

USP6 基因重排检测在动脉瘤样骨囊肿病理诊断中应用的初步探讨^{*}

杨邵敏^{**} 由江峰 齐双双 王 华

(北京大学基础医学院病理学系, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨 USP6 基因重排检测在原发性和继发性动脉瘤样骨囊肿 (aneurysmal bone cyst, ABC) 病理鉴别诊断中的应用价值。 **方法** 对 20 例需要鉴别原发性和继发性的 ABC 病例 (穿刺标本 9 例, 切除标本 11 例), 在常规福尔马林固定石蜡包埋标本上, 利用 USP6 基因双色分离探针进行染色体荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 检测, 计数分离阳性细胞, 阳性细胞比例 >7% 视为分离重排阳性。 **结果** 18 例可判读荧光信号结果, 2 例切除标本检测失败。9 例 USP6 基因分离重排阳性 (阳性细胞比 10% ~ 70%), 支持原发性 ABC, 其中 2 例为实性亚型; 9 例 USP6 基因分离重排阴性 (阳性细胞 <1%), 其中 4 例经术后标本全面病理检查证实为继发性 ABC, 分别继发于骨巨细胞瘤 2 例、纤维结构不良 1 例和骨母细胞瘤 1 例。USP6 基因断裂重排诊断原发性 ABC 的敏感性为 64% (9/14), 特异性为 100% (4/4), 准确率 72% (13/18)。 **结论** 利用 FISH 法检测 USP6 基因断裂重排对原发性 ABC 的病理确诊有重要辅助作用, 特别有助于穿刺少量标本和临床病理学表现不典型病例的病理诊断。

【关键词】 动脉瘤样骨囊肿; 荧光原位杂交; USP6 基因

文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2018)02-0151-05

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2018.02.016

A Primary Study of USP6 Gene Rearrangement Detection in the Pathological Diagnosis of Aneurysmal Bone Cyst Yang Shaomin, You Jiangfeng, Qi Shuangshuang, et al. Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Peking University, Beijing 100191, China

Corresponding author: Yang Shaomin, E-mail: yangshaomin@bjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the value of USP6 gene rearrangement in the pathological differentiation of primary and secondary aneurysmal bone cyst (ABC). **Methods** Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis was performed in 20 cases of routine formalin fixed paraffin embedded tissues using dual color USP6 gene breaking apart probes. Nine samples were obtained by core biopsy, and 11 were resected by surgery. The breaking apart positive cells were observed and counted. The cases with positive cells >7% were judged as positive. **Results** The immunofluorescence staining could be interpreted in 18 cases, while no satisfactory signal could be detected in 2 cases. The USP6 gene breaking apart was observed in 9 cases (positive cells varied from 10% to 70%), being supported to be primary ABC, including 2 cases of solid variant. It was negative in the other 9 cases (positive cells <1%), among which 4 cases were confirmed to be secondary ABC by comprehensive pathology examination on the postoperative samples, derived from giant cell tumor of bone (2 cases), osteoblastoma (1 case), and fibrous dysplasia (1 case). The sensitivity, specificity and accuracy of USP6 gene breaking apart in primary ABC were 64% (9/14), 100% (4/4) and 72% (13/18), respectively. **Conclusion** USP6 gene break apart detected by FISH method is helpful for the pathological diagnosis of primary ABC, especially for small samples obtained by biopsy and lesions with uncommon clinical or histological features.

【Key Words】 Aneurysmal bone cyst; Fluorescence in situ hybridization; USP6 gene

动脉瘤样骨囊肿 (aneurysmal bone cyst, ABC) 是一种具有局部侵袭性的良性骨肿瘤, 受累骨发生膨胀性破坏。经典的 ABC 病变由含有血液的多房囊

腔构成。多种良性和恶性骨病变可以发生出血和 (或) 囊性变, 类似 ABC 结构, 称为继发性 ABC^[1]。原发性和继发性 ABC 从临床和影像学上经常难以

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81302335)

** 通讯作者, E-mail: yangshaomin@bjmu.edu.cn

鉴别。病理检查在送检样本较少或者病变表现不典型时经常难以确诊。目前,原发性和继发性 ABC 的病理诊断主要依靠常规 H&E 染色切片的形态观察,依赖于病理医生的经验和主观判断,没有客观的免疫组化和分子诊断指标。

Oliveira 等^[2]报道原发性 ABC 病变中存在泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific protease, USP6)基因的断裂和易位,而继发性 ABC 中未发现此改变。虽然 USP6 基因的断裂重排在原发性 ABC 发病机制中的作用尚不太明了,但其可以作为原发性和继发性 ABC 病理诊断的客观辅助标准^[2]。

对于病理科常规的福尔马林固定石蜡包埋组织,染色体荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测是较为实用的染色体重排检查方法,比核型分析和逆转录 PCR(RT-PCR)方法更适用于临床。FISH 法可以原位观察组织,少量样本即可检测,样本制备处理相对简单,是病理科常

用的分子检测方法。本研究收集 2015 年 1 月~2017 年 8 月北京大学第三医院及外院申请病理会诊的可疑 ABC 20 例,探讨 FISH 法检测 USP6 基因断裂重排的应用价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本组 20 例,因常规病理 H&E 染色难以鉴别原发性或继发性 ABC,申请做 USP6 基因 FISH 检测。男 9 例,女 11 例。年龄 7~46 岁,平均 17.7 岁。脊柱病变 16 例,桡骨病变 2 例(其中 1 例位于桡骨表面),肋骨病变 2 例。MRI 检查均显示为溶骨性膨胀性骨破坏,病变边界清楚,呈多房囊性或囊实性,囊内可见液-液平面,提示存在动脉瘤样骨囊肿。9 例行穿刺活检,11 例为手术刮除或切除标本。具体见表 1。

表 1 20 例 ABC 的资料和诊断

病例	年龄(岁)	性别	部位	标本类型	FISH 阳性细胞比例	最后病理诊断
1	25	女	L ₅	切除	失败	原发性 ABC
2	13	男	桡骨	切除	50%(阳性)	原发性 ABC
3	8	女	C ₄	刮除	62%(阳性)	原发性 ABC(实性)
4	23	男	C ₆	穿刺	55%(阳性)	原发性 ABC
5	18	男	C ₅	切除	70%(阳性)	原发性 ABC(实性)
6	34	女	T ₂	穿刺	<1%(阴性)	继发性 ABC(骨巨细胞瘤)
7	11	男	T ₁₂	穿刺	<1%(阴性)	原发性 ABC
8	18	女	C ₂	穿刺	<1%(阴性)	继发性 ABC(骨巨细胞瘤)
9	13	女	T ₁₁	穿刺	63%(阳性)	原发性 ABC
10	18	女	C ₅	刮除	<1%(阴性)	原发性 ABC
11	13	男	T ₇	穿刺	<1%(阴性)	继发性 ABC(骨母细胞瘤)
12	46	女	肋骨	切除	<1%(阴性)	原发性 ABC
13	10	女	C ₂	穿刺	66%(阳性)	原发性 ABC
14	24	男	肋骨	切除	<1%(阴性)	继发性 ABC(纤维结构不良)
15	19	男	L ₅	穿刺	<1%(阴性)	原发性 ABC
16	14	女	T ₅	切除	<1%(阴性)	原发性 ABC
17	7	女	C ₄	穿刺	58%(阳性)	原发性 ABC
18	13	男	桡骨	切除	61%(阳性)	原发性 ABC
19	13	女	C ₅	刮除	失败	原发性 ABC
20	14	男	T ₆	刮除	10%(阳性)	原发性 ABC

注:C:颈椎;T:胸椎;L:腰椎;ABC:动脉瘤样骨囊肿

1.2 标本处理和病理诊断标准

送检组织常规福尔马林固定、石蜡包埋。含有质硬骨组织的样本经 10% 甲酸脱钙液处理至软化可以切片。H&E 染色切片由 2 名以上资深骨关节专业病理医师阅片。

原发性 ABC 的病理诊断按照 2013 年 WHO 软组织 and 骨肿瘤分类^[1],有如下特点:病变含有囊壁样结构,囊壁主要由增生的梭形细胞构成,细胞密度中等,异型性不明显,分裂象可多可少,但无病理性

核分裂象。囊壁分布多核巨细胞,部分病例可见编织骨(图 1~3)。当病变中实性结构多见,仅局灶有不明囊腔形成,详细检查未见其他原发病变时,提示为实性 ABC(图 4,5)。

1.3 FISH 染色方法及结果判读

ZytoLight SPEC USP6 双色分离探针试剂盒购自 CytoVision 公司(CytoVision GmbH,德国)。探针位于染色体 17p13.2,基因近端(近着丝粒)探针标记红色荧光,基因远端(近端粒)探针标记绿色荧光。

FISH 染色按标准步骤进行,简要如下:切片厚度为 4 μm ,65 $^{\circ}\text{C}$ 烤片过夜,依次脱蜡、水化,经蛋白酶 K(100 mg/L)消化 20 分钟,滴加探针,杂交仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。4',6-联脒-2'-苯基吡啶(4',6-diamidino-2'-phenylindole, DAPI)复染后荧光显微镜下观察。

FISH 结果由 2 位病理医师单独判读:至少计数 100 个不重叠的细胞核,红色信号和绿色信号距离 >2 个信号点直径视为阳性细胞。参照文献^[2],阳性细胞比例 $>7\%$ 视为分离重排阳性。

病理诊断与 FISH 结果判读分别由病理诊断医师和分子检测医师完成。

2 结果

20 例结果见表 1。

经 FISH 检测,18 例获得可判读的良好荧光信号;2 例检测不成功,荧光信号无法判读,均为经酸脱钙后的手术标本。9 例穿刺小标本均获得质优的可判读荧光信号。

9 例 USP6 基因断裂重排阳性:结合常规病理组织学特点,确诊 7 例普通型 ABC 和 2 例实性 ABC,其中 1 例位于桡骨表面,支持骨表面原发性 ABC。阳性病例均为 17 号染色体二倍体,阳性细胞中可见 1 个黄色信号(红色和绿色信号重叠)、1 个红色信号和 1 个绿色信号(图 6)。8 例阳性细胞比例为 50%~70%,1 例阳性细胞比例为 10%。

9 例 USP6 基因断裂重排阴性,只能观察到黄色信号,红色和绿色信号分离的阳性细胞计数 $<1\%$;经术后标本全面检查,4 例在病变某些区域发现有骨巨细胞瘤(2 例)、骨母细胞瘤(1 例)、纤维结构不良(1 例)成分,从而确诊为继发性 ABC(图 7~9)。另 5 例切除标本全面检查仍未见其他原发病变,符合原发性 ABC 的病理组织学特点。

本研究共成功检测 14 例原发性 ABC 和 4 例继发性 ABC。FISH 法检测 USP6 基因断裂重排诊断原发性 ABC 的敏感性为 64%(9/14),特异性为 100%(4/4),准确率为 72%(13/18)。见表 2。

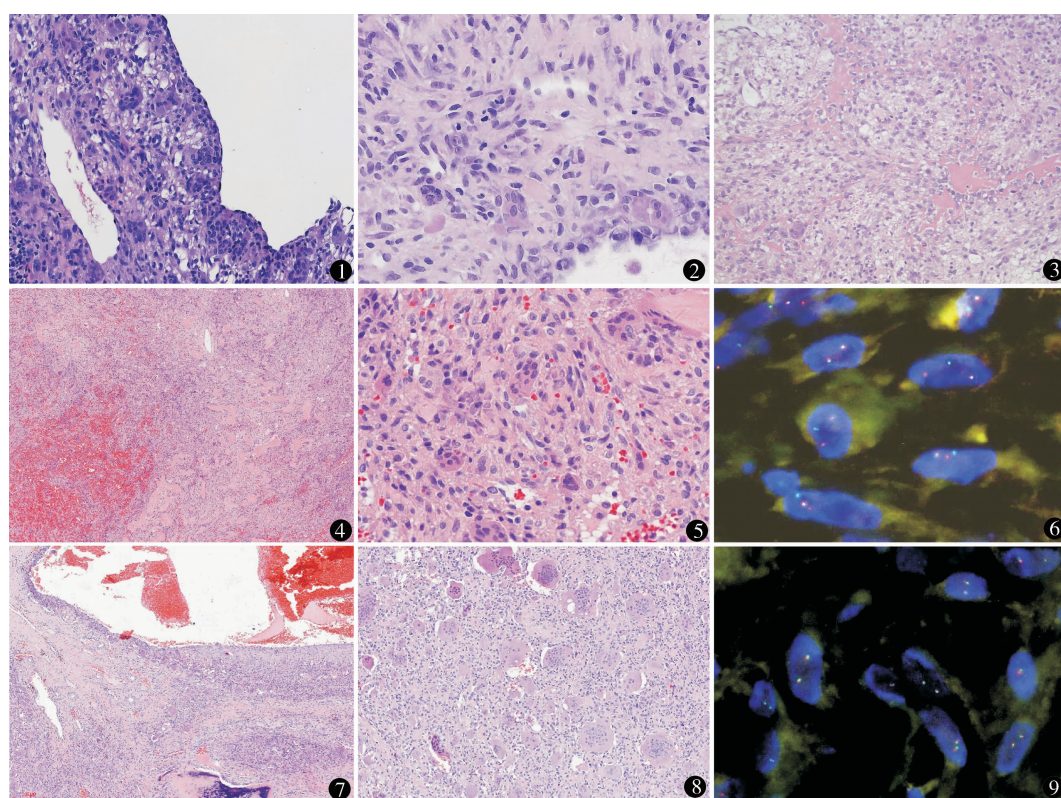


图 1 原发性 ABC,病变一侧为囊壁结构(H&E 染色 $\times 10$) 图 2 原发性 ABC,囊壁由梭形细胞、多核巨细胞和炎症细胞构成(H&E 染色 $\times 40$) 图 3 原发性 ABC,囊壁编织骨形成(H&E 染色 $\times 20$) 图 4 原发性 ABC,实性 ABC 中囊腔结构不明显,仅局灶可见出血(H&E 染色 $\times 4$) 图 5 原发性 ABC,实性 ABC 由梭形细胞、多核巨细胞和炎症细胞构成(H&E 染色 $\times 40$) 图 6 原发性 ABC,USP6 基因分离探针 FISH 检测可见红绿分离的阳性信号 图 7 骨巨细胞瘤继发 ABC,可见含血的囊腔(H&E 染色 $\times 20$) 图 8 骨巨细胞瘤继发 ABC,病变其他区域可见骨巨细胞瘤成分(H&E 染色, $\times 20$) 图 9 骨巨细胞瘤继发 ABC,FISH 检测显示红绿信号重叠呈黄色,未见分离

表 2 FISH 法检测 USP6 基因断裂重排诊断
原发性 ABC 的价值

USP6 基因 断裂重排	最终病理诊断		合计
	原发性 ABC	继发性 ABC	
阳性	9	0	9
阴性	5	4	9
合计	14	4	18

3 讨论

ABC 是一种良性骨肿瘤,具有局部侵袭性,以往曾被认为是反应性增生。Oliveira 等^[2]报道原发性 ABC 存在染色体 17q13 上 USP6 基因平衡易位,提示病变为肿瘤性。目前发现的易位伙伴基因包括 CDH11、ZNF9、COL1A1、TRAP150 和 CMD。USP6 即泛素特异性蛋白酶^[3,4],染色体重排使 USP6 基因的编码区与上述伙伴基因高度活跃的启动子区结合,上调 USP6 基因转录,使 Jak1 去泛素化,活化 Jak1-STAT3 信号通路^[5],可能与骨母细胞成熟阻滞和基质金属蛋白酶产生异常有关^[6,7],参与疾病发生发展。未发现继发性 ABC 中存在 USP6 基因的易位重排^[2]。

原发性 ABC 可发生于任何骨,最常见于长骨干骺端,特别是胫骨、腓骨、肱骨,其次是椎体后侧附件。本组脊柱病变多,与北京大学第三医院骨科以收治脊柱患者为主有关。ABC 通常发生在髓腔,少数发生在骨表面(骨表面 ABC)^[8]。大约 1/3 ABC 为继发性。本组以及 Oliveira 等^[2]的报道均显示,USP6 基因分离重排对原发性 ABC 的特异性为 100%,敏感性接近 70%。USP6 基因的 FISH 检测在分子水平上为甄别原发性 ABC 提供帮助。本组 USP6 重排阴性的 9 例中,4 例术后全面检查在病变局部发现骨巨细胞瘤、骨母细胞瘤、纤维结构不良病变,5 例 USP6 基因易位重排阴性的原发性 ABC 可能与不同于 USP6 的其他基因有关,其发病机制有待进一步研究。另外,原发性 ABC 特别注意需要与血管扩张型骨肉瘤鉴别,两者均好发于 20 岁以下年轻人,组织学表现有某些相似性,USP6 基因重排检测从分子水平为两者鉴别提供帮助。本组 1 例(例 2)发生在桡骨表面,临床考虑不能除外骨肉瘤,USP6 基因易位检测支持骨表面的原发性 ABC 诊断,避免过度治疗。也有少数发生在软组织的原发性 ABC^[8],以及个别转移的病例报道^[9]。这些少见部位和临床表现不典型病例是否为真正的原发性 ABC,需要遗传学证据的支持。

原发性 ABC 的治疗有手术和非手术方式,如栓塞治疗、狄诺塞麦(denosumab)药物治疗等^[10,11]。

对于脊柱等手术难度较大的病变部位,以及年龄较小的患者,损伤较小的治疗方式更为适用。常在治疗前进行穿刺活检排除骨巨细胞瘤、骨肉瘤等继发性 ABC。但因穿刺获得的组织量较少,给病理诊断带来极大挑战。较小穿刺标本组织固定一般较为及时充分,不需长时间经酸脱钙,FISH 检测更为稳定。本组 9 例穿刺样本全部获得满意的荧光信号,其中 4 例阳性,从而使较少的送检样本即得以确诊,避免过大手术。经酸脱钙的手术标本可能因组织处理而影响探针杂交,本组 11 例手术标本中 2 例检测不成功。

实性 ABC 是一种较为少见的病变,呈囊实性,缺乏经典 ABC 的海绵样腔隙,以较多间隔较厚的实性区为主,临床和病理表现不典型^[12]。本组 14 例原发性 ABC 中 2 例经 FISH 检测确认为实性 ABC,与本组申请基因检测的病例以疑难病例为主有关。实性 ABC 的组织学特点是:梭形细胞弥漫性增生,细胞核无多形性,含有散在、簇状分布的破骨样巨细胞,钙化的纤维黏液样间质,有骨母细胞分化和骨样组织产生。这些组织学表现与典型原发性 ABC 的囊壁结构相同,但缺乏囊腔结构,单纯根据组织学表现经常难以确诊^[12-14]。

巨细胞修复性肉芽肿发生在颌骨和手足小骨,组织学表现与实性 ABC 类似。研究显示手足小骨的巨细胞修复性肉芽肿也存在 USP6 基因易位,提示病变本质是 ABC,而颌骨类似病变均为阴性,因此有学者建议将手足小骨的巨细胞修复性肉芽肿诊断为实性 ABC^[15],而颌骨的巨细胞修复性肉芽肿是不同于 ABC 的病变。

USP6 基因重排也见于大约 90% 的结节性筋膜炎^[16],这是一种间叶组织病变,含有大量增生的纤维母细胞,病变通常细胞丰富,是一种假肉瘤性肌纤维母细胞增生,可自发消退,以往被认为是对创伤的反应,目前认为是一种软组织肿瘤。USP6 基因重排同样见于结节性筋膜炎的类似病变——骨化性肌炎^[17],有学者认为最好把此两种病变统一归为软组织的 ABC,此类病变中 USP6 基因最常见的易位伙伴是 MYH9 基因,位于 22q12.3,该易位伙伴并未发现于骨的 ABC。此类病变也可应用 USP6 基因 FISH 进行检测。

综上,利用 FISH 法检测 USP6 基因重排阳性是一种实用有效的原发性 ABC 的辅助诊断方法,特别有助于少量样本、临床病理学表现不典型原发性 ABC 的诊断。但由于本病少见,本研究样本量较少,确切结果尚待积累更多病例。

参考文献

- 1 Christopher DM, Fletcher JAB, Pancras CW, et al. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2013. 348 – 349.
- 2 Oliveira AM, Perez-Atayde AR, Inwards CY, et al. USP6 and CDH11 oncogenes identify the neoplastic cell in primary aneurysmal bone cysts and are absent in so-called secondary aneurysmal bone cysts. *Am J Pathol* 2004, 165(5):1773 – 1780.
- 3 Paulding CA, Ruvolo M, Haber DA. The Tre2 (USP6) oncogene is a hominoid-specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(5): 2507 – 2511.
- 4 Wei R, Liu X, Yu W, et al. Deubiquitinases in cancer. *Oncotarget*, 2015, 6(15):12872 – 12889.
- 5 Quick L, Young R, Henrich IC, et al. Jak1-STAT3 signals are essential effectors of the USP6/TRE17 oncogene in tumorigenesis. *Cancer Res*, 2016, 76(18):5337 – 5347.
- 6 Lau AW, Pringle LM, Quick L, et al. TRE17/ubiquitin-specific protease 6 (USP6) oncogene translocated in aneurysmal bone cyst blocks osteoblastic maturation via an autocrine mechanism involving bone morphogenetic protein dysregulation. *J Biol Chem*, 2010, 285(47):37111 – 37120.
- 7 Ye Y, Pringle LM, Lau AW, et al. TRE17/USP6 oncogene translocated in aneurysmal bone cyst induces matrix metalloproteinase production via activation of NF-kappaB. *Oncogene*, 2010, 29(25):3619 – 3629.
- 8 Shoohtarizadeh T, Movahedinia S, Mostafavi H, et al. Aneurysmal bone cyst: a analysis of 38 cases and report of four unusual surface ones. *Arch Bone Jt Surg*, 2016, 4(2):166 – 172.

- 9 van de Luijngaarden AC, Veth RP, Slootweg PJ, et al. Metastatic potential of an aneurysmal bone cyst. *Virchows Arch*, 2009, 455(5): 455 – 459.
- 10 Tsgozis P, Brosjo O. Current strategies for the treatment of aneurysmal bone cysts. *Orthop Rev (Pavia)*, 2015, 7(4):6182.
- 11 Pauli C, Fuchs B, Pfirrmann C, et al. Response of an aggressive periosteal aneurysmal bone cyst (ABC) of the radius to denosumab therapy. *World J Surg Oncol*, 2014, 12:17.
- 12 Johnson EM, Caracciolo JT. Solid variant aneurysmal bone cyst in the distal fibular metaphysis: radiologic and pathologic challenges to diagnosis. *Radiol Case Rep*, 2017, 12(3):555 – 559.
- 13 Singh A, Majeed A, Mallick S, et al. Solid variant of aneurysmal bone cyst masquerading as malignancy. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(7): ED35 – ED36.
- 14 孙昆昆, 沈丹华. 椎体肿物. *中华病理学杂志*, 2009, 38(9): 628 – 629.
- 15 Agaram NP, LeLoarer FV, Zhang L, et al. USP6 gene rearrangements occur preferentially in giant cell reparative granulomas of the hands and feet but not in gnathic location. *Hum Pathol*, 2014, 45(6): 1147 – 1152.
- 16 Erickson-Johnson MR, Chou MM, Evers BR, et al. Nodular fasciitis: a novel model of transient neoplasia induced by MYH9-USP6 gene fusion. *Lab Invest*, 2011, 91(10):1427 – 1433.
- 17 Sukov WR, Franco MF, Erickson-Johnson M, et al. Frequency of USP6 rearrangements in myositis ossificans, brown tumor, and cherubism: molecular cytogenetic evidence that a subset of “myositis ossificans-like lesions” are the early phases in the formation of soft-tissue aneurysmal bone cyst. *Skeletal Radiol*, 2008, 37(4):321 – 327.

(收稿日期:2017-11-22)

(修回日期:2017-12-10)

(责任编辑:王惠群)