

液基细胞学联合免疫细胞化学在痰液脱落细胞诊断非小细胞肺癌中的应用

陈江帆 李春英 孙秀娟 郑绍光

柳州市柳铁中心医院病理科, 广西 柳州 545007

[摘要] **背景与目的:** 肺癌中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)发病率最高, NSCLC痰液脱落细胞学诊断已成为肺癌早期诊断的重要辅助手段。本研究旨在探讨液基细胞学和免疫细胞化学方法在NSCLC恶性痰液脱落细胞学标本的分类与诊断中的应用价值。**方法:** 应用液基薄层细胞学自动涂片技术方法筛查到可疑肿瘤细胞及肿瘤细胞的恶性痰液标本共530例进行细胞包埋连续切片, 分别作NSCLC肿瘤细胞标志物细胞角蛋白7(cytokeratin-7, CK7)、细胞角蛋白5/6(cytokeratin-5/6, CK5/6)、甲状腺转录因子-1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)、P63、上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)免疫细胞化学染色。**结果:** 530例NSCLC恶性痰液患者确诊为肺腺癌265例, 鳞癌246例, 腺鳞癌19例。TTF-1和CK7在腺癌中有明显高表达, 阳性表达率为92.45% (245/265)和91.70% (243/265); CK5/6和P63在鳞癌中有明显高表达, 阳性表达率为97.15% (239/246)和99.59% (245/246)。**结论:** 液基细胞学与免疫细胞化学技术相结合在痰液标本诊断中有很重要的临床意义, CK7、CK5/6、TTF-1、P63、EMA联合可用于NSCLC恶性痰液分类与诊断, 值得在临床细胞病理学诊断中推广应用。

[关键词] 液基细胞学; 免疫细胞化学; 痰液; 非小细胞肺癌

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.03.005

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)03-0182-05

The non-small cell lung cancer diagnosis by thinprep cytology test and immunocytochemistry in sputum exfoliated cells CHEN Jiang-fan, LI Chun-ying, SUN Xiu-juan, ZHENG Shao-guang (Department of Pathology, Liuzhou Municipal Liutie Central Hospital, Liuzhou Guangxi 545007, China)

Correspondence to: CHEN Jiang-fan E-mail: imun.chenjiangfan@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** The non-small cell lung cancer (NSCLC) has been the highest disease incidence in lung cancer, sputum cytology diagnosis has become an important adjunct to the early diagnosis of lung cancer. The purpose of this study was to investigate the value of thinprep cytological and immunocytochemical method in differential diagnosis of exfoliated cells of malignant sputum in NSCLC. **Methods:** Sputum samples were detected with thinprep cytology test, a total of 530 cases suspicious tumor cells and malignant tumor cells sputum specimens were randomly selected in continuous paraffin-embedded sections, respectively, NSCLC tumor cell markers CK7, CK5/6, TTF-1, P63, EMA were evaluated by immunocytochemical staining. **Results:** Of the 530 cases of malignant sputum, these were confirmed 265 cases of lung adenocarcinoma, 246 cases of squamous carcinoma, 19 cases of adeno-squamous carcinoma. Moreover, TTF-1 and CK7 were significantly higher expressed in adenocarcinoma, the positive rates were 92.45% (245/265) and 91.70% (243/265); CK5/6 and P63 were significantly higher expressed in squamous carcinoma, the positive rates were 97.15% (239/246) and 99.59% (245/246). **Conclusion:** Liquid-based cytology combined with immunocytochemistry had important clinical value in classification and identification of sputum samples, the combination of CK7, CK5/6, TTF-1, P63, EMA can be used for classification and identification of malignant sputum samples between NSCLC, is worthy of promoting in clinical cytopathology diagnosis.

[Key words] Thinprep cytological; Immunocytochemistry; Sputum; Non-small cell lung cancer

痰液细胞病理学检查是临床病理学检查的主要手段之一, 也是帮助临床查找病因、了解病

情进展的重要方法。膜式超薄液基细胞学检测技术是近年应用于临床细胞病理学诊断的一项新技术, 免疫细胞化学在脱落细胞学检查中具有重

要意义,有研究表明,液基细胞学联合免疫细胞化学检查在恶性肿瘤细胞诊断中具有重要意义^[1-2]。本研究应用TCT联合免疫细胞化学方法,检测痰液标本中难以明确诊断的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),探讨NSCLC的分类与诊断。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集柳州市柳铁中心医院2012年7月—2013年7月门诊及病房患者痰液标本1 680例,嘱患者早晨咳痰之前漱口、刷牙以避免食物残渣和细菌的污染。指导患者深呼吸后用力咳痰,重复数次,咳出肺深部的痰液,尽量选择带有血丝部分或者黏液部分的痰液收集在塑料盒内送检。应用液基细胞学检测技术初检,从筛查到可疑瘤细胞及瘤细胞标本中选取530例,其中男性321例,女性209例,年龄≤50岁者192例,>50岁者338例,全部患者最后经CT、磁共振及组织病理学确诊均为NSCLC。

1.2 主要试剂

CK7、CK5/6、TTF-1、P63、EMA鼠抗人单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 液基细胞学检测技术

将痰液标本倒入液基细胞学检测专用保存杯内,每10 mL加入1 mL黏液松解剂DTT(二硫苏糖醇),混合后在震荡器上震荡15 min,如混合液中仍有凝结,可再增加DTT,直至黏液完全溶解。将溶解后的痰液倒入50 mL离心管中,2 000 r/min离心5 min后,弃上清液,加入50 mL泰普细胞清洗液继续2 000 r/min离心5 min后,吸取适量沉淀物加入泰普细胞保存瓶,静置10 min,用泰普液基细胞仪制成薄层细胞涂片,95%的酒精固定10 min,巴氏染色。

1.3.2 细胞包埋切片技术

痰液按照液基细胞学步骤加入DDT震荡离心并加入细胞清洗液再次离心后,弃上清液,加入95%乙醇固定8 h。弃上清液后加入二甲苯透明0.5~1.0 h,向透明后的细胞团块

中加入液体石蜡浸透,一般需经3次,每次0.5~1.0 h,将浸透石蜡的细胞团块放入新包埋器中并倒入熔化的新蜡,待石蜡凝固后,进行4 μm厚连续切片。

1.3.3 免疫细胞化学技术

常规石蜡包埋切片后,采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法(streptavidin-peroxidase, S-P)进行免疫细胞化学染色。切片常规烤片,脱蜡,水化,0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液高温高压抗原修复3 min;内源性过氧化物酶阻断液37℃温育30 min;非免疫性羊血清37℃温育40 min;一抗4℃温育过夜,CK7、CK5/6、TTF-1、P63、EMA稀释比例为1:100;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗37℃温育30 min;链霉素亲和素过氧化物酶溶液37℃温育30 min;新配置的DAB溶液显色;苏木素复染,中性树胶封片。各步之间用pH值为7.4左右的PBS冲洗3次,每次5 min。用PBS代替一抗作阴性对照,用已知阳性肺癌切片作阳性对照。

免疫细胞化学结果判定标准:细胞核、细胞质或细胞膜中出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞,每张切片在光镜下随机选取5个视野,每个视野计数100个肿瘤细胞。着色强度分为:无色为0分,浅黄色或黄色为1分,棕黄色为2分。阳性细胞数分为:<10%为0分,10%~50%为1分,>50%为2分,两项得分相乘结果>2为阳性(+),≤2为阴性(-)。

1.4 统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件进行数据处理,采用四格表资料 χ^2 检验(不满足条件时用Fisher确切概率法)分析各组计数资料, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 液基细胞学检测结果

镜下显示细胞散在分布或聚集成团块状排列,核异型性明显,核质细腻,N/C比例失调,核大小不等,液基细胞学检测初步诊断为可疑瘤细胞;而非可疑瘤细胞则以坏死脱落的黏膜

上皮细胞为主, 伴有或不伴有部分炎性细胞(图1A、B、C)。

2.2 免疫细胞化学染色结果

对液基细胞学检测筛查到可疑瘤细胞的痰液标本, 做石蜡细胞包埋切片, 进一步做免疫细胞化学染色(图1D、E、F、G、H)。

2.3 组织学常规染色结果

肺腺癌瘤细胞异型性明显, 镜下可见腺腔形成, 肿瘤细胞排列成管状或腺样结构(图2A)。肺鳞癌镜下可见角化珠和或细胞间桥, 肿瘤细胞核位于细胞中央, 不规则而深染, 有一个或多个小核仁, 细胞质丰富, 肿瘤细胞呈散在分布或黏附性聚集(图2B)。

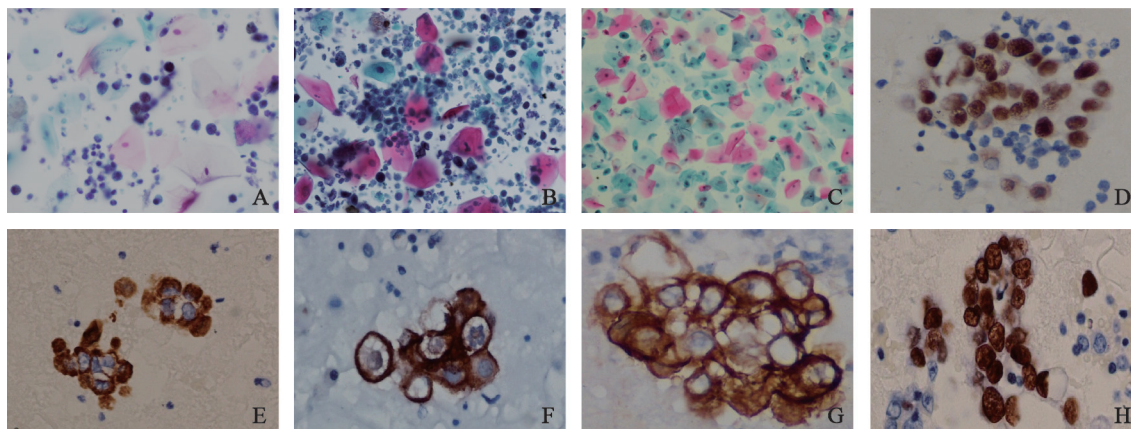


图1 痰液中NSCLC细胞液基细胞学和免疫细胞化学图片

Fig. 1 The sputum cells' images of NSCLC by thinprep cytological and immunocytochemistry

A: Adenocarcinoma cells of sputum (papanicolaou stain, $\times 200$); B: Squamous carcinoma cells of sputum (papanicolaou stain, $\times 200$); C: Exfoliated cells of benign sputum (papanicolaou stain, $\times 200$); D: TTF-1 expression in the nucleus of adenocarcinoma cells (S-P, $\times 400$); E: CK7 expression in the cytoplasm of adenocarcinoma cells (S-P, $\times 400$); F: EMA expression in the cytoplasm of adenocarcinoma cells (S-P, $\times 400$); G: CK5/6 expression in the cytoplasm of squamous carcinoma cells (S-P, $\times 400$); H: P63 expression in the nucleus of squamous carcinoma cells (S-P, $\times 400$).

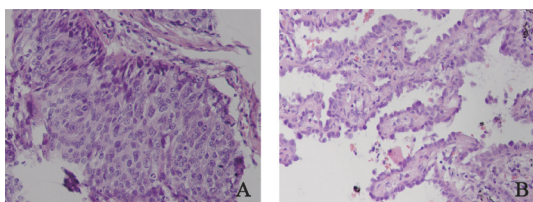


图2 NSCLC组织学图片

Fig. 2 The images of NSCLC tissue

A: Adenocarcinoma tissue of lung (HE, $\times 200$); B: Squamous carcinoma tissue of lung (HE, $\times 200$).

2.4 免疫组化结果分析

TTF-1在肺腺癌、肺鳞癌、腺鳞癌标本内的表达率分别为92.45%、4.47%、36.84%, 差

异有统计学意义($P < 0.05$); CK5/6在肺腺癌、肺鳞癌、腺鳞癌标本内的表达率分别为9.81%、97.15%、47.37%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); P63在肺腺癌、肺鳞癌、腺鳞癌标本内的表达率分别为3.77%、99.59%、57.89%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CK7在肺腺癌、肺鳞癌、腺鳞癌标本内的表达率分别为91.70%、16.67%、42.11%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); EMA在肺腺癌、肺鳞癌、腺鳞癌标本内的表达率分别为82.26%、80.49%、78.95%, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。

表1 530例NSCLC中免疫细胞化学指标的阳性表达

Tab. 1 The positive expression of immunocytochemistry in 530 cases of NSCLC

Item	Adenocarcinoma	Squamous carcinoma	Adeno-squamous carcinoma	P value
TTF-1	245(92.45)	11(4.47)	7(36.84)	< 0.05
CK5/6	26(9.81)	239(97.15)	9(47.37)	< 0.05
P63	10(3.77)	245(99.59)	11(57.89)	< 0.05
CK7	243(91.70)	41(16.67)	8(42.11)	< 0.05
EMA	218(82.26)	198(80.49)	15(78.95)	> 0.05

3 讨 论

近年来,肺癌的发病率及病死率逐年升高,每年新增17%的肺癌患者和将近25%的患者死亡^[3]。NSCLC在肺癌中占80%,患者放疗化疗的效果并不明显,5年生存率<15%^[4]。痰液脱落细胞学检查是早期诊断肺癌的重要方法之一,具有简便易行、安全无痛、无创、可重复多次检查,是防癌普查的重要手段之一。多年来应用的传统痰液制片方法存在着一些不利因素,如背景不清晰、细胞涂片厚薄不一、坏死细胞碎屑较多、加之黏液的干扰常将肿瘤细胞遮盖掩蔽等。液基细胞学检测技术是近年应用于临床细胞病理学诊断的一项新技术。液基细胞学检测应用于痰液,能够最大限度的利用标本,并通过消黏、离心将痰液中的黏液和炎性细胞等与肿瘤细胞分离,利用特有的薄层涂片技术将细胞集中到一个2 cm大小背景的范围,涂片背景干净,细胞分布均匀,结构清晰。液基细胞学检测变革了标本采集和处理方法,而且提高了制片质量,改善了观察效果;细胞图像清晰,层次分明,核膜核仁及染色质等细胞细微结构清晰,三维立体感突出,从而减少了可疑例数,明确了诊断^[5]。我们根据TCT检查结果可以初步筛选出异型增生和可疑瘤细胞痰液标本,但不能准确地对NSCLC分类以及鉴别诊断,还需进一步做免疫细胞化学染色。

本研究中530例痰液首先经液基细胞学检测筛查到可疑肿瘤细胞或肿瘤细胞,然后经石蜡包埋切片,标记NSCLC肿瘤细胞标志物抗体CK7、CK5/6、TTF-1、P63、EMA,最终CK7、TTF-1、EMA联合表达证实为肺腺癌265例,CK5/6、P63、EMA联合表达证实为肺鳞癌246例,CK7、CK5/6、TTF-1、P63、EMA联合表达证实为肺腺鳞癌19例。值得注意的是,所有NSCLC痰液标本中,未发现TTF-1和CK5/6同时阴性表达者。其中TTF-1和CK7在肺腺癌中有明显高表达阳性表达率分别为92.45%和91.70%,而在肺鳞癌中低表达或不表达,

阳性表达率分别为4.47%和16.67%;CK5/6和P63在肺鳞癌中有明显高表达阳性表达率分别为97.15%和99.59%,而在肺腺癌中低表达或不表达,阳性表达率分别为9.81%和3.77%,与最近Mukhopadhyay等^[6]研究结果趋于一致。EMA在NSCLC各类型中阳性表达率差异无统计学意义($P>0.05$)。TTF-1又称甲状腺转录因子1是一种组织特异性核转录因子,选择性的表达于II型肺泡细胞、细支气管上皮细胞、甲状腺滤泡细胞、甲状腺滤泡旁C细胞等区域。TTF-1在原发性肺癌中主要表达于肺腺癌和NSCLC中,在其他组织类型肺癌中表达较少甚至不表达^[7]。CK5/6主要表达于鳞状上皮和导管上皮的基底细胞,可用于鳞癌和腺癌的鉴别诊断^[8]。P63基因是P53基因家族的新成员,其表达直接或间接影响细胞的增殖活性^[9]。正常肺组织中,P63表达于支气管储备细胞,而不表达于纤毛细胞、肺泡上皮细胞或非上皮细胞。P63的表达可以解释上述某些细胞具有鳞状上皮化生或其来源的肿瘤具有鳞状细胞分化的特征。相反,不表达P63的肿瘤(如肾肿瘤、结肠肿瘤等)很少发生鳞状上皮化生。P63基因可能对肺鳞状细胞发生、发展起到一个特别重要的作用。研究发现,P63主要表达于肺鳞状细胞癌中,阳性表达率高于90%^[10]。CK7多在卵巢、肺、乳腺的上皮细胞质中表达,可作为肺腺癌分化的客观指标。一般非上皮来源的细胞无表达,在卵巢、乳腺和肺的腺癌呈阳性反应。CK7主要用于肿瘤的鉴别诊断,判断转移部位肿瘤细胞的来源^[11]。EMA又称上皮膜抗原是从人乳脂小体膜中分离出来的一种蛋白质,广泛存在于各种上皮细胞系结构。研究表明EMA在乳腺癌、胰腺癌、肺鳞癌、肺腺癌、恶性间皮瘤等上皮源性肿瘤中表达,是一种上皮性肿瘤的标志物^[12]。因此,联合应用CK7、CK5/6、TTF-1、P63、EMA等抗体,可用于NSCLC恶性痰液分类与诊断。

以上研究表明,在痰液中运用TCT技术联合免疫细胞化学方法检测有助于NSCLC的分类与

鉴别诊断, 值得在临床细胞病理学诊断中推广应用。

[参 考 文 献]

- [1] 陈江帆, 杜明伟, 姜海娇, 等. 免疫细胞化学方法对胸腔积液中性肿瘤细胞的分类与诊断 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2013, 22(1): 49-53.
- [2] 陈江帆, 姜海娇, 祝迪, 等. MOC-31和CD44v6在良恶性腹水鉴别诊断中的应用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2013, 22(5): 411-415.
- [3] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [4] ERRIDGE S C, MØLLER H, PRICE A, et al. International comparisons of survival from lung cancer: pitfalls and warnings [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2007, 4(10): 570-577.
- [5] HEES K, LEBEAU P B. Comparison of conventional and ThinPrep preparations of mucoid cytology samples [J]. Diagn Cytopathol, 1995, 12(2): 181-185.
- [6] MUKHOPADHYAY S, KATZENSTEIN A L. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6 [J]. Am J Surg Pathol, 2011, 5(1): 15-25.
- [7] NG W K, CHOW J C, NG P K. Thyroid transcription factor-1 is highly sensitive and specific in differentiating metastatic pulmonary from extrapulmonary adenocarcinoma in effusion fluid cytology specimens [J]. Cancer, 2002, 96(1): 43-48.
- [8] KHAYYATA S, YUN S, PASHA T, et al. Value of p63 and CK5/6 in distinguishing squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung fine-needle aspiration specimens [J]. Dign Cytopathol, 2009, 37(3): 178-183.
- [9] BOKHOVEN H, BRUNNER H G. Splitting p63 [J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(1):1-13.
- [10] WU M, WANG B, GIL J, et al. P63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung [J]. Am J Clin Pathol, 2003, 119(5): 696-702.
- [11] KENNEDY M T, JORDAN R C, BEREAN K W, et al. Expression pattern of CK7, CK20, CDX-2, and villin in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma [J]. J Clin Pathol, 2004, 57(9): 932-937.
- [12] TUTTLE S E, LUCAS J G, BUCCI D M, et al. Distinguishing malignant mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma: an immuno-histochemical approach using a panel of monoclonal antibodies [J]. J Surg Oncol, 1990, 45(2): 72-78.

(收稿日期: 2014-01-14 修回日期: 2014-02-24)

《肿瘤影像学》杂志2014年征订启事

《肿瘤影像学》杂志自1992年创刊以来深受医学界赞颂, 1998年经国家科委、中央新闻出版总署批准为国内外公开发行正式期刊, 刊号: ISSN 1008-617X, CN31-1793/R。杂志由优质铜版纸印制, 大16开, 80页, 暂定为季刊。被中国学术期刊综合评价数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库等收录。主要报道医学影像领域中科研成果、临床应用、综述、病例报告、讲座及与理工结合的有关论文等。

《肿瘤影像学》坚持学术性与科学性, 信息量大具有临床实用价值。是医院图书馆、影像科室及高等院校的学术刊物, 是临床医学影像医务人员晋升中、高级职称的重要论文发表园地。欢迎各医学院校、医学图书馆、影像科室及个人向当地邮局订阅。

本刊季末出版, 邮发代号4-653, 暂定价每期10元, 每年共40元整。

单位全称: 《肿瘤影像学》杂志编辑部

通讯地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院

邮编: 200032

电话: (021)54244927 (021)64043766

传真: (021)54244927

E-mail: imaging109@163.com