

# P16在原发性外阴Paget病中的表达及意义

Gloria Zhang, M.D., M.P.H., Yun Zhao, M.D., Ph.D., Fadi W. Abdul-Karim, M.D., M.Ed.,  
and Bin Yang, M.D., Ph.D.

**摘要:** P16免疫组化检测广泛应用于HPV相关的普通型外阴上皮内瘤变的辅助诊断,但对p16在原发性外阴的乳腺外Paget病(extramammary Paget disease, EMPD)中表达情况的研究知之有限。我们用免疫组化检测了p16在40例原发性外阴EMPD含34例上皮内外阴EMPD和6例浸润性外阴EMPD中的表达情况,同时观察p16的表达模式与病程进展的相关性。结果显示,36例(90%)p16阳性表达,其中20例(50%)呈局灶染色模式,16例(40%)呈弥漫染色模式。呈局灶染色的所有20例均为上皮内型,而呈弥漫染色的10例为上皮内型(10/30例;33%),6例为浸润型(6/6;100%)。4例(10%)外阴EMPD上皮内型呈p16阴性表达。同时观察到p16在上皮内EMPD的表达主要定位于胞浆,而核定位则见于浸润性EMPD。应用高灵敏性的RNA原位杂交方法,在p16呈弥漫染色的10例EMPD(含6例上皮内EMPD和4例浸润性EMPD)中没有检测到高危型HPV,研究显示绝大部分原发性外阴EMPD呈p16阳性,但与HPV感染无关。因此,了解和掌握在不同类型的外阴EMPD中p16不同的染色模式,对于正确诊断非常重要。

**关键词:** 外阴; Paget病; p16; VIN; 免疫组化

(*IJGP*2020 Mar;39(2):105-110)

From the Pathology & Laboratory Medicine Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio (G.Z., F.W.A.K., B.Y.); and Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University People's Hospital, Beijing, P.R. China (Y.Z.).

Y.Z. and G.Z. are co-first authors who contributed equally in this study.

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence and reprint requests to Bin Yang, MD, PhD, Pathology & Laboratory Medicine Institute, Cleveland Clinic Lerner College of Medicine, 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195. E-mail: yangb@ccf.org.

乳腺外Paget病(EMPD)是一种少见病,常累及外阴和会阴部<sup>[1]</sup>。EMPD常见的临床表现是瘙痒伴皮肤呈红色至粉色病变。绝大部分原发性外阴Paget病发生于绝经后的白种人妇女,但也有报道见于亚裔或非裔的美国女性<sup>[2,3]</sup>。EMPD为皮肤原发性肿瘤,与其他内脏器官的恶性病变以及直肠、膀胱、尿道或巴氏腺的癌无关。

组织病理学上,外阴EMPD表现为表皮内非典型腺样细胞肿瘤,可累及皮肤附属器。典型的Paget细胞通常体积较大,呈多边形,胞质丰富,含有黏液。单个或成群分布在表皮基底或副基底,但也可以分布于表皮全层。除黏液染色外, Paget细胞CK7、CAM5.2和上皮膜抗原常呈阳性,而黑色素细胞标记常为阴性。虽然绝大部分原发性外阴EMPD是位于表皮内且呈水平播散,但部分病例中,肿瘤性Paget细胞浸润深部真皮。真皮侵犯提示预后不良<sup>[4]</sup>。当Paget细胞累及表皮全层或出现在角化细胞中时,外阴EMPD组织形态学上与普通型高级别VIN相似<sup>[4-7]</sup>。由于p16免疫组化已广泛应用在HPV-相关的普通型高级别VIN的诊断中<sup>[8]</sup>。尽管大家知道外阴EMPD是与HPV不相关的肿瘤<sup>[9-12]</sup>,但也有在外阴及肛周的EMPD中的报道<sup>[13,14]</sup>。为进一步研究p16在原发性外阴EMPD中的免疫染色模式及其与病变程度等相关关系,我们对40例明确的原发性外阴EMPD患者p16的表达进行了观察,分析p16的表达方式与病变程度的相关性。

## 材料与方 法

### 研究对象

回顾性分析本单位病理档案数据库中诊断为原发性外阴EMPD病例,剔除潜在的内脏器官恶性肿瘤病例或无组织块可供进一步免疫组化研究的病例,通过对CK7、CK20、GCDPF-15和S100进行免疫组化染色进一步排除继发性外阴EMPD、黑色素瘤和VIN病例。绝大部分病例在初次诊断时进行了PAS或粘液卡红染色。每个病例的临床和病理随访均作记录。

## P16免疫组化

选择的福尔马林固定石蜡包埋组织块，重新制备 4 $\mu$ m 厚的切片，重切的最后一张切片进行 HE 染色，以明确有 Paget 病变。采用鼠抗单克隆抗体、克隆号 E6H4（预稀释，Optiview 检测试剂盒，Ventana 方法，Tucson, AZ）和 VENTANA BenchMark ULTER 全自动免疫组化染色仪进行 p16 免疫组化染色。以宫颈鳞状细胞癌标本为每批的阳性对照。

P16 免疫染色模式分为阴性、局灶或弥漫阳性。判读标准阴性为 Paget 细胞无染色；弥漫阳性为 >90% 的 Paget 细胞呈连续的 p16 染色，无论是在表皮内还是在浸润性肿瘤巢中；局灶阳性为 Paget 细胞 (<90%) 呈斑驳或不连续的 p16 染色。复习每一例患者的临床病理资料并列表对比，分析 p16 免疫染色模式与 Paget 细胞在表皮和真皮下间质中的浸润状态的相关性。

## 原位杂交技术检测高危型HPV的mRNA

应用 Advance Cell Diagnostics(ACD) 公司的 RNAscope 2.5 HD assay HPV 18 系统对 10 例 P16 弥漫阳性的病例进行 HPV 的 mRNA 检测，该系统含 18 种高危型 HPV E6/E7 mRNA 的探针：HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 和 82。以 USB 探针用于检测 RNA 完整性的阳性对照，以含有高危型 HPV 的宫颈腺癌作为阳性组织对照；同时以空白探针作为阴性对照。细胞核和/或核周胞浆的点状信号判读为阳性。

## 结果

### 临床病理学特征

本组资料共有 68 例外阴 EMPD。其中 8 例有已知的其它恶性肿瘤病史，15 例无组织块可供进一步免疫组化研究，首先排除该 23 例，为进一步确认外阴 EMPD 的原发性，对其余没有明确其它恶性肿瘤病史的 45 例进行了 CK7、CK20 和 GCDFP 抗体的免疫组化研究。根据免疫反应模式 CK7-/CK20 + /GCDFP- 或 CK7 + /CK20 + /GCDFP- 提示可能与潜在的内脏恶性肿瘤相关，据此排除 5 例。最后 40 例为真正的原发性外阴 EMPD。

在 40 例原发性外阴 EMPD 中，患者年龄 46-82 岁，中位年龄 65 岁。34 例为上皮内 EMPD。6 例为浸润性 Paget 病，

皮下浸润的范围从微浸润 (<1mm) 到肉眼可见的结节性肿块 (最大径 28mm)。一例浸润性 Paget 病既有皮下的真皮间质浸润又有阴道和宫颈内膜的派杰样累犯。所有病例随访 10-116 个月，中位时间为 38 个月，21 例 (52.5%) 在 8-42 个月内复发，平均 22 个月。

## P16免疫组化表达

40 例原发性外阴 EMPD 中，36 例 (90%) 显示不同程度的 p16 免疫染色阳性，4 例 (10%) 为 p16 阴性 (表 1)。36 例 p16 阳性病例中，20 例 (55.6%) 呈局灶阳性，16 例 (44.4%) 呈 p16 弥漫阳性。局灶阳性的所有病例仅有  $\leq$  30% 的 Paget 细胞 p16 染色，组织类型均为上皮内 EMPD (图 1)。10 例上皮内 EMPD 和 6 例浸润性 EMPD 呈 p16 弥漫阳性 (图 2)。进一步评估 Paget 细胞中 p16 表达部位，几乎所有的 p16 弥漫阳性的上皮内 EMPD 染色均定位于细胞浆，只有很少 (<3%) 定位于细胞核。相反，所有的浸润性 EMPD 显示从 50% 到 95% 不等的核与浆的表达。(图 3)。

表 1. p16 在原发性外阴的乳腺外 Paget 病中的免疫染色模式

p16 表达模式	n%			N
	阴性	局灶	弥漫	
上皮内 EMPD	4 (11.8)	20 (58.8)	10 (29.4)	34
浸润性 EMPD	0	0	6 (100)	6
病例总数	4 (10)	20 (50)	16 (40)	40

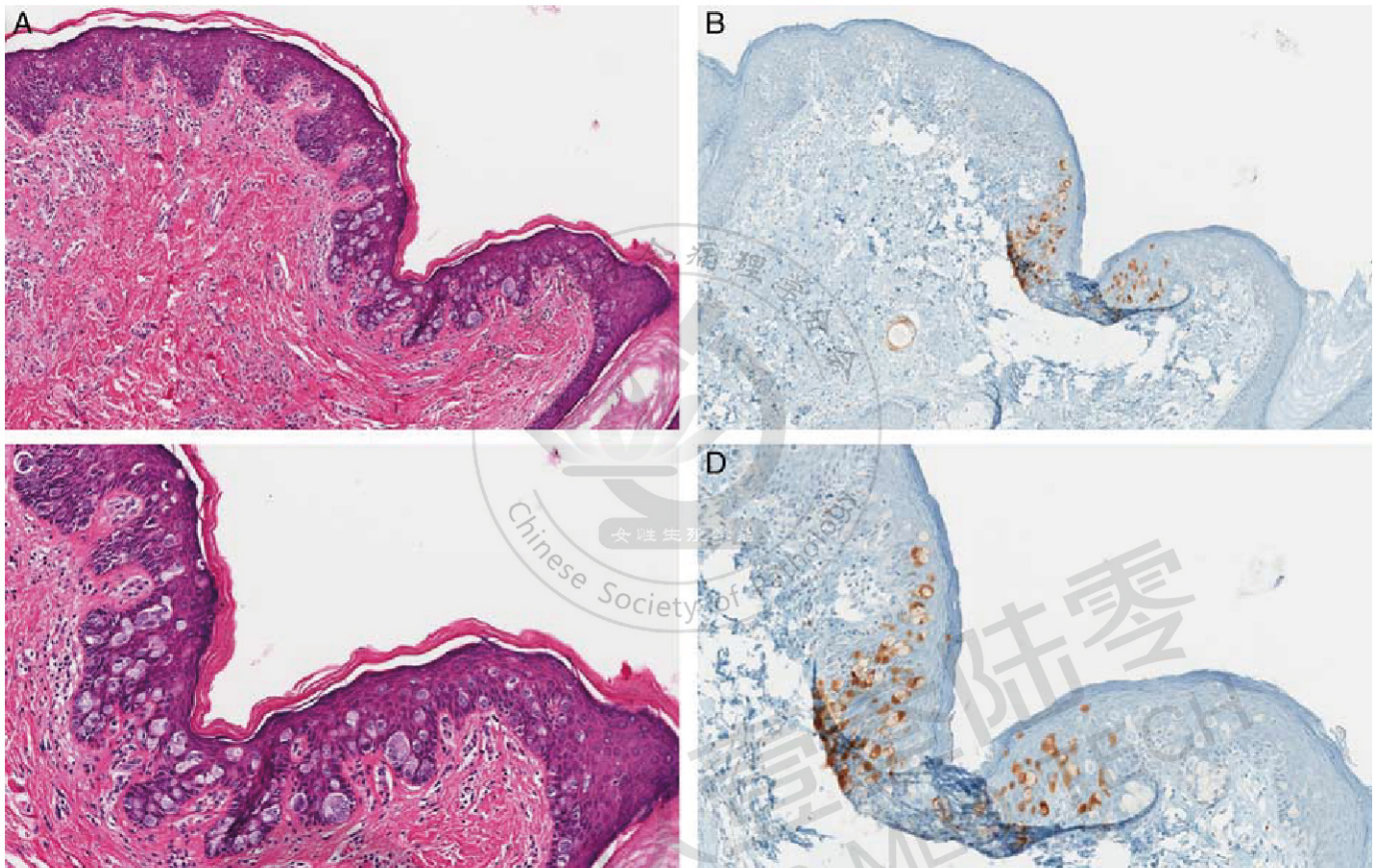
### EMPD: 乳腺外 Paget 病

## 原位杂交技术检测高危型HPV的mRNA

选择 10 例 p16 弥漫阳性病例，包括 6 例上皮内和 4 例浸润性 EMPD，应用 HPV RNA 原位杂交显色探针技术检测 18 种高危型 HPV 亚型。均未检测到高危型 HPV 的存在。

## 讨论

EMPD 是一种发生于外阴、会阴及肛门的罕见肿瘤。组织病理学特征是在表皮的基底层和副基底层可见单个或成簇增大的多角形细胞，胞浆丰富、淡染，富含粘液。Paget 细胞通常沿着表皮水平增生，但某些病例中，可侵犯真皮和皮下



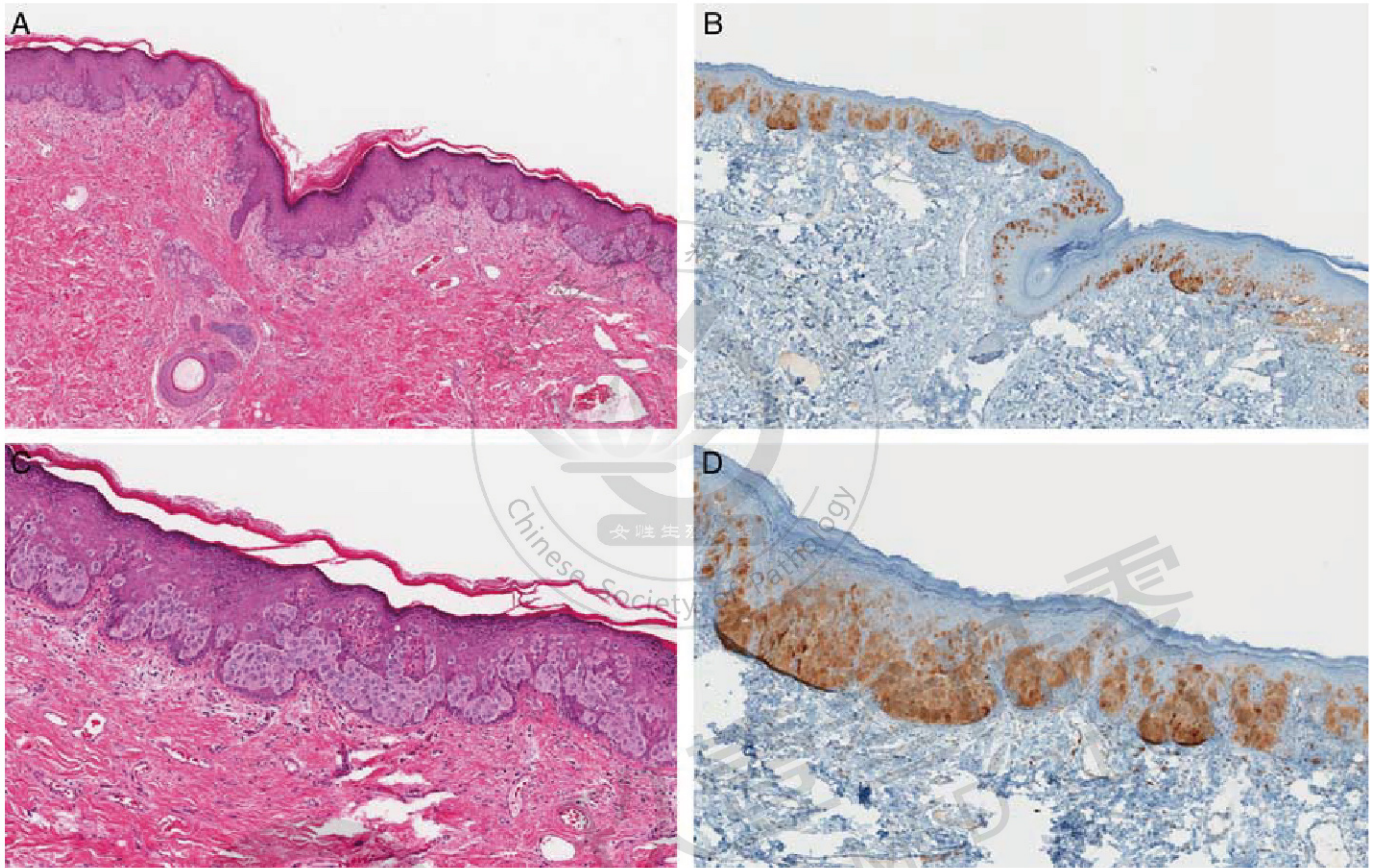
**图1. 外阴上皮内Paget病中p16呈局灶免疫染色模式：**  
A和C为低倍和高倍的HE染色切片；  
B和D为低倍和高倍镜下p16主要呈局灶的胞浆斑驳状阳性。

软组织并转移至淋巴结。当 Paget 细胞弥漫浸润表皮全层时，病变可与普通型高级别 VIN 相似。某些 EMPD 患者可见与增生性、发育不良性或恶性表皮病变共存。Brainard 和 Hart<sup>[15]</sup>发现 54% 的 EMPD 与其他皮肤病变相关，包括 29% 的乳头状瘤样增生、10% 的外阴原位鳞癌和浸润性鳞状细胞癌。外阴 EMPD 与普通型 VIN 共存也有报道<sup>[5-7,12,16-18]</sup>。此外，约 5% 的皮肤原位鳞状细胞癌呈巢团状模式，称为派杰样原位癌或派杰样鲍温病<sup>[16,19,20]</sup>。因此，应将外阴 EMPD 与其它相似病变区分开来，尤其是常见的 VIN 类型。

P16免疫组化染色已广泛应用于HPV相关的高级别鳞状上皮内病变（包括普通型VIN）的诊断，尤其是在组织学特征不典型时<sup>[8]</sup>。最近，Sah 和 McCluggage<sup>[21]</sup>报道外阴 EMPD 中发现 p16免疫反应性。为进一步研究原发性外阴 EMPD 中 p16

免疫染色的特征，我们系统地研究了 40 例典型的原发性外阴 EMPD 中 p16 的免疫组化表达模式，并探讨其表达模式与病变程度的关系。研究发现绝大多数（90%）原发性外阴 EMPD 存在 p16 免疫反应性，包括 88.2%（30/34 例）上皮内 EMPD 和 100%（6/6 例）浸润性 EMPD。局灶 P16 阳性仅见于 66.7%（20/30 例）上皮内 EMPD，浸润性 EMPD 未见。弥漫 p16 阳性见于 33.3%（10/30 例）上皮内 EMPD 和 100% 的浸润性 EMPD。依据 p16 免疫反应水平从阴性、局灶阳性到弥漫阳性的差异，提示 p16 表达水平的上调可能参与了外阴 Paget 病的进展机制。

对于 p16 阳性表达的部位与病变程度的关系，本组资料研究发现上皮内 EMPD 中 p16 局灶或弥漫阳性主要定位于胞浆，罕见核阳性。然而，所有 6 例浸润性 EMPD 中均为 p16



**图2. 外阴上皮内Paget病中p16呈弥漫免疫染色模式：**  
A和C为低倍好及高倍的HE染色切片；  
B和D为>95%的肿瘤性Paget细胞呈连续的p16胞浆染色，核染色罕见。

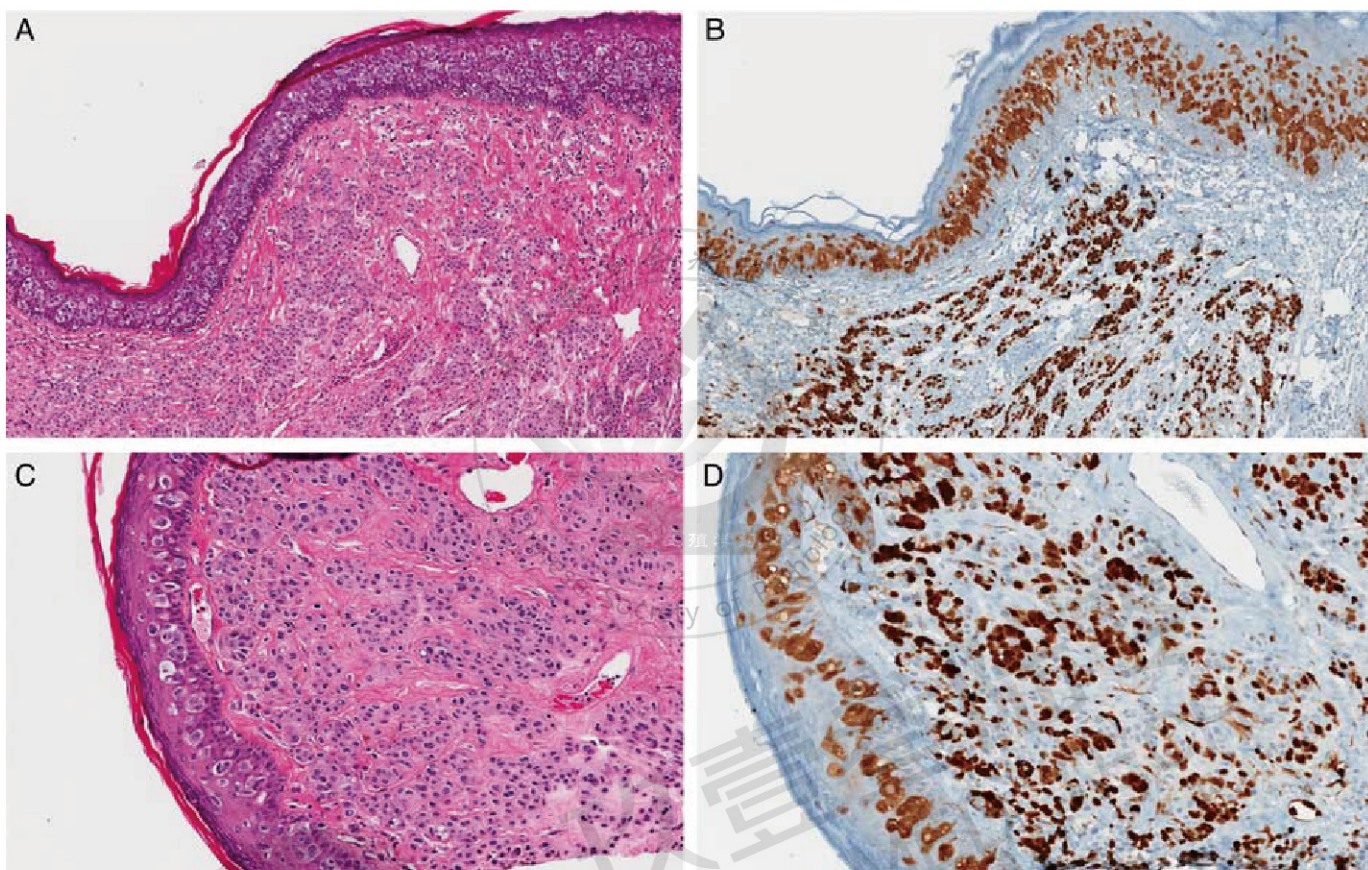
的核加浆阳性，浸润性成分中 p16 核阳性强度达50%到90%。虽然p16 在这种非 HPV 相关外阴疾病中上调的内在分子机制尚不完全清楚，但我们观察到 p16 免疫表达是随病变程度而逐渐增强，以及染色细胞亚定位从上皮内型的胞浆阳性到浸润性的胞核阳性，表明 p16 表达的上调可能参与了原发性 Paget 病的发生和发展的分子机制。

原发性外阴 EMPD 是与 HPV 不相关疾病。几十年来，运用不同的检测方法如免疫组化和 DNA 原位杂交等，在外阴和肛周 Paget 病中未能检测到 HPV。新近报道，一种针对 18 种高危型 HPV 的 E6/E7mRNA 检测方法，RNAscope, 在宫颈鳞状上皮异型增生中的敏感性 98%，特异性 95%<sup>[22]</sup>。

我们应用该检测系统，在 p16 弥漫阳性的 6 例上皮内和 4 例浸润性外阴 EMPD 中均未能检测到高危型 HPV，进一步证实了外阴 EMPD 与高危型 HPV 感染无关。

综上所述，p16 免疫组化已常规用于普通型 VIN 辅助诊断。在大部分普通型的高级别 VIN 中，p16 免疫组化染色显示异型增生的鳞状上皮弥漫阳性。我们的研究与其他研究显示了在大部分上皮内 EMPD 相似的 p16 免疫组化染色模式。因此，从诊断病理学的角度而言，单纯 p16 染色在鉴别外阴 EMPD 和普通型 VIN 中的作用有限。外阴 EMPD 鉴别诊断时，应用 CK7、CK20、CEA、GCDFP-15 等抗体及组织化学黏液染色有助于鉴别诊断。

总之，我们发现 p16 免疫反应在绝大多数原发性外阴 EMPD 存在不同的染色模式。弥漫 p16 阳性见于 1/3 的上皮内 EMPD 和所有浸润性 EMPD。p16 免疫反应从上皮内 EMPD 中的胞浆阳性到浸润性 EMPD 的胞核阳性且逐渐增强，提示 p16 表达异常可能参与了原发性外阴 EMPD 的发病和疾病进展机制。



**图3. 浸润性乳腺外Paget病中p16的表达:**

A和C HE切片显示有表皮累及的两例乳腺外Paget病;

B和D上皮内和浸润性成分均见弥漫p16免疫染色模式, 注意上皮内型主要呈胞浆阳性, 浸润型主要呈胞核阳性。

## 参考文献

1. Shaco-Levy R, Bean SM, Vollmer RT, et al. Paget's disease of the vulva: a histologic study of 56 cases correlating pathologic features and disease course. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:69-78.
2. Chang YT, Liu HN, Wong CK. Extramammary Paget's disease: a report of 22 cases in Chinese males. *J Dermatol* 1996;23:320-4.
3. Stapleton JJ. Extramammary Paget's disease of the vulva in a young, black woman. A case report with histogenic confirmation by immunostaining. *J Reprod Med* 1984;29:444-6.
4. Honda Y, Egawa K. Extramammary Paget's disease not only mimicking but also accompanying condyloma acuminatum. A case report. *Dermatology* 2005;210:315-8.
5. Chung J, Kim JY, Gye J, et al. Extramammary Paget's disease of external genitalia with bowenoid features. *Ann Dermatol* 2013;25:88-91.
6. Yoo KH, Seo SJ, Park J, et al. Extramammary Paget's disease of the penis with features of Bowen's disease. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:e999-1000.
7. Cannavo SP, Guarneri F, Napoli P. Extramammary Paget's disease of the scrotum with Bowenoid features. *Eur J Dermatol* 2006;16:203-4.
8. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32:76-115.
9. Snow SN, Desouky S, Lo JS, et al. Failure to detect human papillomavirus DNA in extramammary Paget's disease. *Cancer* 1992;69:249-51.
10. Czerwenka K, Heuss F, Hosmann JW, et al. Human papilloma virus DNA: a factor in the pathogenesis of mammary Paget's disease? *Breast Cancer Res Treat* 1996;41:51-7.
11. Bornstein J, Kaufman RH, Adam E, et al. Paget's disease of the vulva: search for herpes simplex virus antigens and human papillomavirus antigen and DNA. *Gynecol Oncol* 1988;31:384-8.
12. Egawa K, Honda Y. Simultaneous human papillomavirus 6 (HPV 6)-positive condyloma acuminatum, HPV 31-positive Bowen's disease, and non HPV-associated extramammary Paget's disease coexisting within an area presenting clinically as condyloma acuminatum. *Am J Dermatopathol* 2005;27:439-42.
13. Catteau X, Noel JC. p16 expression in case of perianal Paget's disease. *J Cutan Pathol* 2012;39:727-8.
14. Sah SP, Kelly PJ, McManus DT, et al. Diffuse CK7, CAM5.2 and BerEP4 positivity in Paget's disease of the perianal region: a mimic of extramammary Paget's disease. *Histopathology* 2013;62:511-4.
15. Brainard JA, Hart WR. Proliferative epidermal lesions associated with anogenital Paget's disease. *Am J Surg Pathol* 2000;24:543-52.
16. Armes JE, Lourie R, Bowlay G, et al. Paget's disease of the vulva: comparison with extramammary Paget's disease and non-Paget's disease squamous cell neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27:118-24.
17. Kim SA, Kwon JI, Jung HR, et al. Primary extramammary Paget's disease combined with Bowen's disease in vulva. *Ann Dermatol* 2011;23(suppl 2):S222-5.
18. Orlandi A, Piccione E, Francesconi A, et al. Simultaneous vulvar intraepithelial neoplasia and Paget's disease: report of two cases. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11:224-8.
19. Raiten K, Paniago-Pereira C, Ackerman AB. Pagetoid Bowen's disease vs. extramammary Paget's disease. *J Dermatol Surg* 1976;2:24-5.
20. Raju RR, Goldblum JR, Hart WR. Paget's disease of the vulva: squamous cell carcinoma in situ (Pagetoid Bowen disease) of the external genitalia. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22:127-35.
21. Sah SP, McCluggage WG. Florid vulval Paget's disease exhibiting p16 immunoreactivity and mimicking classic VIN. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32:221-7.
22. Mills AM, Coppock JD, Willis BC, et al. HPV E6/E7 mRNA in situ hybridization in the diagnosis of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL). *Am J Surg Pathol* 2018;42:192-200.

(李美平 翻译 包磊 审校)