

• 临床研究 •

晚期非小细胞肺癌患者胸水液基细胞学蜡块中新抗体 D5F3 检测的临床价值

福建医科大学教学医院 福建省福州肺科医院病理科 (福州 350008) 林清华 吴联平 刘加夫 陈友轩
齐春能 林玉琼 黄小红 郑 静

【摘要】 目的 探讨晚期非小细胞肺癌患者胸水液基细胞学蜡块中 ALK 新抗体 D5F3 检测的临床价值。**方法** 选择 200 例经胸膜活检确诊的非小细胞肺癌且胸水发现癌细胞患者的胸水, 将其制成液基细胞学蜡块, 应用 ALK 新型抗体 D5F3 检测该基因蛋白表达情况, 分别从阴性、阳性 (1~3+) 对比其在两种标本中的表达异同。**结果** 200 例液基细胞学蜡块标本检测显示, 9 例 ALK 阳性 (1~3+), 191 例 ALK (-), 阳性率 4.5%。阳性胸水的组织学类型均为腺癌, 其中, 1 例 (+), 5 例 (2+), 3 例 (3+); ≤60 岁的 6 例, >60 岁的 3 例 (中位年龄 51 岁), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 男性 5 例, 女性 4 例。与同一患者的胸膜活检标本 ALK 表达情况完全一致, 符合率为 100%。**结论** ALK 蛋白阳性多见于晚期肺腺癌中较年轻的患者, D5F3 新抗体在晚期 NSCLC 患者的胸膜活检组织及胸水液基细胞学蜡块中表达情况一致。胸水液基细胞块可作为检测 ALK 蛋白的样本。对原发性肺腺癌合并胸膜转移出现恶性胸腔积液的患者, 可根据胸腔积液沉渣包埋标本 ALK 蛋白表达指导临床靶向治疗。

【关键词】 D5F3; 非小细胞肺癌; 胸水液基; 细胞学蜡块; ALK 蛋白

【中图分类号】 R365; R734.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)01-0003-03

Clinical value of D5F3 in hydrothorax fluid based cytological wax block in patients with advanced non-small cell lung cancer

LIN Qinghua, WU Lianping, LIU Jiafu, CHEN Youxuan, QI Chunheng, LIN Yuqiong, HUANG Xiaohong, ZHENG Jing. Department of Pathology, Fuzhou Pulmonary Hospital, Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350008, China

【Abstract】 Objective To analyze the clinical value of ALK new antibody D5F3 in the application of hydrothorax liquid-based cytological wax blocks in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Methods** The pleural effusions of 200 patients diagnosed as non-small cell lung cancer by pleural biopsy and with cancer cell found in the pleural effusion were chosen, and were made into liquid based cytology wax block. ALK D5F3 new antibody (CST company) was applied to detect the gene protein expression. The similarities and differences of the expression in the two kinds of specimens were compared respectively from the negative and positive (1-3+). **Results** The results showed that 9 cases were ALK positive (1-3+) and 191 cases were ALK negative (-). There were one case (+), five cases (2+) and three cases (3+). There were six patients aged less than or equal to 60 years old, three patients aged old than 60 years old and the median age was 51, with statistically significant difference ($P < 0.05$). There were five males and four females. The expression of pleural biopsy specimen was completely consistent with that of the same patient, and the coincidence rate was 100%. **Conclusion** ALK protein positivity is more common in younger patients with advanced lung adenocarcinoma, and D5F3 expression is consistent in pleural biopsy tissues and hydrothorax cytological wax blocks of advanced NSCLC patients. Hydrothorax-based cells can be used as samples to detect ALK protein. For patients with malignant pleural effusion due to primary lung adenocarcinoma complicated by pleural metastasis, ALK protein expression can be detected according to pleural effusion sediment embedded specimens to guide clinical targeted treatment.

【Key words】 D5F3; non small cell lung cancer; hydrothorax liquid-based; Cell block; ALK protein

肺癌是全世界死亡率最高的恶性肿瘤, 每年新增肺癌人群超过 65 万人, 其中 80%~85% 为非小细胞肺癌 (NSCLC), 其治疗以铂类药物化疗为主, 临床疗效不到 15%^[1]。随着基因组学研究的不断

发展, 分子靶细胞已成为治疗 NSCLC 的研究热点, 其中棘皮动物微管相关蛋白样 4-间变性淋巴瘤激酶 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK)

是继 EGFR 肺癌 EGFR 基因之后发现的肺癌分子新靶点^[2-3]，临床上对如何筛选该靶点阳性的患者成为关注的主要问题^[4]。肺癌的诊断主要依靠小活检或细胞学标本的病理分析，晚期肺癌患者常常出现胸水。本研究收集 200 例经胸膜活检确诊的 NSCLC，且胸水有癌细胞的样本，将其制成液基细胞学蜡块，应用 ALK 新型抗体 D5F3 检测该基因蛋白在胸膜活检标本和液基细胞学蜡块中的表达情况，进而评估该指标检测的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般临床：收集 2015 年 7 月至 2018 年 1 月我科经胸膜活检确诊的 200 例 NSCLC 且胸水发现癌细胞的胸水样本，将其制成液基细胞学蜡块。其中，男性 95 例，女性 105 例；年龄为 32~92 岁，中位年龄 66 岁；腺癌 197 例，鳞癌 3 例。由两名有经验的病理科医生对 CK5/6, P40, TTF-1, CK7, MOC31, NapsinA 等免疫组化染色结果阅片，确认 NSCLC 病理类型。

1.2 方法：

1.2.1 液基细胞蜡块及胸膜活检标本制作：1) 液基细胞蜡块制作：取胸腔积液置于有保存液的 50 mL 试管中，试管底部接触震荡器，震荡 30 s，使细胞完全混匀于标本瓶保存液中，3 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，用吸管吸取 50 mL 离心管底部的细胞团，挤出于对应号码的小宣纸上，静置 10 min，在细胞团上滴一滴伊红染色液，包好、常规脱水，石蜡包埋、切片，HE 染色、光镜观察。2) 胸膜活检标本均经 10% 中性福尔马林固定，常规脱水，石蜡包埋，4 μ m 厚切片，HE 染色，光镜观察。

1.2.2 免疫组织化学分析：每批染色将已知阳性片作为阳性对照，正常胸膜组织为阴性内对照。免疫组化染色采用 EliVision 两步法。选择 TTF-1、CK-7、Napsin A、CK5/6、P40 和 MOC31 作为转移性肺腺癌诊断和鉴别诊断指标。所有抗体及二抗试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。ALK (D5F3) XP 兔单抗试剂购自美国 CST 中国分公司，EliVision 试剂盒购自福州迈新公司。ALK (D5F3) 抗体按 1:100 稀释，新鲜配制 DAB 显色剂显色。染色步骤按照试剂盒说明书进行手工操作。

1.2.3 结果判读：CK-7、Napsin A、CK5/6、MOC31 以胞质着棕黄色为阳性，TTF-1、P40 以细胞核着棕黄色为阳性。D5F3 的判读标准：肿瘤

细胞明确无着色为 (-)；>5% 肿瘤细胞呈微弱或模糊的胞质着色为 (+)；>5% 肿瘤细胞呈中等强度胞质着色为 (2+)；>5% 肿瘤细胞呈颗粒状胞质强着色为 (3+)。由两名有经验的病理科诊断医生进行 D5F3 结果判读。判读时应排除以下非特异性染色因素，如组织中浸润的淋巴细胞非特异性着色以及在肿瘤坏死区域、分泌黏液区的背景染色。注意排除假阳性，如包膜着色无意义。

1.3 统计学分析：采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析处理。计数资料以频数表示，采用 χ^2 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织及细胞形态观察：胸膜活检组织可见肿瘤细胞巢团状分布，呈腺样、筛孔样、乳头状或实性 (图①，封三)。液基细胞学蜡块中细胞形态表现为腺癌细胞大小不一，多堆叠成团或呈花瓣样、花环样排列，也有单个散在癌细胞，细胞核大而深染，染色质不均匀，胞质部分有空泡 (图②，封三)。鳞癌细胞大小不一，多排列成小片状或单个散在，细胞呈梭形，部分看见角化，细胞排列具有一定的极向。

2.2 免疫组织化学染色：患者胸腔积液沉渣包埋标本 CK-7 肿瘤细胞胞质阳性 (图③，封三)，TTF-1 肿瘤细胞核阳性 (图④，封三)，Napsin A 肿瘤细胞胞质阳性 (图⑤，封三)，MOC31 肿瘤细胞胞质阳性 (图⑥，封三)，证实为原发性肺腺癌胸膜转移产生的恶性胸腔积液，CK5/6 阴性除外恶性间皮瘤；CK5/6 细胞胞浆阳性，P40 细胞核阳性，证实为鳞癌胸膜转移产生的恶性胸腔积液。

2.3 ALK 蛋白表达：200 例液基细胞学蜡块标本检测显示，9 例 ALK 阳性 (1~3+，图⑦，封三)，191 例 ALK (-)，阳性率 4.5%。阳性胸水的组织学类型均为腺癌，其中，1 例 (+)，5 例 (2+)，3 例 (3+)； ≤ 60 岁的 6 例， > 60 岁的 3 例 (中位年龄 51 岁)，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；男性 5 例，女性 4 例。与同一患者的胸膜活检标本 ALK 表达情况完全一致 (图⑧，封三)，符合率为 100%。

3 讨论

ALK 融合基因是具有致癌性的变异基因，其具有独特的临床病理特征和相对高的阳性率。2007 年，Soda 等^[4]首次在 1 例 62 岁肺腺癌患者的手术切除标本中发现了 ALK 融合基因，随后该基因迅速成为肺癌分子靶向治疗领域的研究热点。Shaw

等^[5]发现,肺腺癌 ALK 融合基因的阳性率为 13%,其已成为晚期 NSCLC 临床治疗的新靶点^[6]。ALK 融合基因表达常见于年轻、不吸烟或少吸烟肺腺癌患者,偶见于腺鳞癌患者^[7]。国内外学者报道,ALK 融合基因在腺癌中阳性率为 3%~13%^[8-10]。本研究 200 例胸水细胞学蜡块中 ALK 阳性 9 例,阳性率为 4.5%,与文献报道的相符;ALK 阳性患者比阴性患者更年轻,无明显性别差异,这也与以往报道一致^[10-11]。本组患者中,胸水及胸膜活检中腺癌的类型远远高于鳞癌(腺癌 197 例,鳞癌 3 例),ALK 阳性率在腺癌中也显著高于鳞癌。

针对 ALK 融合基因的小分子抑制剂克唑替尼是一种 ATP 竞争性酪氨酸酶抑制剂,对 ALK 阳性的晚期 NSCLC 患者临床疗效较好,中位无进展生存期长,客观有效率较高^[12]。临床上如何寻找 ALK 阳性患者是急需解决的问题,目前的方法主要是对手术的组织标本进行检测确定;然而临床实践中,许多患者均为晚期,晚期患者常伴发胸水,只能得到小活检标本或细胞学标本。有文献报道,晚期肺癌患者常伴发胸水,对于取得组织困难但又迫切希望进行个体化治疗的患者,积液细胞块可作为一种新的检测标本来源^[13]。基于我国肺癌患者众多,“中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊断专家共识(2013 版)”指出细胞学标本可用于 ALK 检测,细胞块(cell block)样本可用于 FISH 或 IHC 法检测^[14]。

本研究对 200 例同一患者的胸膜活检标本及胸水液基细胞学蜡块进行 ALK 检测,对比其在两种不同来源标本的表达情况,发现 ALK 蛋白阳性表达的结果一致。

综上所述,胸水液基细胞学标本具有取材方式微创、可以当场评价,并立即补充取材以确保充足的肿瘤细胞量等优点;对无法获得组织标本的晚期肺腺癌患者,胸腔积液沉渣包埋标本可用于 ALK 蛋白表达检测,为是否进行分子靶向治疗提供参考。

参考文献

- [1] 徐风华,郭荣荣,李欣,等.非小细胞肺癌患者 ERCC1 表达与铂类药物化疗敏感性的相关性的系统分析[J].中国临床药理学与治疗学,2013,18(1):45-50.
- [2] Zhu J, Cai L, Yang H, et al. Echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase rearrangement and epidermal growth factor receptor mutation coexisting in Chinese patients with lung adenocarcinoma [J]. Thoracic Cancer, 2014, 5 (5): 411-416.
- [3] 石远凯,孙燕.非小细胞肺癌分子靶向治疗的发展趋势[J].中华肿瘤杂志,2014,36(7):481-484.
- [4] Soda M, Choi Y L, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EMIA. ALK fusion geBe in non small cell lung cancer [J]. Nature, 2007, 448 (7153): 561-566.
- [5] Shaw A T, Yeap B Y, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EMIA-ALK [J]. J Clin Oncol, 2009, 27 (26): 4247-4253.
- [6] 王丽杰,郭其森. EMIA-ALK 融合基因——晚期非小细胞肺癌临床治疗新靶标 [J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2014, 7 (1): 94-97.
- [7] Gridelli C, Solange P, Sgambato A, et al. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40 (2): 300-306.
- [8] 朱翔,李红威,曹宝山,等. 525 例肺癌中 ALK 阳性病例临床病理特征研究及检测方法探讨 [J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17 (3): 226-232.
- [9] Xia N, An J, Jiang Q Q. et al. Analysis of EGFR, EMIA-ALK, KRAS, and c-MET mutations in chinese lung adenocarcinoma patients [J]. Exp Lung Res, 2013, 39 (8): 328-335.
- [10] 陈学敬,周立娟,董宇杰,等. Ventana 全自动免疫组化法检测不同来源肺腺癌 ALK 蛋白表达一致性的研究 [J]. 诊断病理学杂志, 2016, 23 (4): 259-262.
- [11] 陈颖,高丽丽,王彦丽,等. 间变性淋巴瘤激酶阳性肺腺癌细胞病理学特点初探 [J]. 中华病理学杂志, 2015, 44 (9): 628-632.
- [12] Solomon B J, Mok T, Kim D W, et al. First line erizotinib versus chemotherapy in ALK. positive lung cancer [J]. N Engl J Med, 2014, 371 (23): 2167-2177.
- [13] 杨红,王影,覃胜,等. 浆膜腔积液细胞块对提高细胞学诊断及开展基因检测的价值 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (21): 9489-9493.
- [14] 张旭超,陆舜,张力,等. 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊断专家共识(2013 版) [J]. 中华病理学杂志, 2013, 6 (42): 402-406.

[1] 徐风华,郭荣荣,李欣,等.非小细胞肺癌患者 ERCC1 表达与