

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.18.004
文章编号: 1005-8982 (2019) 18-0020-05

临床研究·论著

TCT联合免疫组织化学在NSCLC恶性胸腔积液诊断中的价值*

任美英, 王翠峰, 文荣, 景学芬, 付玉华

(内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院 检验科, 内蒙古 包头 014010)

摘要: 目的 采用液基薄层细胞学检查(TCT)与免疫组织化学检测甲状腺转录因子1(TTF-1)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白5/6(CK5/6)和P63在恶性胸腔积液中的表达,探讨这2种检测方法联合诊断非小细胞肺癌(NSCLC)致恶性胸腔积液及在分型诊断中的临床价值。**方法** 采用TCT对703例胸腔积液进行细胞学涂片,筛选出疑似肿瘤细胞和肿瘤细胞标本281例;再利用免疫组织化学染色对确诊为NSCLC恶性胸腔积液的137例患者进行肺腺癌、鳞癌分型诊断;最后采用ROC曲线计算其曲线下面积,进一步判断该指标是否具有诊断价值。**结果** 初筛703例胸腔积液,137例为NSCLC所致的恶性积液,其中肺腺癌110例、肺鳞癌25例、肺腺鳞癌2例。CK5/6、P63、TTF-1及CK7在肺鳞癌和肺腺癌致恶性胸腔积液标本中的阳性表达率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CK5/6在肺鳞癌所致恶性胸腔积液中敏感性、特异性分别为92.86%(95% CI: 0.64, 0.99)和89.58%(95% CI: 0.77, 0.99);P63在肺鳞癌致恶性胸腔积液中敏感性、特异性分别为91.67%(95% CI: 0.60, 0.99)和72.73%(95% CI: 0.54, 0.86)。TTF-1在肺腺癌致恶性胸腔积液中的敏感性、特异性分别为87.18%(95% CI: 0.77, 0.93)和90.63%(95% CI: 0.74, 0.98);CK7在肺腺癌致恶性胸腔积液中敏感性、特异性分别为94.23%(95% CI: 0.83, 0.98)和75.00%(95% CI: 0.41, 0.93)。TTF-1和CK7诊断肺腺癌致恶性胸腔积液的ROC曲线下面积(AUC)分别为0.821和0.774;CK5/6和P63诊断肺鳞癌致恶性胸腔积液的(AUC)分别为0.805和0.755。**结论** TTF-1和CK7、CK5/6和P63分别对肺腺癌、鳞癌致恶性胸腔积液有重要的诊断价值,TCT联合免疫组织化学对良恶性胸腔积液的鉴别诊断及NSCLC致恶性胸腔积液的分型诊断具有临床应用价值,值得推广应用。

关键词: 癌,非小细胞肺;免疫组织化学;胸腔积液,恶性

中图分类号: R734.2;R446.1

文献标识码: A

Clinical value of TCT combined with immunohistochemistry in diagnosis of malignant pleural effusion caused by NSCLC*

Mei-ying Ren, Cui-feng Wang, Rong Wen, Xue-fen Jing, Yu-hua Fu

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: Objective To examine the cytopathology and Thyroid Transcription Factor (TTF-1), Cytokeratin 7 (CK7), Cytokeratin 5/6 (CK5/6) and P63 in the pleural effusion by the Thin-Cytologic Test

收稿日期: 2019-03-29

* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(No: 2016MS0803); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(No: NJZY17257); 包头医学院科学研究基金(No: BYJJ-YF 201693)

[通信作者] 王翠峰, E-mail: wangcui Feng1973@vip.sina.com; Tel: 13514728666

(TCT) and the immunohistochemistry method, and then to evaluate the clinical application of these combined method in diagnosing malignant pleural effusion caused by non-small cell lung cancer (NSCLC) classification diagnosis. **Methods** Firstly, we screened out 281 cases of suspected tumor cells and tumor cells by the TCT method from 703 pleural effusion cases. Secondly, we tested the TTF-1, CK7, CK5/6 and P63 by the immunohistochemistry method in the 137 cases pleural effusion caused by confirmed NSCLC to classify adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Finally, we calculated the area under the curve (AUC) and evaluated the clinical diagnostic value. **Results** We found 137 malignant effusion cases caused by NSCLC from 703 pleural effusions cases, including 110 cases of lung adenocarcinoma, 25 cases of lung squamous cell carcinoma and 2 cases of lung adenosquamous carcinoma. The positive rates of CK5/6, P63, TTF-1 and CK7 in malignant pleural effusion caused by lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma were significantly different ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of CK5/6 in malignant pleural effusion caused by lung squamous cell carcinoma were 92.86% (95% CI: 0.64, 0.99) and 89.58% (95% CI: 0.77, 0.99); those of P63 were 91.67% (95% CI: 0.60, 0.99) and 72.73% (95% CI: 0.54, 0.86); those of TTF-1 were 87.18% (95% CI: 0.77, 0.93) and 90.63% (95% CI: 0.74, 0.98); those of CK7 were 94.23% (95% CI: 0.83, 0.98) and 75.00% (95% CI: 0.41, 0.93). The AUC of ROC curve for TTF-1 and CK7 in the diagnosis of lung adenocarcinoma were 0.821 and 0.774 respectively; correspondingly, those of the CK5/6 and P63 in the diagnosis of squamous cell carcinoma were 0.805 and 0.755 respectively. **Conclusions** The TTF-1, CK7, CK5/6, and P63 are important in guiding the diagnosis of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Thin-Cytologic Test combined with the immunohistochemistry method is clinically useful for the pathological diagnosis and classification of malignant effusion caused by NSCLC.

Keywords: carcinoma, non-small-cell lung; immunocytochemistry; pleural effusion, malignant

胸腔积液是肺部等多种疾病的常见并发症, 临床上 40% 胸腔积液由恶性肿瘤引起。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 致恶性胸腔积液的病理诊断及其分型诊断难以明确, 而胸腔积液细胞病理学检查是目前具有诊断意义的检查手段之一。

液基薄层细胞学检查 (thinprep cytogy test, TCT) 是近些年应用于细胞病理学诊断的一项新技术, TCT 在宫颈和胸腔积液的细胞病理学检查中有非常大的诊断价值^[1-2]。而免疫组织化学法对于肿瘤细胞的分型诊断具有重要意义, 但两者联合应用于胸腔积液细胞病理学诊断及分型诊断的研究报道甚少。本研究拟探讨 TCT 联合免疫组织化学进行良恶性胸腔积液的鉴别诊断及由 NSCLC 致恶性胸腔积液分型诊断的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 3 月—2017 年 3 月于内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院检验科细胞室收集的呼吸内科、肿瘤内科、肿瘤外科及胸外科等科室和外院送

检的脱落细胞学胸腔积液标本 703 例。应用 TCT 初检, 从诊断结果为可疑肿瘤细胞及肿瘤细胞的标本中选取 281 例。患者最后经 CT、磁共振及组织病理学确诊为 NSCLC 致恶性胸腔积液标本 137 例。其中, 男性 88 例, 女性 49 例; 年龄 30 ~ 85 岁; 肺腺癌 110 例、肺鳞癌 25 例、肺腺鳞癌 2 例。

1.2 主要试剂

TCT 试剂 (湖北德立森科技有限公司), 甲状腺转录因子 1 (thyroid transcription factor-1, TTF-1)、细胞角蛋白 5/6 (Cytokeratin 5/6, CK5/6)、细胞角蛋白 7 (Cytokeratin 7, CK7) 及 P63 免疫组织化学试剂均购于福州迈新生物技术有限公司。按说明书步骤进行实验操作。

1.3 方法

1.3.1 TCT 取 2 管胸腔积液, 每管 10 ml, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 每管加入约 10 ml 细胞清洗液, 继续 3 000 r/min 离心 5 min, 再弃上清液, 在沉淀物中加入适量 TCT 细胞保存液, 置漩涡混合器上震荡 1 min 混匀, 用德立森液基细胞仪制成薄层细胞涂片, 95% 乙醇固定 15 min, 巴氏染色。

1.3.2 细胞蜡块的制作 取 50 ml 胸腔积液，静止沉淀 1 h 后，吸取底部液体至离心管中，加入 10% 甲醛 5 ml，离心弃上清液，重复 1 次上述步骤后，用滤纸包裹，脱水、浸蜡及包埋后行 4 μ m 厚连续切片。

1.3.3 免疫组织化学 常规切片后，采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法进行免疫细胞化学染色，以试剂盒中提供的对照作为阴阳性对照，二氨基联苯胺显色。在细胞核、细胞膜或细胞质中出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。由具有诊断资质的病理医师随机观察每张切片的 5 个视野，每视野计数 100 个细胞。染色强度：0 分为无色，1 分为浅黄色或黄色，2 分为棕黄色。阳性细胞百分比： $<10\%$ 计 0 分， $10\% \sim 50\%$ 计 1 分， $>50\%$ 计 2 分，染色强度与阳性细胞百分比的乘积 >2 为阳性， ≤ 2 为阴性。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示，比较用 χ^2 检验；绘制 ROC 曲线，计算曲线下面积 (area under the curve AUC)， $AUC > 0.5$ 为该指标有诊断价值， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCT 初诊结果

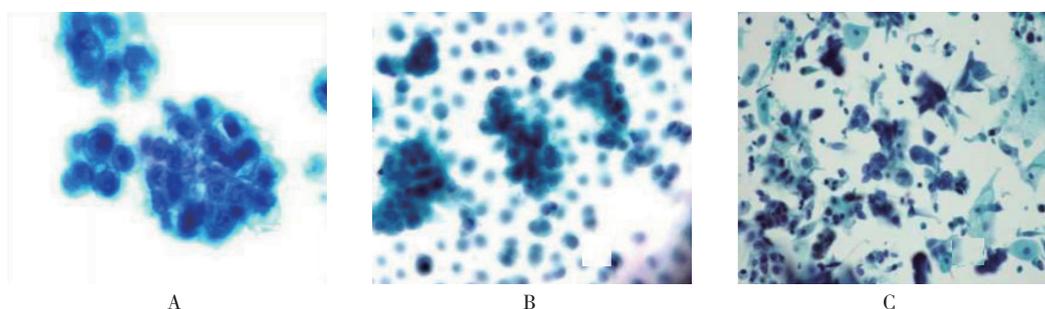
镜下细胞排列呈腺腔样或桑葚样 (见图 1A、B)，核异型性不明显，核染色较深，核仁明显，有时胞浆中出现黏液空泡。TCT 可初步诊断为可疑肿瘤细胞或肿瘤细胞。镜下细胞散在分布 (见图 1C)，细胞体积大小不一，形态多样，细胞核大小不等，明显畸形，核染色深。TCT 初步诊断为可疑肿瘤细胞或肿瘤细胞。

2.2 免疫组织化学染色结果

将 TCT 筛查为可疑肿瘤细胞或肿瘤细胞的胸腔积液，进一步做石蜡包埋切片，并进行免疫细胞化学染色。CK5/6、CK7 阳性颗粒定位于细胞质和细胞膜，TTF-1、P63 蛋白阳性颗粒定位于细胞核。见图 2。

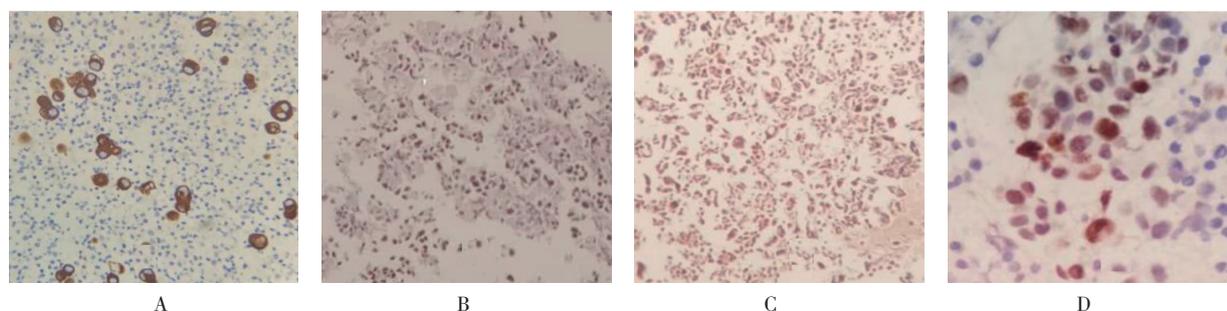
2.3 恶性胸腔积液中各免疫组织化学标志物的阳性表达率比较

肺鳞癌和肺腺癌致恶性胸腔积液标本中 CK5/6、P63、TTF-1 及 CK7 的阳性表达率比较，经 χ^2 检验，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。



A: 细胞呈腺腔样 ($\times 100$)；B: 细胞呈桑葚样 ($\times 20$)；C: 细胞呈散在分布 ($\times 20$)。

图 1 TCT 初诊的肿瘤细胞 (巴氏染色)



A: CK5/6 ($\times 20$)；B: TTF-1 ($\times 10$)；C: CK7 ($\times 10$)；D: P63 ($\times 20$)。

图 2 免疫组织化学染色结果

表 1 恶性胸腔积液中各免疫组织化学标志物的阳性表达率比较 例 (%)

恶性胸腔积液	CK5/6	P63	TTF-1	CK7
肺鳞癌	13 (92.86)	11 (91.67)	3 (9.09)	2 (85.71)
肺腺癌	5 (10.40)	9 (27.30)	68 (87.18)	49 (94.23)
χ^2 值	31.864	14.778	61.346	26.063
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 各免疫组织化学标志物在恶性胸腔积液中的鉴别诊断

在肺鳞癌和腺癌所致恶性胸腔积液的鉴别诊断中, CK5/6 敏感性、特异性较高, 分别为 92.86% 和 89.58%; P63 敏感性较高而特异性一般, 分别为 91.67% 和 72.73%; TTF-1 敏感性、特异性较高, 分别为 87.18% 和 90.63%; CK7 敏感性较高而特异性一

般, 分别为 94.23% 和 75.00%。见表 2。

2.5 各免疫组织化学标志物的 ROC 曲线及曲线下面积

CK5/6、P63 诊断肺鳞癌所致恶性胸腔积液的 ROC 曲线下面积分别为 0.805 和 0.755; TTF-1、CK7 诊断肺腺癌所致恶性胸腔积液的 ROC 曲线下面积分别为 0.821 和 0.774。见图 3。

表 2 各免疫组织化学标志物在恶性胸腔积液中的鉴别诊断参数

标志物	肺鳞癌比例	肺腺癌比例	阳性预测值 /%	阴性预测值 /%	准确性 /%	敏感性 /%	95% CI		特异性 /%	95% CI	
							下限	上限		下限	上限
CK5/6	13/14	5/48	72.22	97.73	90.32	92.86	0.64	0.99	89.58	0.77	0.99
P63	11/12	9/33	55.00	96.00	77.78	91.67	0.60	0.99	72.73	0.54	0.86
TTF-1	3/33	68/78	95.77	74.36	88.18	87.18	0.77	0.93	90.63	0.74	0.98
CK7	2/8	49/52	96.08	66.67	91.67	94.23	0.83	0.98	75.00	0.41	0.93

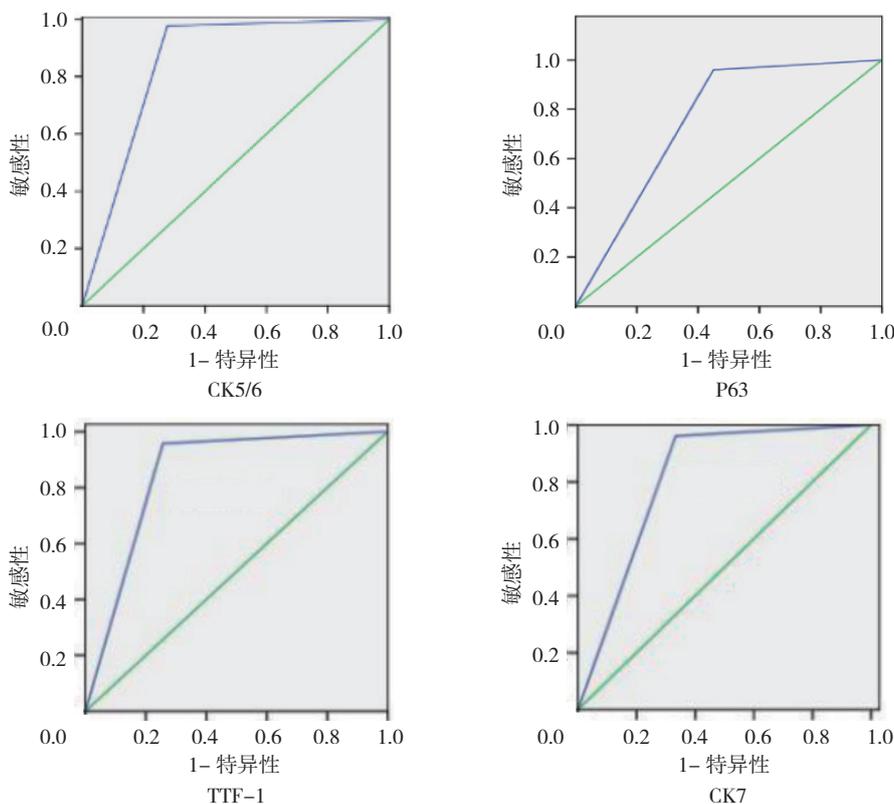


图 3 各免疫组织化学标志物诊断恶性胸水的 ROC 曲线

3 讨论

随着恶性肿瘤发病率的不断升高,临床上伴有恶性胸腔积液的患者也在逐渐增多。NSCLC 是产生恶性胸腔积液的主要原因,NSCLC 的愈后差,5 年生存率只有 13%,早期发现并明确诊断十分重要。目前,恶性胸腔积液的诊断与鉴别诊断是临床和细胞学共同面临的难题,虽然组织病理学检查是金标准,但并不是所有患者都能接受这种有创检查,所以手术或穿刺活检并不适合所有伴有胸腔积液的癌症患者。对于恶性胸腔积液,细胞病理学检查显得尤为重要,尤其是年老体弱无法获得活检组织的患者。刘芳等^[9]研究显示,浆膜腔积液细胞形态学联合免疫组化染色,补充和发展了细胞病理学对疾病的准确诊断,提高肿瘤细胞的检出率。钱红等^[4]指出 CTC 联合胸水细胞沉渣石蜡切片及免疫组织化学,既可提高确诊率,也可减少不必要的检查,具有很高的临床应用价值。

TCT 是目前国际领先的脱落细胞检查新技术。胸腔积液利用 TCT 制片,把细胞集中到直径为 2 cm 范围内,涂片背景干净,红细胞被破坏掉,细胞分布均匀,结构特别清晰。TCT 优化了标本制作,提高了制片质量,改善了观察效果;细胞结构清晰,三维立体感突出,易于识别,明确诊断。根据 TCT 检查结果,可初步筛选出恶性和可疑恶性的胸腔积液标本,但对由 NSCLC 致胸腔积液进行分型诊断,还需进一步做免疫组织化学染色。

CK5/6 主要表达鳞状上皮的基底细胞,P63 表达于复层上皮细胞及多个器官的基底层细胞中,可用于肺鳞癌和肺腺癌的鉴别诊断。本研究显示 CK5/6 和 P63 在肺鳞癌致恶性胸水中呈高表达,而在肺腺癌致胸水中呈低表达,与 MUKHOPADHYAY 等^[5]的研究结果一致;CK5/6 和 P63 诊断肺鳞癌致恶性胸水有较高的敏感性和特异性,与其他学者报道 P63 独立诊断肺鳞癌的敏感性为 90% ~ 100%,特异性为 68% ~ 96% 相符^[6-8];且 CK5/6 和 P63 的 AUC 为 0.805 和 0.755,进一步证明 CK5/6 和 P63 可以作为肺鳞癌致恶性胸水的生物标志物。

TTF-1 在原发性肺恶性肿瘤中主要表达于肺腺癌,在其他组织类型的肺癌中表达较少甚至不表达,CK7 多在卵巢、肺及乳腺的上皮细胞质中表达,主要标记于腺上皮和移行上皮,在鳞状上皮不表达。本研究结果显示,TTF-1 和 CK7 在肺腺癌所致的恶性胸水中呈高表达,而在肺鳞癌所致的胸腔积液中呈低表达;

TTF-1 和 CK7 诊断肺腺癌所致的恶性胸腔积液的敏感性、特异性较高,且 AUC 较高,进一步说明 TTF-1 和 CK7 诊断肺腺癌致恶性胸腔积液的价值较高,说明 TTF-1 和 CK7 可以作为肺腺癌致恶性胸腔积液的生物标志物,这与余何等^[9]的结果相符。

综上所述,在恶性胸腔积液中,运用 TCT 联合免疫组织化学染色检测,对于良恶性胸腔积液的鉴别诊断及 NSCLC 致恶性积液的分型诊断,具有较好临床应用价值,这与邹萍等^[10]研究显示 TCT 联合细胞免疫组织化学能够准确判断肿瘤病理学分型的结论相一致,值得在临床细胞病理学诊断工作中推广应用。

参考文献:

- [1] MONSONEGO J, AUTILLO-TOUATI A, BERGERON C, et al. Liquidbased cytology for primary cervical cancer Screening: a multi centre study[J]. British Journal of Cancer, 2001, 84(3): 360-361.
- [2] MAREL M, ANUSTOVA M, STASNY B, et al. Incidence of pleural effusion in a well-defined region: epidemiologic study in central bohemia[J]. Chest, 1993, 10(4): 1486-1489.
- [3] 刘芳,何欣,李晓琴. 免疫组化标志物在鉴别浆膜腔积液恶性肿瘤细胞中的应用价值[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(2): 201-204.
- [4] 钱红,钟鹏,赵娟霞,等. 多种细胞学方法联合检查不明原因渗出性胸腔积液的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(03): 433-435.
- [5] 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.
- [6] KIM M J, SHIN H C, SHIN K C, et al. Best immunohistochemical panel in distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of Lung: tissue microarray assay in resected lung cancer specimens[J]. Ann Diagn Pathol, 2013, 17(1): 85-90.
- [7] WHITHAUS K, FUKUOKA J, PRIHODA T J, et al. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, P63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung cell[J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(2): 155-162.
- [8] REKHTMAN N, ANG D C, SIMA C S, et al. immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens[J]. Mod Pathol, 2011, 24(10): 1348-1359.
- [9] 余何,李楠,刘丹,等. TTF-1, NapsinA, P63 和 CK5/6 在肺癌组织的表达与分型诊断的价值[J]. 四川大学学报(医学版), 2017, 48(03): 336-341.
- [10] 邹萍,胡怀远,宋瑞,等. 液基细胞学检测技术在肺癌诊断中的作用[J]. 安徽医药, 2018, 22(1): 105-108.

(李科 编辑)