHC 和 MSI，*POLE*，*PTEN* 和 *TP53* 突变的分子检测，证实为 SC。根据我们 10 年间诊断的 63 例 SC 病例队列，p16 阴性病例占 SC 的 3.2%。为了确保 p16 阴性染色结果不是由于对 SC 敏感性低的抗体克隆所致，我们使用了 Chen^[38]和 Yemelyanova^[15]等人使用的相同的 E6H4 抗体，在这 2 个研究中 97/101 例（96%）p16 蛋白呈弥漫阳性染色。此外，这 2 个病例的 p16 IHC 染色均在实验室平台和我们日常临床工作中使用的经过验证的临床组织实验室进行了检测。同时 2 例病例中我们均使用了包含肿瘤量最多区域的全切片，

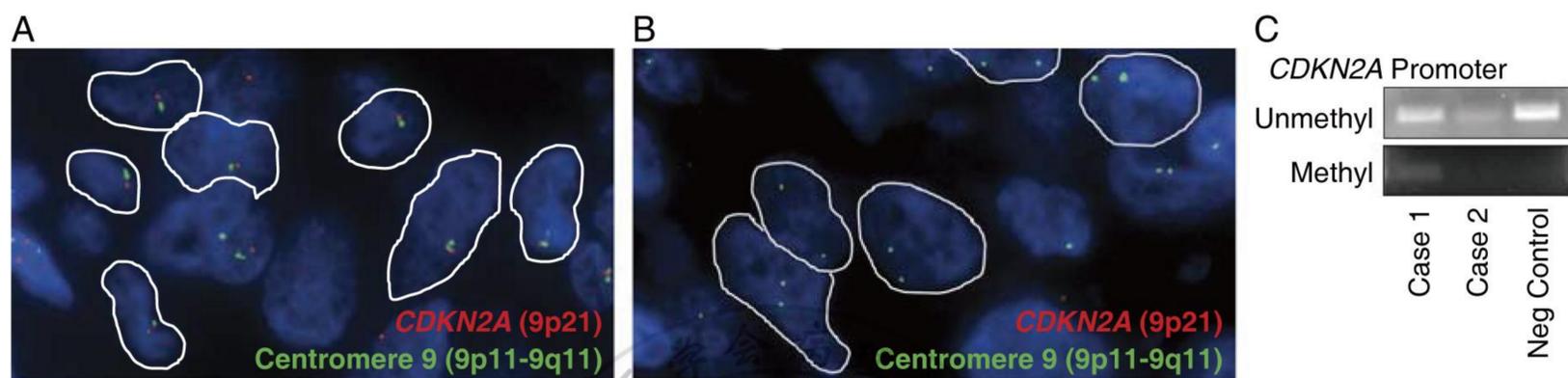


图3. *CDKN2A* FISH 结果。病例 1 的肿瘤切片仅显示着丝粒 9 和 *CDKN2A* 的单一信号，反映了染色体 9 的单体 (A)。例 2 的肿瘤切片 (B)。红色信号表示 *CDKN2A* (9p21) 探针，绿色信号表示着丝粒 9 (9p11-9q11) 探针。跨越 *CDKN2A* 启动子的甲基化特异性 PCR 证实了病例 1 中的启动子甲基化，附带阴性对照样本。在 *CDKN2A* 纯合子缺失的病例 2 中检测到微弱的 *CDKN2A* 启动子，可能反映了肿瘤旁良性组织中基因组 DNA 的存在。

而不是 TMA 芯片，以最大限度地减少因样本因素导致的假阴性结果的可能性。最后，2 例病例我们均阐明了 p16 表达缺失的分子机制，遗传和表观遗传修饰联合能够产生阴性 p16 IHC 结果。

鉴于 p16 在子宫内膜中的“正常”表达状态^[24]，正如在子宫内膜样腺癌等非 SC 肿瘤中以低水平表达为特征^[15]，p16 有 2 个“异常”形式表达：(1) 常见的过表达模式，即绝大多数（至少 90%）肿瘤细胞呈现强的核和胞浆染色，主要是 p16 对 *TP53*^[15, 34]突变的代偿反应；(2) 罕见的完全阴性或“缺失”模式，即 *CDKN2A* 基因的双等位基因失活，p16 的代偿反应缺失。这类似于 SC 中 p53 的“全或无”的两种异常染色^[8]。

其他作者已经认识到，从免疫表型的角度来看，一些子宫内膜癌病例可能不符合我们的预期。Fadare 等^[39]表明在临床和形态学符合 SC 的前提下，野生型 p53 染色结果不一定排除 SC 的诊断，甚至证实这些病例可能仍然具有致病性 *TP53* 突变。Matrai 等^[40]证实在某些 SC/HGEC 混合型病例中，HGEC 成分 p16 可显示 SC 样弥漫表达模式。

我们建议，在有恰当内对照的情况下完全阴性（缺失）p16 染色结果，如有其他经典的 SC 临床病理特征（即绝经后患者的肿瘤显示 SC 的经典组织学特征，异常的 p53 染色，保留 MMR 表达，可能的话分子检测 *POLE* 阴性结果），则符合 SC 的诊断。

致谢：作者感谢威斯康星大学生物技术中心 DNA 测序平台提供的文库制备和 Illumina 测序服务。作者感谢威斯康星大学大学生物技术中心提供生物信息学服务。作者还感谢 Drs Stephanie McGregor 和 Christopher Flynn 博士的宝贵见解。作者感谢由威斯康星大学病理和实验室医学系 (P30

CA014520) 和 NIH 主任办公室 (S10OD023526) 支持的威斯康星大学病理学实验室转化研究倡议 (TRIP)，感谢他们设施的使用和服务。作者得到了威斯康星大学麦迪逊分校病理学和实验室医学系的额外资金支持。DRM 还获得了威斯康星大学麦迪逊 Kirschstein 国家研究服务奖 (T32 HL07899) 的支持。

参考文献

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *WHO Classification of Female Genital Tumours*, 5th Ed. Lyon, France: IARC Press; 2020.
2. Murali R, Davidson B, Fadare O, et al. High-grade endometrial carcinomas: morphologic and immunohistochemical features, diagnostic challenges and recommendations. *Int J Gynecol Pathol* 2019;38(suppl 1):S40-S63.
3. Boruta DM, Gehrig PA, Groben PA, et al. Uterine serous and grade 3 endometrioid carcinomas: is there a survival difference? *Cancer* 2004;101:2214-21.
4. Hamilton CA, Cheung MK, Osann K, et al. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *Br J Cancer* 2006;94:642-6.
5. Altman AD, Ferguson SE, Atenafu EG, et al. Canadian high risk endometrial cancer (CHREC) consortium: analyzing the clinical behavior of high risk endometrial cancers. *Gynecol Oncol* 2015;139:268-74.

6. Alkushi A, Köbel M, Kalloger SE, et al. High-grade endometrial carcinoma: serous and grade 3 endometrioid carcinomas have different immunophenotypes and outcomes. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:343–50.
7. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497:67–73.
8. McCluggage WG, Soslow RA, Gilks CB. Patterns of p53 immunoreactivity in endometrial carcinomas: “all or nothing” staining is of importance. *Histopathology* 2011;59:786–8.
9. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, et al. Interpretation of P53 immunohistochemistry in endometrial carcinomas: toward increased reproducibility. *Int J Gynecol Pathol* 2019;38(suppl 1): S123–31.
10. Hussein YR, Broaddus R, Weigelt B, et al. The genomic heterogeneity of FIGO grade 3 endometrioid carcinoma impacts diagnostic accuracy and reproducibility. *Int J Gynecol Pathol* 2016;35:16–24.
11. Gilks CB, Oliva E, Soslow RA. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2013;37:874–81.
12. Bosse T, Nout RA, McAlpine JN, et al. Molecular classification of grade 3 endometrioid endometrial cancers identifies distinct prognostic subgroups. *Am J Surg Pathol* 2018;42:561–8.
13. Allo G, Bernardini MQ, Wu R-C, et al. ARID1A loss correlates with mismatch repair deficiency and intact p53 expression in high-grade endometrial carcinomas. *Mod Pathol* 2014;27:255–61.
14. Salvesen HB, Kumar R, Stefansson I, et al. Low frequency of BRAF and CDKN2A mutations in endometrial cancer. *Int J Cancer* 2005;115:930–4.
15. Yemelyanova A, Ji H, Shih I-M, et al. Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases. *Am J Surg Pathol* 2009;33: 1504–14.
16. Reid-Nicholson M, Iyengar P, Hummer AJ, et al. Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis. *Mod Pathol* 2006;19: 1091–100.
17. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017; 19:4–23.
18. Bian Y-S, Osterheld M-C, Fontollet C, et al. p16 Inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett’s esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1113–21.
19. Shima K, Noshio K, Baba Y, et al. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: cohort study and literature review. *Int J Cancer* 2011;128: 1080–94.
20. Tsutsumi M, Tsai YC, Gonzalvo ML, et al. Early acquisition of homozygous deletions of p16/p19 during squamous cell carcinogenesis and genetic mosaicism in bladder cancer. *Oncogene* 1998;17:3021–7.
21. Kashiwabara K, Oyama T, Sano T, et al. Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int J Cancer* 1998;79:215–20.
22. Shim Y-H, Park H-J, Choi MS, et al. Hypermethylation of the p16 gene and lack of p16 expression in hepatoblastoma. *Modern Pathology* 2003;16:430–6.
23. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5’ CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1:686–92.
24. Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Shaw J, et al. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Lab Invest* 1999;79: 1137–43
25. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, et al. p16 (Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 2011;30:2087–97.

26. Bartoletti R, Cai T, Nesi G, et al. Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer. *J Surg Res* 2007;143:422-7.
27. Cipriani NA, Blair EA, Finkle J, et al. Salivary gland secretory carcinoma with high-grade transformation, CDKN2A/B loss, distant metastasis, and lack of sustained response to crizotinib. *Int J Surg Pathol* 2017;25:613-8.
28. Knösel T, Altendorf-Hofmann A, Lindner L, et al. Loss of p16 (INK4a) is associated with reduced patient survival in soft tissue tumours, and indicates a senescence barrier. *J Clin Pathol* 2014;67:592-8.
29. Liggett WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1197-206.
30. Zhao R, Choi BY, Lee M-H, et al. Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16INK4a) in cancer. *EBioMedicine* 2016;8:30-39.
31. Buza N, Tavassoli FA. Comparative analysis of P16 and P53 expression in uterine malignant mixed mullerian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2009;28:514-21.
32. Netzer IM, Kerner H, Litwin L, et al. Diagnostic implications of p16 expression in serous papillary endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:1441-5.
33. Hu S, Hinson JL, Matnani R, et al. Are the uterine serous carcinomas underdiagnosed? Histomorphologic and immunohistochemical correlates and clinical follow up in high-grade endometrial carcinomas. *Mod Pathol* 2018;31:358-64.
34. Leong WF, Chau JFL, Li B. p53 Deficiency leads to compensatory up-regulation of p16INK4a. *Mol Cancer Res* 2009; 7:354-60.
35. Tashiro H, Isacson C, Levine R, et al. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997;150:177-85.
36. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-30.
37. Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;6:153-9.
38. Chen W, Husain A, Nelson GS, et al. Immunohistochemical profiling of endometrial serous carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2017;36:128-39.
39. Fadare O, Roma AA, Parkash V, et al. Does a p53 "Wild-type" immunophenotype exclude a diagnosis of endometrial serous carcinoma? *Adv Anat Pathol* 2018;25:61-70.
40. Matrai CE, Pirog EC, Ellenson LH. Despite diagnostic morphology, many mixed endometrial carcinomas show unexpected immunohistochemical staining patterns. *Int J Gynecol Pathol* 2018;37:405-13.

(孙平丽 翻译 高洪文 审校)