

4例豫南黑猪黑色素瘤的病理学诊断分析

王小女¹, 张晨¹, 张维真², 魏丽², 刘萌萌², 李秀领¹, 乔瑞敏^{1*}

¹河南农业大学动物科技学院, 河南 郑州

²郑州市第三人民医院, 河南 郑州

Email: *qrm480@163.com

收稿日期: 2020年10月7日; 录用日期: 2020年10月21日; 发布日期: 2020年10月28日

摘要

为了对河南省的培育品种豫南黑猪的皮肤肿瘤进行初步诊断, 试验对4例患病个体进行了临床诊断和病理学组织观察, 手术切除肿瘤组织后进行病理组织切片制作和HE染色观察。结果表明: 4例患病个体是典型的猪黑色素瘤, 主要的病理学变化特征为肿瘤组织排列紊乱, 表皮的棘细胞层和基底层的柱状细胞之间有黑色素瘤细胞, 呈梭形, 椭圆形, 体积较正常细胞大, 内含有黑色素颗粒。

关键词

黑色素瘤, 豫南黑猪, 临床诊断, 病理学诊断

Pathological Diagnosis and Analysis of Four Cases of Melanoma in Yunan Black Pigs

Xiaonv Wang¹, Chen Zhang¹, Weizhen Zhang², Li Wei², Mengmeng Liu², Xiuling Li¹, Ruimin Qiao^{1*}

¹College of Animal Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan

²The Third People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou Henan

Email: *qrm480@163.com

Received: Oct. 7th, 2020; accepted: Oct. 21st, 2020; published: Oct. 28th, 2020

Abstract

In order to diagnose the skin tumor of Yunan black pigs, a cultivated breed of pigs in Henan province, 4 cases of sick individuals were diagnosed by clinical diagnosis and histopathological obser-

*通讯作者。

vation. After operation, the tumor tissue was resected and the pathological sections were made and HE staining was used to observe the tumor. The results showed that 4 cases were typical melanoma, and the main pathological features were disordered arrangement of tumor tissues. There were melanomas between the spinous cell layer of epidermis and the columnar cells at the basal layer, which were spindle shaped and elliptic in size, larger than normal cells, and contained melanin particles.

Keywords

Melanoma, Yunan Black Pigs, Clinical Diagnosis, Pathological Diagnosis

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黑色素瘤是由黑色素细胞突变为恶性黑色素瘤细胞而来, 表现为良性或恶性。人黑色素瘤一般表现为恶性, 是全球致死率最高的皮肤肿瘤, 2018 年全球新增皮肤黑色素瘤患者约 287723 万例, 死亡 60712 例[1]。猪黑色素瘤一般为良性, 多发于黑猪品种, 天然发生或者在出生后几周龄发生, 不受紫外线影响, 会转移到内脏器官且有自发性消退现象, 致死率较低[2]。国际上, 在杜洛克猪以及杜洛克猪与伊比利亚猪的杂交群体中曾有皮肤黑色素瘤病例的报道[3] [4]。目前有 MeLiM, Sinclair 和 MMS-Troll 三种家猪黑色素瘤模型, 研究发现, 黑色素瘤的发生没有性别和部位偏好性[5], 疾病的外显率不足 100%, 遗传模式均未知。其中, 以 MeLiM 家猪群体的研究最为系统。研究者推测 MeLiM 群体受两个抑癌基因和一个显性基因控制[6], 通过基因连锁分析发现了 MC1R [7]和 KIT [8]基因与疾病具有一定的相关性, RACK1 [9]基因则存在过表达现象, 通过全基因组关联分析检测到了 16 个染色体影响区段[10], 利用转录组测序分析发现 lncRNA 和一些 miRNA [11]在疾病发生中发挥着作用。国内暂时没有猪黑色素瘤的研究报道。河南地方猪的培育品种豫南黑猪拥有淮南猪和杜洛克猪血统, 近些年来, 在它选种选育过程中, 发现一些疑似患有黑色素瘤的个体, 从中挑选 4 头进行诊断。现就这 4 例豫南黑猪黑色素瘤临床特征及组织病理学特征进行报告。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

4 头患病猪出生于 2017~2018 年之间, 来自河南省三高农牧股份有限公司, 根据出生先后顺序, 将其编号为 1 号, 2 号, 3 号, 4 号患病猪。手术切除肿瘤后, 用 10%的福尔马林(购自北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1260)固定并制片后进行组织病理学检查。

2.2. 手术切除及切片制备

手术在动物医院进行, 术前保定患病个体, 对患病个体的肿瘤组织周围做表面浸润麻醉。手术切除肿瘤组织, 采集肿瘤组织做切片, 10%的福尔马林固定。3 号猪在手术过程中死亡, 解剖后发现肺脏和脾脏也有疑似黑色素瘤组织, 故同时采取肺脏和脾脏带有肿瘤的组织做切片。将固定好的肿瘤组织切成大小为 2.0 cm × 2.0 cm × 0.2 cm 的小组织块, 再经脱水透明、浸蜡和包埋后, 用切片机制成 5 μm 厚的切片,

经展片、贴片、烘片并脱蜡，用 HE 染色试剂盒按常规 HE 染色后，脱水封固制片。

3. 结果与分析

3.1. 临床检查

4 号猪肿瘤直径约 3~4 cm，其他猪肿瘤直径 1~2 cm。1 号猪为母猪，10 日龄(以下日龄均为对患病个体的肿瘤组织进行手术切除的时间)，发病部位在后背部；2 号猪为公猪，8 日龄，发病部位在左后腿部；3 号猪为公猪，4 日龄，左后背侧和左后肢上各有一个瘤组织(图 1)；4 号猪为母猪，25 日龄，发病部位在后臀部。4 头患病猪天生皮肤表面即带有肿胀物，该肿胀物会随着日龄的增长不断增大，肿瘤部位上均发生不同程度的破溃出血，患病猪的食欲和生长速度与正常猪相比并无差异。肿瘤表现实性质软，形状不规则，表面凹凸不平，颜色均为灰黑色。3 号猪手术死亡解剖后发现肺脏和脾脏有疑似黑色素瘤组织(图 2)，眼观为肺脏和脾脏表面散乱分布大小不同的黑色病灶，这些病灶深入脏器内部。

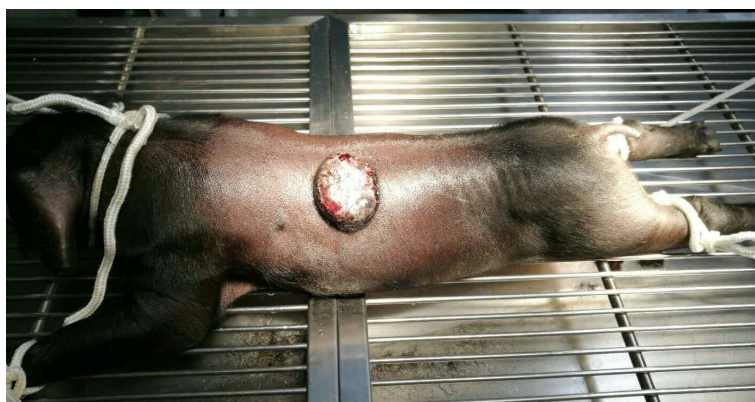


Figure 1. Left posterior lateral melanoma tissue of pig No.3

图 1. 3 号猪左后背侧黑色素瘤组织

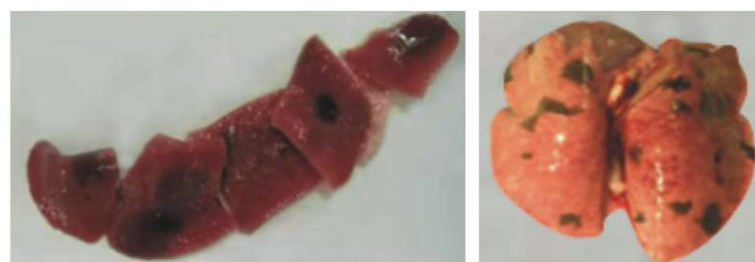


Figure 2. Suspected melanoma lesions in No.3 pig' spleen (left) and lung (right). Note: The spleen was sheared with scissors

图 2. 3 号猪脾脏(左)和肺脏(右)的疑似黑色素瘤病灶。注：脾脏用剪刀进行了剪切处理

3.2. 病理组织学观察

整体来看，4 头猪的皮肤患病处有大面积溃疡形成，镜检可见皮肤表皮萎缩，表皮的棘细胞层和基底层的柱状细胞之间有黑色素瘤细胞。低倍镜下，肿瘤在皮肤真皮层及皮下组织内浸润性生长，肿瘤组织排列紊乱，与正常黑色素细胞相比，黑色素瘤细胞体积大，形态多，细胞核体积也大，肿瘤细胞呈梭形，椭圆形，可见瘤巨细胞。高倍镜下，瘤细胞形态大小各不相同，颜色深浅不一，当瘤细胞内含有大量的黑色素颗粒时，瘤细胞体积大，细胞核被黑色素颗粒覆盖，瘤细胞呈一个黑块，颜色呈深黑色，当

含有少量黑色素时, 瘤细胞体积小, 结构清晰, 可以看到细胞核, 颜色呈浅褐色。4 个个体之间及个体内不同部位各有特点。1 号个体瘤细胞呈片块状分布, 在皮肤真皮层及皮下组织内浸润性生长, 细胞之间界限明显, 细胞呈梭形, 椭圆形, 胞浆红染, 核仁明显, 可见病理性核分裂像, 肿瘤内淋巴细胞浸润不明显(图 3(a))。2 号个体瘤细胞成片在皮肤真皮层、皮下组织及骨骼肌组织内浸润性生长, 瘤细胞体积大, 细胞呈梭形, 椭圆形, 胞浆内黑色素颗粒丰富, 大部分瘤细胞核仁明显, 肿瘤内淋巴细胞浸润不明显(图 3(b))。3 号个体腿部瘤细胞弥散成片, 由于胞浆内含有大量的黑色素颗粒, 导致无法辨别瘤细胞轮廓, 使瘤细胞连成一片黑色(图 3(c))。3 号个体肺泡间隔和脾脏脾窦内可见少量胞浆内有丰富色素的细胞并且散在分布, HE 染色后的瘤细胞无法与良性的含铁血黄素细胞鉴别, 需要做免疫组化检测, 疑似为转移性黑色素瘤细胞(图 3(d), 图 3(e))。4 号个体瘤细胞弥散分布, 排列疏松, 细胞之间空隙明显, 肿瘤细胞呈梭形或椭圆形(图 3(f))。根据肿瘤组织的病理学观察, 结合临床症状, 初步诊断: 4 例猪皮肤肿瘤均为黑色素瘤, 3 号个体肺脏和脾脏需要做进一步免疫组化检测。

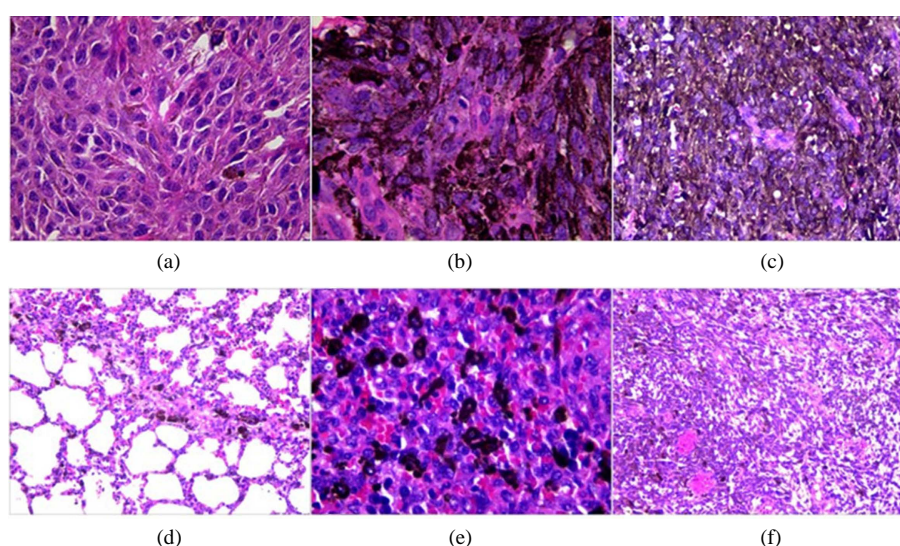


Figure 3. Microscopic examination of skin tumors in 4 pigs. (a): Slice of pig No.1 (200×); (b): Slice of pig No.2 (200×); (c): Slice the leg of pig No.3 (200×); (d): Slice the lung of pig No.3 (200×); (e): Slice the spleen of pig No.3 (200×); (f): Slice of pig No.4 (200×)

图 3. 4 头猪皮肤肿瘤切片镜检。(a) 1 号猪切片(200×); (b) 2 号猪切片(200×); (c) 3 号猪腿部切片(200×); (d) 3 号猪肺部切片(200×); (e) 3 号猪脾脏切片(200×); (f) 4 号猪切片(200×)

4. 讨论

本研究表明, 豫南黑猪黑色素瘤先天发生, 与以往其它猪种研究相符, 可能发生先天转移或后天转移。本研究的病例是典型的黑色素瘤。临床检查可发现, 黑色素瘤呈黑色或灰黑色, 有的瘤体表皮较厚, 有的瘤体表皮较薄且含有丰富的血管, 易破溃出血, 瘤组织高于皮肤表面, 形状大多不规则, 与正常皮肤的界限不明显。镜下检测可发现, 黑色素瘤细胞形态多样, 呈梭形、椭圆形、上皮样、痣细胞样或泡沫样, 有的可见瘤巨细胞, 排列混乱, 呈集团状、束状、条索状、漩涡状或疏松网状等[12]。在同一黑色素瘤组织中, 瘤细胞大小各异, 总体来说, 瘤细胞体积比正常细胞大; 黑色素瘤细胞内黑色素的含量不同, 有的细胞含有大量黑色素, 瘤组织结构被遮挡, 影响观察, 导致无法做出正确诊断, 甚至有的黑色素瘤细胞内不含有黑色素, 容易与其他多种类型肿瘤相混淆[13]。而对难以辨别的成分和易混淆的其他肿瘤需要我们进一步诊断鉴别, 结合不同易混淆肿瘤的发病情况、形态结构及各类肿瘤标记物, 利用特殊

染色法、脱黑色素方法和免疫组化方法进行鉴别[14]。国外研究证明猪是研究黑色素瘤的良好的动物模型[5]，所以确诊猪黑色素瘤是研究黑色素瘤的关键。本研究通过临床观察和病理组织学观察对4例猪皮肤肿瘤进行初步诊断，临床检查与皮肤黑色素瘤特征相符，肿瘤组织形态表现为典型的黑色素瘤组织特征，所以诊断为猪皮肤黑色素瘤。3号猪肺泡间隔和脾脏脾窦内含有丰富的色素颗粒，怀疑为转移的黑色素瘤组织病变，但无法与含铁血黄素细胞进行区别，进而没有确诊肺部和脾脏的病变是否为转移的黑色素瘤细胞，下一步还需进行免疫组化，检测黑色素瘤标志物，确诊是否为转移性黑色素瘤。

人黑色素瘤和其他肿瘤一样，主要通过组织切片，利用不同的组织病理学方法进行诊断[15]。手术切除是原发性黑色素瘤唯一有效的治疗手段，一旦发生转移，除了传统的手术、放疗、全身化疗外，还得使用免疫疗法、靶向疗法以及它们的组合疗法，与传统疗法相比，提高了转移性黑色素瘤病人的存活率[16]。目前在对疑似人黑色素瘤病例的诊断，除了临床诊断，组织病理学诊断，影像学诊断，免疫组化外，还有皮肤镜检查、反射共聚焦显微镜、全身摄影等，但这些方法都有局限性[17][18]。有研究表明，早期黑色素瘤的五年生存率超过90%，而转移性黑色素瘤五年生存率仅为15%，所以早期确诊和预测是否转移变得非常迫切[19]。迄今为止，已经发现一系列黑色素瘤的基因水平和表观遗传水平的生物标志物，很多成熟的标志物已在临床上得到应用，新开发的标志物可为黑色素瘤的诊断和治疗提供方向。

综上所述，对黑色素瘤应坚持早诊断早治疗的原则，随着该病发生率不断提高，如何在发病初期确诊易感群体，是改善黑色素瘤患者预后的重要因素。不论用于治疗还是研究，确诊都是关键。

5. 结论

根据临床症状及病理组织学切片镜检结果，按照组织病理学标准，确诊这4例猪皮肤肿瘤为猪黑色素瘤。

基金项目

河南省优秀青年基金项目《鉴别豫南黑猪自发性皮肤黑色素瘤的致病位点》(202300410195)。

参考文献

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., et al. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] Hook Jr., R.R., 袁昌国. 黑色素瘤的动物模型: Sinclair 猪黑色素瘤[J]. 上海实验动物科学, 1984, 4(3): 183-184.
- [3] Hordinsky, M.K., Ruth, G. and King, R. (1985) Inheritance of Melanocytic Tumors in Duroc Swine. *Journal of Heredity*, **76**, 385-386.
- [4] Perez, J., Garcia, P.M., Bautista, M.J., Millan, Y., Ordas, J. and Martin de las Mulas, J. (2002) Immunohistochemical Characterization of Tumor Cells and Inflammatory Infiltrate Associated with Cutaneous Melanocytic Tumors of Duroc and Iberian Swine. *Veterinary Pathology*, **39**, 445-451. <https://doi.org/10.1354/vp.39-4-445>
- [5] Bourneuf E. (2017) The MeLiM MiniPig: An Original Spontaneous Model to Explore Cutaneous Melanoma Genetic Basis. *Frontiers in Genetics*, **8**, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00146>
- [6] Hruban, V., Horak, V., Fortyn, K., Hradecky, J., Klauudy, J., Smith, D.M., Reisnerova, H. and Majzlik, I. (2004) Inheritance of Malignant Melanoma in The MeliM Strain of Miniature Pigs. *Veterinarni Medicina*, **49**, 453-459. <https://doi.org/10.17221/5739-VETMED>
- [7] Du, Z.Q., Vincent-Naulleau, S., Gilbert, H., Vignoles, F., Crechet, F., Shimogiri, T., Yasue, H., Leplat, J.J., Bouet, S., Gruand, J., Horak, V., Milan, D., Le Roy, P. and Geffrotin, C. (2007) Detection of Novel Quantitative Trait Loci for Cutaneous Melanoma by Genome-Wide Scan in The MeliM Swine Model. *International Journal of Cancer*, **120**, 303-320. <https://doi.org/10.1002/ijc.22289>
- [8] Fernandez-Rodriguez, A., Estelle, J., Blin, A., Munoz, M., Crechet, F., Demenais, F., Vincent-Naulleau, S. and Bourneuf, E. (2014) *KIT* and Melanoma Predisposition in Pigs: Sequence Variants and Association Analysis. *Animal Genetics*, **45**, 445-448. <https://doi.org/10.1111/age.12136>

- [9] Egidy, G., Jule, S., Bosse, P., Bernex, F., Geffrotin, C., Vincent-Naulleau, S., Horak, V., Sastre-Garau, X. and Panthier, J.J. (2008) Transcription Analysis in the MeLiM Swine Model Identifies RACK1 as A Potential Marker of Malignancy for Human Melanocytic Proliferation. *Molecular Cancer*, **7**, Article No.: 34. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-34>
- [10] Bourneuf, E., Estelle, J., Blin, A., Crechet, F., Schneider, M.D.P., Gilbert, H., Brossard, M., Vaysse, A., Lathrop, M., Vincent-Naulleau, S. and Demenais, F. (2018) New Susceptibility Loci for Cutaneous Melanoma Risk and Progression Revealed Using A Porcine Model. *Oncotarget*, **9**, 27682-27697. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25455>
- [11] Baco, M., Chu, C.Y., Bouet, S., Rogel-Gaillard, C., Bourneuf, E., Le Provost, F., Chu, C.Y. and Vincent-Naulleau, S. (2014) Analysis Of Melanoma-Related MicroRNAs Expression During The Spontaneous Regression of Cutaneous Melanomas in MeLiM Pigs. *Pigment Cell & Melanoma Research*, **27**, 668-670. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12243>
- [12] 孙玉倩, 李瑞珍, 宋高杰, 等. 特殊染色法对仔猪先天性黑色素瘤的鉴别[J]. 动物医学进展, 2015, 36(5): 128-131.
- [13] 韩庆功, 刘超, 陈金山, 等. 猪恶性黑色素瘤的病理学观察[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(8): 37-38.
- [14] 姜晨霞, 管小松, 施公胜, 等. 恶性黑色素瘤的临床病理特征与鉴别诊断[J]. 实用临床医药杂志, 2018, 22(9): 49-53.
- [15] Hekler, A., Utikal, J.S., Enk, A.H., Solass, W., Bestvater, F., Schmitt, M., Klode, J., Schadendorf, D., Sondermann, W., Franklin, C., Bestvater, F., Flaig, M.J., Krahl, D., von Kalle, C., Frohling, S. and Brinker, T.J. (2019) Deep Learning Outperformed 11 Pathologists in The Classification of Histopathological Melanoma Images. *European Journal of Cancer*, **118**, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.06.012>
- [16] Ugurel, S., Rohmel, J., Ascierto, P.A., Flaherty, K.T., Grob, J.J., Hauschild, A., Larkin, J., Long, G.V., Lorigan, P., McArthur, G.A., Ribas, A., Robert, C., Schadendorf, D. and Garbe, C. (2017) Survival of Patients with Advanced Metastatic Melanoma: The Impact of Novel Therapies—Update 2017. *European Journal of Cancer*, **83**, 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.06.028>
- [17] Schadendorf, D., Akkooi, A.C.J., Berking, C., Griewank, K.G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A. and Ugurel, S. (2018) Melanoma. *Seminars*, **392**, 971-984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- [18] Gareau, D.S., Rosa, J.C., Yagerman, S., Carucci, J.A., Gulati, N., Hueto, F., DeFazio, J.L., Suarez-Farinas, M., Marghoob, A. and Krueger, J.G. (2017) Digital Imaging Biomarkers Feed Machine Learning for Melanoma Screening. *Experimental Dermatology*, **26**, 615-618. <https://doi.org/10.1111/exd.13250>
- [19] Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S.L., Eggermont, A.M., Flaherty, K.T., Gimotty, P.A., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm, M.C., Morton, D., Ross, M.I., Sober, A.J. and Sondak, V.K. (2009) Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 6199-6206. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4799>