论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1568-04

胸腔积液细胞块免疫组化染色的病理诊断价值

唐应成,梁利斌,杨瑞仙,崔 燕,邱红莲 (400900 重庆,重庆市黔江中心医院病理科)

[摘要] **目的** 探讨细胞块切片免疫组化染色对胸腔积液病理诊断与鉴别诊断的应用价值。**方法** 收集78例患者胸腔积液,分别行常规细胞涂片和细胞块切片,HE染色观察细胞的形态特点,免疫组化S-P法检测CK7、MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1、CK5/6、Calretinin、WT-1和Desmin的表达,筛选肺腺癌和间皮病变鉴别诊断相关的免疫标记组合。分析临床与随访资料与不同细胞学诊断方法结果之间的差异。**结果** 细胞块制片阳性检出率高于常规细胞涂片,二者HE染色对胸腔积液细胞阳性检出率无显著性差异($P>0.05$)。细胞块免疫组化明显优于单纯细胞涂片,二者比较具有显著差异性($\chi^2=4.17$,$P<0.01$),其对恶性胸腔积液的分型诊断符合率达97.2%,组合性抗体检测显示,肺腺癌中CK7、MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1呈高表达,间皮病变显示CK5/6、Calretinin、WT-1、Desmin高表达。**结论** 胸腔积液细胞块对诊断恶性胸腔积液具有一定的价值,结合免疫组化选择适当的抗体组合对肺腺癌和恶性间皮瘤的鉴别诊断具有一定的意义,值得临床推广应用。

[关键词] 细胞涂片; 细胞块; 胸腔积液; 免疫组化;鉴别诊断
[中图法分类号] R446; R447; R561 [文献标志码] A

Significance of cell block immunohistochemistry in diagnosis of pleural effusions

Tang Yingcheng, Liang Libin, Yang Ruixian, Cui Yan, Qiu Honglian (Department of Pathology, Qianjiang Central Hospital of Chongqing, Chongqing, 400900, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the difference between cell smear and cell block in differential diagnosis of pleural effusions, and to investigate the methods for differential diagnosis between lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma. **Methods** Seventy-eight cases of pleural effusions were examined using cell smear and cell block, respectively. Cell morphology was observed by HE staining. Expression of CK7, MOC-31, CD15, BerEP4, CEA, TTF-1, CK5/6, calretinin, WT-1 and desmin were detected by SP immunohistochemical assay. The association of clinical and follow-up data with different cytology diagnostic methods was analyzed. **Results** The positive detection rate of the cell block was higher than that of the cell smear, but the positive detection rate by HE staining showed no significant difference between the two methods. The accordance rate of the cell block immunohistochemistry for the diagnosis of malignant pleural effusion was 46.2%, which was significantly higher than that of the cell smear (Chi-square = 4.17, $P<0.01$). CK7, MOC-31, CD15, BerEP4, CEA and TTF-1 were highly expressed in lung adenocarcinoma, whereas CK5/6, calretinin, WT-1 and desmin were highly expressed in malignant mesothelioma and mesothelial reactive hyperplasia. **Conclusion** Cell block has a certain diagnostic value for malignant pleural effusion, and its combination with immunohistochemistry and complex antibodies is helpful for the differential diagnosis between lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma.

[**Key words**] cell smear; cell block; pleural effusion; immunohistochemistry; differential diagnosis

Corresponding author: Tang Yingcheng, Tel: 86-23-79225105, E-mail: qjzxyyblk-66666@163.com

细胞病理学对浆膜腔积液的诊断具有独到之处和重要的意义,长期以来,良、恶性浆膜腔积液诊断主要依赖细胞涂片检查,其诊断恶性浆膜腔积液的敏感度为50%~78%[1-2]。单纯细胞涂片中,因转移性癌和浆膜腔原发性间皮性肿瘤两者间细胞形态相似,一直是细胞病理诊断的难点[1]。临床实际工作中,区分转移性癌和间皮性肿瘤具有重要意义,特别是鉴别肺腺癌和恶性间皮瘤常关系到患者治疗方案的确定。我们

[通信作者] 唐应成,电话:(023)79225105, E-mail:qjzxyyblk-66666@163.com

对78例临床倾向恶性肿瘤的患者胸腔积液分别运用细胞涂片和细胞块切片观察,辅助免疫组化检测,结合临床病史与随访资料进行比较研究,旨在改进胸腔积液的诊断方法,探讨肺腺癌和恶性间皮瘤鉴别诊断的有效细胞病理方法,进一步提高细胞病理在诊断恶性浆膜腔积液中的阳性率,寻找鉴别肺腺癌和恶性间皮瘤的特异有效的方法。

1 资料与方法

1.1 材料

收集重庆市黔江中心医院2004年1月至2010年12月细胞病理资料,纳入标准为:送检标本均为胸腔积液;每例均进行常规细胞涂片和制作细胞块。病例在门诊以胸腔积液待查就诊,均收入本院呼吸内科诊治,共收集78例病例,其中男性39例,女性39例;年龄12~82岁,中位年龄47岁。根据临床表现和影像学检查结果,临床诊断均倾向恶性。本研究经本院伦理委员会同意,纳入研究病例均征得患者或家属同意。

1.2 方法

1.2.1 细胞涂片及细胞块制备 所有标本各取10 ml,分3~5管,3 000 r/min离心10 min,取部分离心沉渣制备HE涂片,其余沉渣用试镜纸包裹后固定于10%中性福尔马林固定液中,常规处理制备细胞蜡块并连续切片,厚度3~4 μm,所有涂片和切片分别行HE染色和免疫组化染色。

1.2.2 HE染色观察与敏感性分析 所有病例的细胞涂片与细胞块切片行HE染色,由2名高级职称病理医师进行形态学观察,根据细胞形态、核不典型性和粘附性分为良性、恶性和不能肯定[1-2]:①良性:反应性增生间皮细胞(细胞弥散、形态温和、无不典型性);②恶性:转移性腺癌和恶性间皮瘤细胞(细胞成团、细胞形态及核具重度不典型性);③不能肯定(细胞弥散、细胞核具中-重度不典型性或形成细胞团但细胞核仅具轻-中度不典型性),并分别获得阳性检出率(敏感度)。

1.2.3 免疫组化 采用Maxvision快捷免疫组织化学S-P法染色,Maxvision试剂盒及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂均购自福州迈新公司。染色过程按试剂盒操作说明进行,选择一抗见表1。每批染色以PBS代替一抗设立空白对照,染色切片中采用已知阳性组织同时染色设立阳性对照。参照文献[6-11]支持间皮细胞的免疫组化指标:CK5/6、Calretinin、WT-1和Desmin;支持肺腺癌的免疫组化指标:CK7、MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1。结果判断:CK7、MOC-31、BerEP4、CEA、CK5/6、Desmin呈棕黄色细胞质染色视为阳性,TTF-1、WT-1细胞核呈棕黄色染色为阳性,Calretinin(CR)细细胞质和细胞核均着色为阳性,CD15细胞膜/细胞质着色为阳性。以细胞块结果统计反应性增生间皮细胞、转移性腺癌细胞和恶性间皮瘤细胞各种抗体阳性染色并计算阳性率,分析各种抗体在肺腺癌与间皮瘤和反应性增生间皮细胞之间的表达情况。

1.3 统计学分析

采用四格表概率法进行统计分析。

表1 免疫组化一抗试剂

抗体名称	克隆号	克隆	工作浓度	修复方式
CK7	OV-TL12/30	单克隆	1:200	胃酶消化
MOC-31	MOC-31	单克隆	1:100	胃酶消化
CD15	Carb-3	单克隆	1:60	EDTA高温修复
Epithelial Antigen	Ber-EP4	单克隆	1:100	胃酶消化
CEA	ZC23	单克隆	1:200	无修复
TTF-1	SPT24	单克隆	1:100	柠檬酸高温修复
CK5/6	D5/16B4	单克隆	1:100	EDTA高温修复
Calretinin	SP13	单克隆	1:100	EDTA高温修复
WT-1	WT49	单克隆	1:50	EDTA高温修复
Desmin	D33	单克隆	1:100	无修复

2 结果

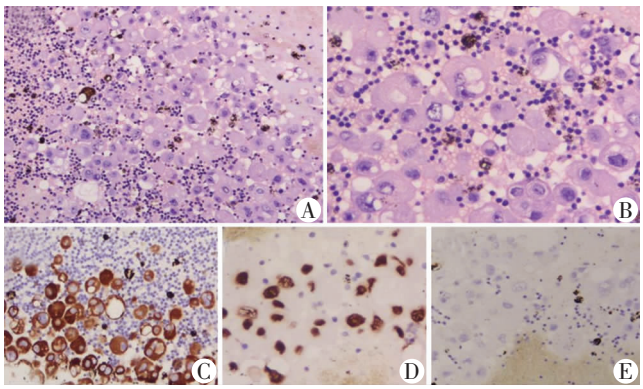
2.1 HE及免疫组化染色观察结果

本组78例胸腔积液单纯细胞涂片HE染色观察诊断良性33例(42.3%)、恶性25例(32.1%)、不能肯定20例(25.6%);采用细胞块切片HE染色观察诊断良性、恶性和不能肯定分别为34例(43.6%)、28例(35.9%)和16例(20.5%)。两种方法单纯HE染色观察结果无显著差异($P>0.05$)。78例胸腔积液细胞涂片免疫组化染色,结果显示良性35例(44.9%)、恶性29例(37.2%)、不能肯定14例(17.9%);而细胞块免疫组化染色均获得明确性质诊断,其中良性42例(53.8%)、恶性36例(46.2%)。单纯细胞涂片与细胞块的免疫组化标记对恶性胸腔积液诊断率间具显著差异性($\chi^2=4.17$, $P<0.01$)。其中细胞涂片HE染色观察2例良性间皮增生,经免疫组化染色诊断为肺腺癌;2例腺癌病例经免疫组化证实为间皮增生或间皮瘤;6例未肯定病例经免疫组化诊断2例为良性、4例为恶性。细胞块切片免疫组化染色诊断42例反应性胸腔积液,结合临床分别诊断为结核性胸膜炎31例、脓胸9例、寄生虫病2例,其中2例先前HE染色诊断恶性。本组最后确诊的36例恶性病例中,采用细胞块免疫组化明确恶性类型35例,误诊1例,其诊断符合率35/36例(97.2%),其中28例肺腺癌、3例肺鳞癌、2例恶性间皮瘤均由肺和胸膜穿刺活检组织学证实,2例淋巴瘤通过手术或活检分别确诊为Burkitt淋巴瘤伴胸腔播散和弥漫大B细胞淋巴瘤,1例误诊为转移腺癌,根据临床病史和组织学诊断为足跟部恶性黑色素瘤胸腔转移。本组病例中有1例先前HE染色诊断为良性间皮增生,细胞块切片显示多种细胞混合,散在大细胞类似间皮增生,细胞质丰富(图1A、B),经免疫组化染色CK阳性(图1C)、TTF1阳性(图1D)和WT1阴性(图1E),最后确诊为转移性肺腺癌。另1例HE染色切片见异型细胞成团,细胞形态及细胞核具重度不典型性(图2A、B),初诊为转移性癌,免疫组化显示Calretinin(图2C)和WT1(图2E)细胞核阳性,TTF1阴性(图2D),确诊为恶性间皮瘤。

2.2 免疫组化染色敏感性和特异性

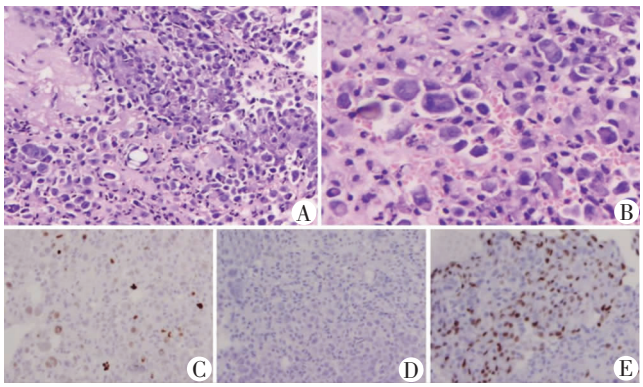
本组对细胞涂片和细胞块切片各种免疫标记染色结果见表2。肺腺癌细胞对CK7、MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1均有较高的阳性表达率;恶性间皮瘤和反应性增生间皮细胞对CK5/6、Calretinin、WT-1、Desmin阳性表达率明显增高。其中

CK7、MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1、CK5/6、Calretinin、WT-1、Desmin抗体组合在肺腺癌与间皮病变(包括间皮肿瘤和反应性增生间皮细胞)之间表达具显著差异性($P<0.01$)。



A:低倍镜显示肿瘤细胞体积大,细胞质丰富(HE ×100);B:高倍镜显示肿瘤细胞核轻度异型(HE ×200);C:肿瘤细胞呈CK细胞质阳性(S-P ×100);D:肿瘤细胞呈TTF1细胞核阳性(S-P ×100);E:肿瘤细胞呈WT1阴性(S-P ×100)

图1 胸水转移性肺腺癌细胞病理观察



A:低倍镜下肿瘤细胞成团巢状酷似转移性癌(HE ×100);B:高倍镜下肿瘤细胞形态及细胞核均具有明显异型性(HE ×200);C:肿瘤细胞呈Calretinin细胞核及细胞质阳性(S-P ×100);D:肿瘤细胞呈TTF1阴性(S-P ×100);E:肿瘤细胞呈WT1细胞核阳性(S-P ×100)

图2 胸水恶性间皮瘤细胞病理观察

3 讨论

3.1 胸腔积液细胞学常规制片的诊断价值与问题

胸腔积液细胞学检查因样本采集容易,制片快捷,仍为目前病理诊断中普遍采用方法。常规离心涂片HE染色观察虽然对积液细胞性质判断具有一定价值,但因胸腔积液中所含细胞成分复杂,各种细胞形态具有类似性,有时仅凭细胞涂片也难以做出准确的诊断。尤其转移性肺腺癌和恶性间皮瘤的细胞形态极为相似,单纯细胞涂片HE染色观察对基层医院病理医生来说几乎难以鉴别,易致误诊。但肺腺癌与恶性间皮瘤鉴别对临床治疗方案选择和预后判断又具有重要的意义[1-3],甚至有时良恶性判断也比较困难。文献[8]报道结核性胸膜炎、脓胸等胸腔积液中常会出现大量间皮细胞增生(即反应性增生间皮细胞),其细胞形态和某些恶性肿瘤细胞形态有所重叠。本组78例胸腔积液细胞涂片常规HE染色观察良恶性阳性诊断率均较低,分别约42.3%和32.1%,还有20例(25.6%)难以肯定良恶性。此外胸腔积液除最常见的肺腺癌外,其他腺癌、肺鳞癌、淋巴瘤、恶性黑色素瘤等也形成胸腔积液,鉴别诊断难度更大,不依靠特殊染色有时很难确定转移性肿瘤的来源。因此,胸膜腔积液细胞涂片常规HE染色病理诊断尚存在诸多问题,缺乏临床较实用的技术用于诊断与鉴别诊断。

3.2 细胞块切片及免疫组化染色对胸腔积液的诊断价值

本研究通过对78例临床倾向恶性肿瘤的胸腔积液分别制作细胞涂片与细胞块,并结合免疫组化染色,比较其诊断敏感性与鉴别诊断价值,结果发现:①细胞块切片质量明显高于细胞涂片:细胞块分布均匀,能保持脱落细胞的形态结构;而细胞涂片分布不均,常重叠

表2 78例胸腔积液细胞涂片和细胞块切片免疫组化染色结果

免疫组化指标	良性(反应性间皮增生)		恶性				未肯定	
	涂片	细胞块(敏感性)	转移性肺腺癌		恶性间皮瘤		涂片	细胞块
	($n=35$)	($n=42$)	涂片 ($n=28$)	细胞块(敏感性) ($n=28$)	涂片 ($n=2$)	细胞块(敏感性) ($n=2$)	($n=14$)	($n=0$)
CK7	1	0(0%)	23	28(100%)	1	0(0%)	2	0
MOC-31	0	1(2%)	22	27(96%)	0	0(0%)	1	0
CD15	0	0(0%)	26	28(100%)	0	0(0%)	0	0
BerEP4	0	0(0%)	24	28(100%)	0	0(0%)	0	0
CEA	1	0(0%)	23	27(96%)	0	0(0%)	1	0
TTF-1	0	0(0%)	21	22(79%)	0	0(0%)	0	0
CK5/6	34	42(100%)	1	0(0%)	2	2(100%)	12	0
Calretinin	35	42(100%)	0	0(0%)	2	2(100%)	10	0
WT-1	33	42(100%)	1	0(0%)	2	2(100%)	13	0
Desmin	30	41(97%)	1	0(0%)	1	2(100%)	9	0

存在致使细胞形态模糊,结构不清。②采用细胞涂片免疫组化染色显示良性、恶性诊断阳性率分别为44.9%和37.2%。细胞涂片免疫组化虽然有助于胸腔积液鉴别诊断,但存在涂片细胞厚薄不均、数量不等,易致高背景着色,出现假阳性,同时阳性表达细胞缺乏对应性致使判读困难等问题,本组仍有14(17.9%)病例不能明确良恶性。而细胞块免疫组化染色,细胞分布均匀,可避免假阳性,采用连续切片染色所检测细胞的各种指标阳性表达容易对比观察,能准确判读,同时包埋细胞块也可永久性保留标本,利于回顾性研究。本组78例细胞块免疫组化染色观察基本能明确细胞类型和性质,其良恶性诊断阳性率分别为53.8%和46.2%。结合病理活检、临床资料与随访结果分析,其分型诊断符合率可达97.2%。减少了细胞涂片的误诊率和漏诊率,明显优于单纯细胞涂片。提示细胞块免疫组化染色有助于浆膜腔积液细胞类型和性质判断,是较理想的细胞病理诊断方法[4-6]。更重要的是,细胞块制作过程简单,容易保存,进行免疫组化检测简单易行,便于在广大基层医院开展应用。总结细胞块制作技术,有以下几点值得借鉴:①中速离心(3 000 r/min)收集制备细胞数量丰富,分布均匀,能最佳保持脱落细胞的形态结构;②细胞块切片进行免疫组化厚度4~5 μm较佳,细胞分布均匀,利于避免假阳性。

3.3 肺腺癌和恶性间皮瘤鉴别诊断的抗体组合

本组78例临床倾向恶性胸腔积液采用细胞块制片结合免疫组化,检测系列抗体CK7、MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1、CK5/6、Calretinin、WT-1和Desmin,结果显示:①肺腺癌细胞主要表达CK7、MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1;②恶性间皮瘤和反应性增生间皮细胞主要表达CK5/6、Calretinin、WT-1、Desmin。联合应用以上抗体可鉴别肺腺癌与间皮病变,并具有较强的特异性。Tery等[4]研究各种免疫标记的价值和意义分析显示CK7可作为肺腺癌最敏感和最佳预测因子。另外,文献[7-9]报道MOC-31、CD15、BerEP4、CEA、TTF-1、CK5/6、Calretinin、WT-1和Desmin单个抗体对肺腺癌和恶性间皮瘤的鉴别诊断的敏感性及特异性差异较大。本研究采用多种抗体染色综合结果分析,可有效消除各抗体的表达差异,避免交叉反应,提高敏感性和特异性,使恶性胸腔积液的阳性诊断率明显较高,尤其对肺腺癌和恶性间皮瘤的鉴别诊断能筛选出较高的敏感性和特异性的鉴别诊断抗体组合,其中选择CK7、CD15、BerEP4、TTF-1、Calretinin、WT-1可作为肺腺癌与间皮瘤鉴别诊断一线抗体,前4个抗体对肺腺癌较特异,后2个对间皮瘤较特异,具有一定的临床实用价值。对肺鳞状细胞癌、恶性淋巴瘤及其他恶性肿瘤胸腔转移需要结合临床病史、细胞形态选择其他器官和肿瘤特异的抗体进一步标记鉴别。对于恶性间皮瘤和反应性增生间皮细胞的鉴别目前尚缺乏相应的特异性抗体,文献[10]报道Glut-1对鉴别恶性间皮瘤与反应性增生间皮细胞具有帮助,有待进一步研究证实。

参考文献:

[1] Thapar M, Mishra R K, Sharma A, *et al*. Critical analysis of cell block versus smear examination in effusions[J]. J Cytol, 2009, 26(2): 60-64.

[2] 谢深科, 舒千玉, 姚军. 细胞块免疫标记在胸腹水细胞病理诊断与鉴别诊断中的价值[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(4): 73-74.

[3] Swiderek J, Morcos S, Donthireddy V, *et al*. Prospective study to determine the volume of pleural fluid required to diagnose malignancy[J]. Chest, 2010, 137(1): 68-73.

[4] Terry J, Leung S, Laskin J, *et al*. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples[J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34(12): 1805-1811.

[5] Kim D H, Kwon M S. Role of fine needle aspiration cytology, cell block preparation and CD63, P63 and CD56 immunostaining in classifying the specific tumor type of the lung[J]. Acta Cytol, 2010, 54(1): 55-59.

[6] Noda Y, Fujita N, Kobayashi G, *et al*. Diagnostic efficacy of the cell block method in comparison with smear cytology of tissue samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration[J]. J Gastroenterol, 2010, 45(8): 868-875.

[7] 尚士宣, 赵晓丹, 肖月英. 细胞块切片免疫组化染色在肿瘤细胞学诊断中的应用[J]. 肿瘤基础与临床, 2010, 23(6): 514-515.

[8] 苏学英, 李甘地, 唐应成. MOC-31在浆膜腔积液转移性腺癌、间皮瘤和增生间皮细胞中表达的检测价值[J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36(5): 734-735.

[9] 郭以河, 张闽峰, 孟加榕, 等. TTF-1, CK7在胸水细胞块中鉴别肺腺癌诊断的应用[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(12): 1713-1714.

[10] 张秀琴, 吕喜英, 韩亚群. GLUT-1与恶性胸腔积液的关系: 文献综述[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(1): 39-40.

(**收稿**:2012-03-09;**修回**:2012-03-26)

(编辑 王 红)