

• 论 著 •

免疫组织化学联合抗体在浆膜腔积液中的诊断作用*

顾婷婷,王 倩,徐 松[△]

(江苏大学附属昆山医院/昆山市第一人民医院病理科,江苏 昆山 215300)

[摘 要] 目的 探讨免疫组织化学联合抗体在浆膜腔积液中鉴别增生性间皮细胞和转移性腺癌细胞的应用价值。方法 选取 2017—2020 年该院病理科收集的有增生性间皮细胞及腺癌细胞的浆膜腔积液标本 208 例,采用细胞石蜡技术并进一步运用免疫组织化学标记方法检测特异性抗体 CEA、MOC-31、Ber-Ep4、CK5/6、WT1、Calretinin 的表达水平。选取的恶性浆膜腔积液病例均经常规细胞学检出恶性肿瘤细胞,且细胞学诊断均与临床诊断或原发灶组织病理学诊断相符。其中转移性腺癌 135 例,反应性增生间皮细胞 71 例,间皮瘤 2 例。结果 间皮细胞与腺癌细胞本身有质的区别,但在细胞学诊断中增生性间皮细胞与腺癌细胞单从形态上常难以分辨。增生性间皮细胞 CEA、MOC-31、Ber-Ep4、CK5/6、Calretinin、WT1 的表达水平与腺癌细胞比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 应用细胞石蜡技术结合免疫组织化学联合抗体检测对鉴别浆膜腔积液中增生性间皮细胞与转移性腺癌细胞有极大帮助,在细胞病理学诊断中具有极高的应用价值。

[关键词] 免疫组织化学; 抗体; 浆膜腔积液; 病理诊断

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.15.004 中图法分类号:R542.1+2;R442.5

文章编号:1009-5519(2023)15-2544-05 文献标识码:A

Diagnostic role of immunocytochemistry combined with antibody in serous cavity effusion*

GU Tingting, WANG Qian, XU Song[△]

(Department of Pathology, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University/The First People's Hospital of Kunshan, Kunshan, Jiangsu 215300, China)

[Abstract] Objective To investigate the application value of immunocytochemistry combined with antibody on the differential diagnosis between proliferative mesothelial cells and metastatic adenocarcinoma cells in serous cavity. Methods A total of 208 serosal cavity effusion specimens with proliferative mesothelial and adenocarcinoma cells were collected from the pathology department of this hospital from 2017 to 2020. The expression of specific antibodies CEA, MOC-31, Ber-Ep4, CK5/6, WT1 and Calretinin were detected by cell paraffin technology and immunocytochemical labeling. Malignant tumor cells were detected by routine cytology in all cases of malignant serosal effusion, and the cytological diagnosis was consistent with clinical diagnosis or primary histopathological diagnosis. There were 135 cases of metastatic adenocarcinoma, 71 cases of reactive hyperplasia mesothelioma and two cases of mesothelioma. Results There are qualitative differences between mesothelial cells and adenocarcinoma cells, but it is often difficult to distinguish proliferative mesothelial cells from adenocarcinoma cells in cytological diagnosis. The expressions of CEA, MOC-31, Ber-Ep4, CK5/6, Calretinin and WT1 in proliferative mesothelial cells were compared with those of adenocarcinoma cells, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Conclusion The use of cell paraffin technology combined with immunocytochemistry and antibody detection is of great help in differentiating proliferative mesothelial cells from metastatic adenocarcinoma cells in serosal effusion, and has high application value in cytopathological diagnosis.

[Key words] Immunocytochemistry; Antibodies; Dropsy of serous cavity; Pathologic diagnosis

晚期恶性肿瘤首发症状常表现为浆膜腔积液,而增生性间皮与腺癌细胞往往难以鉴别,容易造成漏常规细胞学涂片阳性检出率较低^[1]。浆膜腔积液中诊,甚至误诊。提高浆膜腔积液细胞检出率,以及鉴

* 基金项目:江苏省昆山市重点研发计划(社会发展)项目(KSF202133)。
作者简介:顾婷婷(1989—),硕士研究生,主治医师,主要从事肿瘤病理学诊断研究。 △ 通信作者,E-mail:xs19780116@163.com。

别细胞良、恶性与患者的临床分型、后续治疗及预后密切相关^[2]。近年来,随着新技术的应用和细胞学制片技术的加强,细胞块联合免疫标记、分子检测等均大大提高了阳性检出率^[3-4]。本研究对可疑异型腺上皮的 208 例浆膜腔液体进行细胞石蜡包埋切片,并运用一组联合抗体进行免疫组织化学(IHC)染色,探讨了免疫细胞化学联合标记鉴别浆膜腔积液中腺癌细胞与增生性间皮细胞的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017—2020 年本院病理科收集的有增生性间皮及腺癌细胞的浆膜腔积液标本 208 例,其中男 111 例,女 97 例;年龄 19~96 岁;胸腔积液 161 例,腹腔积液 45 例,心包积液 2 例。选取的恶性浆膜腔积液病例均经常规细胞学检出恶性肿瘤细胞,且细胞学诊断均与临床诊断或原发灶组织病理学诊断相符,其中转移性腺癌 135 例,反应性增生间皮细胞 71 例,间皮瘤 2 例。

1.2 方法

1.2.1 细胞石蜡切片制备 将存档的浆膜腔积液倒入 50 mL 离心管中,2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 95%乙醇,2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,取沉渣放入包埋盒中,10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋,切片 4 μm,烘箱 65 ℃烤片 60 min 备用。

1.2.2 苏木精-伊红(HE)及 IHC 染色 常规切片脱蜡,进行 HE 染色,中性树胶封片。特异性抗体 CEA、MOC-31、Ber-Ep4、CK5/6、WT1、Calretinin 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,使用全自动 IHC 染色机染色,严格按试剂盒说明书步骤操作。

1.2.3 结果判定 免疫标记结果均由 2 名中级专业技术职务的病理医师独立阅片。CK5/6 定位于细胞质,CEA、Ber-Ep4 定位于细胞膜和细胞质,MOC-31、Calretinin 定位于细胞核和细胞质,WT1 定位于细胞核、核周及细胞质。着色定位明确,呈棕黄色颗粒为阳性细胞。有异型细胞、无着色或着色小于 5%者为阴性,着色 5%~25%者为弱阳性,着色大于 25%~50%者为阳性,着色大于 50%者为强阳性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率或构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。间皮瘤数量较少,故与增生性间皮细胞合并进行统计。灵敏度=真阳性病例数/(真阳性病例数+假阴性病例数)×100%。特异度=真阴性病例数/(真阴性病例数+假阳性病例数)×100%。

2 结 果

2.1 HE 染色特点 208 例恶性浆膜腔积液镜下观察为腺癌细胞 102 例,细胞有明显异型性,呈圆形或椭圆形,核质比较高,核偏位,核仁大而清晰,染色质

呈粗颗粒状。癌细胞平铺或呈小乳头状、梁状等立体结构。增生性间皮细胞 46 例,常聚集成团,细胞核较正常间皮细胞稍增大、深染,核浆比略增大。细胞形态多样,呈圆形、类圆形等,细胞之间常见“开窗”现象。难以诊断 60 例,需鉴别为间皮细胞反应性增生、间皮瘤或腺癌细胞。

2.2 腺癌与增生性间皮细胞免疫标记情况 细胞石蜡行连续切片且免疫标记的染色背景清晰、蛋白阳性定位准确,易于判断。CEA、Ber-Ep4 定位于细胞膜和细胞质,在腺癌细胞中的阳性率分别为 81.5%(110/135)、80.0%(108/135);MOC-31 定位于细胞核和细胞质,在腺癌细胞中的阳性率为 95.6%(129/135)。而在增生性间皮细胞中 CEA、Ber-Ep4、MOC-31 阳性率分别仅为 5.5%(4/73)、12.3%(9/73)、5.5%(4/73)。CEA、Ber-Ep4、MOC-31 在腺癌细胞和增生性间皮细胞中的表达比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。CK5/6 定位于细胞质,在增生性间皮细胞中的阳性率为 79.5%(58/73);WT1 定位于细胞核,在增生性间皮细胞中的阳性率为 75.3%(55/73);Calretinin 定位于细胞核和细胞质,标记间皮细胞时伴有较强的胞膜着色,在增生性间皮细胞中的阳性率为 90.4%(66/73)。而在腺癌细胞中 CK5/6、WT1、Calretinin 阳性率分别仅为 20.5%(15/73)、24.7%(18/73)、9.6%(7/73)。CK5/6、WT1、Calretinin 在增生性间皮细胞和腺癌细胞中的表达比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1,图 1、2。

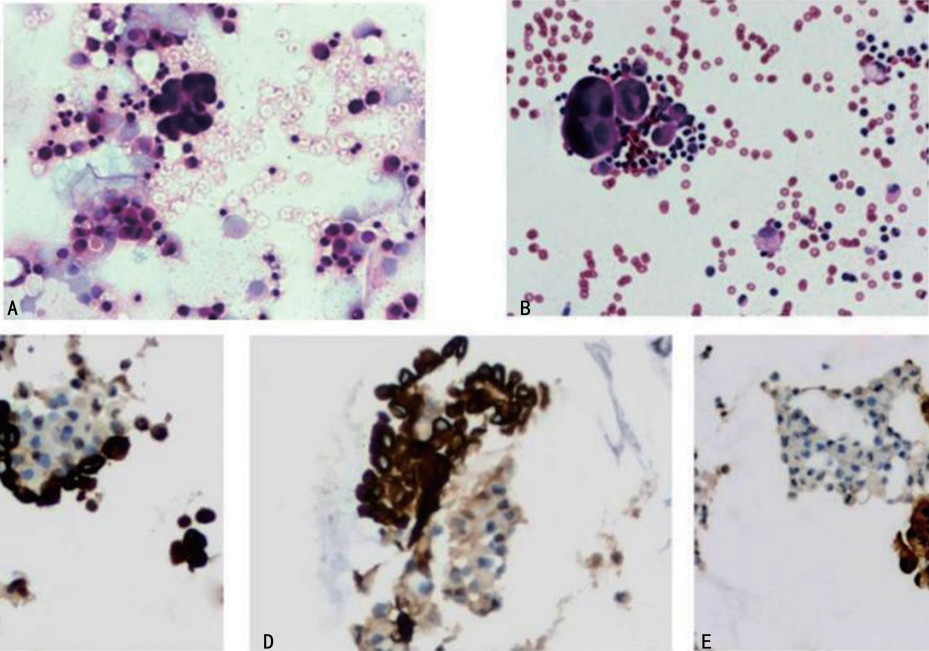
表 1 6 种免疫标记在转移性腺癌细胞与增生性间皮细胞中的表达比较[n(%)]

项目	转移性腺癌细胞 (n=135)	增生性间皮细胞 (n=73)	χ^2	P
Calretinin			109.11	0.001
阳性	21(15.6)	66(90.4)		
阴性	114(84.4)	7(9.6)		
WT1			111.46	0.001
阳性	7(5.2)	55(75.3)		
阴性	128(94.8)	18(24.7)		
CK5/6			77.63	0.001
阳性	23(17.0)	58(79.5)		
阴性	112(83.0)	15(20.5)		
Ber-Ep4			88.17	0.001
阳性	108(80.0)	9(12.3)		
阴性	27(20.0)	64(87.7)		
MOC-31			166.74	0.001
阳性	129(95.6)	4(5.5)		
阴性	6(4.4)	69(94.5)		

续表 1 6 种免疫标记在转移性腺癌细胞与增生性间皮细胞中的表达比较[n(%)]

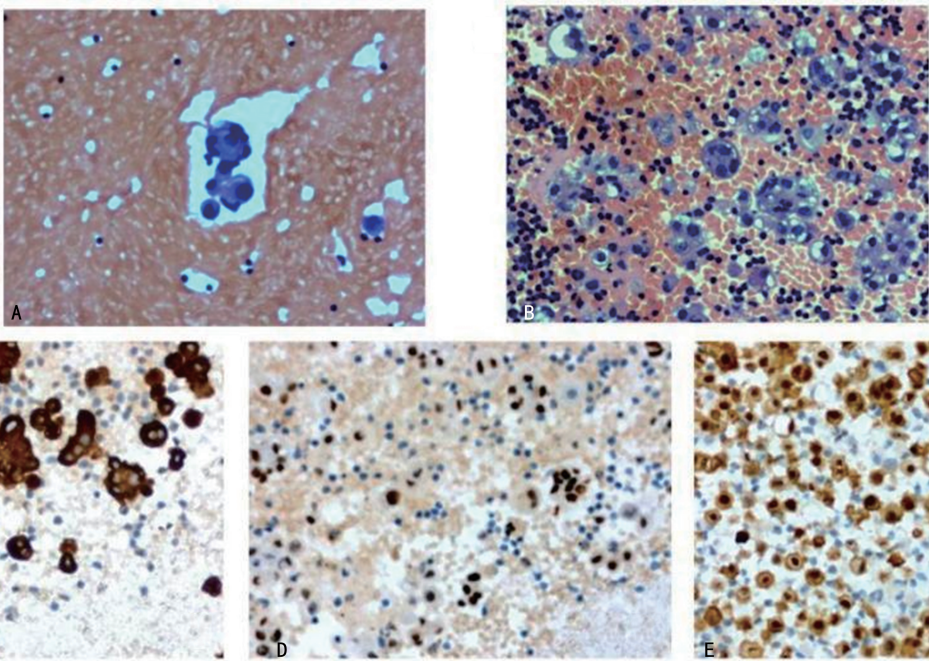
项目	转移性腺癌细胞 (n=135)	增生性间皮细胞 (n=73)	χ^2	P
CEA			110.49	0.001
阳性	110(81.5)	4(5.5)		
阴性	25(18.5)	69(94.5)		

2.3 免疫标记在腺癌细胞与增生性间皮细胞中表达的灵敏度与特异度 在腺癌细胞中 CEA 表达的灵敏度为 81.5%，特异度为 97.5%；Ber-Ep4 表达的灵敏度为 80.0%，特异度为 87.7%；MOC-31 表达的灵敏度为 95.5%，特异度为 97.5%。在增生性间皮细胞中 CK5/6 表达的灵敏度为 79.5%，特异度为 83.0%；WT1 表达的灵敏度为 75.3%，特异度为 94.8%；Cal-retinin 表达的灵敏度为 90.4%，特异度为 84.4%。



注：A. 胸腔积液涂片中的腺癌细胞(HE, 200×)；B. 胸腔积液细胞块中的腺癌细胞(HE, 200×)；C. 癌细胞 CEA 阳性(EnVision 法, IHC, 200×)；D. 癌细胞 Ber-Ep4 阳性(EnVision 法, IHC, 200×)；E. 癌细胞 MOC-31 阳性(EnVision 法, IHC, 200×)。

图 1 胸腔积液中腺癌细胞 HE 及 CEA、Ber-Ep4、MOC-31 IHC 染色



注：A. 腹腔积液涂片中增生的间皮细胞(HE, 200×)；B. 腹腔积液细胞块中增生的间皮细胞(HE, 200×)；C. 间皮细胞 CK5/6 阳性(EnVision, IHC, 200×)；D. 间皮细胞 WT1 阳性(EnVision 法, IHC, 200×)；E. 间皮细胞 Calretinin 阳性(EnVision 法, IHC, 200×)。

图 2 腹腔积液中增生性间皮细胞 HE 及 CK5/6、WT1、Calretinin IHC 染色

3 讨 论

浆膜腔积液是常见的临床表现,其产生的原因很多,较多见的良性因素有炎症、结核、肝硬化等;常见恶性因素有转移性肿瘤、恶性间皮瘤、淋巴瘤等,其中转移性肿瘤为最常见的形成因素^[5-6]。常规浆膜腔积液沉渣涂片虽简单、经济,但诊断恶性浆膜腔积液的灵敏度较低,往往需多次送检才能确诊。浆膜腔积液离心沉淀后行细胞石蜡包埋切片不仅提高了检出细胞的数量,避免了细胞形态破坏,还可反复、连续切片,用于其他辅助检查。由于增生性间皮细胞呈不典型性,恶性肿瘤细胞也可分化好,异型性小,从而导致假阳性或假阴性结果。IHC 染色在浆膜腔积液病理学检查中不仅可鉴别细胞良、恶性,还能进一步判断肿瘤细胞类型及组织来源^[7]。日常病理诊断中以 HE 染色形态学观察为主,IHC 染色为辅,同时,多个抗体联合应用、相互补充,是理想的诊断方法,也可为临床晚期患者寻找原发灶提供可靠的线索^[8]。

本研究对 208 例浆膜腔积液进行石蜡包埋,并采用 CEA、Ber-Ep4、MOC-31、Calretinin、WT1、CK5/6 6 种抗体组合用于浆膜腔积液的细胞学病理诊断及鉴别诊断,结果显示,CEA 标记腺癌细胞的灵敏度为 81.5%,特异度为 97.5%,标记间皮细胞阳性率仅 5.5%。CEA 在大多数腺癌细胞中表达,广泛存在于各种腺上皮源性肿瘤中^[9],而在增生性间皮细胞和间皮瘤中表达较少,甚至不表达,是较常用的鉴别诊断标记。Ber-Ep4^[10]除表层鳞状上皮、肝细胞和壁细胞外,所有上皮均表达,而间皮瘤通常不表达。本研究结果显示,Ber-Ep4 在腺癌细胞中的灵敏度为 80.0%,特异度为 87.7%。MOC-31^[10]又称为 EGP-2(上皮糖蛋白-2),是上皮细胞的分子标记,非上皮来源的细胞不表达。因此,MOC-31 极有助于确定浆膜腔积液细胞是否为上皮来源。本研究结果显示,MOC-31 在腺癌细胞中的灵敏度为 95.5%,特异度为 97.5%,而在增生性间皮细胞中表达极低。且 CEA、Ber-Ep4、MOC-31 在腺癌细胞与增生性间皮细胞中的表达存在显著差异,提示这 3 种抗体联合检测对识别腺癌细胞非常可靠。Calretinin^[11-12]是一种存在于神经元细胞中的钙结合蛋白,间皮细胞中也有表达,腺癌细胞中极少表达,是最具特异性的鉴别间皮细胞的标记。本研究结果显示,Calretinin 标记增生性间皮细胞的灵敏度为 90.4%,特异度为 84.4%。CK5/6^[12]是高相对分子质量细胞角蛋白(分别为 58×10^3 、 56×10^3),多表达在鳞状上皮生发层细胞、肌上皮细胞和间皮细胞,不表达在腺上皮细胞。因此,可用于

腺癌和鳞状细胞癌、腺癌和间皮瘤的鉴别诊断。本研究结果显示,CK5/6 标记增生性间皮细胞的灵敏度为 79.5%,特异度为 83.0%。WT1^[11-12]正常表达于肾、支持细胞、子宫蜕膜细胞及卵巢颗粒细胞等,在 Wilm's 瘤、后肾腺瘤、间皮瘤中常阳性表达,可作为腺癌细胞与间皮细胞的鉴别诊断。本研究结果显示,WT1 标记增生性间皮细胞的灵敏度为 75.3%,特异度高达 94.8%,在腺癌细胞中表达极少。且 Calretinin、WT1、CK5/6 在增生性间皮细胞与腺癌细胞中的表达存在显著差异,提示这 3 种抗体联合检测是识别增生性间皮细胞的可靠标记。除了上述研究的 CEA、MOC-31、Ber-Ep4、CK5/6、WT1、Calretinin 6 种抗体是鉴别浆膜腔积液中增生性间皮细胞与腺癌细胞的可靠指标外,文献又报道了新的特异性抗体 zeste 同源物增强子 2,一种参与肿瘤进展的转录抑制因子,在多种恶性肿瘤中广泛存在异常免疫表达,是诊断恶性浆膜腔积液细胞的特异性抗体,在未来的临床诊断工作中有待进一步实践应用^[13]。

综上所述,运用细胞石蜡包埋技术并 IHC 联合抗体检测对鉴别增生性间皮细胞与腺癌细胞帮助很大,特别是对浆膜腔积液中难以分辨的增生性间皮细胞和高分化腺癌细胞更有价值。CEA、MOC-31、Ber-Ep4、CK5/6、WT1、Calretinin 是鉴别浆膜腔积液中增生性间皮细胞与腺癌细胞较为理想的抗体组合,虽然各个抗体的灵敏度和特异度存在一定的局限性,但联合检测能有效提高细胞学诊断的正确率,大大增加了其实际应用价值。

参考文献

- [1] PORCEL J M. Diagnosis and characterization of malignant effusions through pleural fluid cytological examination[J]. Curr Opin Pulm Med, 2019,25(4):362-368.
- [2] PINTO D, CHANDRA A, CROTHERS B A, et al. The international system for reporting serous fluid cytopathology diagnostic categories and clinical management[J]. J Am Soc Cytopathol, 2020,9(6):469-477.
- [3] ALSHAIKH S, LAPADAT R, ATIEH M K, et al. The utilization and utility of immunostains in body fluid cytology[J]. Cancer Cytopathol, 2020,128(6):384-391.
- [4] 赵帅,肖琳. 细胞块结合免疫组化技术在恶性胸腔积液病理诊断中的应用[J]. 肿瘤基础与临床,

2019, 32(3):253-255.

[5] OTOSHI T, KATAOKA Y, IKEGAKI S, et al. Pleural effusion biomarkers and computed tomography findings in diagnosing malignant pleural mesothelioma: A retrospective study in a single center[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185805.

[6] BOTANA RIAL M, LOJO RODRÍGUEZ I, MOURONTE ROIBÁS C, et al. Diagnostic yield and safety of pleural cryobiopsy during medical thoracoscopy to diagnose pleural effusion. A systematic review and meta-analysis[J]. Arch Bronconeumol, 2020, 56(12): 784-791.

[7] 龙兆博, 唐晓梅, 司婷婷, 等. 细胞块制片免疫组化对胸腹腔积液转移性腺癌的诊断价值[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(11): 1787-1790.

[8] 侯兴华, 金素芬, 李春杨, 等. 组合型抗体在胸腔积液细胞块诊断中的应用[J]. 诊断病理学杂志, 2017, 21(8): 510-512.

[9] LAKEMEYER L, SANDER S, WITTAU M, et al. Diagnostic and prognostic value of CEA and CA19-9 in colorectal cancer[J]. Diseases, 2021, 9(1): 21.

[10] NAJJAR S, GAN Q, STEWART J, et al. The utility of claudin-4 versus MOC-31 and Ber-EP4 in the diagnosis of metastatic carcinoma in cytology specimens [J]. Cancer Cytopathol, 2023, 131(4): 245-253.

[11] CHAPEL D B, SCHULTE J J, HUSAIN A N, et al. Application of immunohistochemistry in diagnosis and management of malignant mesothelioma[J]. Transl Lung Cancer Res, 2020, 9(Suppl 1): S3-S27.

[12] BROECKX G, PAUWELS P. Malignant peritoneal mesothelioma: A review[J]. Transl Lung Cancer Res, 2018, 7(5): 537-542.

[13] ANG P P, TAN G C, KARIM N, et al. Diagnostic value of the EZH2 immunomarker in malignant effusion cytology[J]. Acta Cytol, 2020, 64(3): 248-255.

(收稿日期: 2022-08-15 修回日期: 2023-02-18)

(上接第 2543 页)

injury[J]. J Neurosci, 2001, 21(4): 1302-1312.

[8] 雷贤明, 杨洁, 曹云涛. 孕酮对新生鼠脑室周围白质软化模型脑白质少突细胞标记物 O_1 和 O_4 表达的影响[J]. 临床儿科杂志, 2017, 35(4): 311-314.

[9] 周超群, 周珮. 人参皂苷 Rd 的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(5): 832-836.

[10] ZHANG Y, ZHOU L, ZHANG X, et al. Ginsenoside-Rd attenuates TRPM7 and ASIC1a but promotes ASIC2a expression in rats after focal cerebral ischemia[J]. Neurol Sci, 2012, 33(5): 1125-1131.

[11] YE R, KONG X, YANG Q, et al. Ginsenoside Rd attenuates redox imbalance and improves stroke outcome after focal cerebral ischemia in aged mice [J]. Neuropharmacology, 2011, 61(4): 815-824.

[12] 朱丽华, 蒋犁, 张志华, 等. 缺氧缺血致低龄大鼠脑白质损伤和神经功能障碍的实验研究[J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(9): 784-787.

[13] 曾田, 杨丽华, 黄晶晶, 等. 缺血缺氧性脑损伤对新生 3 日龄幼鼠学习记忆及情感行为的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(23): 3530-3538.

[14] LIU M, KELLEY M H, HERSON P S, et al. Neuroprotection of sex steroids [J]. Minerva Endocrinol, 2010, 35(2): 127-143.

[15] BACK S A. White matter injury in the preterm infant: Pathology and mechanisms [J]. Acta Neuropathol, 2017, 134(3): 331-349.

(收稿日期: 2023-02-11 修回日期: 2023-04-18)