



DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.007

http://www.gjbl.net/gjblx/fileup/PDF/201306486.pdf

胸腔镜胸膜活组织检查联合免疫组织化学诊断恶性胸腔间皮瘤

刘汉忠, 肖静, 涂珍, 肖兰, 杨继洲, 王岚

(孝感市中心医院病理科, 湖北 孝感 432000)

[摘要] 目的: 探讨胸腔镜胸膜活组织检查联合免疫组织化学(组化)在恶性胸腔间皮瘤临床诊断中的应用价值。方法: 通过视频胸腔镜检查(video-assisted thoracoscopic surgery, VATS)进行胸膜取材活检确诊恶性胸腔间皮瘤79例为观察组, 胸膜活检确诊163例肺腺癌作为对照组, 采用常规HE染色联合应用免疫组织化学SP法检测钙结合蛋白(calretinin), 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA), CD15, 细胞角蛋白(cytokeratin, CK5/6), E-钙黏着蛋白(E-cadherin)、上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA), 间皮细胞蛋白(mesothelial cell, MC)、鼠源的单克隆抗体31(mouse monoclonal antibody31, Moc-31)、甲状腺转录因子1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)、血栓调节蛋白(thrombomodulin)、波形蛋白(vimentin)、肾母细胞瘤1蛋白(Wilms' tumor 1, WT-1)的表达并进行统计学分析。结果: 观察组79例恶性胸膜间皮瘤中, 上皮型48例、双相型22例、肉瘤样型9例。恶性胸膜间皮瘤和肺腺癌的免疫表型分析, 间皮细胞相关抗体calretinin, WT-1, CK5/6和MC的表达在观察组和对照组间差异有统计学意义($P<0.01$); CEA, CD15, E-cadherin, MOC-31, TTF-1, vimentin及thrombomodulin的表达在两组间差异也有统计学意义($P<0.01$); 而EMA的表达在两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。对免疫组织化学染色结果采用logistic回归分析, 结果显示进入回归方程的自变量是E-cadherin和TTF-1($P<0.01$)。结论: VATS胸膜活组织检查联合免疫组化检查, 能提高恶性胸腔间皮瘤诊断的准确性, E-cadherin和TTF-1阴性是发生恶性胸腔间皮瘤的危险因素, 阳性时多发肺腺癌。

[关键词] 胸腔镜; 恶性胸腔间皮瘤; 活组织检查; 免疫组织化学

Thoracoscopic pleural biopsy combined with immunohistochemistry for diagnosis of malignant pleural mesothelioma

LIU Hanzhong, XIAO Jing, TU Zhen, XIAO Lan, YANG Jizhou, WANG Lan

(Department of Pathology, Central Hospital of Xiaogan, Xiaogan Hubei 432000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of thoracoscopic pleural biopsy combined with immunohistochemistry in diagnosis of malignant pleural mesothelioma. **Methods:** Altogether 79 patients with malignant

收稿日期 (Date of reception): 2013-06-09

作者简介 (Biography): 刘汉忠, 硕士, 副主任医师, 主要从事病理诊断与教学工作。

通信作者 (Corresponding author): 王岚, Email: 1564281750@qq.com

mesothelioma (diagnosed by biopsy via video-assisted thoracoscopic surgery) and 63 patients with pulmonary adenocarcinoma were allocated to the research group and the control group, respectively. The HE staining and immunohistochemical SP assay was conducted to detect the expression of calretinin, carcinoembryonic antigen (CEA), CD15, cytokeratin (CK)5/6, E-cadherin, epithelial membrane antigen (EMA), mesothelial cell (MC), mouse monoclonal antibody 31(MOC-31), thyroid transcription factor-1(TTF-1), thrombomodulin, vimentin and Wilms' tumor 1(WT-1). Logistic regression analysis was applied to analyze the results of two groups. **Results:** In the research group, there were 48 patients with epithelial type, 22 with bipolar type, and 9 with sarcomatoid type among 79 patients. The immunohistochemistry revealed that there were significant differences between the research and the control groups in the expression of mesothelial cell-associated antibodies (calretinin, WT-1, CK5/6 and MC)($P<0.01$) and other proteins (CEA, CD15, E-cadherin, MOC-31, TTF-1, and vimentin)($P<0.01$), whereas there was no significant difference in EMA expression between the two groups. The logistic regression analysis demonstrated that the two independent variables in the regression equation were E-cadherin and TTF-1 ($P<0.01$). **Conclusion:** Thoracoscopic pleural biopsy combined with immunohistochemistry can improve the accuracy of diagnosis for malignant pleural mesothelioma. Low expressions of E-cadherin and TTF-1 are the risk factors for malignant pleural mesothelioma while high expression of the two proteins means at high risk for lung adenocarcinoma.

Key words thoracoscopy; malignant pleural mesothelioma; biopsy; immunohistochemistry

恶性胸腔间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)是胸膜较常见的恶性肿瘤。其临床无特异性症状和体征,故对于MPM的诊断比较困难,常通过视频胸腔镜检查(video-assisted thoracoscopic surgery, VATS)进行胸膜取材活组织检查(活检)而得以诊断。本病需与许多疾病相鉴别,包括各种转移癌、肉瘤以及其他胸膜原发肿瘤,而免疫组织化学检查是MPM鉴别诊断中最常用的辅助诊断方法^[1]。为了提高MPM的诊断准确性,作者采用VATS胸膜活检联合免疫组织化学(免疫组化)检查取得了较好的诊断效果,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本收集及临床资料

观察组标本79份收集自2007年1月至2012年12月行VATS胸膜活检确诊为MPM资料完整的病例,其中男性43例,女性36例,年龄46~74(平均57.8)岁。对照组标本163份收集自同期VATS胸膜活检确诊的肺腺癌患者,其中男性92例,女性71例,年龄34~78(平均60.5)岁,均来自孝感市中心医院住院患者。

1.2 方法

标本均用10%中性甲醛固定,常规自动组织脱水机脱水处理、石蜡包埋切片,切片

厚度为4 μm ,行HE染色,常规诊断。免疫组织化学染色方法均采用SP法,用已知阳性标本作为阳性对照,PBS代替一抗为空白对照。SP试剂盒及钙结合蛋白(calretinin)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、CD15、细胞角蛋白(cytokeratin, CK)5/6、E-钙黏着蛋白、上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)、间皮细胞蛋白(mesothelial cell, MC)、鼠源的单克隆抗体31(mouse monoclonal antibody31, Moc-31)、甲状腺转录因子1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)、血栓调节蛋白(thrombomodulin)、波形蛋白(vimentin)、肾母细胞瘤1蛋白(Wilms' tumor 1, WT-1)等抗体均购自福州迈新生物技术有限公司。均采用0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)高压锅热修复方法进行抗原修复,过氧化氢(H_2O_2)封闭后滴加一抗,于4℃过夜,滴加二抗于37℃孵育30 min,最后以DAB显色、苏木精复染、封片。

1.3 结果判断

WT-1和TTF-1以肿瘤细胞核着色为阳性;Calretinin以肿瘤细胞胞质和(或)核着色为阳性;EMA, MC, thrombomodulin以肿瘤细胞胞膜和胞质着色为阳性;CEA, CD15, CK5/6, E-cadherin, MOC-31及vimentin等以肿瘤细胞胞质着色为阳性;肿瘤细胞阳性率 $<10\%$ 为阴性(-), $\geq 10\%$ 为阳性(+).

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计分析。MPM和肺腺癌的免疫组织化学染色结果采用 χ^2 检验; 同时进行logistic回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学类型

观察组79例MPM中, 上皮型共48例(60.76%)、双相型22例(27.85%)、肉瘤样型9例(11.39%)。对照组肺腺癌163例中, 高分化腺癌40例(24.39%)、中分化腺癌36例(21.95%)、低分化腺癌87例(53.66%)。

2.2 免疫组织化学染色结果

观察组79例MPM中, 表达阳性率较高的有calretinin(74/79)、CK5/6(62/79)、EMA(69/79)、MC(67/79)、thrombomodulin(73/79)、WT-1(61/79); 对照组163例肺腺癌中, 表达阳性率较高的有CEA(153/163)、CD15(161/163)、E-Cadherin(159/163)、EMA(141/163)、MOC-31(147/163)、TTF-1(160/163)。免疫组化间皮细胞相关抗体calretinin, WT-1, CK5/6及MC的表达在观察组和对照组间差异有统计学意义($P < 0.01$); CEA, CD15, E-Cadherin, MOC-31, TTF-1, thrombomodulin及vimentin的表达在两组间差异亦有统计学意义($P < 0.01$); 而EMA的表达在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$; 表1)。

表1 MPM(观察组)和肺腺癌(对照组)的免疫组织化学染色结果分析

Table 1 Immune phenotype analysis between MPM and pulmonary adenocarcinoma

组别	Calretinin	CEA	CD15	CK5/6	E-Cadherin	EMA	MC	MOC-31	TTF-1	Vimentin	Thrombomodulin	WT-1
观察组												
+	74	4	4	62	0	69	67	1	0	53	73	61
-	5	75	75	17	79	10	12	78	79	26	6	18
阳性率/%	93.67	5.06	5.06	78.48	0	87.34	84.81	1.27	0	67.09	92.41	77.21
对照组												
+	13	153	161	4	159	141	4	147	160	0	43	1
-	150	10	2	159	4	22	159	16	3	163	120	162
阳性率/%	7.98	93.87	98.77	2.45	97.55	86.50	2.45	90.18	98.16	0	26.38	0.61
χ^2	169.70	278.68	308.48	61.05	224.68	0.03	174.09	173.10	228.86	30.32	92.94	163.85
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 Logistic回归分析结果

Logistic回归分析结果显示, 进入回归方程的自变量是E-Cadherin和TTF-1, 两指标在两组中差异有统计学意义($\chi^2 = 305.711$, $P < 0.001$), 故logistic回归方程据有统计学意义。Logistic回归方程为 $\text{logit } P = 19.720 - 36.411 (\text{E-cadherin}) - 36.411 (\text{TTF-1})$ 。对于对照组腺癌而言, E-cadherin和TTF-1阴性是发生MPM的危险因素, 阳性时多发肺腺癌。

3 讨论

MPM患者多为60岁以上男性, 临床无特异性症状和体征, 主要以胸痛和气短为最常见的起始症状, 胸腔积液是其最常见的体征, 常伴有消瘦、不适、虚弱等全身病症。胸部X线及CT示胸膜不规则增厚, 胸腔积液、胸水常为血性。VATS见胸膜壁层(也可脏层)多发性小结节, 进而融合

致胸膜增厚, 质硬或胶冻样, 将肺包裹、压缩。MPM基本组织学类型分3型; 即上皮型、肉瘤样型、混合型(双向型)。本观察组79例MPM中, 上皮型最多, 共48例(60.76%)、双相型次之, 22例(27.85%)、肉瘤样型较少, 9例(11.39%); 本组同一肿瘤内3种类型混合区域多见, 以上皮样为主, 也有非常少见类型。上皮型主要表现为圆形或者多角形肿瘤细胞增生伴丰富的嗜酸性浆和温和的细胞核, 常缺乏核分裂, 呈管状乳头状型, 内衬立方细胞的脉管状结构和含纤维血管轴心的乳头状结构特征(与转移腺癌难以区分)。肉瘤样型主要表现为成束梭形细胞增生伴卵圆形细胞核, 少量双染性胞浆, 偶尔有突出核仁, 可表现纤维肉瘤样外观。

目前MPM诊断技术多采用细胞学或穿刺活检。因组织少, 或破碎不整, 难以观察到更多图像, 使之不易诊断; 虽然部分病例有足够典型的特点, 用常规的组织学方法可得到确诊; 但大部

分病例组织学诊断不肯定, 另外组织形态表现复杂多变, 细胞形态多样, 不易识别, 特别是和转移性肺腺癌的鉴别是个难点。为解决这些问题, 需要采取多种辅助手段, 如电子显微镜(电镜)、组织化学、免疫组化对于MPM的诊断与鉴别诊断起着重要的作用。免疫组织化学检查是MPM鉴别诊断中最常用的辅助诊断方法^[1]。Calretinin是间皮细胞标记较好的指标, 染色常表现为核浆弥漫阳性, 核染色较强是辨认间皮细胞的有用指标; 但是通常不能区分反应性和MPM, 诊断恶性必须核阳性, 浸润是诊断MPM的最好指标^[2]。上皮型MPM, 根据临床巨检、镜检、免疫组化和电镜特点进行鉴别。免疫组化方面主要包括腺癌特异性标志TTF-1、普通标志CEA, CD15或MOC31, 间皮瘤标志calretinin和CK5/6^[3]。在临床实践中, 包括calretinin, CK5/6(或WT-1), CEA和MOC-31在内的4种标志物可以正确诊断几乎所有病例^[4]。有学者^[5]认为组织切片结合免疫组化是鉴别腺癌细胞与增生间皮细胞的有效方法, CEA, CK7和CR抗体组合具有较高的临床应用价值。也有研究^[6-7]表明: 在上皮型MPM和转移性腺癌的鉴别诊断中, CK5/6, CK8/18, CEA, vimentin, MC和calretinin是目前最有效的抗体组合, 可以大大提高诊断的准确性, 而且方法简便易行, 值得推广。本研究采用一组抗体包括calretinin, CEA, CD15, CK5/6, E-cadherin, EMA, MC, MOC-31, TTF-1, thrombomodulin, vimentin, WT-1, 在与肺腺癌对照研究中发现: 间皮细胞相关抗体calretinin, WT-1, CK5/6及MC的表达在观察组和对照组间差异明显; CEA, CD15, E-cadherin, MOC-31, TTF-1, vimentin以及thrombomodulin的表达在两组间差异也明显; 而EMA的表达在两组间差异不明显。本研究显示在MPM的诊断中有意义的阳性反应抗体有: calretinin, CK5/6, MC, vimentin及WT-1, 阴性反应抗体有: CEA, E-cadherin, Moc-31及TTF-1, 通过这一组抗体联合应用可以大大提高MPM诊断的准确性。同时经logistic回归分析发现E-cadherin和TTF-1阴性是发生恶性间皮瘤的危险因素, 阳性时多发肺腺癌。此两项在上皮型恶性间皮瘤和转移性腺癌中更具有鉴别诊断的意义与价值。

免疫组化抗体的选择是建立在对细胞形态详尽观察的基础上, 免疫细胞化学染色是对细胞形态诊断进一步的印证和补充, 只有多种方法的有机结合才能有效提高诊断率^[7]。因此MPM的诊断

常需胸腔镜胸膜活检联合免疫组化检查, 不同肿瘤选择相对应的抗体, 建议选用下列一组抗体: calretinin, CEA, CD15, CK5/6, E-cadherin, EMA, MC, Moc-31, TTF-1, thrombomodulin, vimentin及WT-1。通过一组抗体的协同作用(敏感性和特异性相结合), 提高阳性检出率; 另外不同抗体阳性和阴性结果的综合分析不仅可以避免假阳性的出现, 也可以提高阳性检出率。因此VATS胸膜活检联合免疫组化检查在确诊MPM上具有重要作用, 值得临床推广。

参考文献

1. 杨虹, 刘丽男. 弥漫性恶性胸膜间皮瘤28例临床病理分析[J]. 实用肿瘤学杂志, 2006, 20(6): 536-537.
YANG Hong, LIU Linan. Clinicopathological analysis of 28 cases of diffuse malignant pleural mesothelioma[J]. Journal of Practical Oncology, 2006, 20(6): 536-537.
2. 加图索, 雷迪, 大卫, 等. 外科病理鉴别诊断学[M]. 2版, 回允中译. 北京: 北京大学医学出版社, 2012: 308-309.
Gattuso P, Reddy VB, David O, et al. Differential diagnosis of surgical pathology[M]. 2nd ed. Translated by HUI Yunzhong. Beijing: Peking University Medical Press, 2012: 308-309.
3. 吴秉铨, 刘彦仿. 免疫组织化学病理诊断[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2007: 222.
WU Bingquan, LIU Yanfang. Chemical pathology immunohistochemistry[M]. Beijing: Beijing Science and Technology Press, 2007: 222.
4. 罗塞. ROSAI & ACKERMAN外科病理学[M]. 9版, 回允中译. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 363.
Juan Rosai. ROSAI & ACKERMAN surgical pathology[M]. 9th Ed. Translated by HUI Yunzhong, Beijing: Peking University Medical Press, 2006: 363.
5. 斯向东, 李庆. 细胞块切片免疫组化在恶性浆膜腔积液诊断中的应用体会[J]. 中国现代医生, 2011, 49(28): 114-116.
SI Xiangdong, LI Qing. Application of cell block slice and immunohistochemistry in malignant serous cavity effusion[J]. China Modern Doctor, 2011, 49(28): 114-116.
6. 邢荣格, 郭效忠, 张欣, 等. 免疫组化联合抗体在胸腹膜转移性腺癌与上皮型恶性间皮瘤鉴别中的应用[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(23): 3991-3992.
XING Rongge, GUO Xiaozhong, ZHANG Xin, et al. Combined immunohistochemistry and antibody in metastatic adenocarcinoma with abdominal membrane and epithelial malignant mesothelioma[J].

- The Journal of Practical Medicine, 2009, 25(23): 3991-3992.
7. 张继贤, 赵莺, 卢韶华. D2-40联合Calretinin在恶性胸膜间皮瘤诊断及鉴别诊断中的价值[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(8): 632-633.
ZHANG Jixian, ZHAO Ying, LU Shaohua. The value of D2-40 and calretinin in diagnosis and differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma[J]. Journal of Chinese Oncology, 2012, 18(8): 632-633.
8. 李俊君, 撤俊, 朱江宁, 等. MC、Vimentin及CEA在浆膜腔积液中恶性间皮瘤与转移癌的表达及其意义[J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(11): 1034-1036.

LI Junjun, HAN Jun, ZHU Jiangning, et al. Expression and significance of MC, Vimentin and CEA in malignant mesothelioma and metastatic carcinoma in serous effusion[J]. Ningxia Medical Journal, 2011, 33(11): 1034-1036.

(本文编辑 陈丽文)

本文引用: 刘汉忠, 肖静, 涂珍, 肖兰, 杨继洲, 王岚. 胸腔镜胸膜活组织检查联合免疫组织化学诊断恶性胸腔间皮瘤 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33(6): 486-490. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.007

Cite this article as: LIU Hanzhong, XIAO Jing, TU Zhen, XIAO Lan, YANG Jizhou, WANG Lan. Thoracoscopic pleural biopsy combined with immunohistochemistry for diagnosis of malignant pleural mesothelioma[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2013, 33(6): 486-490. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.007