

The Prevalence of Glypican3 (GPC3) Expression in Germ Cell Tumors of Testis

Farshad Naghshvar¹,
Jila Torabizade¹,
Omid Emadian Saravi¹,
Soheil Ehsan Alavi²,
Abdol-Hakim Agh-Atabay²,
Reza Ali Mohammadpour Tahamtan³

¹ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Pathology Assistant, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Health Sciences Research Center, Department of Bio Statistics, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 4, 2011 ; Accepted September 17, 2011)

Abstract

Background and purpose: Germ cell tumor is the most common malignancy of men between 15-34 years of age. Proper treatment is highly dependent on accurate histologic diagnosis, and different markers such as cytokeratin, CD3, GPC3 and etc. were proposed. It was reported that GPC3 is over expressed in testicular germ cell tumors by micro array assay. The aim of this study was to evaluate the expression of GPC3 using IHC in all testicular germ cell tumors to assess its possible application as a diagnostic marker.

Materials and methods: GPC3 was immunohistochemically assessed among 55 cases of germ cell tumors, including 23 seminoma, 10 embryonal carcinoma, 8 teratocarcinoma, 4 mixed germ cell tumor, 3 mature teratoma, 3 immature teratoma and 4 yolk sac tumors.

Results: All yolk sac tumors and yolk sac components of mixed germ cell tumors showed diffuse membranous and cytoplasmic positivity for GPC3. The positive results decreased to 33% , 25% and 20% in immature teratomas, teratocarcinomas and embryonal carcinomas, respectively. No reactivity in seminoma, mature teratoma and normal testicular tissue was seen.

Conclusion: It seems that GPC3 is a usefull marker in the histopathologic diagnosis of yolk sac tumors or yolk sac elements of mixed germ cell tumors.

Key words: GPC3, Germ cell tumors, yolk sac tumor, immunohistochemistry

فراوانی بروز مارکر گلیپیکان ۳ (GPC3) در تومورهای سلول زیای بیضه

فرشاد نقش وار^۱
ژیلا ترابی زاده^۱
امید عمادیان ساروی^۱
سهیل احسان علوی^۲
عبدالحکیم آق آتابای^۲
رضاعلی محمدپور تهمتن^۳

چکیده

سابقه و هدف: GPC3 مارکری است که در تروفوبلاست‌ها و بسیاری از بافت‌های جنینی بروز می‌یابد. از آن‌جا که تومورهای سلول زیای غیر سمنومایی، امبریونز را تکرار می‌کنند امید بر آن است که از GPC3 به عنوان مارکری جهت افتراق انواع زیرگروه‌های این تومورها استفاده شود. در این مطالعه به ارزیابی بروز آن در زیر گروه‌های گوناگون تومورهای سلول زیای بیضه به روش ایمونوهیستوشیمی پرداختیم.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۵۵ مورد از تومورهای سلول زیای بیضه، شامل ۲۳ مورد سمنوما، ۱۰ مورد امبریونال کارسینوما، ۸ مورد تراتوکارسینوما، ۴ مورد تومور سلول زیای مختلط، ۳ مورد تراتوم بالغ، ۳ مورد تراتوم نابالغ و ۴ مورد تومور کیسه زرده انجام شد و مارکر GPC3 در آن‌ها به روش ایمونوهیستوشیمی ارزیابی شد.

یافته‌ها: مارکر GPC3 به صورت منتشر در سطح غشایی و سیتوپلاسمیک تمامی تومورهای کیسه زرده و تومورهای مختلط که دارای عناصر کیسه زرده بوده‌اند، مثبت بود. بروز مارکر در تراتوم نابالغ (۳۳ درصد)، تراتوکارسینوما (۲۵ درصد) و امبریونال کارسینوما (۲۰ درصد) در برخی از نمونه‌ها مثبت بود. تومورهای سمنوما، تراتوم بالغ و بافت طبیعی بیضه برای این مارکر منفی بودند.

استنتاج: به نظر می‌رسد که GPC3 مارکر مناسبی برای شناسایی پاتولوژیک تومور کیسه زرده و یا حضور عناصر کیسه زرده در تومورهای سلول زیای مختلط باشد.

واژه‌های کلیدی: GPC3، تومور سلول زیای، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

درصد موارد مرگ ناشی از سرطان‌ها را به خود اختصاص می‌دهند (۲). بروز سالانه آن‌ها نیز در ۴۰ سال اخیر دو برابر شده است (۳). تومورهای سلول زیای، ۹۰ درصد تومورهای بیضه را تشکیل می‌دهند و خود به دو گروه

تومورهای بیضه درصد کمی از نئوپلاسم‌های بدخیم را تشکیل می‌دهند (۱)، اما در گروه سنی ۱۵ تا ۳۴ سال - یعنی زمانی که اوج بروز این نئوپلاسم‌ها می‌باشد - شایع‌ترین تومور مردان را تشکیل می‌دهند و تقریباً ۱۰

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۳۲-۸۸ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

E-mail: zhtorabi@yahoo.com

مؤلف مسئول: ژیلای ترابی زاده - ساری: مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره)

۱. گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. دستیار پاتولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱۲/۲۴ تاریخ تصویب: ۹۰/۶/۲۶

اصلی تقسیم می‌شوند: سمینوم و تومورهای سلول زایای مختلط غیر سمینومایی. کلیه تومورهای این دو گروه از اپی‌تلیوم زایای (سمینیفروس) بیضه بالغ یا در حال بلوغ منشاء می‌گیرند (۱).

شناخت زیر گروه‌های هیستولوژیک این تومورها در تعیین پیش‌آگهی، تصمیم در مورد درمان‌های مقتضی و تشخیص متاستازها و عودها بسیار مهم است (۴). به همین دلیل در حین گزارش پاتولوژی یک تومور سلول زایای مختلط، باید انواع هیستولوژیک تومورهای مشارکت کننده را تعیین نمود (۱). با این وجود، شناسایی و افتراق این اجزاء گاهی اوقات به ویژه در مورد اجزاء کیسه زرده و امبریونال مشکل است (۴). در تلاش برای حل این مشکل تا کنون مطالعات گوناگونی با استفاده از رنگ آمیزی‌های سیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی و روش‌های ژنتیک انجام شده است. اما این تلاش‌ها تا کنون به نتیجه مورد نظر نرسیده است و کماکان مواردی، هرچند اندک، وجود دارد که با وجود به کارگیری تمامی امکانات موجود نمی‌توان اجزای سازنده این تومورها را با قطعیت برشمرد.

در یکی از آخرین تلاش‌ها از یک مارکر ایمونوهیستوشیمی به نام گلیپیکان ۳ (GPC3) برای افتراق اجزاء این تومورها استفاده شده است (۳). اما تعداد اندک مطالعات موجود و نتایج نسبتاً متناقض آن‌ها تا کنون مانع کاربرد بالینی این مارکر شده است.

گلیپیکان‌ها، یک خانواده از پروتئوگلیکان‌های هپارین سولفات و جزء پروتئین‌های خارج سلولی می‌باشند که توسط یک گلیکوفسفاتی‌دیل اینوزیتول به سطح سلول متصل می‌شوند. گلیپیکان ۳، عضوی از این خانواده است که به‌نظر می‌رسد در تنظیم رشد از طریق فاکتورهای رشد مثل *wnt5a*، فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲، پروتئین مورفولوژیک استخوانی ۷ و مهارکننده رشد بافتی نقش دارد (۵،۴). GPC3 به‌طور نرمال در تروفوبلاست‌ها و یک طیف گسترده از بافت‌های جنینی و به صورت محدود در بافت‌های بالغ بروز می‌کند. این

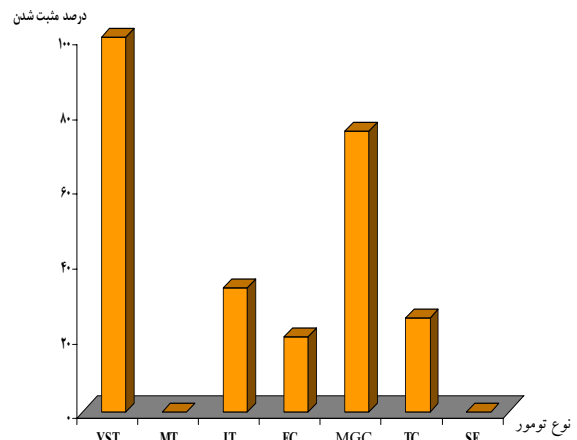
گلیکوپروتئین ممکن است به عنوان یک پروتئین انکوفتال در جاهایی که بروزش در بالغین خاموش شده است عمل کند. تومورهای مشتق شده از این بافت‌های بالغ شامل کارسینوم هیپاتوسلولار، هیپاتوبلاستوما، تومور ویلمز، نوروبلاستوما و رابدومیوسارکوما، یک افزایش سطح m-RNA گلیپیکان ۳ دارند (۴). اخیراً بروز بیش از حد گلیپیکان ۳ در تومورهای کیسه زرده بیضه توسط آنالیز میکروارای (Microarray) گزارش شده است (۶). در بررسی تومورهای تخمدان مشخص شده که GPC3 در تمام تومورهای کیسه زرده و کوریوکارسینوم‌ها مثبت می‌شود (۷).

با توجه به این که تعداد مطالعات انجام شده در این زمینه محدود بوده و نتایج آن‌ها همپوشانی کامل با یکدیگر نداشتند انجام مطالعات بیشتر جهت تایید نتایج به‌دست آمده برای بسترسازی کاربرد بالینی مارکر فوق‌الذکر ضروری به نظر می‌رسید. لذا بر آن شدیم تا بیان مارکر گلیپیکان ۳ را در تمامی تومورهای سلول زایای بیضه بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی با مراجعه به بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان‌های شهر ساری و بررسی کلیه لام‌های مربوط به تومور سلول زایای بیضه در بیمارانی که بین سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸ تحت اریکتومی قرار گرفته بودند، انجام شد. لام‌ها، بلوک‌های پارافینی و گزارش‌های پاتولوژی مورد مطالعه از بایگانی بخش پاتولوژی استخراج شدند. در نهایت ۵۵ مورد با نتیجه گزارش پاتولوژی تومور سلول زایا استخراج شد، که از این تعداد ۲۳ مورد سمینوما، ۱۰ مورد امبریونال کارسینوما، ۸ مورد تراتوکارسینوما، ۴ مورد تومور سلول زایای مختلط، ۳ مورد تراتومای بالغ، ۳ مورد تراتومای نابالغ و ۴ مورد تومور کیسه زرده بودند و هیچ موردی از کوریوکارسینوما گزارش نشده بود. در تمام موارد، زیر گروه مورفولوژیک تومور مشخص شده بود و هیچ

موردی به دلیل مشخص نبودن زیر گروه از مطالعه حذف نشد.



نمودار شماره ۱: توزیع فراوانی نسبی مثبت شدن مارکر GPC3 در انواع تومورهای سلول زایا

(EC) Embryonal carcinoma, (IT) Immature teratoma
(MT) Mature teratoma, (YST) Yolk sac tumor
(SE) Seminoma, (TC) Teratocarcinoma
(MGC) Mixed germ cell tumor

برش‌هایی به ضخامت ۴ تا ۵ میکرون از بلوک‌ها تهیه شد و پس از دپارافینه کردن با الکل مجدداً آبگیری شد. سپس در بافر سیترات ۰/۱ مولار به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. اسلایدها با آنتی‌بادی گلیپیکان ۳ مونوکلونال انسانی ساخت شرکت سیگمای آمریکا و به طریق HIER (Heat Induced Epitope Retrieval) در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس با بافر تریس شستشو داده شد و پس از تماس با کمپلکس آویدین-بیوتین به مدت ۴۵ دقیقه، رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد. ارزیابی لام‌های رنگ آمیزی شده بر اساس رنگ پذیری غشایی و

سیتوپلاسمی حداقل در ۵۰ hpf در هر اسلاید مورد آنالیز قرار گرفتند.

شدت رنگ پذیری از نظر کمی به صورت منفی (score=۰)، کمتر از ۵ درصد از سلول‌ها رنگ شدند، مثبت فوکال (score=+۱)، ۵ تا ۱۰ درصد از سلول‌ها رنگ شدند) مثبت (score=+۲)، ۱۱ تا ۵۰ درصد از سلول‌ها رنگ شدند) و مثبت منتشر (score=+۳)، بیشتر از ۵۰ درصد از سلول‌ها رنگ شدند) نمره گذاری شدند. نمره‌های بزرگتر و یا مساوی +۲ به عنوان نتایج مثبت در نظر گرفته شدند. بافت جفت به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت، که در آن سلول‌های سین سیشیو تروفوبلاست شدیداً برای GPC3 رنگ پذیر بودند.

یافته‌ها

سن بیماران در محدوده ۲ تا ۷۷ سال قرار داشت و میانگین سنی آن‌ها ۳۱/۴ سال بود. تشخیص پاتولوژی کم سن‌ترین بیمار تومور کیسه زرده و مسن‌ترین بیمار سمنیوما بود. میانگین اندازه تومورها در نمونه‌های پاتولوژی بررسی شده ۵/۳ سانتی‌متر و محدوده اندازه آن‌ها بین ۲/۵ تا ۱۰/۷ سانتی‌متر بود.

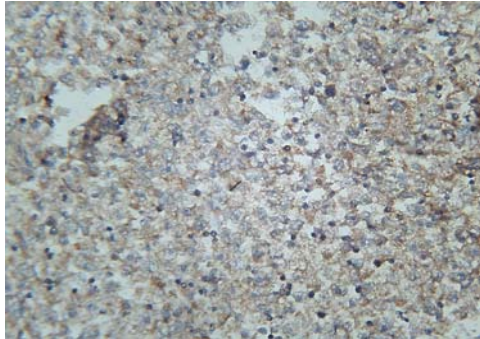
جدول و نمودار شماره ۱، توزیع فراوانی نسبی و شدت بروز مارکر GPC3 در بین انواع مختلف تومورهای بررسی شده را نشان می‌دهد.

بر اساس رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی به عمل آمده مارکر GPC3 در هر چهار مورد تومور کیسه زرده به صورت منتشر (+۳) مثبت بودند. هر چهار تومور، کیفیت رنگ‌پذیری قوی (+۳) برای GPC3 داشتند (تصویر شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۱: توزیع و شدت بروز مارکر GPC3 در تومورهای سلول زایای بیضه

نوع تومور							درصد سلول‌های رنگ‌گرفته
Seminoma	Terato carcinoma	Mixed germ cell tumor	Embryonal carcinoma	Immature teratoma	Mature teratoma	Yolk sac tumor	
۰	۰	۲۵	۰	۰	۰	۱۰۰	بیشتر از ۵۰ درصد (۳+)
۰	۰	۵۰	۰	۰	۰	۰	۱۱ تا ۵۰ درصد (۲+)
۰	۲۵	۰	۲۰	۳۳	۰	۰	۵ تا ۱۰ درصد (۱+)
۱۰۰	۷۵	۲۵	۸۰	۶۷	۱۰۰	۰	کمتر از ۵ درصد (۰)

تمامی ۲۳ مورد سمنوما برای GPC3 منفی بودند (تصویر شماره ۴).

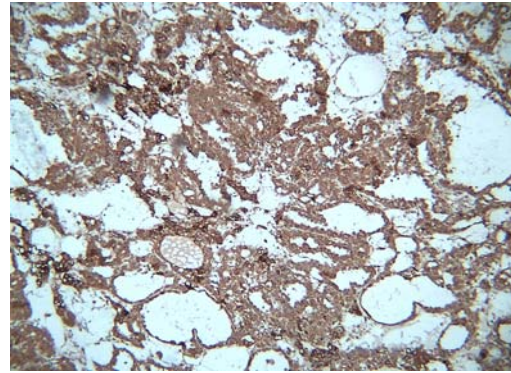


تصویر شماره ۴: سمنوما

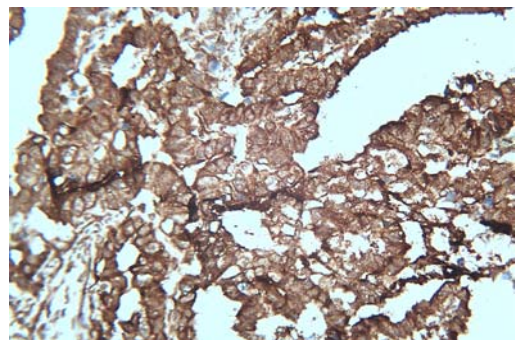
عمده موارد کارسینوم امبریونال برای GPC3 منفی بودند ولی ۲ مورد به صورت فوکال (+) برای GPC3 مثبت بودند. تمامی ۸ مورد تراتوماتوز برای GPC3 منفی بودند. در ۲ مورد مناطق مثبت به صورت فوکال (+) برای GPC3 در جزء تراتومی وجود داشت که محدود به مناطق نوروایپی تلیالی نابالغ بود.

بحث

با توجه به مطالعات بیان ژن که جهت رشد و تمایز تومورهای سلول زایای بیضه توسط Sugimura و همکاران انجام شد (۸) گلیپیکان ۳ به عنوان سومین ژنی که بروز افزایش یافته در تومورهای کیسه زرده داشته مطرح گردیده است، در حالی که در تومورهای امبریونال تا ۱۰ برابر کاهش را نشان داده است. مطالعات مختلفی انجام گرفته تا با روش‌های ساده‌تر از جمله ایمونو هیستوشیمی بتوان از این اختلاف برای افتراق تومورهای فوق‌الذکر بهره برد (۴). با این وجود نتایج متناقضی حاصل شده است. برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Debra و همکاران بر روی ۷۱ بیمار انجام شد در ۱۰۰ درصد موارد تومور کیسه زرده و کوریوکارسینوما و در ۸ درصد کارسینوم‌های امبریونال مارکر گلیپیکان ۳ مثبت بود (۴). در مطالعه‌ای که توسط Ota و همکارانش

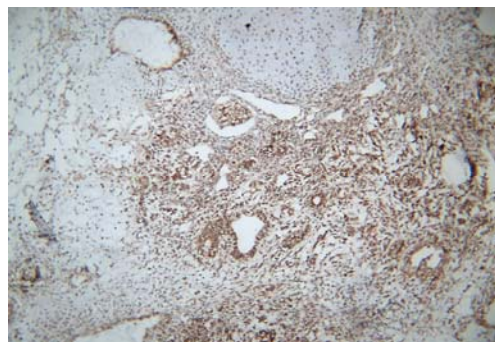


تصویر شماره ۱: تومور کیسه زرده (Low power)



تصویر شماره ۲: تومور کیسه زرده (High power)

۳ مورد از ۴ مورد تومور مختلط سلول زایا که حاوی مناطق کیسه زرده بودند برای GPC3 مثبت شدند (۲+ و ۳+) ولی مناطق امبریونال و تراتوماتوز آن‌ها از نظر شدت رنگ پذیری منفی بود. هر ۳ مورد تراتوما ی بالغ برای GPC3 منفی بودند. در حالی که از ۳ مورد تراتوما ی نابالغ ۲ مورد برای GPC3 منفی و ۱ مورد با اجزای نوروایپیتیلیالی نابالغ به صورت فوکال برای GPC3 مثبت (+) بودند (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: تراتوم نابالغ

انجام شد در تمام تومورهای کیسه زرده، مارکر فوق مثبت بود. در حالی که در تمام کارسینوم‌های امبریونال مارکر فوق منفی بود (۶). در مطالعه‌ای که توسط Zynger و همکاران انجام شد مارکر فوق در ۱۰۰ درصد موارد برای تومور کیسه زرده و کوریوکارسینوم مثبت و برای کارسینوم امبریونال منفی بود (۷). در مطالعات فوق مثبت بودن مارکر گلیپیکان ۳ برای تراتوم از ۵ درصد تا ۴۰ درصد متغیر بود. با توجه به این که تعداد مطالعات انجام شده محدود بوده و نتایج آن‌ها همپوشانی کامل با هم نداشتند، انجام مطالعات بیشتر برای تایید نتایج به دست آمده جهت بسترسازی برای کاربرد بالینی آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. جالب آن که در مورد تومورهای مختلط سلول زایا که بیشترین مشکلات تشخیصی را باعث می‌شوند تنها یک مطالعه انجام شده است (۴). نتایج مطالعه ما تاییدی بود بر این که می‌توان در تومورهای سلول زایای مختلط از گلیپیکان ۳ به عنوان مارکری برای افتراق جزء کیسه زرده‌ای از سایر اجزای تومور و به ویژه جزء امبریونال استفاده کرد. در مطالعه ما تمامی موارد تومور کیسه زرده و تومورهای مختلط دارای اجزای کیسه زرده و تنها ۲۰ درصد کارسینوم‌های امبریونال برای گلیپیکان ۳ مثبت بودند.

در موارد کارسینوم امبریونال دارای گلیپیکان ۳ نیز این مارکر به صورت خفیف و کانونی مثبت شده بود. با توجه به این که وجود جزء کیسه زرده در یک تومور مختلط باعث تغییر در پروگنوز آن خواهد شد اثبات وجود آن در بررسی، درمان و پیگیری بیماران کمک‌کننده خواهد بود. تا کنون مارکری وجود نداشته که در تمام موارد تومور کیسه زرده مثبت بوده و در عین حال در تمام موارد کارسینوم امبریونال منفی باشد. مارکری که به دفعات از آن استفاده شده آلفا فیتوپروتئین است که در ۷۴ تا ۱۰۰ درصد تومورهای کیسه زرده و

در صفر تا ۳۳ درصد کارسینوم‌های امبریونال مثبت بوده است (۴). گلیپیکان ۳ نسبت به آلفا فیتوپروتئین، گستره وسیع تری از تومورهای سلول زایا را در بر می‌گیرد. مطالعات تکمیلی برای مقایسه حساسیت و ویژگی آلفا فیتوپروتئین و گلیپیکان ۳ ضروری به نظر می‌رسد.

تومور کیسه زرده علاوه بر کارسینوم امبریونال در موارد خاصی نیز می‌تواند با سمنوم در نمای هیستوپاتولوژیک اشتباه شود. مطالعات بر روی گلیپیکان ۳ نشان داد که این مارکر به راحتی می‌تواند تومورهای کیسه زرده را از سمنوم جدا سازد. زیرا که تمام موارد سمنوم از نظر گلیپیکان ۳ منفی بود. البته کماکان برای مقایسه حساسیت و ویژگی این مارکر در افتراق این دو تومور با سایر مارکرها از قبیل کراتین، آلکالین فسفاتاز جفتی، c-Kit، OCT4 و آلفا فیتوپروتئین، مطالعات بیشتری لازم است.

در مطالعات قبلی بروز گلیپیکان ۳ با Stage نومور ارتباط نداشته است (۹) و Grading میکروسکوپی تومورهای سلول زایا حتی در موارد ابهام تشخیصی، تأثیری در انتخاب روش درمانی این تومورها ندارد. لذا از بررسی ارتباط بروز گلیپیکان ۳ با Stage و Grade نومور صرف نظر شد.

در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گلیپیکان ۳ (GPC3) یک مارکر مفید و دارای ارزش تشخیصی در شناسایی تومور کیسه زرده است و به ویژه می‌تواند نقش بسیار مهمی در تشخیص افتراقی تومور کیسه زرده از کارسینوم امبریونال ایفا کند.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دستیاری آقای دکتر سهیل احسان علوی می‌باشد.

References

- Rosai R, Ackerman A. Surgical pathology. 10th ed. New York: Mc Graw Hill, Elsevier Inc; 2011.
- Cotran RS, Robbins SL. *Robbins and Cotran*

- Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia, Pa: Saunders; 2010.
- Iczkowski KA, Butler SL. New immunohistochemical markers in testicular tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 2006; 28(4): 181-187.
 - Zynger DL, Nikolay D, Dimov ND, Laun Ch, Tean Reh B, Yang XJ. Glypican 3: A novel marker in testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2006; 30 (12): 1570-1575.
 - Ou-Yang RJ, Hui P, Yang XY, Zynger DL. Expression of glypican3 in placental site trophoblastic tumor. *Diagn Pathol* 2010; 5(64): 1746-1764.
 - Ota S, Hishinuma M, Yamauchi N, Goto A, Morikawa T, Fujimura T, et al. oncofetal protein glypican 3 in testicular germ cell tumors. *Virchows Arch* 2006; 449(3): 308-314.
 - Zynger DL, Everton MJ, Dimov ND, Chou PM, Yang XJ. Expression of glypican 3 in ovarian and extragonadal germ cell tumors. *Am J Clin Pathol* 2008; 130(2): 224-230.
 - Sugimura J, Foster RS, Cummings OW, Kort EJ, Takahashi M, Lavery TT, et al. Gene expression profiling of early and late-relapse nonseminomatous germ cell tumor and primitive neuroectodermal tumor of the testis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2368-2378.
 - Stadlmann S, Gueth U, Baumhoer D, Moch H, Terracciano L, Singe G. Glypican-3 expression in primary and recurrent ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26(3): 341-344.