

卵巢透明细胞癌与上皮间质转化 (EMT) 标记物： 肿瘤出芽的免疫组化特征

Lawrence Hsu Lin, M.D., Ph.D., Ronaldo DeLeon Zamuco, M.D., and Pratibha S. Shukla, M.D.

摘要：肿瘤出芽是许多癌症的预后标志物，很大程度上被认为是上皮-间质转化 (EMT) 的一种表现。在最近的一项研究中，肿瘤出芽与早期卵巢透明细胞癌的不良预后有关。本研究中，我们在具有中位随访时间为 39.47 个月的 72 例原发卵巢透明细胞癌中检测了三种 EMT 相关蛋白 (E-cadherin, β -catenin 和 glypican-3) 的免疫表达水平。在 29 例 (40%) 肿瘤出芽病例中进一步评估了 E-cadherin 和 β -catenin 的表达水平。在肿瘤主体中，E-cadherin 和 β -catenin 的弥漫膜阳性表达分别见于 83% (60/72) 和 81% (58/72) 的病例。7 例 (10%) E-cadherin 核浓染，无 β -catenin 核阳性病例。Glypican-3 在 33.3% (24/72) 病例中弥漫表达，29.2% (21/72) 斑片状表达，37.5% (27/72) 不表达。在肿瘤出芽中，29/29 (100%) 病例中的 E-cadherin 和 26/29 (90%) 病例中的 β -catenin 出现异常表达 (完全丢失/浆阳性/减弱，或者不连续不完整的膜阳性)。在肿瘤主体中，E-cadherin、 β -catenin、glypican-3 的表达与分期、淋巴结转移、疾病复发/进展、末次随访状态、生存时间和病理特征无相关性 ($P > 0.05$)。

本研究发现 E-cadherin 和 β -catenin 在肿瘤出芽中表达异常，表明肿瘤出芽与 Wnt 信号通路/EMT 有关，肿瘤出芽可作为早期卵巢透明细胞癌的预后标志物。

关键词：透明细胞癌；卵巢癌；E-cadherin； β -catenin；Beta-catenin；Glypican-3

(*IJGP*.2023 Nov.;42(6):602-612)

卵巢透明细胞癌 (Clear cell carcinoma, CCC) 是一种罕见的上皮性肿瘤，好发于相对年轻的女性，与子宫内膜异位症有很强的相关性，并表现出多种组织学形态^[1-4]。由于传统的与肿瘤侵袭性相关的组织学特征，如组织学结构、核级别和分裂象未被发现在预测临床预后中，世界卫生组织 (WHO) 肿瘤分类不推荐对 CCC 进行组织学分级^[5]，分期被 WHO 认可为唯一的预后因素^[5]。在最近对 76 例 CCC 患者的研究中，我们发现肿瘤出芽与较短的生存期、复发和进展率增加相关^[6]。肿瘤出芽被认为是上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的一种表现，已被显示与多种肿瘤的侵袭行为有关^[7, 8]。

EMT 是一个多步骤的过程：细胞改变其上皮表型，失去细胞-细胞粘附，获得间充质表型，具有更高的侵袭和迁移潜能。EMT 的特征之一是上皮细胞特异性跨膜粘附连接蛋白 E-cadherin 的膜定位丧失，通常与膜性 β -catenin 的减少相关，提示 Wnt 信号通路的激活^[7-9]。既往研究发现，E-cadherin 丢失与 CCC 患者的不良临床预后相关^[10, 11]。Wnt/ β -catenin 通路已被证实在卵巢癌发生过程中起作用^[12]。

Glypican-3 是一种蛋白多糖，可调节细胞生长，并可激活 Wnt/ β -catenin 通路^[13-15]。已有研究表明，glypican-3 的表达与 ARID1A 表达丢失的 CCC 亚组的不良预后相关^[16]，与分期晚相关^[17]。

From the Department of Pathology, NYU Langone Health, New York, NY.

This work was supported in part by the NYULH Pathology Department Translational Research Program (TRP). The NYULH Center for Biospecimen Research and Development, Histology and Immunohistochemistry Laboratory (RRID:SCR_018304), is supported in part by the Laura and Isaac Perlmutter Cancer Center Support Grant; NIH/NCI P30CA016087. The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to Pratibha S. Shukla, MD, Department of Pathology, NYU Langone Health, New York, NY 10016. E-mail: pratibha.shukla@nyumc.org.

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website, www.intjgynpathology.com.

为了研究我们前期描述的肿瘤出芽的形态学表现^[6]是否与 EMT 有关, 我们评估了 E-cadherin 和 β -catenin 免疫组化染色在肿瘤出芽中的表达。我们还评估了 E-cadherin、 β -catenin 和 glypican-3 在肿瘤主体中的表达的模式及其临床意义。

材料与方法

本研究是经 IRB 批准的一项回顾性队列研究, 研究对象为 2001-2020 年间诊断为 CCC 的患者, 具有完善的随访信息和术后福尔马林固定石蜡包埋组织。多头显微镜下盲阅病理切片, 证实为纯 CCC。记录以下如前所述的组织病理学特点^[6]: 有无实体成分, 核异型性 (低级别/高级别), 热点区域核分裂像个数/10HPF (2.4mm^2), 瘤内出芽 (瘤内非胶原化间质中单个细胞或 <5 个细胞组成的细胞簇), 瘤周出芽 (肿瘤和非肿瘤交界处间质中单个细胞或 <5 个细胞组成的细胞簇), 瘤周和瘤内炎症, 子宫内膜异位症, 透明细胞腺纤维瘤, 淋巴结受累情况及病理分期。每个病例选择一个有代表性的切片进行免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC)。

从患者病历中检索临床资料, 包括年龄、临床分期、治疗方式和末次随访状态。患者被分类为: (a) 完全缓解 (治疗后随访期间未发现病变), (b) 疾病复发 (一段时间未发现疾病后又发现新病变), (c) 疾病进展 (治疗后疾病持续和进展)。

IHC

在每个病例的代表性肿瘤切片上, 采用以下抗体进行 E-cadherin、 β -catenin 和 glypican-3 的免疫组化染色: 未偶联的鼠抗人 β -catenin 抗体 (克隆号 14, IVD, Cell Marque); 鼠抗人 glypican-3 抗体 (克隆号 GC33, IVD, Ventana Medical Systems, Roche) 和未偶联的兔抗人 E-cadherin 抗体 (克隆号 EPY700Y, IVD, AbCam)。利用 Ventana Medical Systems Discovery Ultra 平台和 Ventana 的试剂和检测试剂盒, 使用经过验证的体外诊断方法, 对所有标记物进行检测。简言之, 将 $5\mu\text{m}$ 组织切片收集到 Plus 载玻片 (Fisher Scientific, Cat#22-042-924) 上, 风干后在室温下保存。切片脱蜡, 然后在 CC1 (TRIS Borate-EDTA, ph 8.5, Cat#950-224) 中抗原修复 36 分钟。一抗孵育时间分别为 24 分钟、32 分钟、16 分钟。用 Ultra-

view DAB 检测标记物。然后切片经蒸馏水洗涤、苏木精复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明, 最后中性树胶封片。实验过程采用合适的阳性和阴性对照。

在临床结果未知情况下, 在肿瘤主体中评估这三种标志物的免疫组化表达。E-cadherin 判读标准与之前采用的标准类似^[10, 11]: 1) 弥漫表达: $\geq 10\%$ 肿瘤细胞中出现连续的膜染色 (完整膜染色或基底-外侧膜染色); 2) 表达丢失: $< 10\%$ 肿瘤细胞中表达。 β -catenin 判读标准: 1) 弥漫表达: $> 50\%$ 肿瘤细胞中呈现连续完整膜染色或基底-外侧膜染色; 2) 表达减弱: $\leq 50\%$ 肿瘤细胞阳性。记录这两种抗体的核表达情况。Glypican-3 判读标准: 根据染色强度 (0: 无; 1: 弱阳性; 2: 中等阳性; 3: 强阳性) 和阳性肿瘤细胞百分比 (0: 缺失; 1: 1%-9%; 2: 10%-49%; 3: $\geq 50\%$) 进行综合评分。此外, 我们还检测了 E-cadherin 和 β -catenin 在肿瘤出芽部位的表达。将瘤内出芽或瘤周出芽细胞的染色与同一病例中相邻的大的肿瘤巢的染色进行对比。

统计学分析

采用 Fisher 精确检验分析分类变量。采用 Shapiro Wilk 检验评估连续变量的正态分布情况。对正态分布的连续变量采用 t 检验, 对非正态分布的连续变量采用 Mann-Whitney U 检验。采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 log rank 检验进行生存分析。

结果

共纳入 72 例患者, 中位年龄 50 岁 (IQR: 45-62 岁), 中位随访时间 30.47 个月 (IQR: 12.9-86.3)。我们前期研究的 76 例队列中^[6], 有 4 例因缺乏石蜡包埋组织块而被排除。大多数患者在诊断时为 I 期 (39/72; 54%), 16% 接受淋巴结清扫的患者存在淋巴结受累 (10/61)。初始治疗后, 62% 的患者完全缓解无复发 (45/72), 28% 的患者在随访期间出现复发 (20/72), 10% 的患者在治疗后仍出现疾病进展 (7/72)。截至随访日, 14% 的患者死于该疾病 (10/72), 21% 的患者存活 (15/72), 65% 的患者无疾病证据 (47/72)。

免疫组化染色结果见表 1。在肿瘤主体中, 83% (60/72) 的 E-cadherin 表现为弥漫膜阳性, 17% (12/72) 的病例表现为膜染色丢失。该 12 例中有 8 例表现为致密的胞浆阳性, 无膜着色浓积, 其余 4 例 E-cadherin 表达完全丢

失。7例(9.7%)表现为 E-cadherin核阳性,其中5例(71%)同时有胞浆阳性和膜染色丢失。 β -catenin在78%(56/72)的肿瘤中呈弥漫膜阳性,16例(22%)的肿瘤细胞膜表达减弱($\geq 50\%$ 的肿瘤细胞膜表达丢失)。所有病例均无 β -catenin核表达。4例同时具有 E-cadherin和 β -catenin膜染色减弱。Glypican-3在33.3%(24/72)表现弥漫强阳性表达(4-6分),29.2%(21/72)表达降低(1-3分),37.5%(27/72)完全不表达(图1)。

33例 HE 切片中可见肿瘤出芽(33/33为瘤内出芽,7/33为瘤周出芽),其中有4例瘤内出芽病灶很小,在 IHC 染色切片中 E-cadherin和 β -catenin显示弥漫膜表达而不能识别,因此该4例未被纳入肿瘤出芽免疫染色评估。其余29例肿瘤出芽显示 E-cadherin表达异常,表现为膜强度减弱、密集或微弱的胞浆阳性而无膜阳性(偶尔为胞浆内小球)、颗粒状不完整膜着色或着色完全丢失(图2-5)。29例肿瘤出芽中有26例(90%)出现 β -catenin的异常表达。其特征是染色完全丢失,膜染色不连续,或胞浆着色增强,但无膜浓积(图2-5)。29例中有26例(90%)的肿瘤出芽同时具有 E-cadherin和 β -catenin的异常表达。与出芽周围的肿瘤组织相比,出芽区域的 E-cadherin和 β -catenin的染色强度减弱,多数病例在低倍镜下即可发现二者表达异常。肿瘤出芽病灶内的芽偶尔也表现为 E-cadherin和/或 β -catenin的完整膜着色。

在大多数病例中,随着肿瘤出芽与肿瘤主体分离, E-cadherin和 β -catenin的膜表达逐渐丢失。29例肿瘤出芽 E-cadherin异常表达的病例中,有6例(20.6%)在肿瘤主体中也出现 E-cadherin膜表达丢失(4例核浆阳,2例仅浆阳)。26例 β -catenin肿瘤出芽异常表达的病例中,有7例(27%)在肿瘤主体中也表现为膜表达减弱($< 50\%$)。所有病例的肿瘤出芽中均未见 E-cadherin或 β -catenin的核表达,瘤内和瘤周出芽病灶的异常染色模式无差异。

在所有病例、早期亚组(1和2期)、晚期亚组(3和4期)中,肿瘤主体的 E-cadherin、 β -catenin和 glypican-3的表达水平与分期、淋巴结转移、复发/进展情况、末次随访状态和总生存期均无相关性($P > 0.05$,表2,图6A)。此外,肿瘤主体中 E-cadherin、 β -catenin和 glypican-3免疫表达情况与组织病理学特征(如有无实体成分、有丝分裂活性、核异型性、瘤内和瘤周炎症、瘤内和瘤周出芽、是否伴有子宫内膜异位症和/或透明细胞腺纤维瘤)无相关性(补充表

1 Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/IJGP/A138>)。E-cadherin的核表达与肿瘤分期和预后均无相关性($P > 0.05$)。在所有病例以及早期亚组(1-2期)中,肿瘤出芽(通过 E-cadherin和 β -catenin的异常染色模式证实)与疾病复发/进展和不良预后显著相关($P < 0.05$,表3,图6B和C),这与我们前期已发表文章中对形态学分析的结果相似^[6]。在早期亚组中,仅有3例出现明确的淋巴血管侵犯(LVI),均表现为肿瘤出芽, E-cadherin和 β -catenin表达异常,并出现复发/疾病进展。早期亚组中 LVI与肿瘤出芽($P = 0.044$)和疾病复发/进展($P = 0.004$)相关,但与生存无关($P = 0.65$)。

讨论

肿瘤出芽是结直肠癌和其他几种实体癌中公认的预后标志物。通过 TGF- β 和 Wnt 信号通路激活 E-cadherin 抑制因子从而导致细胞膜 E-cadherin和 β -catenin的丢失是 EMT 的主要机制之一,导致出芽的肿瘤细胞从肿瘤主体分离,并侵犯和浸润间质^[8]。我们最近描述了 CCC 中的肿瘤出芽(瘤内和瘤周),并揭示其与整个研究队列和早期亚组(1期和2期)患者的不良预后的相关^[6]。肿瘤出芽在其他肿瘤中的预后意义已得到很好的证实,本研究的一个重要目的是评估 CCC 中肿瘤出芽的形态学表现是否与 EMT 相关,是否类似于其他癌症中肿瘤出芽的预后意义^[7-8]。

我们评估了 E-cadherin和 β -catenin在肿瘤出芽区域的免疫染色,发现大多数肿瘤出芽同时具有 E-cadherin和 β -catenin的异常染色模式(膜着色减少/丢失/胞浆着色),也观察到从肿瘤主体到肿瘤出芽,膜染色强度逐渐减弱。我们观察到,肿瘤出芽与邻近肿瘤细胞团相比,染色强度减弱,并且从膜染色转为胞浆染色,这与 Bronsert 等人在结直肠癌、胰管癌、肺癌和乳腺癌的肿瘤出芽中研究 E-cadherin 表达的结果相符^[18]。在肿瘤出芽的病灶内,偶尔会有分散的肿瘤芽保留 E-cadherin或 β -catenin膜表达,此外有3例 E-cadherin异常表达但 β -catenin膜表达完整,这些均表明 EMT 可能是一个动态过程,根据侵袭阶段不同,同一肿瘤中 E-cadherin可表达丢失或重新表达^[7, 8]。

在前期发表的 CCC 形态学研究中,我们描述了肿瘤出芽的三种不同组织学模式^[6]: (1) 单个或小的成角的肿瘤细胞簇浸润纤维间质, (2) 单个/小细胞簇悬浮于水肿间质中, (3) 具有“污秽”的染色质和致密嗜酸胞浆的单个细胞浸润

表1. 卵巢透明细胞癌免疫组化总结

E-cadherin		β-catenin		Glypican-3	
表达模式	例数, n/N (%)	表达模式	例数, n/N (%)	表达模式	例数, n/N (%)
肿瘤主体中表达					
弥漫膜阳性 (≥10%)	60/72 (83.3)	弥漫膜阳性 (>50%)	56/72 (77.7)	弥漫性着色	24/72 (33.3)
散在核阳性	2/60 (3.0)	膜表达减弱 (≤50%)	16/72 (22.3)	斑片状着色	21/72 (29.2)
膜丢失表达 (<10%)	12/72 (16.7)	仅胞浆着色	1/72 (1.4)	无着色	27/72 (38.5)
胞浆及核着色	5/12 (6.9)	核着色	0		
仅胞浆着色	3/12 (4.1)				
无着色	4/12 (5.5)				
表达模式		E-cadherin, n/N (%)		β-catenin, n/N (%)	
肿瘤出芽中表达					
连续完整膜着色, 或基底-外侧膜着色		0/29 (0)		3/29 (10)	
异常表达 (膜表达丢失或不连续, 伴胞浆表达)		29/29 (100)		26/29 (90)	

肿瘤内间质。我们发现, 与附近较大的肿瘤巢相比, 三种类型的肿瘤出芽模式中 E-cadherin 和 β-catenin 均显示异常染色 (图 2-5)。4 个病例, HE 切片中瘤内出芽非常少 (每个病例只一个病灶, 伴 1-2 个出芽), 免疫切片中未发现肿瘤出芽病灶可能是深切片中病灶消失的原因。肿瘤出芽 (E-cadher-

in/β-catenin 异常表达证实) 与整个队列以及早期亚组 (1 期和 2 期) 患者的较短生存期和较高的肿瘤复发/疾病进展率密切相关, 这与前期在较大队列中依据形态诊断为肿瘤出芽的研究结果相似^[6]。早期亚组患者的 LVI 与预后不良相关^[19]。虽然仅在我们的 3 例早期患者中观察到明确的 LVI, 但其与复

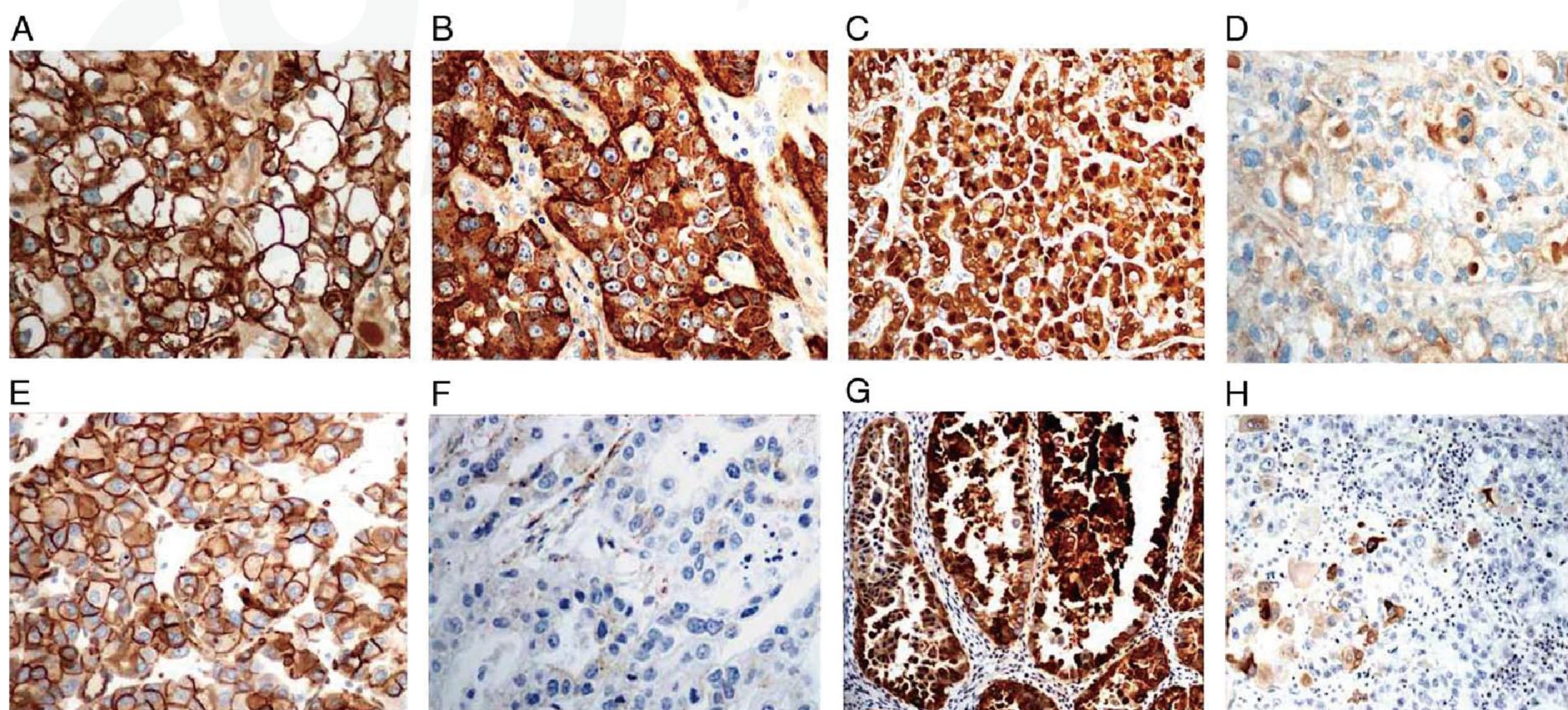


图1.E-cadherin, β-catenin 和 glypican-3 免疫组化表达模式。(A-D) E-cadherin: (A) 弥漫膜染色; (B) 胞浆浓聚无膜深染; (C) 核深染; (D) 表达完全丢失。(E 和 F) β-catenin: (E) 弥漫膜染色; (F) 染色丢失。(G 和 H) Glypican-3: 弥漫阳性和斑片状染色。

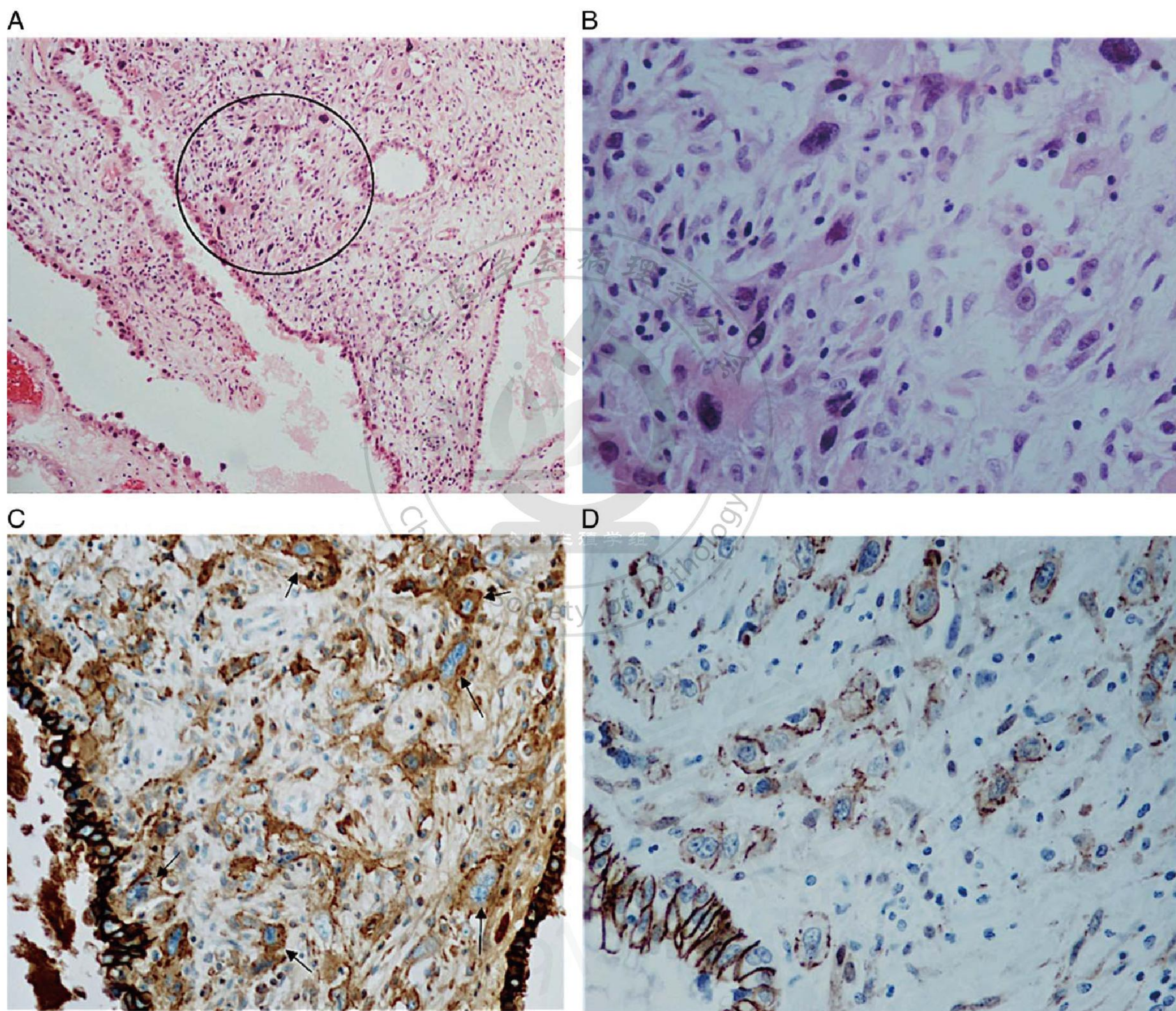


图2.瘤内出芽。(A) 肿瘤内的水肿性间质中出现了单个梭形或多边形细胞，这些细胞在形态上与衬附在腺体结构上的细胞相似(HE)。(B) 图A圆圈区域高倍放大。(C) E-cadherin 在出芽的肿瘤细胞中显示微弱的胞浆着色(箭头)，而在衬附在腺体结构的细胞中保留了膜强阳性着色。(D) β -catenin 在出芽细胞中显示膜表达完全丢失，或不连续的颗粒状膜着色，而在肿瘤腺体中保留完整连续的膜着色。

发/疾病进展以及肿瘤の出芽相关性不仅提示 LVI 自身的预后意义，而且支持肿瘤出芽是早期肿瘤的侵袭性特征。

我们发现的肿瘤出芽中 E-cadherin 和 β -catenin 表达异常，表明我们之前在 CCC 形态学观察到的肿瘤出芽与结直肠癌、胰管癌和食管癌中描述の出芽有相似的生物学过程^[20-22]，因此支持它们可作为潜在的强有力的预后标记物，特别是对于早期 CCC 患者。我们的研究表明，需要进一步研究 CCC 肿瘤出芽的形态学诊断标准和预后意义。

CCC 的 IHC 研究聚焦于各种类型的标志物，包括靶向治疗相关的生物标志物、增殖或细胞死亡标志物、细胞周期调

节，它们与临床结果的相关性已经显示出不同的结果^[23-28]。E-cadherin 和 β -catenin 的表达与多种肿瘤的临床预后相关，如肺癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、卵巢浆液性癌等^[29-34]。Voutilainen 等人评估了 E-cadherin 和 β -catenin 在卵巢癌中的表达，显示在 30 例 CCC 中，E-cadherin 膜表达丢失病例占 63%， β -catenin 表达丢失病例占 47%^[32]。他们对研究中的所有卵巢癌患者随访了 10 年，发现 E-cadherin 和 β -catenin 的膜表达丢失与不良预后相关。一项包括卵巢癌的各种组织类型研究的荟萃分析也发现，E-cadherin 的丢失与总生存期相关^[33]。Ho 等人^[10]和 Huang 等人^[11]的研究也表

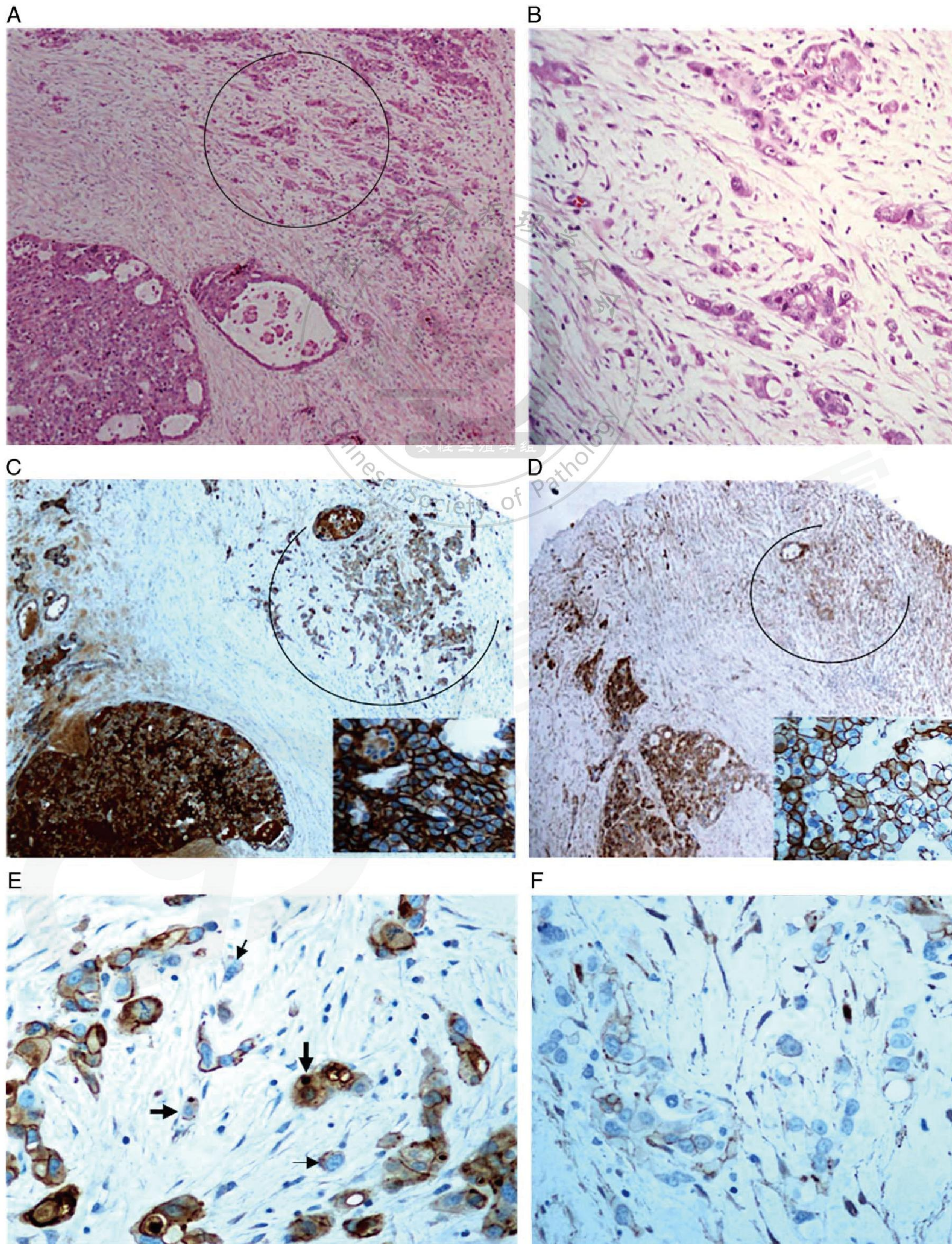


图3. 瘤内出芽。 (A) 肿瘤出芽 (圆圈中成角的小簇肿瘤细胞) 浸润瘤内间质 (HE)。 (B) A 图圆圈处高倍放大。 (C) E-cadherin 和 (D) β -catenin 在肿瘤芽中的表达明显减弱 (弧形标记区域), 而在相邻的大肿瘤巢表达增强, 高倍镜下显示膜强阳性 (插图)。 (E) 高倍镜下, E-cadherin 在肿瘤出芽中显示密集到微弱的胞浆着色 (细箭头), 常伴有胞浆内小球 (粗箭头)。 (F) 高倍镜下, 肿瘤出芽中 β -catenin 表达几乎完全丢失。

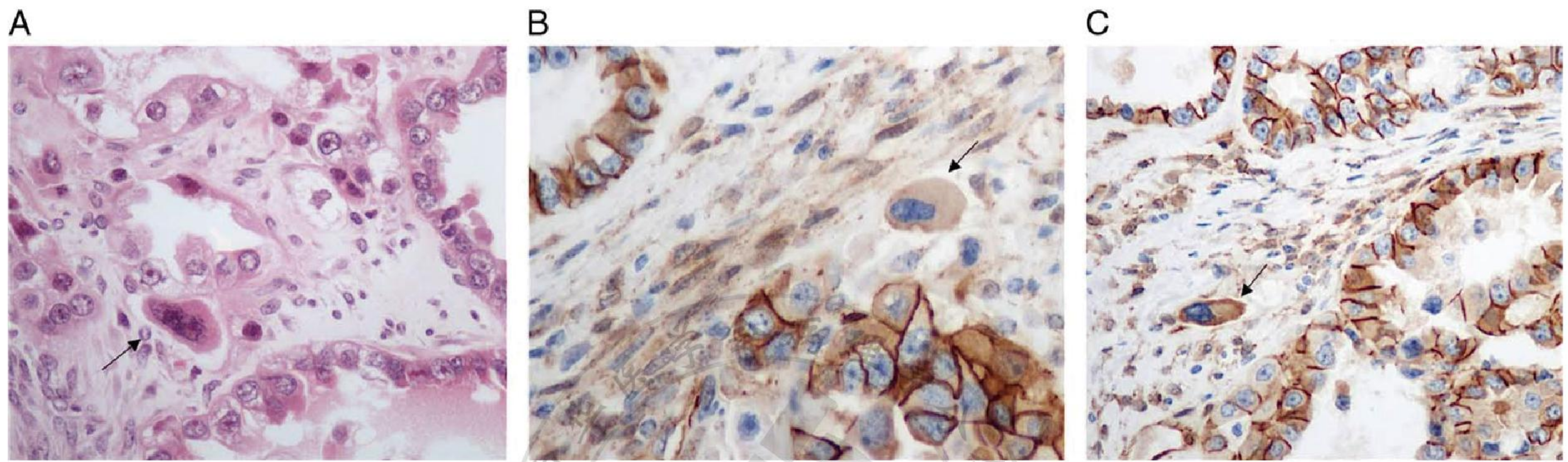


图4.瘤内出芽。(A) 具有“污秽”染色质的散在单个大细胞的浸润肿瘤内间质。(B) 在出芽的单个肿瘤细胞中, β -catenin 膜表达丢失。(C) 在出芽的单个肿瘤细胞中, E-cadherin 仅胞浆阳性。

明, E-cadherin 的丢失与 CCC 患者较短的总生存期相关。⁴⁴ E-cadherin 或 β -catenin 膜表达丢失病例的占比较低, 可以

本研究中, 虽然我们发现 17% 的病例中膜 E-cadherin 部分或完全丢失, 22% 的病例中 β -catenin 部分或完全丢失, 但二者与临床结果无统计学相关性。在我们的研究中,

用使用不同的抗体克隆号以及评估这些免疫标记存在主观性来解释。另一个可能的解释是按照人种的不同, 相同的肿瘤组织类型可能表现出不同的分子特征或生物标志物^[34, 35]。具有

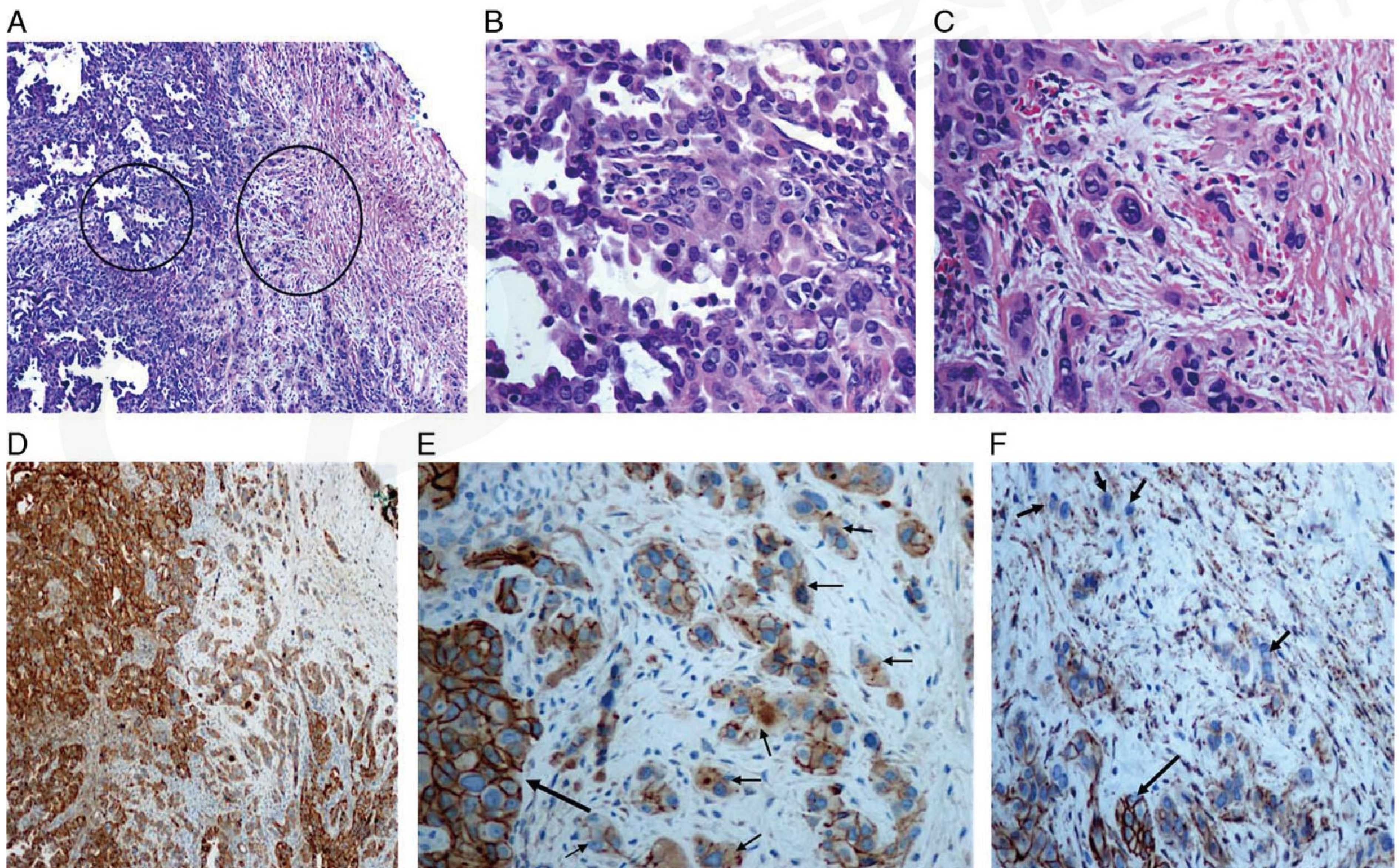


图5.瘤周出芽。(A) 肿瘤出芽浸润肿瘤周围间质, 并随着向涂墨边缘侵袭而逐渐变小。(B) 小圆圈区域高倍放大, 以显示透明细胞癌形态。(C) 肿瘤出芽高倍放大 (大圆圈区域)。(D) 肿瘤出芽中 E-cadherin 表达逐渐减弱。(E) 高倍镜下 E-cadherin 染色显示, 与相邻较大肿瘤巢 (长箭头) 中保留的连续膜强阳性相比, 肿瘤出芽中 E-cadherin 膜表达丢失或不连续, 偶有胞浆内小球 (短箭头)。(F) 高倍镜下 β -catenin 染色显示, 肿瘤出芽中 β -catenin 表达完全丢失 (短箭头), 而在相邻的较大细胞巢中显示完整膜着色 (长箭头)。

表2. 卵巢透明细胞癌 E-cadherin、 β -catenin 和 Glypican-3 的免疫组化表达及临床预后

	E-cadherin			β -catenin			Glypican-3			
	弥漫膜表达	膜表达丢失	P	弥漫膜表达	膜表达丢失	P	表达丢失 (0分)	中度表达 (1-3分)	弥漫表达 (4-6分)	P
分期 n/N (%)			>0.99			0.75				
I 和 II	43/52 (83)	9/52 (17)		41/52 (79)	11/52 (21)		22/52 (42)	12/52 (23)	18/52 (35)	0.16
III 和 IV	17/20 (85)	3/20 (15)		15/20 (75)	5/20 (25)		5/20 (25)	9/20 (45)	6/20 (30)	
淋巴结受累 n/N (%)			0.67			>0.99				
无	41/51 (80)	10/51 (20)		38/51 (78)	13/51 (22)		20/51 (39)	15/51 (30)	16/51 (31)	0.83
有	9/10 (90)	1/10 (10)		8/10 (80)	2/10 (20)		3/10 (30)	3/10 (30%)	4/10 (40)	
复发/疾病进展 n/N (%)			>0.99			0.77				
无	37/45 (82)	8/45 (18)		34/45 (76)	11/45 (24)		18/45 (40)	10/45 (22)	17/45 (38)	0.23
有	23/27 (85)	4/27 (15)		22/27 (81.5)	5/27 (18.5)		9/27 (33)	11/27 (41)	7/27 (26)	
某次随访状态 n/N (%)			0.81			0.58				
无疾病证据	39/47 (83)	8/47 (17)		36/47 (77)	11/47 (23)		18/47 (39)	10/47 (21)	19/47 (40)	0.25
带病存活	12/15 (80)	3/15 (20)		11/15 (73)	4/15 (27)		6/15 (40)	6/15 (40)	3/15 (20)	
因病死亡	9/10 (90)	1/10 (10)		9/10 (90)	1/10 (10)		3/10 (30)	5/10 (50)	2/10 (20)	

表3. E-cadherin、 β -catenin 异常表达证实肿瘤出芽的病例与无肿瘤出芽病例的临床病理比较

通过 E-cadherin / β -catenin 异常表达证实肿瘤出芽的病例	无肿瘤出芽的病例 (n=39)	P	
中位年龄 (范围), 年	51 (37-55)	49 (26-75)	
平均随访时间 (范围), 月	22.8 (1.16-230.5)	34.2 (2-216)	
淋巴结受累, n/N (%)	7/26 (19)	3/35 (9)	0.08
复发/疾病进展, n/N (%)	18/29 (62)	7/39 (18)	0.0003
末次随访时状态, n/N (%)			
NED	12/29 (41)	32/39 (82)	0.0008
AWD	9/29 (31)	6/39 (16)	0.14
DOD	8/29 (28)	1/39 (2)	0.0036
通过 E-cadherin / β -catenin 的异常表达证实肿瘤出芽的早期 (1-2 期) 病例 (n=18)	无肿瘤出芽的早期 (1-2 期) 病例 (n=31)		
中位年龄 (范围), 年	48.5 (37-75)	49 (26-70)	
中位随访时间 (范围), 月	53.9 (5.3-230.9)	50.6 (1.8-216)	
复发/疾病进展, n/N (%)	7/18 (39)	2/31 (6)	0.0079
某次随访时状态, n/N (%)			
NED	12/18 (66)	29/31 (94)	0.0389
AWD	3/18 (17)	2/31 (6)	0.34
DOD	3/18 (17)	0/31 (0)	0.0443
伴有 LVI 的早期病例 (n=3)	无 LVI 的早期病例 (n=46)		
肿瘤出芽	3/3 (100)	15/46 (33)	0.0443
复发/疾病进展	3/3 (100)	6/46 (13)	0.0046

P<0.05 为差异具有统计学意义。

AWD: 带病存活; DOD: 死于该疾病; LVI: 脉管侵犯; NED: 无疾病证据。

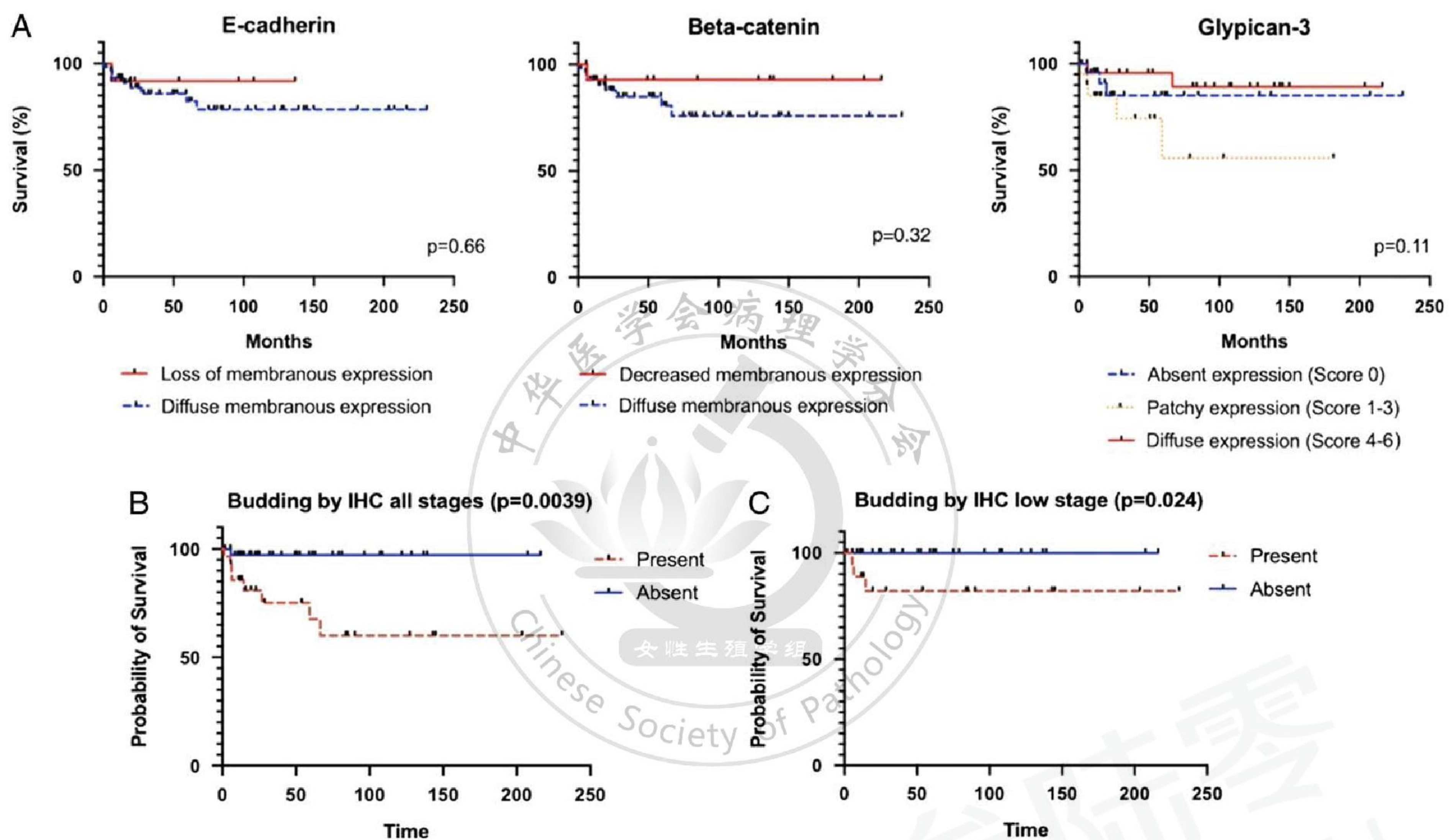


图6. (A) Kaplan-Meier 生存分析的卵巢透明细胞癌中 E-cadherin、 β -catenin 和 glypican-3 的免疫组化染色与生存期的关系。(B 和 C) Kaplan-Meier 生存分析的总研究队列 (B) 和低分期 (1-2 期) 亚组 (C) 中, 经 E-cadherin 和 β -catenin 异常表达证实的肿瘤出芽与生存期的关系。IHC: 免疫组织化学。

E-cadherin 致密胞浆染色但无膜染色的 8 例患者的肿瘤主体中, 在腺样和乳头状结构的细胞具有失黏附的表现, 其中 6 例还出现肿瘤出芽。在某些情况下, E-cadherin 膜表达丢失伴随着胞浆表达增强可能预示着肿瘤出芽, 但这并不是肿瘤出芽的先决条件, 因为有 23 例肿瘤出芽表现为 E-cadherin 弥漫膜表达。

E-cadherin 和 β -catenin 的核易位已被证明与多种肿瘤中 Wnt 信号通路的增强和不良预后相关^[36-39]。我们的病例中有 7 例为 E-cadherin 核表达, 其中 5 例还有 E-cadherin 膜表达丢失伴胞浆中大量浓聚。在所有病例中, E-cadherin 阳性及阴性细胞核随机散在分布 (图 1C), 支持 E-cadherin 核积聚的非克隆机制, 类似于 Lobo 等人在乳腺小叶癌中的观察结果^[39]。虽然 E-cadherin 核表达与疾病复发/进展之间无统计学意义, 但 7 例中有 5 例存在肿瘤出芽, 提示其侵袭性的行为。

Glypican-3 可调节不同类型细胞的迁移、存活和增殖, 并已被证明能够激活 Wnt/ β -catenin 通路^[13-15]。在卵巢癌中, glypican-3 主要在 CCC 中表达, 其高表达与 CCC 亚

组, 包括 ARID1A 表达丢失亚组、3-4 期亚组的不良预后相关^[16, 17, 40, 41]。然而, 与本研究类似, 这些研究亦未发现 glypican-3 在总 CCC 队列中的预后意义^[16, 17, 40]。我们研究未发现 glypican-3 与 CCC 早期和晚期 (1 期和 2 期和 3 期和 4 期) 亚组的预后相关。

本研究的局限性包括该研究是回顾性研究, 并且样本量较小。与前期探索 IHC 标志物对 CCC 预后意义的研究相比, 本研究纳入了更多的病例^[10, 11]。CCC 在美国是一种相对罕见的肿瘤, 需要多中心的前瞻性研究。

总之, 我们没有发现 E-cadherin、 β -catenin 和 glypican-3 在 CCC 肿瘤主体中的表达与临床结果相关。然而, 与肿瘤主体相比, 我们发现 e-钙粘蛋白和 β -连环蛋白在 CCC 肿瘤芽中异常表达, 这支持了一种观点, 即它们与肿瘤芽在结肠直肠癌、胰腺导管癌和其他肿瘤中具有相似的预后意义。本研究证实了我们前期描述的 CCC 肿瘤出芽的形态学特征的重要性, 并强调需要更大规模多中心的研究, 以完善和标准化卵巢 CCC 中肿瘤出芽的诊断标准和预后评估。

参考文献

1. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Köbel M, et al. Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage. *J Natl Cancer Inst* 2019;111:60–8.
2. Delair D, Oliva E, Köbel M, et al. Morphologic spectrum of immunohistochemically characterized clear cell carcinoma of the ovary: a study of 155 cases. *Am J Surg Pathol* 2011;35:36–44.
3. Bennett JA, Dong F, Young RH, et al. Clear cell carcinoma of the ovary: evaluation of prognostic parameters based on a clinicopathological analysis of 100 cases. *Histopathology* 2015;66:808–15.
4. Fadare O, Parkash V. Pathology of endometrioid and clear cell carcinoma of the ovary. *Surg Pathol Clin* 2019;12:529–64.
5. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Female Genital Tumours (Vol 4)*, 5th ed. Lyon, France: IARC; 2020.
6. Lin LH, Zamuco RDL, Shukla PS. Intratumoral budding is associated with poor clinical outcome in early-stage clear cell carcinoma of ovary*. *Histopathology* 2021;79:1018–29.
7. Grigore A, Jolly M, Jia D, et al. Tumor budding: the name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* 2016;5:51.
8. Lugli A, Zlobec I, Berger MD, et al. Tumour budding in solid cancers. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18:101–15.
9. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:151–66.
10. Ho CM, Ho CM, Ho CM, et al. Prognostic and predictive values of e-cadherin for patients of ovarian clear cell adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20:1.
11. Huang HN, Huang WC, Lin CH, et al. Chromosome 20q13.2 ZNF217 locus amplification correlates with decreased E-cadherin expression in ovarian clear cell carcinoma with PI3K-Akt pathway alterations. *Hum Pathol* 2014;45:2318–25.
12. Arend RC, Londoño-Joshi AI, Straughn JM, Jr, et al. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecol Oncol* 2013;131:772–9.
13. Stigliano I, Puricelli L, Filmus J, et al. Glypican-3 regulates migration, adhesion and actin cytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:251–62.
14. Capurro M, Martin T, Shi W, et al. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci* 2014;127:1565–75.
15. Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005;65:6245–54.
16. Wiedemeyer K, Köbel M, Koelkebeck H, et al. High glypican-3 expression characterizes a distinct subset of ovarian clear cell carcinomas in Canadian patients: an opportunity for targeted therapy. *Hum Pathol* 2020;98:56–63.
17. Maeda D, Ota S, Takazawa Y, et al. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Mod Pathol* 2009;22:824–32.
18. Bronsert P, Enderle - Ammour K, Bader M, et al. Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three - dimensional study of the human cancer-host interface. *J Pathol* 2014;234:410–22.
19. Koji M, Kiyoshi Y, Hasegawa K, et al. Survival outcome of stage I ovarian clear cell carcinoma with lympho-vascular space invasion. *Gynecol Oncol* 2015;136:198–204.
20. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget* 2010;1:651–61.
21. Kohler I, Bronsert P, Timme S, et al. Detailed analysis of epithelial - mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long - term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:78–84.
22. Nakagawa Y, Ohira M, Kubo N, et al. Tumor budding and E-cadherin expression are useful

- predictors of nodal involvement in T1 esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2013;33:5023–9.
23. Barreta A, Sarian LO, Ferracini AC, et al. Immunohistochemistry expression of targeted therapies biomarkers in ovarian clear cell and endometrioid carcinomas (type I) and endometriosis. *Hum Pathol* 2019;85:72–81.
 24. Min KW, Park MH, Hong SR, et al. Clear cell carcinomas of the ovary: a multi-institutional study of 129 cases in Korea with prognostic significance of Em1 and Galectin-3. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32:3–14.
 25. Katagiri A, Nakayama K, Rahman MT, et al. Loss of ARID1A expression is related to shorter progression-free survival and chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012;25:282–8.
 26. Kajiyama H, Hosono S, Terauchi M, et al. Twist expression predicts poor clinical outcome of patients with clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology* 2007;71:394–401.
 27. Liu J, Wang H, Zheng M, et al. p53 and ANXA4/NF- κ B p50 complexes regulate cell proliferation, apoptosis and tumor progression in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2020;46:2102–14.
 28. Bennett JA, Safdar N, Segal JP, et al. Evaluation of SWI/SNF protein expression by immunohistochemistry in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2021;40:156–64.
 29. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, et al. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;121:11–22.
 30. Hsu HP, Shan YS, Jin YT, et al. Loss of E-Cadherin and β -Catenin is correlated with poor prognosis of ampullary neoplasms. *J Surg Oncol* 2010;101:356–62.
 31. Li LF, Wei ZJ, Sun H, et al. Abnormal β -catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2014;20:12313–21.
 32. Voutilainen KA, Anttila MA, Sillanpää SM, et al. Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:460–7.
 33. Dai C, Cao J, Zeng Y, et al. E-cadherin expression as a prognostic factor in patients with ovarian cancer: a metaanalysis. *Oncotarget* 2017;8:81052–61.
 34. Chen S, Zhou K, Yang L, et al. Racial differences in esophageal squamous cell carcinoma: incidence and molecular features. *Biomed Res Int* 2017;2017:1204082.
 35. Miree O, Srivastava SK, Khan MA, et al. Clinicopathologic significance and race-specific prognostic association of MYB overexpression in ovarian cancer. *Sci Rep* 2021;11:12901.
 36. He Y, Davies CM, Harrington BS, et al. CDCP1 enhances Wnt signaling in colorectal cancer promoting nuclear localization of β -catenin and E-cadherin. *Oncogene* 2020;39:219–33.
 37. Keck B, Wach S, Kunath F, et al. Nuclear E-cadherin expression is associated with the loss of membranous E-cadherin, plasmacytoid differentiation and reduced overall survival in urothelial carcinoma of the bladder. *Ann Surg Oncol* 2013;20:2440–5.
 38. Gervais ML, Henry PC, Saravanan A, et al. Nuclear E-cadherin and VHL immunoreactivity are prognostic indicators of clear-cell renal cell carcinoma. *Lab Invest* 2007;87:1252–64.
 39. Lobo J, Petronilho S, Newell AH, et al. E-cadherin clone 36 nuclear staining dictates adverse disease outcome in lobular breast cancer patients. *Mod Pathol* 2019;32:1574–86.
 40. Stadlmann S, Gueth U, Baumhoer D, et al. Glypican-3 expression in primary and recurrent ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2007;26:341–4.
 41. Umezu T, Shibata K, Kajiyama H, et al. Glypican-3 expression predicts poor clinical outcome of patients with early-stage clear cell carcinoma of the ovary. *J Clin Pathol* 2010;63:962–6.

(王跃 董颖 翻译 张丽华 审校)