

Hath1 基因在锯齿状腺瘤/息肉与增生性息肉中的差异性表达分析

Differential Expression of Hath1 Gene in Sessile Serrated Adenoma/Polyp and Hyperplastic Polyp

QU Bing-jie, WANG Hong-mei, CAI Ru-yi

曲冰杰¹, 王红梅¹, 蔡茹艺²

(1. 北京怀柔医院, 北京 101400; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010)

摘要: [目的] 探讨 Hath1 基因在锯齿状腺瘤/息肉(SSA/P)与增生性息肉(HP)鉴别诊断中的价值。[方法] 选择行结肠镜检查的患者进行回顾性阅片, 所有切片按 WHO 第 4 版消化系统肿瘤分类标准, 筛选出 63 例无蒂 SSA/P、35 例 HP、5 例传统锯齿状腺瘤(TSA)、10 例管状腺瘤(TA)、3 例 SSA/P 伴异型增生患者为研究对象, 以 15 例正常结直肠组织为对照。采用免疫组化法检测各组织中 Hath1 的表达情况。[结果] (1) 在正常结肠黏膜中, Hath1 在固有层的表面上皮细胞、隐窝细胞和间质性炎症细胞中显示一致的细胞核染色。在 HP 中, Hath1 在微泡(28/28)和杯状细胞(7/7)的隐窝内均有核染色, 染色强度与正常结肠黏膜相当。Hath1 核表达在增生性息肉黏膜脱垂的扭曲隐窝中也保持不变。(2) 在大多数(58/63) SSA/P 病例中, 隐窝中 Hath1 的表达缺失或非常微弱。5 例隐窝细胞核染色阳性的 SSA 均位于左半结肠。无论是根据诊断还是根据息肉部位进行比较, HP 和 SSA/P 的 Hath1 染色阳性率均有显著性差异。(3) 在伴有细胞学异常增生的 SSA 中, Hath1 有一种独特的染色模式, 它不是在细胞核中完全消失或非常弱的染色, 而是在发育不良上皮的细胞质中显示弥漫性阳性染色。(4) Hath1 在 TA 中, 大部分是强阳性的核染色, 但在一些斑片状区域阴性表达。在 TSA 中, Hath1 在息肉中的表达也表现为混合模式, 局灶性强核染色和局灶性表达缺失。[结论] Hath1 基因缺失可作为鉴别 SSA/P 和 HP 的敏感而特异的标志物, 可作为单纯形态学难以确诊病例的辅助诊断指标。

关键词: 锯齿状腺瘤; 增生性息肉; 传统锯齿状腺瘤; 管状腺瘤

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2021)07-0592-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.07.B014

无蒂锯齿状腺瘤/息肉(sessile serrated adenoma/polyp, SSA/P)是一种结直肠癌的前驱病变, 多位于右侧结肠, 包括盲肠、升结肠和横结肠^[1]。内镜下表现为扁平无蒂, 柔软光滑, 表面苍白, 边界不清, 通常表面覆有黏液^[2]。根据世界卫生组织第 4 版《消化系统肿瘤分类》, SSA/P 发生不典型增生或癌变时, 易出现有蒂(包括半蒂)、双立面、中央凹陷以及发红等特征^[3]。有时由于大小、方位和其他活检伪影的限制, 仅基于组织学, SSA/P 与增生性息肉(hyperplastic polyp, HP)的鉴别诊断存在一定难度, 特别是在左半结肠, 黏膜脱垂与 SSA/P 的形态十分相似^[4]。SSA/P 和 HP 的癌变风险显著不同, 治疗及随访方案也存在明显差异^[5]。因此, 寻找到敏感、特异的标志物将

有助于辅助诊断形态学难以判断的病例, 但目前尚缺乏同时具有高灵敏度和特异性的理想生物标志物。Notch 信号在肠道发育和内稳态中起重要作用, Hath1 是 Notch 信号通路的下游靶点, 通过调节肠细胞的分化进而调节肠道发育, 在人和小鼠肠上皮细胞核中均有表达^[6]。目前关于 SSA/P 或 HP 中 Hath1 表达的研究结果并不一致。因此, 本研究对比分析 Hath1 基因在 SSA/P 或 HP 中表达, 以期对两者的鉴别诊断提供更多依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

从北京怀柔医院病理科数字化管理系统中选取 2015 年 1 月至 2020 年 1 月行结肠镜检查及息肉病理检查的患者为研究对象。所有病例均由 3 位病理学家独立评审, 本研究仅纳入 3 位病理学家诊断一

基金项目: 2017 年度“扬帆”计划临床技术创新项目(XMLX201714); 北京市怀柔区卫生健康委员会科研项目任务书(2019-B-001)
通信作者: 曲冰杰, 主治医师, 硕士; 北京怀柔医院病理科, 北京市怀柔区永泰北街九号院(101400); E-mail: xiehan533754@163.com
收稿日期: 2020-08-03; **修回日期:** 2020-11-04

致的病例。纳入标准:(1)年满 18 周岁;(2)第一次行全结肠镜检查;(3)病理诊断为传统腺瘤或锯齿状息肉。排除标准:(1)合并有其他系统的恶性肿瘤;(2)合并炎症性肠病;(3)曾行肠道手术;(4)合并遗传性的肠道疾病,如家族性腺瘤性息肉病、遗传性非息肉性结肠癌、增生性息肉综合征、P-J 综合征等;(5)临床资料不全,数据缺失。最终纳入 98 例患者,其中 SSA/P 患者 63 例,年龄 41~81 岁,平均年龄(62.4 ± 6.7)岁,男性 34 例,女性 29 例;右半结肠(盲肠和升结肠) 45 例,左半结肠(降结肠、乙状结肠和直肠) 18 例。HP 组 35 例,年龄 39~85 岁,平均年龄(54.4 ± 4.8)岁,男性 22 例,女性 13 例;左半结肠 27 例,右半结肠 8 例。根据黏蛋白分布将 HP 分为 2 个主要亚型,包括微泡状黏蛋白型锯齿状息肉($n=28$)、杯状细胞型锯齿状息肉($n=7$),本研究未发现黏蛋白缺失型息肉。同时,还收集了 15 例传统锯齿状腺瘤(traditional serrated adenoma, TSA)、10 例管状腺瘤(tubular adenoma, TA)、3 例 SSA/P 伴异型增生患者为研究对象,以 15 例正常结直肠组织为对照。

1.2 病理学特征

HP 多位于直肠或远端结肠,镜下呈水滴珍珠色,形态扁平轻微隆起。镜下可有如下特征:(1)隐窝长而直,表面约一半有典型锯齿状结构,基底狭窄呈非锯齿状结构。(2)细胞核普遍较小,但形态一致,细胞总体靠基底侧排列整齐。(3)有柱状上皮和杯状上皮细胞覆盖。(4)无明显的不典型细胞及结构异常。SSA/P 特征包括:(1)细胞异型:伴有上皮异常增殖,但细胞学和组织结构不够成低级别。组织异形,且易癌变。(2)组织异形:深隐窝锯齿明显,畸形隐窝紧贴黏膜肌层横向生长 L 型、倒 T 型、烧杯底状为特征。(3)多发于右半结肠,直径多为 5~9 mm。传统 TSA 特点:(1)细胞、结构学改变可诊断低级别,但异形增生位于隐窝上 1/2,且畸形的隐窝不与黏膜肉相邻。(2)多发于左半结肠,有蒂隆起为主,伴有部分平坦的双层隆起型病变,表面呈脑回状。TA 特点:(1)有完整包膜,表面光滑。剖面呈棕黄色,可有大小不等的囊腔,内含黏液。(2)肿瘤由柱状或立方上皮组成,双层排列,并互相吻合成不规则的小管状或狭长的小梁状。细胞核大,卵圆形,大小一致,胞浆嗜酸性。管腔或小梁外周无肌上皮细胞。管腔内含 PAS 阳性分泌物。间质疏松,其中有大量毛细血管和小静脉。

实质和间质间有基底膜分隔。

1.3 Hath1 免疫组化染色

采用免疫组化方法检测 Hath1 在组织标本中的表达。免疫组化检查在北京怀柔医院病理科完成。从 HE 染色切片中选择一个有代表性的区域。在二甲苯和梯度乙醇中脱蜡,热修复抗原,0.3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,血清孵育阻断非特异性结合。切片与 Hath1 兔单克隆抗体一抗共同孵育 24h。将生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶标记的亲本素与样品孵育,利用 DAB 法染色。采用半定量法对染色强度进行分级,染色强度分为 4 级:0 级(无染色)、1 级(弱染色)、2 级(中度染色)、3 级(强染色),阳性细胞百分比分为 4 级:分别为 0 分(0%)、1 分(0~30%)、2 分(30%~50%)、3 分(>50%)。染色阳性的判定公式为:总积分=阳性百分比分数×强度分数,0~2 分记为阴性,>2 分记为阳性。

1.4 统计学处理

数据分析均采用 SPSS20.0 软件进行。计数资料采用例数表示,采用 Fisher 精确检验(双尾)比较 Hath1 在 HP 和 SSA/P 中的表达差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hath1 在正常结肠和增生性息肉中的表达

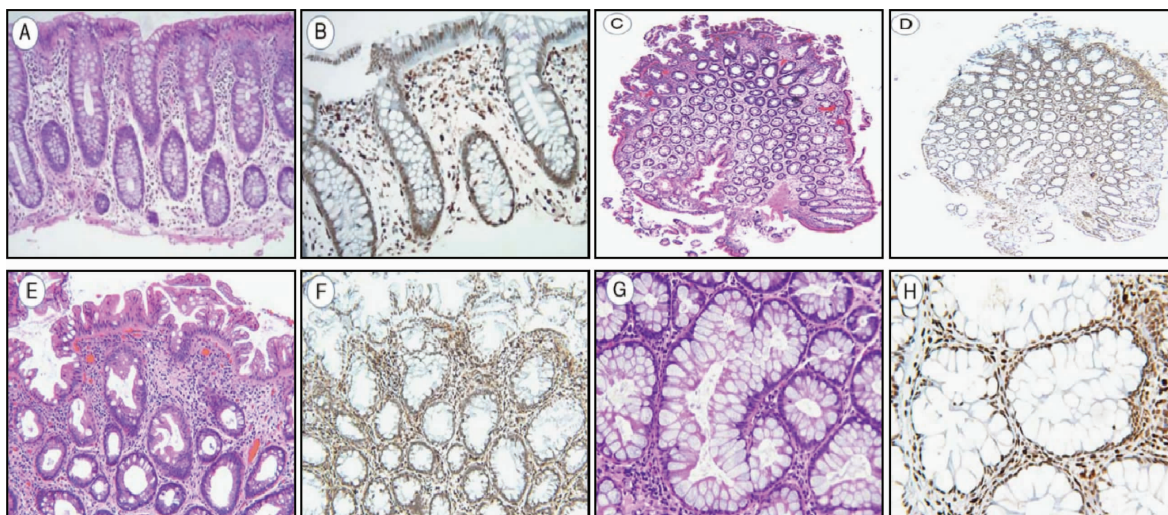
在正常结肠黏膜中,Hath1 在固有层的表面上皮细胞、隐窝细胞和间质性炎症细胞中显示一致的细胞核染色(Figure 1A、1B)。每个病例固有层间质炎症细胞的核染色都很强且一致。Hath1 染色强度与固有层炎症细胞的染色强度相当,则认为其为阳性。Hath1 在 HP 微泡亚型(Figure 1C~1F)、杯状细胞富集型(Figure 1G、1H)均有核染色。

2.2 Hath1 在 HP 黏膜脱垂中的表达

在增生性息肉病例中,Hath1 在微泡(28/28,100%)和杯状细胞(7/7,100%)的隐窝内均有核染色,染色强度与正常结肠黏膜相当,表明 Hath1 核表达阳性率在 HP 黏膜脱垂的扭曲隐窝中保持不变(Figure 2)。

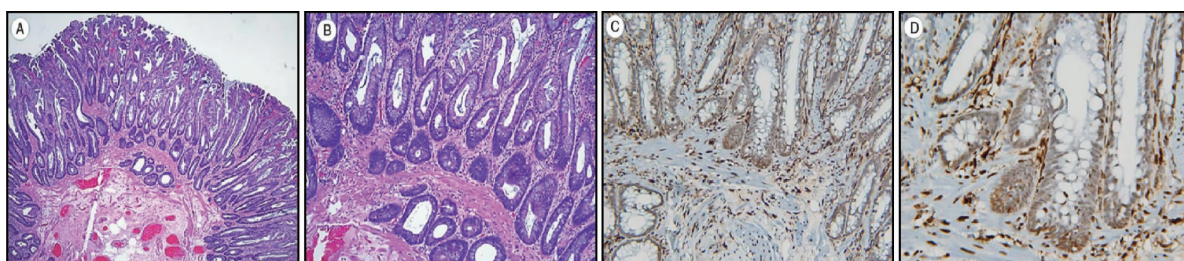
2.3 Hath1 在 SSA/P 和 SSA 伴异型增生中的表达

在 63 例 SSA/P 病例中,58 例患者组织中隐窝



Hath1 can be seen in normal colonic mucosa (A,B), hyperplastic polyp microbubble subtype (C,D: low power microscope; E,F: high power microscope), goblet cell enriched type (G,H)

Figure 1 Expression of Hath1 in normal colonic mucosa and helicobacter pylori (×200)



Hath1 positive expression in crypt cells (A,B: HE staining; C,D: Hath1 immunohistochemical staining)

Figure 2 Expression of Hath1 in HP mucosal prolapse (×200)

中 Hath1 表达缺失或非常微弱 (Figure 3A~3F), 5 例隐窝细胞核染色阳性的 SSA/P 均位于左半结肠 (乙状结肠 3 例, 直肠 2 例)。无论是根据诊断 ($\chi^2=78.944, P<0.01$) 还是根据息肉部位 ($\chi^2=25.920, P<0.01$) 进行比较, HP 和 SSA/P 的 Hath1 染色阳性率均有显著性差异 (Table 1)。在伴有细胞学异常增生的 SSA/P 中, Hath1 有一种独特的染色模式, 它不是在细胞核中完全消失或非常弱的染色, 而是在发育不良上皮的细胞质中显示弥漫性阳性染色 (Figure 3G、3H), 在伴异型增生的 SSA/P 中均可观察到这种染色模式。

Table 1 Comparison of positive rate of Hath1 staining between HP and SSA/P

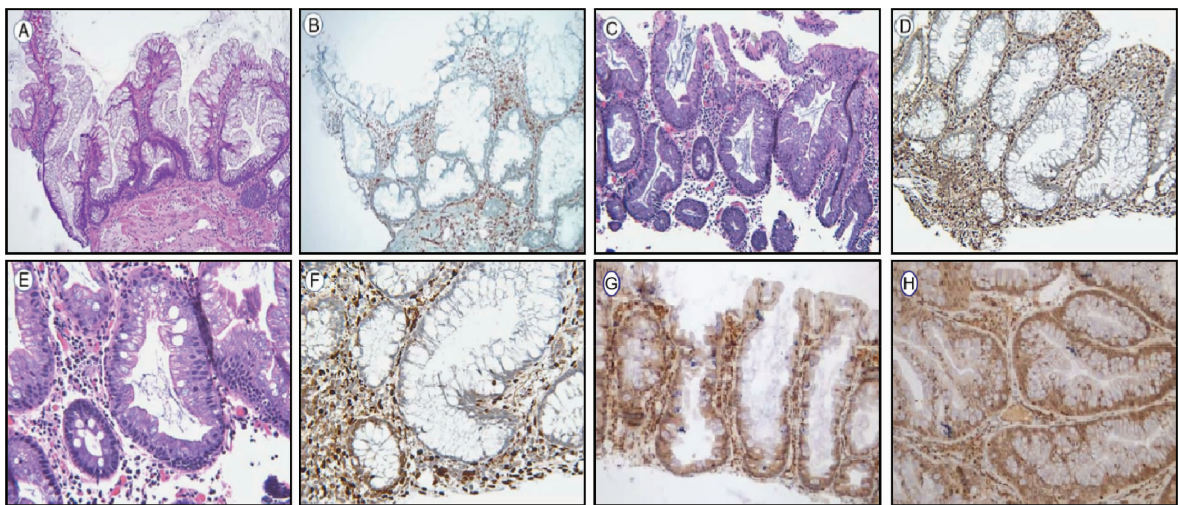
Group	N	Right colon (%)	Left colon (%)
HP	35	8/8(100)	27/27(100)
SSA/P	63	0/45(0)	5/18(27.8)

2.4 Hath1 在管状腺瘤和传统锯齿状腺瘤中的表达

Hath1 在传统锯齿状腺瘤、管状腺瘤中的阳性率分别为 80.0% (12/15)、60.0% (6/10)。Hath1 在管状腺瘤中, 大部分是强阳性的核染色, 但在一些斑片状区域阴性表达 (Figure 4A、4B)。在传统锯齿状腺瘤中, Hath1 在息肉中的表达也表现为混合模式, 局灶性强核染色和局灶性表达缺失 (Figure 4C、4D)。

3 讨论

SSA/P 是一种外表类似于增生性息肉但具有独特组织构造特征的结直肠腺瘤/息肉。SSA/P 最早由 Torlakovic 等^[7]报道, 他们发现结直肠发生的锯齿状息肉的异常增生, 外表与增生性息肉相似, 但是组织构造显著不同, 因而引入了“无蒂锯齿状息肉”、“无蒂锯齿状腺瘤”的概念。根据 WHO 的推荐, 这一类



Hath1 is lost or weak in the crypt of SSA/P (A~F). In the dysplasia of SSA with dysplasia, Hath1 staining was positive (G, H)

Figure 3 Expression of Hath1 in SSA/P and SSA with dysplasia (×200)

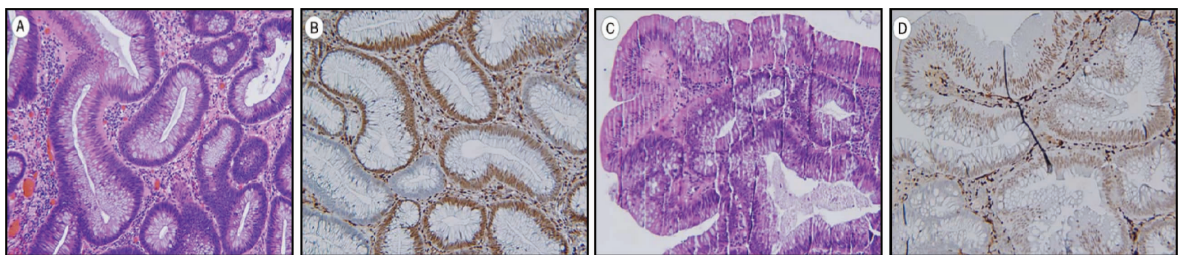


Figure 4 Expression of Hath1 in tubular adenoma and traditional serrated adenoma (×200)

型的息肉被统称为无蒂锯齿状腺瘤/息肉(SSA/P)^[8]。近年来研究认为 SSA/P 具有恶变潜能,且进展快,与右半结直肠癌的发生密切相关,高达 30%结直肠癌是通过锯齿状息肉途径发展而来^[9]。SSA/P 的早期检出和正确处理是阻止其进展及癌变的重要途径。但是,SSA/P 诊断具有一定的挑战性,需要内镜医师与病理医师共同完成。

在本研究中,我们探讨了 Notch 下游靶转录因子 Hath1 对区分 SSA/P 和 HP 的作用。Hath1 表达缺失对鉴别 SSA/P 和 HP 的灵敏度为 92%,特异性为 100%,其灵敏度及特异性均高于已报道的其他标志物。HP 伴黏膜脱垂与 SSA/P 的形态学十分相似。本研究发现,Hath1 的核染色在扭曲的隐窝中保持不变。因此,Hath1 的免疫组化染色对鉴别诊断合并黏膜脱垂的息肉有帮助。我们也证实 Hath1 在大肠黏膜上皮细胞核中正常表达,且 Hath1 在固有层间质炎症细胞中也有很强的核表达,这可以作为每个标本普遍的内部阳性对照和参考水平。

在本研究中,位于左半结肠的少量息肉具有与 SSA/P 一致的形态,但呈 Hath1 阳性核染色。这提示了两种可能:(1)左侧 SSA/P 可以维持 Hath1 表达,而右侧 SSA/P 通常显示 Hath1 均匀丢失。据报道,近侧 SSA/P 和远侧 SSA/P 存在明显的表观遗传特征差异。(2)左侧息肉由于镜检方向、镜下伪影等各种因素而与 SSA/P 形态难以区分。由于目前的生物标志物(如 *BRAF* 突变)不足以区分 SSA/P 和 HP,因此需要更明确的标准来进一步规范这一问题。目前尚不清楚 Hath1 在 SSA/P 中的下调发生在转录还是翻译水平。如果下调发生在转录水平,Hath1 在固有层间质炎症细胞中的持续表达将很难通过 cDNA 微阵列方法或对整个息肉进行甲基化研究来识别。原位 RNA 杂交将有助于阐明 SSA/P 中 Hath1 的下调是否受到转录调控。

TSA 和 TA 是大肠活检中常见的恶性肿瘤先兆。张婉雯等^[10]研究中,TSA 轻度及中度异型增生分别为 66.2%和 30.9%,介于管状腺瘤和绒毛状腺瘤

之间,与绒毛管状腺瘤较接近,癌变率为 2.82%。代小娟等^[11]研究发现,同一患者 TSA、TA 的异型增生程度无显著性差异。这与本研究 Hath1 染色阳性率的结果一致。根据以前报道,TA 中普遍存在 Hath1 表达上调^[12]。在我们研究的病例中,观察到一种混合染色模式,TA 多为阳性核染色,少数为局灶性阴性染色,TSA 多为混合染色模式。鉴于 Hath1 在固有层炎症细胞中有强烈且均匀的染色,混合染色模式是伪影的可能性很小。这与 TA 是一个表观遗传多样性肿瘤的观点是一致的。TSA 也被证明是一个遗传异质性的群体,*KRAS* 和 *BRAF* 突变是最常见的突变类型^[13]。值得注意的是,在 SSA/P 发育不良的上皮中,我们在细胞质中观察到弥漫性的 Hath1 阳性染色,这提示 Hath1 的位置发生了变化,这可能是 Hath1 信号通路失调导致的^[14]。推测这可能与 SSA 进展为 SSA 伴不典型增生的遗传和/或表观遗传学改变有关,但需要更深入的研究来探讨其潜在的机制。

综上所述,本研究发现 Hath1 在 SSA/P 中的表达可能完全消失,与 HP 或正常结肠黏膜相比染色较弱。Hath1 缺失有可能成为诊断 SSA/P 的有力标志物。在伴有异常增生的 SSA/P 上皮中,Hath1 的表达转变为胞浆阳性染色。TA 和 TSA 在息肉内显示不同的 Hath1 染色,细胞核呈阳性和阴性混合染色模式。

参考文献:

- [1] Cho H, Hashimoto T, Yoshida H, et al. Reappraisal of the genetic heterogeneity of sessile serrated adenoma/polyp[J]. *Histopathology*, 2018, 73(4): 672–680.
- [2] Murakami T, Sakamoto N, Nagahara A. Clinicopathological features, diagnosis, and treatment of sessile serrated adenoma/polyp with dysplasia/carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 34(10): 1685–1695.
- [3] Ponugoti PL, Lin J, Odze RD, et al. Prevalence of sessile serrated adenoma/polyp in hyperplastic-appearing diminutive rectosigmoid polyps[J]. *Gastrointest Endosc*, 2017, 85(3): 622–627.
- [4] Huang CC, Frankel WL, Doukides T, et al. Prolapse-related changes are a confounding factor in misdiagnosis of sessile serrated adenomas in the rectum[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(4): 480–486.
- [5] Takashi M, Naoto S, Akihito N. Endoscopic diagnosis of sessile serrated adenoma/polyp with and without dysplasia/carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(29): 53–62.
- [6] Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, et al. Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(11): 2251–2260.
- [7] Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK, et al. Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA)[J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(1): 21–29.
- [8] Niv Y. Changing pathological diagnosis from hyperplastic polyp to sessile serrated adenoma: systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 29(12): 1327–1331.
- [9] Hashimoto T, Yamashita S, Yoshida H, et al. WNT pathway gene mutations are associated with the presence of dysplasia in colorectal sessile serrated adenoma/polyps[J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(9): 1188–1197.
- [10] 张婉雯, 任宝军, 童华生, 等. 结直肠锯齿状腺瘤内镜和病理形态特征分析[J]. *中华消化内镜杂志*, 2006, 23(2): 81–85.
Zhang WW, Ren BJ, Tong HS, et al. Analysis of the characteristics of endoscopic and histopathological features of colorectal serrated adenomas[J]. *Chinese Journal of Digestive Endoscopy*, 2006, 23(2): 81–85.
- [11] 代小娟, 王鲁平, 韩英, 等. 自身配对的锯齿状腺瘤与传统腺瘤临床病理特征的分析[J]. *实用癌症杂志*, 2010, 25(3): 277–279.
Dai XJ, Wang LP, Han Y, et al. Self-matching comparison of the clinical pathological features analysis in cases with both serrated adenomas & traditional adenomas [J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2010, 25(3): 277–279.
- [12] Ueo T, Imayoshi I, Kobayashi T, et al. The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation[J]. *Development*, 2012, 139(6): 1071–1082.
- [13] Humphries A, Cereser B, Gay LJ, et al. Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(27): E2490–E2499.
- [14] Wiland HO, Shadrach B, Allende D, et al. Morphologic and molecular characterization of traditional serrated adenomas of the distal colon and rectum[J]. *Am J Surg Pathol*, 2014, 38(9): 1290–1297.