



· 论 著 ·

免疫组织化学检测在胸水液基细胞学中的可行性研究

金晶晶, 殷于磊, 顾 晏, 苏敏君, 肖 立

复旦大学附属华东医院病理科, 上海 200040

[摘要] **背景与目的:** 液基细胞学 (liquid-based cell test, LCT) 是胸水脱落细胞诊断的常规技术, 鉴别诊断时需用细胞学包块行免疫组织化学检查。运用LCT直接行免疫组织化学检测, 探讨其方法的可行性及临床意义。**方法:** 回顾性分析复旦大学附属华东医院病理科2016—2017年间收集的96例胸水脱落细胞学检查标本, 运用PrepStain自动细胞学制片机薄层细胞学H-E染色片及白片若干张, 抗原修复后进行甲状腺转录因子1 (thyroid transcription factor 1, TTF1)、P63、WT1、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、CK7、CK20、CDX2、CA19-9、P53、PAX2及TG等免疫组织化学染色, 观察染色结果, 结合临床病史综合分析。**结果:** 46例胸水H-E染色片内找见癌细胞, 通过免疫组织化学染色并结合临床病史, 发现TTF1-阳性的肺腺癌19例 (占恶性组59.3%), P63阳性的鳞状细胞癌3例, ER/PR/HER2染色阳性的转移性乳腺癌3例, WT1/P53/ER/PAX2染色阳性的转移性浆液性癌2例, CDX2染色阳性的转移性结肠癌2例, TTF1/TG染色阳性的转移性甲状腺滤泡癌1例, CA19-9阳性的胰腺癌2例。经TTF1 (-)/P63 (-)/WT1 (+) 染色明确反应性间皮细胞43例。仍有7例经免疫组织化学染色无法区分反应性间皮细胞和癌细胞、14例低分化癌细胞无法判断来源, 原因是所选的特异性抗原均不表达、异型细胞量少在免疫组织化学片内消失或肿瘤细胞脱片。**结论:** 相比较细胞学包块检查过程, 薄层细胞学制片方法简单省时, 经适当抗原修复, 免疫组织化学染色结果可靠, 细胞核和细胞膜的抗原表达易于观察。免疫组织化学运用于胸水薄层细胞学制片检查可提高诊断的准确率和特异度, 为临床治疗提供可靠依据。

[关键词] 薄层细胞学; 免疫组织化学; 胸水

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.12.001

中图分类号: R730.45 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)12-0921-06

Feasibility study of immunohistochemistry for liquid-based cytology in pleural exfoliation examination JIN Jingjing, YIN Yulei, GU Yan, SU Minjun, XIAO Li (Department of Pathology, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

Correspondence to: XIAO Li E-mail: fangjx0207@foxmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Liquid-based cell test (LCT) is a routine method in pleural exfoliation examination, while cell block is required to perform immunohistochemistry for differential diagnosis. In this study, we used liquid-based cytology directly for immunohistochemical staining and discussed the feasibility of the method and its clinical significance. **Methods:** A total of 96 cases of pleural effusion were collected from 2016 to 2017 in Department of Pathology, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University to prepare a H-E cytologic staining and white slices by PREPSTAIN thin liquid-based cell test machine. Immunohistochemical staining of cytologic white slices for thyroid transcription factor 1 (TTF1), P63, WT1, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), CK7, CK20, CDX2, CA19-9, P53, PAX2 and TG was performed after antigen repairing, and staining results were interpreted and analyzed with clinical history comprehensively. **Results:** Carcinoma was found in 46 cases, including 19 cases of lung adenocarcinoma confirmed by positive TTF1 staining (accounted for 59.3% of all carcinomas), 3 cases of squamous cell carcinoma by positive P63, 3 cases of metastatic breast carcinoma by positive ER/PR/HER2, 2 cases of metastatic ovary serous carcinoma by positive WT1/P53/ER/PAX2, 2 cases of metastatic colon adenocarcinoma by positive CDX2, 1 case of metastatic thyroid follicular carcinoma by positive TTF1/TG and 2 cases of metastatic pancreatic carcinoma by positive CA19-9. Forty-three cases of reactive mesothelial cells were confirmed by TTF1(-)/P63(-)/WT1(+)

通信作者: 肖 立 E-mail: fangjx0207@foxmail.com

staining. There were still 7 cases hard to differentiate reactive from malignant cells after immunohistochemical staining, and 14 cases of poorly differentiated carcinoma in which the organ source cannot be determined due to no specific antigen expression, limited atypical cells and detachment in immunohistochemical procedure. **Conclusion:** Liquid-based cytology procedure is simpler and more time-saving than the method of cell block. The immunohistochemical result of cytology is reliable after proper antigen repairing and interpretable for the nuclear and membrane expression. Immunohistochemical staining performed using liquid-based cytology of pleural exfoliation may improve the accuracy and specificity of diagnosis and provide reliable basis for clinical treatment.

[Key words] Liquid-based cytology; Immunohistochemistry; Pleural exfoliation

胸水是肿瘤和非肿瘤疾病的常见临床表现, 其性质的判断对临床诊断治疗有重要意义。传统的细胞学方法是胸水离心后的沉淀物涂片, 近年来液基细胞学 (liquid-based cell test, LCT) 技术的应用, 提高了细胞学制片质量, 更易于光镜观察细胞形态。随着医学科学的进步, 单纯的细胞形态学诊断已无法满足临床诊断治疗的需求^[1-2], 免疫组织化学和分子检测已经成为必要的辅助手段, 离心后细胞学包块是常用方法之一, 但相对耗时、肿瘤细胞较少时容易丢失。本研究运用LCT制片技术, 直接行胸水细胞学免疫组织化学检测和观察, 鉴别反应性间皮细胞与肿瘤细胞, 并确定肿瘤细胞组织来源, 探讨其临床应用的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

回顾性分析复旦大学附属华东医院病理科2016—2017年间在胸水中找到脱落细胞的病例, 收集其中96例标本, 诊断为找到癌细胞、存在异型上皮细胞巢、可能为反应性间皮细胞。

1.2 方法

1.2.1 H-E染色片及白片的制备

使用美国BD公司的PrepStain全自动液基细胞制片机。前期标本处理方式: ①收到的胸水标本振荡均匀祛除凝块、微粒及黏液, 再将样本转移至50 mL离心管, 放入离心机并以600×g的转速离心10 min, 倒掉上清液, 保留下层的细胞沉积物。若胸水标本量多可以重复离心后并管。②在离心管中加入15 mL CytoRich红色固定液, 振荡后放置至少30 min, 放入离心机, 以600×g的转

速离心10 min, 倒掉上清液并振荡。③如果未见或仅见少量的细胞沉淀, 加入10 mL蒸馏水振荡后全部转移到12 mL离心管内; 如果见较大或很大的细胞沉淀, 将部分标本 (吸取1~5滴) 转移到12 mL离心管内, 并加入10 mL蒸馏水。将离心管放入离心机, 以600×g的转速离心5 min, 倒掉上清液并振荡。④将贴上标签的12 mL离心管放到PrepStain全自动液基细胞制片机上进行自动制片。⑤根据制片程序制成多张白片及H-E染色片一张。将制备完成的白片放入95%的乙醇中使其保持湿润状态。

1.2.2 免疫组织化学检测

将全自动液基细胞制片机上制备的白片进行免疫组织化学染色。免疫组织化学所用抗体甲状腺转录因子1 (thyroid transcription factor 1, TTF1)、P63、WT1、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、CK7、CK20、CDX2、CA19-9、P53、PAX2、TG为购自丹麦DAKO公司及福州迈新生物技术开发有限公司的即用型抗体, 采用丹麦DAKO公司的Autostainer Link48全自动免疫组织化学机进行免疫组织化学染色, 采用EnVision两步法。

2 结果

2.1 临床资料和薄层细胞学H-E染色

96例患者, 男性57例, 女性39例, 平均年龄72.9岁 (46~95岁)。39例无明显阳性病史而以胸水为首发症状, 10例有肺癌病史或影像学显示肺内占位性病灶, 3例有乳腺癌切除病史, 4例有

结肠腺癌切除病史，2例有胰腺导管腺癌病史，1例有胃腺癌病史，1例甲状腺滤泡癌复发二次手术病史，1例有卵巢浆液性癌病史，1例有前列腺癌病史，其余病例有心衰、慢性肾功能衰竭等良性病变病史。经细胞学检查明确找到癌细胞的有39例，其中倾向腺癌细胞31例，倾向鳞状细胞癌2例，低分化癌需分型6例；肿瘤性细胞与反应性间皮细胞需鉴别17例；倾向反应性间皮40例。

2.2 薄层细胞学免疫组织化学检测结果

LCT白片进行免疫组织化学染色，最终诊断癌46例，反应性间皮43例，仍不确定是反应性间皮或肿瘤细胞的有7例（表1）。在46例诊断癌细胞病例中，TTF-1阳性而明确肺腺癌的有19例（图1），占恶性病例的59.3%，其中1例同时有结肠癌病史，TTF1（+）/CDX2（-）。P63/P40阳性的鳞状细胞癌3例（图2）。CDX2染色阳性的转移性结肠癌2例（图3）。CA19-9阳性的胰腺癌2例（图4）。TTF1/TG染色阳性的转移性甲状腺滤泡癌1例（图5）。ER/PR/HER2阳性染色的转移性乳腺癌3例，其中1例患乳腺癌4年（原发），ER/PR/HER2均为（3+），胸水细胞学为ER（2+）/PR（-）/HER2（3+）；另外2例乳腺癌病史分别为5、11年，原发肿瘤免疫标志不详，胸水细胞学为ER（3+）/PR（-）/HER2（3+）及ER（+）/PR（+）/HER2（-）（图6）。WT1（+）/P53（+）/ER（+或-）/PAX2（+）染色的转移性卵巢浆液性癌2例（图7），其中1例以胸水为首发症状，经胸水诊断后发现盆腔肿块。14例腺癌或低分化癌细胞无法判断来源，原因是病史不明确、异型细胞量少且在免疫组织化学片内消失或肿瘤细胞脱片、所选的器官特异性抗原均不表达。7例经免疫组织化学染色无法区分反应性间皮细胞和癌细胞，原因是间皮和其他特异性上皮标志均不表达、细胞量有限且无法再次提取细胞，建议临床结合病史和影像学检查再次送检细胞学或取组织活检。43例明确反应性间皮细胞TTF1（-）/P63（-）/WT1（+）（图8）。

6例肺腺癌诊断后剩余胸水送检EGFR基因突变检测，其中3例存在基因突变阳性，且均为L858R突变。

表1 细胞学免疫组织化学并结合临床病史的诊断结果

Tab. 1 Diagnosis resulted from cytological immunohistochemistry and clinical history

Diagnosis	n(%)
Malignant (cancer cell found)	46(47.9)
Cancer originated certainly	32(69.6)
Lung adenocarcinoma from TTF1(+)	19(59.3)
Squamous cell carcinoma from p63(+)	3(9.4)
Colorectal adenocarcinoma from CDX2(+)	2(6.3)
Pancreatic cancer from CK7(+)/CA19-9(+)	2(6.3)
Breast cancer from ER(+)/PR(+)/HER2(+)	3(9.4)
Serous carcinoma from WT1(+)/P53(+)/ER(+ or -)/PAX2(+)	2(6.3)
Thyroid follicular carcinoma from TTF1(+)/TG(+)	1(3.1)
Cancer originated uncertainly	14(30.4)
All negative for special organ markers	10(71.4)
Atypical cells could not be obtained due to limited amount	3(21.4)
Cell sliced off and exfoliation consumed out	1(7.1)
Benign (reactive mesothelial cells)	43(44.8)
Uncertain benign or malignant (reactive mesothelial cells and metastatic cancer uncertain)	7(7.3)
Limited aimed cell could not be obtained	2(28.6)
All markers negative or nonspecial staining	4(57.1)
Cell slicing off and exfoliation consumed out	1(14.3)

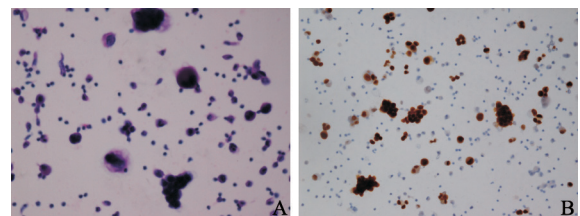


图1 肺腺癌细胞学诊断

Fig. 1 Lung adenocarcinoma detected by cytological diagnosis

A: Atypical glandular clusters (H-E staining, $\times 400$); B: TTF-1 positive in nuclei by immunohistochemistry (EnVision, $\times 200$)

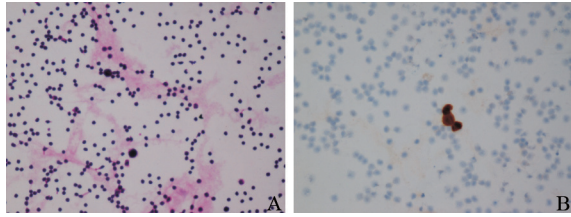


图 2 鳞状细胞癌细胞学诊断

Fig. 2 Squamous cell carcinoma detected by cytological diagnosis

A: A few atypical cells with enlarged nuclei and high ratio of nucleocytoplasm in the background of severe inflammation (H-E staining, ×400); B: P63 positive expression in nuclei by immunohistochemistry (EnVision, ×400)

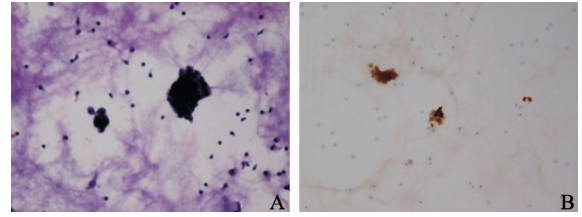


图 3 结肠腺癌细胞学诊断

Fig. 3 Colon adenocarcinoma detected by cytological diagnosis

A: Adenocarcinoma in mucinous background with inflammation (H-E staining, ×400); B: CDX2 positive expression in nuclei by immunohistochemistry (EnVision, ×200)

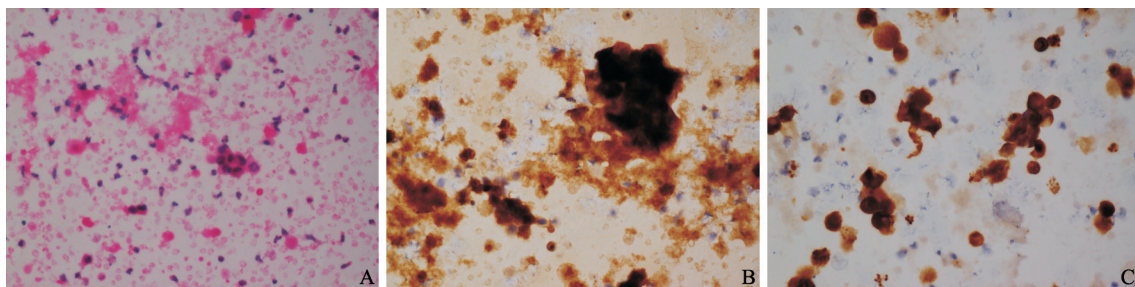


图 4 胰腺导管腺癌细胞学诊断

Fig. 4 Pancreatic ductal adenocarcinoma detected by cytological diagnosis

A: Adenocarcinoma cells in necrotic background (H-E staining, ×400); B: CA19-9 positive expression in cytoplasm and membrane by immunohistochemistry (EnVision, ×400); C: CK7 positive expression (EnVision, ×400)

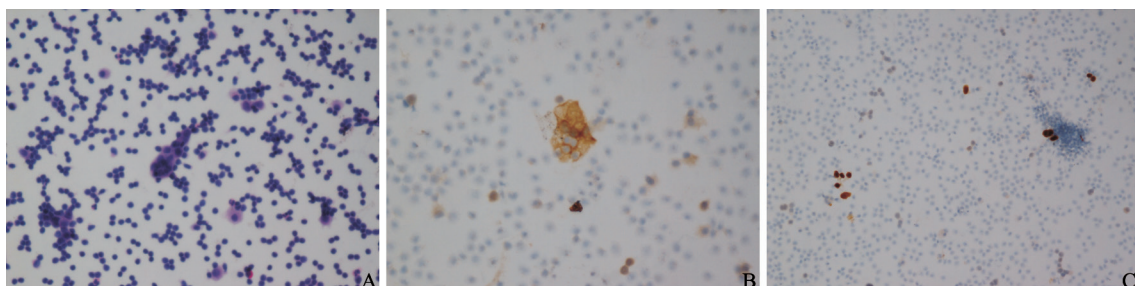


图 5 甲状腺滤泡癌 (二次手术复发后) 的细胞学诊断

Fig. 5 Thyroid follicular carcinoma (recurrence after the second surgery) detected by cytological diagnosis

A: Relatively mild and uniform adenoid cells in the background of inflammation (H-E staining, ×400); B: TG positive expression detected by immunohistochemistry (EnVision, ×400); C: TTF1 positive expression (EnVision, ×200)

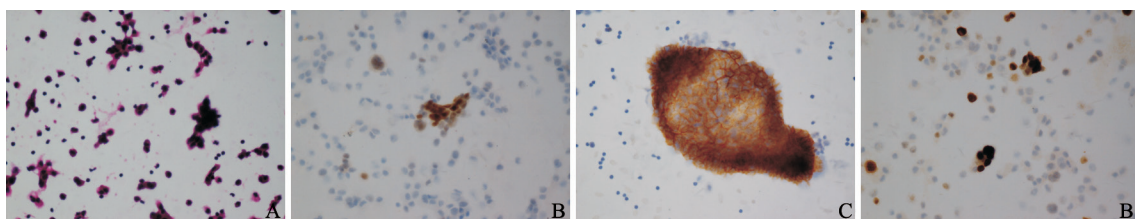


图 6 乳腺癌病史、原发肿瘤免疫标志不详的胸水细胞学检查

Fig. 6 Cytology of pleural exfoliation with a history of breast cancer, without immunostaining result in primary tumor

A: Tumor cells (H-E staining, ×400); B: ER nuclear staining 3+ by immunohistochemistry (EnVision, ×400); C: HER2 3+, showing complete membrane staining (EnVision, ×400); D: Ki-67 positive expression (EnVision, ×400)

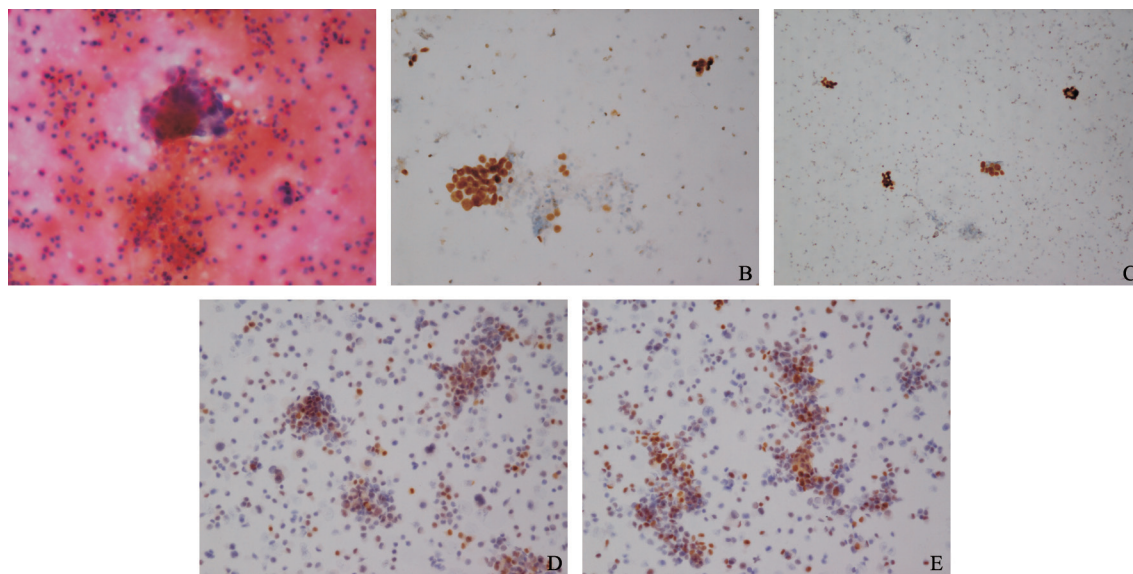


图7 浆液性癌的细胞学诊断

Fig. 7 Serous carcinoma detected by cytological diagnosis

A: Adenocarcinoma cells in the inflammatory and hemorrhagic background (H-E staining, $\times 400$); B: WT1 nuclear positive expression detected by immunohistochemistry; C: P53 nuclear positive expression (EnVision, $\times 100$); D: PAX2 positive expression (EnVision, $\times 200$); E: ER positive expression (EnVision, $\times 200$)

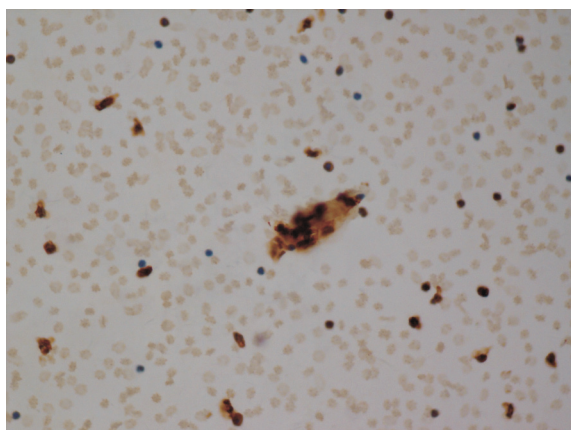


图8 反应性间皮细胞免疫组织化学WT1阳性

Fig. 8 WT1 positive expression in reactive mesothelial cells detected by immunohistochemistry (EnVision, $\times 200$)

3 讨 论

体液脱落细胞学是临床病理学检查常用的方法之一,近年来自动化的LCT制片技术的广泛应用,确保了提取足够量的细胞、背景干净、细胞分布均匀、结构清晰,提高了制片质量,尤其是在脱落的肿瘤细胞少、背景中有较多炎症细胞或黏液时,LCT的前处理可充分发挥其优势,提高肿瘤细胞的检出率和诊断分型的准确率^[3-4]。

体液脱落细胞学标本包括胸水、腹水、心包

等,其中胸水标本更常见,恶性胸水中多数是肺癌,部分是其他组织器官来源的癌,肺癌以TTF1阳性腺癌常见,本文研究中占59.3%,有限的免疫组织化学抗体可以解决大多数诊断问题。而腹水、心包积液临床症状复杂、恶性细胞往往缺乏器官特异性标志,常需要更多免疫组织化学抗体标志。LCT虽然省时、便捷,但制片数量有限、制片成本较高,更合适运用于相对简单的胸水免疫组织化学,而腹水、心包积液用包块检查相对经济,可以提供更多检查方法。

LCT制片利用自然沉降,固定液中可保存30 d,细胞形态保持良好,在标本量足够时,还可制备至少6~8张质量相同的细胞学白片,可以利用白片进一步做特殊染色或免疫组织化学检查,补充形态学观察的局限性。此外,我们还利用了多余细胞进行EGFR分子检测,得到了良好的DNA质量和检测结果,无需细胞包块过程,为患者提供了快速精准的诊断治疗依据。

相比于细胞学包块检查,直接的细胞学白片快捷、便利,避免了细胞学包块因离心不足、黏液较多或肿瘤细胞少时收集到的细胞量的不足,同时也能获得良好染色效果,但缺点是固定时间有限,不能永久保存,因此需要一次性全面足够

检测所有诊断治疗相关项目, 并无法用于回顾性科研、进一步其他类型的检测^[5]。

尽管LCT制片质量较好, 但有时增生或退变的间皮细胞不易与腺癌细胞鉴别, 易造成假阴性或假阳性诊断^[6], 同时, 胸水诊断恶性时, 如果明确恶性肿瘤的组织器官来源, 可以帮助临床医师制定进一步的治疗方案。我们尝试直接细胞学白片进行免疫组织化学检测, 帮助判断反应性间皮、肿瘤细胞及肿瘤来源。我们的研究表明, 大多数病例经免疫组织化学染色可以明确诊断, 并结合临床病史判定肿瘤来源。仍有少量病例虽经免疫组织化学染色, 因剩余细胞量少、染色结果不佳或不表达任何器官特异性标志物等原因无法明确是否是肿瘤以及肿瘤的类型和来源, 此类病例通常需要再次送检胸水标本或组织活检。

胸水中最常见的转移性肿瘤是肺腺癌, 细胞核TTF1染色可以明确诊断, 但除了肺腺癌, 甲状腺癌也表达TTF1, 因此临床病史(甲状腺乳头状癌或滤泡癌病史)、影像学检查非常重要, 结合甲状腺球蛋白TG染色可以提供帮助。部分患者同时有多种肿瘤发生, 胸水中鉴别是否是肺腺癌或其他肿瘤转移对临床治疗非常重要, TTF1染色提供了可靠的证据^[7]。

P63是鳞状细胞癌的标志物, 鳞状细胞癌常伴坏死、炎症反应, 而脱落细胞的数量较少, 散在的细胞核阳性比普通染色片更易发现肿瘤细胞, 免疫组织化学是良好的辅助手段, 当然, P63仅是鳞状细胞癌的标志物, 无法区分肺原发性或转移性肿瘤, 必须结合病史。

胸水中的乳腺癌转移除了提示临床有转移外, 还需提供ER、PR、HER2状态为进一步治疗提供帮助。我们直接将液基细胞学制片进行免疫组织化学检查, 结果良好, 其中HER2的细胞膜强染色易于判断, 可为临床靶向治疗提供依据。结直肠癌转移可用CDX2细胞核染色标志证实, 胰腺癌可用CK7、CA19-9标志证实, 而胃腺癌目前没有很好的器官特异性标志物。

WT1是我们常用的鉴别反应性间皮细胞核染色标志, 同时也是卵巢浆液性癌的标志, 因此, 常规细胞学检查是基础, 浆液性癌细胞学异型性大, 结合P53、PAX2或8、ER等标志可以区分, 当然参考临床病史和影像学检查结果可以明确诊断。另外, WT1也是恶性间皮瘤标志, 间皮瘤有时在细胞学上很难与反应性间皮相区别, 间皮瘤罕见, Desmin标志阳性有助于区分反应性间皮细胞^[8]。

综上所述, LCT直接免疫组织化学染色方法在胸水脱落细胞学诊断中可行, 虽然存在一定的局限性, 但它仍是辅助诊断肺腺癌、鳞状细胞癌、明确部分转移性癌组织器官来源的可靠方法。

[参 考 文 献]

- [1] 刘梅, 季晓丽, 吴海燕, 等. 胸腹水患者液基细胞学检查[J]. 实用临床医学, 2006, 7(2): 6-7.
- [2] 张培谊, 邹赛英, 王玉兰, 等. TCT技术在胸腹水恶性肿瘤诊断中应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2005, 20(3): 357-358.
- [3] 虞红珍, 吴强. 浆膜腔积液细胞学检查中制片技术应用的现状与进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(4): 434-436.
- [4] 宋新兰, 付娟娟. 全自动免疫组织化学染色仪在胸腹水脱落细胞诊断中的应用价值[J]. 诊断病理学杂志, 2013, 20(5): 313-314.
- [5] 隋燕霞, 柳雨, 蒋娜, 等. 142例恶性胸水细胞蜡块的免疫组织化学检测及分子病理检测[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(3): 292-295.
- [6] 邢荣格, 张晓玲, 高远, 刘春荣. 免疫组织化学联合抗体在胸水析出物诊断中的应用[J]. 河北医药, 2012, 34(5): 710-711.
- [7] GOMEZ-FERNANDEZ C, JORDA M, DELGADO P I, et al. Thyroid transcription factor 1: a marker for lung adenocarcinoma in body cavity fluids [J]. Cancer, 2002, 96(5): 289-293.
- [8] SU X Y, LI G D, LIU W P, et al. Cytological differential diagnosis among adenocarcinoma, epithelial mesothelioma, and reactive mesothelial cells in serous effusions by immunocytochemistry [J]. Diagn Cytopathol, 2011, 39(12): 900-908.

(收稿日期: 2019-07-30 修回日期: 2019-10-25)