

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01194

· 论 著 ·

P63 在胸腺瘤亚型诊断中的作用

孙也淇,张莉萍,余 辉,曹 旭,贾小力,陈 岗*

同济大学附属上海市肺科医院病理科,上海 200433

[摘要] **目的** 探讨胸腺瘤各亚型中 P63 的表达及其在病理诊断中的意义。**方法** 收集 76 例胸腺上皮肿瘤(TET; 包括胸腺瘤及胸腺癌)标本,应用免疫组化技术(SP法)检测 P63 在 TET 各亚型中的表达。同时对比分析初始诊断、复核诊断及参考 P63 表达诊断 3 组结果。**结果** 复核诊断发现 9 例误诊,主要集中在胸腺瘤 AB 型和 B 型,还有 3 例不能确诊。P63 不同程度阳性表达于 72 例 TET 中,定位于肿瘤细胞核,并在不同 TET 亚型中呈现不同形态和分布特点。参考 P63 表达结果的病理诊断的准确率优于未参考 P63 的初始病理诊断的准确率(TET: $P=0.017$; 胸腺瘤: $P=0.032$)。结合 P63 的表达帮助确诊了复诊中不能明确的 3 例胸腺瘤亚型。**结论** 鉴于结合 P63 表达能更好地区分胸腺瘤各亚型,我们建议在临床病理诊断中将其作为常规标记物,尤其在诊断胸腺瘤 AB 型和 B 型时。

[关键词] 胸腺肿瘤;胸腺瘤;免疫组织化学;P63;WHO 分型

[中图分类号] R 736.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)11-1194-06

Role of P63 expression in diagnosis of thymoma subtypes

SUN Ye-qi, ZHANG Li-ping, YU Hui, CAO Xu, JIA Xiao-li, CHEN Gang*

Department of Pathology, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of P63 in 76 patients with thymic epithelial tumors (TET, including thymomas and thymic carcinomas) and its role in pathological diagnosis of TET based on World Health Organization classification. **Methods** Immunohistochemistry (SP method) was used to detect P63 expression in 76 different subtypes of TET tissues. The initial diagnostic results, further diagnosis results and diagnostic results considering P63 expression were analyzed and compared. **Results** The further diagnosis results identified 9 cases of misdiagnosis (mainly AB and B subtypes) and 3 uncertain cases. Different degrees of P63 expression (located in the nuclei) was observed in 72 cases, and different subtypes had different expression patterns. The diagnostic results considering P63 expression were more accurate than those not considering P63 expression (TET, $P=0.017$ and thymoma, $P=0.032$, respectively). Detection of P63 expression helped to confirm the diagnosis of the 3 uncertain cases according to the further diagnosis results. **Conclusion** Considering that P63 expression can help to better differentiate the subtypes of thymoma, it should be used as a routine marker for clinical diagnosis, especially for AB and B subtype thymoma.

[Key words] thymus neoplasms; thymoma; immunohistochemistry; P63; WHO classification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11):1194-1199]

胸腺瘤是来源于胸腺上皮细胞的少见肿瘤,临床上常根据症状和影像学表现对胸腺瘤进行初步诊断,明确诊断则需对获自于胸腔穿刺、外科活检或手术切除的标本进行详细检查^[1-3]。目前使用的胸腺瘤组织学分型标准是由世界卫生组织(WHO)于 2004 年颁布的^[4]。

该分型的提出使得胸腺瘤杂乱的分类得到了统

一,但是使用过程中仍然存在的诸多问题限制了其价值和应用^[2,5],包括:(1)胸腺瘤的发生率低,使得许多病理医生接触例数少,容易出现对该分型的理解偏差;(2)胸腺瘤具有明显的组织学多样性和瘤内的异质性;(3)一些亚型存在形态学标准的明显重叠,很难做出精确的分型;(4)由于丰富的非肿瘤背景,使得其中一些亚型的肿瘤细胞不能被清楚地

[收稿日期] 2013-04-09 **[接受日期]** 2013-06-21

[基金项目] 上海市科委基金(10411967700). Supported by Fund from Shanghai Science and Technology Committee (10411967700).

[作者简介] 孙也淇,硕士生. E-mail: liuliuiqime@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-65115006-3033, E-mail: chestpathology@126.com

观察。这些问题容易造成胸腺瘤的误诊。

临床常用角蛋白系列来定位上皮成分及其形成的肿瘤细胞。胸腺瘤中被推荐使用的上皮标记物是 CK19, 阳性定位于细胞质, 但它在所有的亚型中呈一致性的弥散广泛分布, 不能有效区分各型^[4,6], 所以需要更好的标记物联合 H-E 形态对胸腺瘤进行正确的诊断。P63 基因位于染色体 3q27-28, 是抑癌基因 P53 的同源基因, 具有多种亚型^[7-8]。已有的研究表明 P63 表达于所有的胸腺上皮细胞包括增生性的和肿瘤性的^[7,9]。仅有一篇报道指出 P63 (包含所有亚型) 在胸腺瘤各亚型中有不同的表达特点, 而这种差异能否为分型提供帮助值得进一步研究^[10]。本研究基于这一报道, 回顾性分析 76 例胸腺上皮肿瘤 (thymic epithelial tumor, TET; 包括胸腺瘤及胸腺癌) 患者的资料, 探讨 P63 在 TET 各亚型中的表达情况及其在病理诊断中的意义。

1 材料和方法

1.1 标本 同济大学附属上海市肺科医院病理科存档的 TET 标本 76 例 (2005 年 1 月至 2009 年 12 月), 其中男性 40 例、女性 36 例, 年龄 22~86 岁, 中位年龄 51 岁。记录原始病理诊断为初始诊断; 然后由 2 位有多年诊断经验的病理医生根据 H-E 切片复诊, 直到结果一致, 作为复核结果; 最后参考 P63 (包含所有 P63 亚型) 表达, 得出诊断结果。对 3 种诊断结果进行比较。

1.2 免疫组化染色 对初始诊断病例选取 H-E 切片上具有代表性的 2 个部位, 对于复核诊断病例每次诊断各选取 1 个部位, 均在对应蜡块上准确标记, 制作组织芯片 (TMA), 孔径为 3 mm, 常规切片厚 5 μm 。鉴于 TMA 选取的组织有限, 为了更好地进行形态学分析, 复核后选取误诊的和诊断分型难确定的 13 例蜡块进行重新切片, 片厚 5 μm 。切片经常规处理后, 置于 99 $^{\circ}\text{C}$ 柠檬酸盐抗原修复液 (pH = 6.0) 中预热 40 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下用 P63 单克隆抗体 (1 : 100 稀释; 克隆号: 4A4, DAKO 公司) 孵育过夜; 然后用辣根过氧化物酶标记的二抗在室温孵育 1 h, 接着用 DAB 显色免疫复合物 5 min。

1.3 免疫组化结果判定 P63 阳性表达定位于细胞核。用半定量方法判定 P63 的表达强度。(1) 染色程度: 1 级, 没有核染色; 2 级, 出现核染色, 但染色质和核仁仍可以辨别; 3 级, 核呈深褐色, 核仁的特点不能辨别^[10]。(2) 染色细胞百分比: 1 级, 没有

细胞染色; 2 级, $0 < \text{染色细胞} < 30\%$; 3 级, $30\% \leq \text{染色细胞} < 70\%$; 4 级, $70\% \leq \text{染色细胞} \leq 100\%$ 。用“染色程度级别 \times 染色细胞百分比级别”得到表达强度得分, 0~3 分为阴性表达, 4~12 分为阳性表达。同时记录每个组织中阳性细胞的分布。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 参考 P63 表达的诊断结果与初始诊断结果分别相对于复核诊断结果准确率的比较采用 χ^2 检验, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 初诊与复诊结果 76 例 TET 的初诊结果中 3 例 A 型, 29 例 AB 型, 8 例 B1 型, 8 例 B2 型, 9 例 B3 型, 6 例 B2+B3 型, 13 例胸腺癌。76 例 TET 的复诊结果中 4 例 A 型, 29 例 AB 型, 6 例 B1 型, 2 例 B2 型, 10 例 B3 型, 6 例 B2+B3 型, 1 例 B1+B2 型, 1 例 B2+B1 型, 14 例胸腺癌 (表 1), 3 例未确诊。

2.2 免疫组化结果 除 4 例 P63 为阴性表达外 (1 例为 AB 型胸腺瘤, 3 例为胸腺癌), 其余 72 例均呈不同程度阳性表达 (表 1), 阳性率为 95%, 并准确定位于肿瘤细胞核。在不同亚型的胸腺瘤中, P63 呈现不同的表达差异。在 A 型胸腺瘤中, 梭形肿瘤细胞群表达 P63, 其间没有或很少淋巴细胞浸润 (图 1A)。在 AB 型中, P63 能够帮助区分其中的 A 型成分以及纤维间隔 (图 1B)。在 B1 型中, 少量的 P63 阳性卵圆形肿瘤细胞散布在丰富的淋巴细胞背景中 (图 1C)。在 B2 型中, P63 阳性的多角形肿瘤细胞分布在较多淋巴细胞中, 与 B1 型胸腺瘤相比, 明显增加的 P63 阳性细胞成串分布和围绕血管周隙呈栅栏状排列, 核的特点也更加明显 (图 1D)。P63 在大部分 B3 型胸腺瘤 (图 1E) 和胸腺癌 (图 1F) 中较其他亚型更为密集且强度增加, 核的不典型程度变得更加明显, 少量阴性的淋巴细胞及其数量也能很清楚地显现出来。在复合型胸腺瘤中, 以上特点以组合的形式出现。

2.3 初诊与复诊结果的比较 如表 2 所示, 比较初诊和复诊结果, 我们发现 9 例误诊: 1 例胸腺癌被误诊为 B3 型 (No. 68); 1 例 B2+B3 型被误诊为 B2 型 (No. 74); 1 例 AB 型被误诊为 B2 型 (No. 33); 1 例 A 型被误诊为 AB 型 (No. 4), 2 例 B3 型分别被误诊为 B2 型 (No. 54) 和 B2+B3 型 (No. 53); B1 型与 B2 型 (No. 42) 或 B2+B1 型 (No. 75) 或 B1+B2 型 (No. 76) 混淆的有 3 例。表 2 显示诊断错误主要发生在胸腺瘤 AB 型和 B 型。

表 1 复诊确诊的 73 例胸腺上皮肿瘤病例中 P63 的表达强度

Tab 1 Immunoreactivity of P63 expression in 73 thymic epithelial tumor (TET) cases confirmed by further diagnosis results

Score	A	AB	B1	B2	B3	B1+B2	B2+B1	B2+B3	Thymic carcinoma
1	0	1	0	0	0	0	0	0	3
4	0	1	4	0	0	0	0	0	0
6	1	24	1	1	1	0	0	6	0
8	2	0	0	0	2	0	0	0	4
9	0	3	1	1	0	1	1	0	0
12	1	0	0	0	7	0	0	0	7
Total	4	29	6	2	10	1	1	6	14

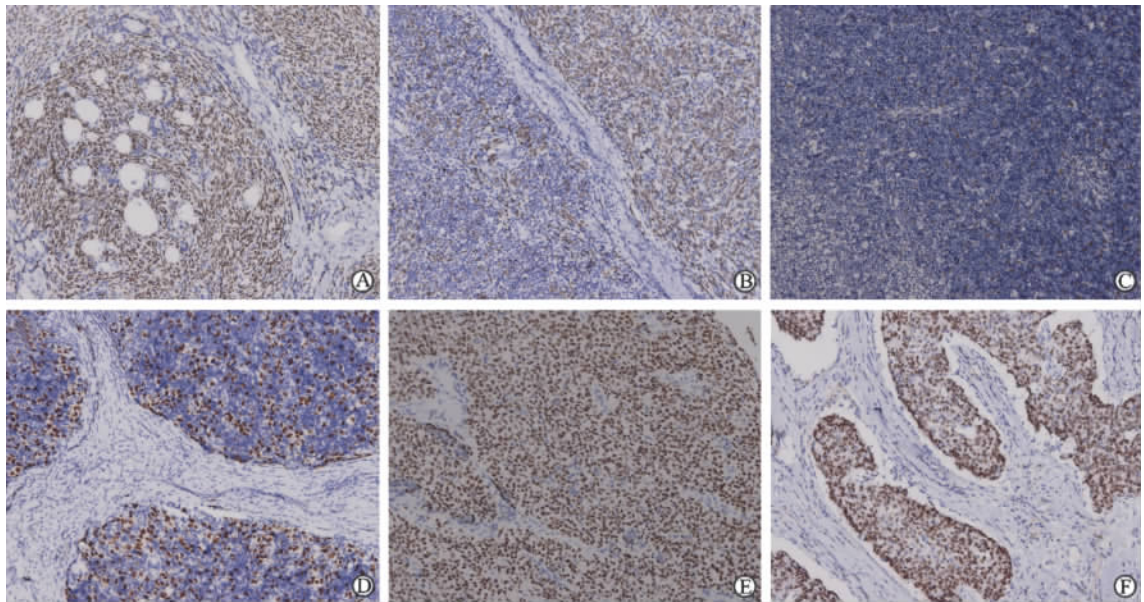


图 1 P63 在胸腺瘤不同亚型中表达的免疫组化分析 (SP 法)

Fig 1 Expression of P63 in each subtype of thymomas by immunohistochemical analysis(SP method)

A: P63 marked spindle-shaped cells of type A thymoma; B: P63 expression in type B component (left) and type A area (right) of type AB thymoma; C: P63 labeling few neoplastic epithelial cells in type B1 thymoma; D: More tumor epithelial cells positive for P63 in type B2 thymoma than type B1; E, F: Tumor cells positive for P63 with intense immunoreactivity in type B3 thymoma(E) and thymic carcinoma(F). Original magnification: $\times 100$

表 2 初诊、复诊和参考 P63 表达诊断的结果比较

Tab 2 Comparison of initial results, further results and results considering P63 immunoreactivity

No. of case	Initial	Further	Considering P63	No. of case	Initial	Further	Considering P63
1-3	A	A	A	45-52	B3	B3	B3
4	AB	A	A	53	(B2+B3) ^a	B3	B3
5-31	AB	AB	AB	54	B2	B3	B3
32	AB	AB	Negative	55-64	Thymic carcinoma	Thymic carcinoma	Thymic carcinoma
33	B2	AB	AB	65-67	Thymic carcinoma	Thymic carcinoma	Negative
34	B1	AB?	AB	68	B3	Thymic carcinoma	Thymic carcinoma
35	B2	AB?	AB	69-73	B2+B3	B2+B3	B2+B3
36-40	B1	B1	B1	74	B2	B2+B3	B2+B3
41	B2	AB/B2?	B1	75	B1	(B2+B1) ^b	B1+B2
42	B2	B1	B1	76	B1	(B1+B2) ^c	B1+B2
43-44	B2	B2	B2				

? : Uncertain diagnosis; ^a : Component of type B2 was more than type B3; ^b : Component of type B2 was more than type B1; ^c : Component of type B1 was more than type B2

2.4 初诊与结合 P63 表达结果的比较 在确诊的 P63 阳性的 69 例 TET 和 59 例胸腺瘤中, 我们比较了不结合 P63 表达的初诊和结合 P63 表达结果与复

核诊断的一致性, 发现后者明显优于前者 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 3 P63 表达阳性的复诊确诊的胸腺上皮肿瘤和胸腺瘤中初诊结果和结合 P63 表达后诊断结果的比较

Tab 3 Comparison of initial results and results considering P63 for P63 positive thymic epithelial tumor (TET) and thymomas confirmed by further diagnosis

Result	TET (N=69)				Thymoma (N=59)			
	Initial	Considering P63	χ^2	P	Initial	Considering P63	χ^2	P
Correct n	60	68	6.900	0.017	51	58	5.894	0.032
Wrong n	9	1			8	1		
Accurate rate(%)	87.0	98.6			91.3	98.2		

2.5 结合 P63 表达分析 3 例复核后不能确诊的病例 表 2 中 No. 41、No. 34 和 No. 35 病例复核后仍不能确诊, 而 P63 的表达帮助明确了诊断结果 (图 2)。对于 No. 41, 免疫组化分析 P63 表达发现少量淡棕色的卵圆形肿瘤上皮细胞“星状”般散布在广泛淋巴细胞背景中, 无成片聚集分布趋势, 核仁不明显,

所以诊断为 B1 型胸腺瘤 (图 2A2)。对于 No. 34, 免疫组化分析 P63 表达后将其中极少量成串排列的浅棕色梭形肿瘤上皮细胞在淋巴细胞丰富的 B 型成分背景中显现出来, 所以诊断为 AB 型胸腺瘤 (图 2B2)。对于 No. 35, 免疫组化分析 P63 表达发现肿瘤上皮细胞成串排列, 诊断为 AB 型胸腺瘤 (图 2C2)。

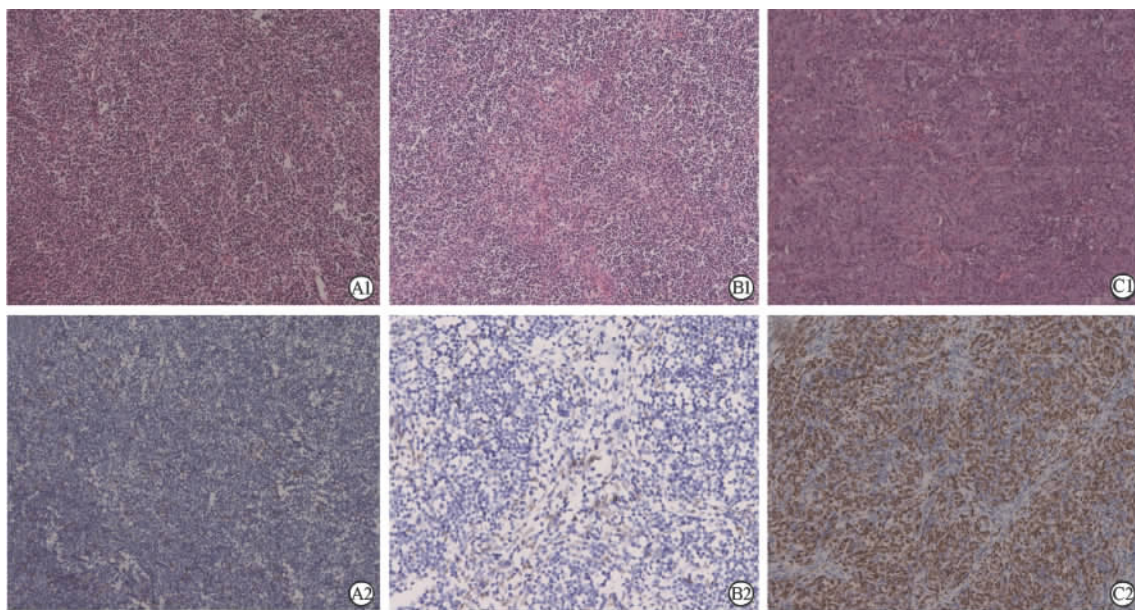


图 2 P63 在 No. 41、No. 34 和 No. 35 胸腺瘤中的表达

Fig 2 Expression of P63 in No. 41, No. 34 and No. 35 thymoma tissues

A1, B1, C1: H-E staining; A2, B2, C2: Immunohistochemistry staining. A1, A2: No. 41 thymoma. Few neoplastic epithelial cells positive for P63 scattered in a lymphocyte-rich background (A2); B1, B2: No. 34 thymoma. Few spindle tumor epithelial cells positive for P63 stringing in plentiful lymphocytes (B2); C1, C2: No. 35 thymoma. Bunches of tumor epithelial cells positive for P63 in many lymphocytes (C2). Original magnification: $\times 100$ (A1, A2, C1, C2); $\times 200$ (B1, B2)

3 讨论

有研究通过评价 17 位病理专家诊断 95 例胸腺

瘤的结果, 发现其中 9 人诊断一致的有 78 例 (82%), 而 14 人诊断一致的则为 26 例 (27%)^[11]。此外 Sakakura 等^[12]通过分析 2 名医生 (1 名是经验

丰富的权威专家,1名是经过培训后的普通病理医生)对148例胸腺瘤和胸腺癌的诊断结果发现一致率仅为62%和58%。这说明胸腺瘤因其多种组织学表现和临床进程,即使对于有多年经验的病理医生而言,要准确分型且诊断一致仍很困难。

本研究发现胸腺瘤分型诊断错误主要发生在AB型和B型。已有的研究显示,绝大部分AB型胸腺瘤不侵犯周围器官,且切除后不会复发和引起肿瘤相关死亡^[13]。因此AB型胸腺瘤因预后良好而被认为是良性肿瘤^[13-15]。B1、B2和B3型的5年生存率存在差异,分别是81%~94%、75%~88%和53%~70%^[1, 15-16]。AB型和B2型较其他胸腺瘤亚型发生率高且二者恶性程度差别较大^[4]。虽B1型的恶性程度较低,B型胸腺瘤应被认为是恶性肿瘤^[15]。可见分清胸腺瘤各亚型可以更准确地预测患者的预后及进行更好的后续治疗。

根据多数病理医生的经验,仅靠增加的上皮细胞数量与核的不典型程度来分清B1型和B2型十分困难^[2, 5, 17]。本研究通过P63免疫组化染色,将隐藏在淋巴细胞中的上皮细胞显示出来,能进行更深入的形态学分析。如1例初诊为B2型胸腺瘤(No. 41),复诊后H-E形态下仍无法明确诊断。P63染色后诊断为B1型。此外,虽然在H-E形态下区分B2型和B3型并不困难,但通过表2可知在复合病例中易漏诊。有研究表明肿瘤复合病例的预后由恶性程度较高的部分决定,所以漏诊成分会导致预后判断不准确^[18],而P63染色可帮助发现漏诊的B3型成分。

AB型是由淋巴细胞较少的A型区域和富含淋巴细胞的B型区域混合构成,2种成分比例可有很大的变化,且其中一种成分常可以很少^[2]。同时它们可以形成不连续的分割结节或者相互混合^[4]。当A型区域极其缺乏时,可能几乎见不到,所以仅见到B型成分而容易被诊断为B1型或B2型。如本组中1例胸腺瘤(No. 34)初诊为B1型,复诊后考虑AB型的可能,结合P63染色后最终确诊为AB型。另1例胸腺瘤(No. 35)具透明胞质和可见核仁的较大的肿瘤上皮细胞聚集分布在淋巴细胞中而容易诊断为B2型,经P63染色后这些细胞成串排列的特点变得明显,所以明确为AB型。可见P63免疫组化染色

有助于观察肿瘤上皮细胞排列特点。

本研究详细分析了P63在TET各分型中的表达情况,并进一步证明了Dotto等^[10]的研究结果,即P63在胸腺瘤各亚型的定位使其呈现不同的形态特点。同时通过比较初诊(未结合P63表达)与结合P63表达2种方式诊断胸腺瘤的准确性,进一步证实了这种形态差异对确定分型有帮助。总之,可以通过P63染色来帮助评估胸腺瘤上皮细胞数量,判定其形态和排列来区分H-E形态下的胸腺瘤亚型。Dotto等^[10]的研究仅指出P63可以作为有用的工具辅助角蛋白系列诊断胸腺疾病。根据我们当前的研究,参考P63表达的结果和复诊结果有很好的一致性,并明显优于初诊结果。鉴于CK19等角蛋白在胸腺瘤亚型诊断中的局限性,我们认为P63可以作为常规标记物来帮助病理医生分清胸腺瘤各亚型和验证已有的诊断。

结合P63的诊断与复诊结果比较仅1例(No. 75)不一致。考虑到免疫组化方法仅是辅助诊断工具,在这种情况下应以H-E诊断结果为准,即当二者存在差异时,仍需要仔细复核已有的H-E结果继续诊断。本实验有4例胸腺瘤P63染色呈阴性表达,这是否具有临床意义值得进一步研究。此外考虑到P63在胸腺瘤中表达的一致性以及分子生物学方面的研究结果,我们认为需要更深入地探究该癌基因的功能以及能否作为胸腺瘤潜在的治疗靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] de Jong W K, Blaauwgeers J L, Schaapveld M, Timens W, Klinkenberg T J, Groen H J. Thymic epithelial tumours: a population-based study of the incidence, diagnostic procedures and therapy[J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44: 123-130.
- [2] Venuta F, Anile M, Diso D, Vitolo D, Rendina E A, De Giacomo T, et al. Thymoma and thymic carcinoma[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2010, 37: 13-25.
- [3] Koppitz H, Rockstroh J K, Schüller H, Standop J, Skowasch D, Müller-Hermelink H K, et al. State-of-the-art

- classification and multimodality treatment of malignant thymoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38: 540-548.
- [4] Travis W D, Brambilla E, Müller-Hermelink H K, Harris C C. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus, and heart [M]. Lyon: IARC Press, 2004.
- [5] Suster S. Diagnosis of thymoma [J]. *J Clin Pathol*, 2006, 59: 1238-1244.
- [6] Kuo T T. Cytokeratin profiles of the thymus and thymomas: histogenetic correlations and proposal for a histological classification of thymomas [J]. *Histopathology*, 2000, 36: 403-414.
- [7] Di Como C J, Urist M J, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat C V, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 494-501.
- [8] Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson R T, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development [J]. *Nature*, 1999, 398: 714-718.
- [9] Wu M, Sun K, Gil J, Gan L, Burstein D E. Immunohistochemical detection of p63 and XIAP in thymic hyperplasia and thymomas [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 131: 689-693.
- [10] Dotto J, Pelosi G, Rosai J. Expression of p63 in thymomas and normal thymus [J]. *Am J Clin Pathol*, 2007, 127: 415-420.
- [11] Verghese E T, den Bakker M A, Campbell A, Hussein A, Nicholson A G, Rice A, et al. Interobserver variation in the classification of thymic tumours — a multicentre study using the WHO classification system [J]. *Histopathology*, 2008, 53: 218-223.
- [12] Sakakura N, Tateyama H, Nakamura S, Taniguchi T, Usami N, Ishikawa Y, et al. Diagnostic reproducibility of thymic epithelial tumors using the World Health Organization classification: note for thoracic clinicians [J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 61: 89-95.
- [13] Kondo K, Yoshizawa K, Tsuyuguchi M, Kimura S, Sumitomo M, Morita J, et al. WHO histologic classification is a prognostic indicator in thymoma [J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77: 1183-1188.
- [14] Okumura M, Ohta M, Tateyama H, Nakagawa K, Matsumura A, Maeda H, et al. The World Health Organization histologic classification system reflects the oncologic behavior of thymoma: a clinical study of 273 patients [J]. *Cancer*, 2002, 94: 624-632.
- [15] Chen G, Marx A, Chen W H, Yong J, Puppe B, Stroebel P, et al. New WHO histologic classification predicts prognosis of thymic epithelial tumors: a clinicopathologic study of 200 thymoma cases from China [J]. *Cancer*, 2002, 95: 420-429.
- [16] Ruffini E, Filosso P L, Mossetti C, Bruna M C, Novero D, Lista P, et al. Thymoma: inter-relationships among World Health Organization histology, Masaoka staging and myasthenia gravis and their independent prognostic significance: a single-centre experience [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011, 40: 146-153.
- [17] Sun Q L, Fang W T, Feng J, Zhang J, Yang X H, Gu Z T, et al. Proteome analysis and tissue array for profiling protein markers associated with type B thymoma subclassification [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125: 2811-2818.
- [18] Ströbel P, Bauer A, Puppe B, Kraushaar T, Krein A, Toyka K, et al. Tumor recurrence and survival in patients treated for thymomas and thymic squamous cell carcinomas: a retrospective analysis [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 1501-1509.