

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.009

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.009

液基细胞学联合免疫细胞化学对疑难肺腺癌转移 胸腔积液的诊断价值

薛秋婷¹, 顾兵², 朱立强²

(1. 无锡解放军第101医院检验科, 江苏 无锡 214000, 2. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏 徐州 221000)

[摘要] 目的: 探讨利用BD TriPath液基细胞学联合免疫细胞化学对疑难肺腺癌转移胸腔积液的诊断价值。方法: 对临床初次送检的31例胸腔积液标本, 采用BD TriPath液基细胞制片染色仪, 每例制片5张, 1张巴氏染色用于细胞学诊断, 其余4张行免疫细胞化学染色分别检测癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、甲状腺转录因子1(thyroid transcription factor 1, TTF-1)、间皮细胞抗原(mesothelial cell, MC)、钙结合蛋白(calretinin, CR)的表达。结果: 呼吸科门诊或住院患者送检的31例胸腔积液, 经证实肺腺癌转移的胸腔积液24例, 7例未见恶性肿瘤细胞。31例胸腔积液经免疫细胞化学染色显示, CEA、TTF-1鉴别腺癌细胞的灵敏度分别为79.2%, 66.7%, 特异度为96.8%, 100%; MC, CR鉴别间皮细胞的灵敏度分别为93.5%, 100%, 特异度为95.8%, 83.3%。两组抗体在腺癌细胞及间皮细胞者的表达差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。单独BD TriPath液基细胞学可明确诊断肺腺癌转移15例、未见恶性肿瘤细胞6例, 10例未能明确诊断。如果结合免疫细胞化学可明确诊断肺腺癌转移21例、未见恶性肿瘤细胞6例, 仅4例不能明确诊断, 两者相结合使阳性检出率显著提高($P < 0.05$)。结论: 基于BD TriPath液基细胞薄片上的免疫细胞化学有助于提高对胸腔积液中转移性肺腺癌细胞的诊断。CEA, TTF-1, MC, CR联合应用可有效辅助细胞学鉴别肺腺癌细胞及间皮细胞, 值得推广应用。

[关键词] 液基细胞学; 胸腔积液; 免疫细胞化学; 腺癌; 肺癌; 鉴别诊断

Application of BD TriPath liquid-based cytologic test and immunocytochemistry in diagnosis of lung adenocarcinoma in pleural effusion

XUE Qiuting¹, GU Bing², ZHU Liqiang²

(1. Department of Clinical Laboratory, PLA 101 Hospital, Wuxi Jiangsu 214000; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the application value of BD TriPath liquid-based cytologic test (LCT) combined with immunocytochemistry (ICC) technology in diagnosis and differential diagnosis of lung adenocarcinoma in complicated pleural effusion. **Methods:** Totally 31 first-time examinational pleural effusion were detected by LCT.

收稿日期 (Date of reception): 2016-09-18

通信作者 (Corresponding author): 朱立强, Email: xzqlq1678@163.com

Furthermore, ICC was performed with carcinoembryonic antigen (CEA), thyroid transcription factor 1 (TTF-1), mesothelial cell (MC) and calretinin (CR) in all of the specimens. **Results:** Among 31 cases of pleural effusion to be tested, 24 cases of pleural effusion were from lung adenocarcinoma transfer and 7 cases without malignant cell. In diagnose of metastatic lung adenocarcinoma, the sensitivity of CEA and TTF-1 was 79.2%, 66.7% and the specificity was 96.8%, 100% respectively. The sensitivity of MC and CR for mesothelial cell was 93.5%, 100% and the specificity was 95.8%, 83.3% respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). If diagnosed by LCT alone, 15 cases of lung adenocarcinoma and 6 reactive effusions were conformed, 10 cases were indeterminate. However, if LCT combined with ICC, 21 cases of lung adenocarcinoma and 6 reactive effusion could be clearly diagnosed, only 4 cases were indeterminate, the positive detection rate increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Positive detection rate can be significantly increased by BD TriPath LCT combined with ICC in complicated pleural effusion diagnosis. A combination of CEA, TTF-1, MC and CR should be popularized in differentiate between lung adenocarcinoma cell and atypical mesothelial cell. Therefore, immunocytochemistry should be widely used in cytological diagnosis.

Keywords liquid-based cytologic test (LCT); pleural effusion; immunocytochemistry; adenocarcinoma; lung cancer; differential diagnosis

胸腔积液细胞学是确诊恶性胸腔积液的常用方法,但其敏感性仅为40%~70%^[1]。影响细胞学诊断的主要原因是积液中非典型间皮细胞与腺癌细胞在形态上存在交叉,难于做出准确的鉴别诊断。近年来,免疫细胞化学染色(immunocytochemistry, ICC)已广泛的应用于细胞学诊断,对鉴别疑难病例诊断起到重要的辅助作用。制备细胞蜡块,切片后再行免疫细胞化学是常规利用的方法之一,但其操作程序繁杂,报告时间长,影响其推广应用。而本研究在BD TriPath液基细胞制片技术(liquid-based cytologic test, LCT)的基础上采用免疫细胞化学对胸腔积液中的肺腺癌细胞进行癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、甲状腺转录因子1(thyroid transcription factor 1, TTF-1)、间皮细胞抗原(mesothelial cell, MC)、钙结合蛋白(calretinin, CR)抗体的标记,有助于提高其阳性检出率。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取31例徐州医科大学附属医院2013年3月至2013年6月门诊或住院患者初次送检的胸腔积液,其中男性17例,女性14例,年龄25~83(65±6)岁。通过徐州医科大学附属医院伦理委员会审批,并均取得患者知情同意。积液阳性判定标准:1)病理组织学证实;2)其他部位发现同一病理类型的恶性肿瘤;3)临床证实(化疗、放疗治疗有效);4)结

合专家会诊结论。阴性结果标准:1)病理组织学证实;2)临床治疗有效(抗结核、抗感染等),病灶消失或缩小;3)CT或平片随访病灶稳定达6个月以上;4)结合专家会诊结论。

1.2 仪器与方法

1.2.1 BD TriPath 制片方法

采用美国SurePath™PrepStain全自动液基薄层细胞制片染片机(BD TriPath, Burlington NC, USA)及相关耗材,严格按照操作规程进行制片。制备液基薄片5张,其中1张巴氏染色用于细胞学诊断,其余4张供免疫细胞化学使用。

1.2.3 免疫细胞化学

将在剩余4张液基涂片采用S-P法行免疫细胞化学染色。所用抗体及配套试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。PBS液冲洗后,3%过氧化氢孵育10~15 min,血清封闭,倾去血清,加一抗,37℃孵育1 h或4℃孵育过夜。PBS洗3次,5 min/次,加生物素标记第二抗体,37℃孵育10~15 min。PBS洗3次,5 min/次,加辣根酶标记链霉卵白素工作液37℃孵育10~15 min, PBS洗3次,5 min/次, DAB显色。

1.3 免疫细胞化学结果评估

CEA、CR阳性定位于细胞质, TTF-1定位于细胞核, MC定位于细胞膜。定位明确且出现清晰棕黄色或棕褐色颗粒,为阳性,肿瘤细胞未着色为(-),肿瘤细胞数<5%为(±),5%~10%为(+),10%~50%为(++),>50%为(+++)。用已知阳性胸、

腹水作阳性对照, 用PBS代替一抗作阴性对照, 或利用内参对照。

1.4 统计学处理

应用SPSS11.5统计软件进行数据分析, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胸腔积液最终诊断结果

根据良恶性判断标准, 31例胸腔积液中24例为肺腺癌转移性积液, 7例未查见恶性肿瘤细胞。

2.2 BD TriPath 制片镜下特点

BD TriPath制片镜下可见细胞形态保存完好, 清楚易辨别; 细胞分布均匀, 背景清晰。转移性腺癌细胞常呈三维立体团状排列、共用胞浆, 细胞核增大, 核仁可见, 胞质内可见黏液样空泡(19/24), 但部分病例可以散在分布为主(5/24)。

反应性增生的间皮细胞轮廓较圆整, 多以单个散在分布为主, 亦可小成团分布(10/31), 细胞间可见“开窗”现象; 核略增大, 可出现双核或多核, 可见核仁, 但三维立体结构不明显。

2.3 免疫细胞化学结果

在BD TriPath LCT制片的基础上采用免疫细胞化学对胸腔积液中的肺腺癌细胞进行CEA、TTF-1、MC、CR抗体的标记, 整个过程仅需2~3 h, 较细胞蜡块3 d左右的时间有巨大的优势。

分别以CEA、TTF-1作为腺癌细胞标志物, 以MC、CR作为间皮细胞标志物。31例最终确诊胸腔积液对4种标志物的表达(图1)。CEA、TTF-1、MC、CR在腺癌细胞及增生性间皮细胞中的表达差异有统计学意义(表1)。CEA、TTF-1诊断腺癌细胞的灵敏度分别为79.2%、66.7%, 特异度为96.8%、100%; MC、CR对间皮细胞的灵敏度分别为93.5%、100%, 特异度为95.8%、83.3%(表2)。

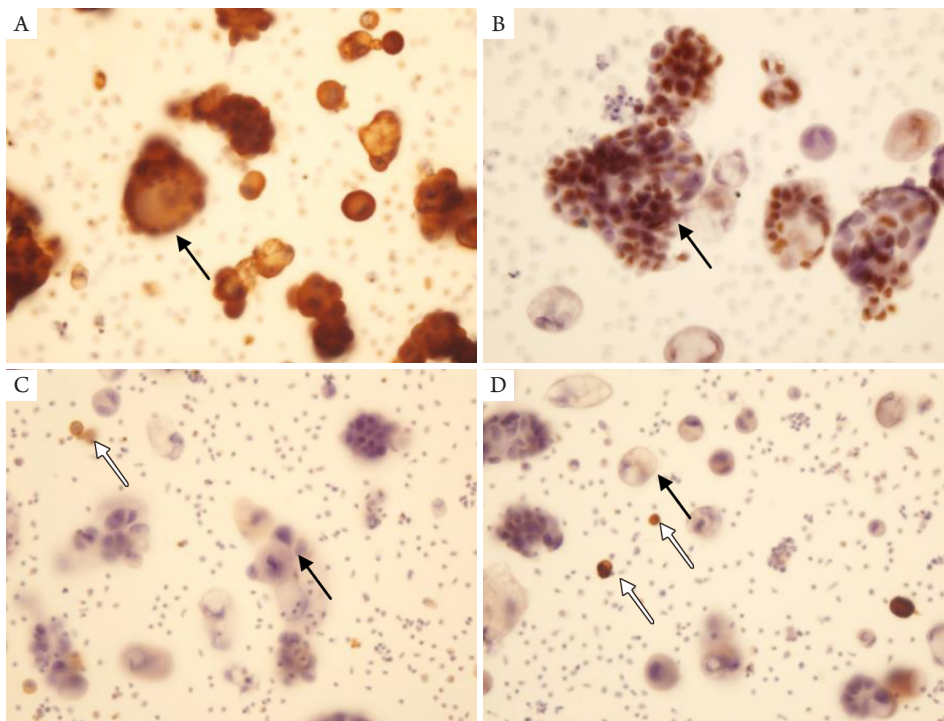


图1 CEA、TTF-1、MC、CR在胸腔积液中肺腺癌细胞及间皮细胞的表达(SP法, DAB显色, $\times 400$)

Figure 1 Expressions of the CEA, TTF-1, MC and CR in lung adenocarcinoma and atypical mesothelial cells in pleural effusion (SP stain, DAB, $\times 400$)

(A) CEA在肺腺癌细胞中呈阳性表达; (B) TTF-1在肺腺癌细胞中呈阳性表达; (C) MC在肺腺癌细胞中呈阴性表达, 而在间皮细胞中呈阳性表达; (D) CR在肺腺癌细胞中呈阴性表达, 而在间皮细胞中呈阳性表达。

(A) Positive expression of CEA in lung adenocarcinoma cells; (B) positive expression of TTF-1 in lung adenocarcinoma cells; (C) negative expression of MC in lung adenocarcinoma cells, but positive expression in mesothelial cells; (D) negative expression of CR in lung adenocarcinoma cells, but positive expression in mesothelial cells (↓, lung adenocarcinoma cells; ↑, mesothelial cells)

表1 CEA、TTF-1、MC、CR在腺癌细胞及增生性间皮细胞中的表达

Table 1 Expressions of the CEA, TTF-1, MC and CR in lung adenocarcinoma and atypical mesothelial cells

类别	n	CEA		TTF-1		MC		CR	
		+	-	+	-	+	-	+	-
转移性腺癌细胞	24	19	5	16	8	1	23	4	20
增生性间皮细胞	31 ^{**}	1	30	0	31	29	2	31	0
χ^2		33.71		29.14		43.59		40.60	
P		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01	

^{**}31例间皮细胞包括7例阴性积液及24例恶性积液中的间皮细胞。

^{**}Skin cells between 31 cases including 7 cases of negative fluid and 24 cases of malignant effusion.

表2 CEA、TTF-1、MC、CR在鉴别诊断腺癌细胞及反应性间皮细胞中的灵敏度及特异度

Table 2 Sensitivity and specificity in differential diagnosis between lung adenocarcinoma and atypical mesothelial cells

指标	真阳性	假阳性	真阴性	假阴性	灵敏度/%	特异度/%
CEA	19	1	30	5	79.2	96.8
TTF-1	16	0	31	8	66.7	100.0
MC	29	1	23	2	93.5	95.8
CR	31	4	20	0	100.0	83.3

2.4 LCT 结合 ICC 诊断结果

单独BD TriPath液基细胞学可明确诊断肺腺癌转移15例、未见恶性肿瘤细胞6例, 10例未能明确诊断。阳性检出率为62.5%。如果结合免疫细胞化学可明确诊断肺腺癌转移21例、未见恶性肿瘤细胞6例, 仅4例不能明确诊断, 与单独使用细胞学比较, 阳性检出率提高至为87.5%, 差异有统计学意义($P=0.046$)。

3 讨论

临床上, 胸腔积液是肺部多种疾病的常见并发症, 脱落细胞学是鉴别积液良恶性的重要方法之一, 其检查结果常常是决定临床采取下一步诊疗措施的重要依据。以往脱落细胞学主要依靠离心后手工制片, 但由于不能将标本中血液、黏液多等物质清除等原因而影响结果的判读。BD TriPath制片配有专用的固定液及清洗液, 可去除血液、粘液等成分, 且细胞固定及时、形态保存完好, 背景清晰, 使得阳性检出率显著提升^[2]。本组31例胸腔积液利用全自动液基薄层细胞制片染

片机制片, 镜下细胞分布均匀、结构清晰, 大部分腺癌细胞特征明显, 诊断明确, 但仍有10例未能做出明确诊断, 主要由于非典型增生间皮细胞与腺癌细胞鉴别困难。其原因可能是转移至胸腔的腺癌细胞在积液中无组织、器官束缚, 且可在积液中增生、繁殖, 失去了原来形态特征, 常常出现反应性间皮细胞的特点, 如细胞散在分布、细胞间出现“开窗”现象; 而间皮细胞受到炎症、化疗及肿瘤的刺激, 可呈现体积增大, 异型, 也可成团或呈假腺腔样排列^[3-5], 与腺癌细胞结构上存在一定的交叉, 判别困难。如何将二者进行区分, 成为临床工作必须解决的问题。随着免疫学方法的不断完善, 免疫细胞化学逐渐成为辅助细胞学鉴别诊断积液性质的主要方法。

对于免疫细胞化学染色, 国外及国内部分学者多采用细胞蜡块制片进行。但其操作程序繁杂, 报告时间长, 影响其推广应用。笔者主张在LCT薄片上进行, 该方法采用新鲜标本制片, 避免了制蜡块过程中人为损伤造成的抗原大量丢失, 保证了标本中可提供足够的抗原量。且不需做高压或微波等特殊处理仍能得到满意的效果, 也可

避免不必要的脱片。同时涂片背景清晰、透明、血细胞少,很少产生非特异性着色;细胞相对集中,节省抗体;涂片薄,结果容易识别,假阳性率低,并可使用多种抗体标记^[6]。

由于间皮细胞具有双向分化的特性,造成间皮源性抗体和上皮源性抗体在免疫表达上有交叉重合,使用单一的抗体,往往无法保证诊断的准确性,通常需要采用一组敏感性和特异性相对较高的单克隆抗体进行鉴别诊断。CEA广泛存在于各种上皮性肿瘤,尤其各种腺癌细胞中,是上皮源性肿瘤的重要标志物。且细胞的分化程度愈低则CEA的含量愈高,而体腔间皮细胞不含CEA,大部分呈阴性表达。但值得注意的是,极少数反应性间皮细胞也可出现阳性^[7]。本组24例胸腔积液转移性腺癌中19例阳性,灵敏度为79.2%,特异度为96.8%。TTF-1是一种组织特异性核转录因子,特异的表达于肺癌和甲状腺癌。甲状腺癌伴发胸腔积液者甚少,因此TTF-1是目前被发现检测肺癌性胸腔积液较为理想的一种肿瘤标志物。由于胸腔积液中转移性腺癌多来自于肺腺癌,理论上讲,胸腔积液中肺腺癌转移的细胞表达TTF-1,而间皮细胞一般不表达,因此检测TTF-1表达与否有助于确定胸腔积液内细胞的性质及来源,所以本研究加上了TTF-1来进行鉴别诊断。本研究结果显示,TTF-1对腺癌的灵敏度为66.7%,低于文献^[8]报道,这与抗体克隆号的选择、病例的选择等有一定关系。间皮细胞标记物(MC、CR)主要分布于间皮细胞中,胸腔积液内的非间皮细胞不表达,因此对胸腔积液内间皮细胞与腺癌细胞的鉴别起到重要的作用。陈江帆等^[9]研究显示,MC、CR作为间皮细胞特异性标记物抗体在恶性间皮瘤中的阳性率为100%和95.0%,而在非小细胞肺癌中阳性率仅为1.93%和2.72%。本实验中MC、CR在间皮细胞表达灵敏度分别为93.5%和100%,腺癌中仅有1例MC表达阳性,特异度为95.8%;4例CR表达阳性,特异度为83.3%。因此MC和CR可以用于胸腔积液中中间皮细胞与非间皮细胞的鉴别诊断。

本研究与多数研究^[7-9]显示免疫细胞化学可辅助细胞学诊断。但仍有少数病例无法明确诊断,可能由于少数恶性积液病例经过放化疗后,对细胞形态、数量及免疫细胞化学结果产生影响,本组病例中有3例因为放化疗原因导致诊断不明确。少数肺癌患者积液中虽未有肿瘤细胞侵入,但其血液及胸

腔积液中CEA等明显增高,可导致积液中的间皮细胞出现较强的非特异性染色,造成假阳性表现。

总之,基于BD TriPath液基细胞薄片上的免疫细胞化学染色,背景清晰且用时短,结果准确可靠,有助于提高对胸腔积液中转移性肺腺癌细胞的诊断。CEA、TTF-1、MC、CR抗体的联合应用在疑难胸腔积液鉴别诊断中起了关键作用,值得临床推广应用。

参考文献

1. Topolcan O, Holubec L, Polivkova V, et al. Tumor markers in pleural effusions[J]. *Anticancer Research*, 2007, 27(4A): 1921-1924.
2. 卢珊珊,曹箭,潘秦镜,等.痰液基薄层技术在肺癌诊断中的价值及影响因素分析[J]. *中国医刊*, 2010, 45(1): 44-46.
LU Shanshan, CAO Jian, PAN Qinjing, et al. Value of thinPrep sputum cytology in the diagnosis of lung cancers and its Influencing Factors[J]. *Chinese Journal of Medicine*, 2010, 45(1): 44-46.
3. 何远春,李俊,陈振东. 1466例浆膜腔积液细胞学分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(7): 1222-1224.
HE Yuanchun, LI Jun, CHEN Zhendong. Cytological analysis of 1466 patients with serous cavity effusion[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2008, 16(7): 1222-1224.
4. Lee JH, Chang JH. Diagnostic utility of serum and pleural fluid carcinoembryonic antigen, neuron-specific enolase, and cytokeratin 19 fragments in patients with effusions from primary lung cancer[J]. *Chest*, 2005, 128(4): 2298-303.
5. Afify AM, Stern R, Michael CW. Differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions: The role of hyaluronic acid and CD44 localization[J]. *Diagnostic Cytopathology*, 2005, 32(3): 145-150.
6. Hoda RS. Non-gynecologic cytology on liquid-based preparations: a morphologic review of facts and artifacts[J]. *Diagn Cytopathol*, 2007, 35(10): 621-634.
7. 樊丽华,李立新,魏玉婵. 免疫细胞化学与浆膜腔积液细胞学诊断[J]. *现代检验医学杂志*, 2006, 21(3): 58-59.
FAN Lihua, LI Lixin, WEI Yuchan. The value of immunocytochemistry in the cytological diagnosis of serous effusion[J]. *Laboratory Medicine*, 2007, 21(3): 58-59.
8. 岑玉兰. 甲状腺转录因子和间皮细胞在肺癌胸腔积液诊断及鉴别诊断中的应用[J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(14): 1690-1691.
CEN Yulan. Diagnosis and differential diagnosis value of TTF-1 and Mesothelial Cell in the pleural effusion of lung cancer[J]. *Laboratory*

Medicine and Clinic, 2011, 8(14): 1690-1691.

9. 陈江帆, 杜明伟, 姜海娇, 等. 免疫细胞化学方法对胸腔积液中恶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.

CHEN Jiangfan, DU Mingwei, JIANG Haijiao, et al. Classification and identification of malignant tumor cells by IHC in pleural effusion diagnosis[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2013, 22(1): 49-53.

本文引用: 薛秋婷, 顾兵, 朱立强. 液基细胞学联合免疫细胞化学对疑难肺腺癌转移胸腔积液的诊断价值[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(12): 1938-1943. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.009

Cite this article as: XUE Qiuting, GU Bing, ZHU Liqiang. Application of BD TriPath liquid-based cytologic test and immunocytochemistry in diagnosis of lung adenocarcinoma in pleural effusion[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(12): 1938-1943. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.009