

TTF-1 临床检测诊断 pN₀ 期肺腺癌淋巴结微转移

刘 宏, 叶玉坤, 李桂梅, 周 源, 韩开宝, 许 罡, 汪 栋
(第二军医大学八一医院临床学院, 中国人民解放军第 81 医院, 江苏 南京 210002)

摘 要: [目的] 探讨检测甲状腺转录因子-1 (TTF-1) 对肺腺癌淋巴结微转移的诊断价值。[方法] 选取 54 例术后常规 HE 诊断为 N₀ 期, 且肿瘤原发灶 TTF-1 表达阳性的肺腺癌病例, 采用免疫组化法检测 TTF-1 在 54 例患者共 893 枚淋巴结中的表达。选取同期明确淋巴结转移且原发灶 TTF-1 表达阳性的肺腺癌病例作为阳性对照, 5 例肺良性病变术中取 5 枚肺内或纵隔淋巴结作为阴性对照。[结果] 54 例患者 893 枚淋巴结中检测出 9 例共 21 枚淋巴结阳性, 阳性淋巴结检出率 2.4% (21/893), 微转移病例检出率 16.7% (9/54)。TTF-1 在阳性对照组淋巴结中均表达, 在阴性对照组中无表达。[结论] 采用免疫组化法检测淋巴结中 TTF-1 表达, 可以发现并诊断肺腺癌淋巴结微转移。
关键词: 肺腺癌; 淋巴结微转移; 甲状腺转录因子-1; 免疫组化
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)04-0303-03

Detection of TTF-1 for Diagnosis of Lymph Node Micrometastasis at pN₀ Stage of Lung Adenocarcinoma

LIU Hong, YE Yu-kun, LI Gui-mei, et al.

(The 81st Hospital Clinical Institute of the Second Military Medical University, The 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the diagnostic value of detection of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) for lymph node micrometastasis in lung adenocarcinomas. [Methods] Fifty-four pN₀ stage (node negative according to histologic examination) lung adenocarcinoma patients with positive expression of TTF-1 in primary lung adenocarcinoma nodules were involved in this study. The TTF-1 expression in 893 lymph nodes from the patients were detected by immunohistochemical method. The metastasis lymph nodes from lung adenocarcinoma patients with the positive expression of TTF-1 in primary nodules were selected as positive control, 5 lymph nodes from 5 patients of lung benign lesion were selected as negative control. [Results] Among 893 lymph node samples from 54 patients, 21 lymph node samples from 9 patients was found positive. The rate of positive lymph node was 2.4%. The rate of the patients with micrometastasis in lymph node was 16.7%. TTF-1 expressed in all of lymph nodes of the positive control group, none of lymph node showed TTF-1 expression in negative control group. [Conclusion] The immunohistochemistry assay of TTF-1 is a potential method for the diagnosis of micrometastasis in lymph node of lung adenocarcinoma patients.

Key words: lung adenocarcinoma; lymph node micrometastasis; thyroid transcription factor-1; immunohistochemistry

在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中, TNM 分期系统作为评估预后和指导临床治疗的指南一直被广泛采用。临床上即使接受根治性手术 (肿瘤完全切除和系统性淋巴结清扫) 的 I 期 NSCLC 仍有 25%~50% 复发, 5 年生存率也仅为 57%~85%, 提示常规病理检查难以发现的淋巴结微转移与术后复发及生存期可能均存有相关性^[1]。甲状腺转录因子-1 (thyroid transcription factor-1, TTF-1) 是一类高度保守的转录因子, 位于人染色体

14q13^[2], 其在肺组织形成早期阶段即开始表达并且终生表达^[3,4]。本研究以 TTF-1 作为标志物, 检测其在肺腺癌根治术后常规病理检查阴性的淋巴结中的表达, 以确定淋巴结微转移的存在情况, 并验证其作为淋巴结微转移检测标志物的可行性。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选取我科 2008 年 1 月至 2010 年 8 月术后分期 N₀ 期肺腺癌, 淋巴结常规 HE 染色阴性、免疫组化检

收稿日期: 2012-02-22

基金项目: 南京军区医药卫生重点项目 (07Z011)

通讯作者: 汪 栋, E-mail: nj.dongwang@yahoo.com.cn

测肿瘤原发灶 TTF-1 表达阳性病例 54 例,占同期肺腺癌病例 94.7%(54/57 例)。其中男性 33 例,女性 21 例;年龄 46~81 岁,中位年龄 66.5 岁;周围型肺癌 47 例,中央型肺癌 7 例;肿瘤直径 $\leq 2\text{cm}$ 14 例,2~3cm 13 例,3~5cm 20 例,5~7cm 4 例,>7cm 3 例;高分化 12 例,中分化 21 例,低分化 21 例。淋巴结数 6~37 枚/例,共 893 枚。选取同期明确淋巴结转移且原发灶 TTF-1 表达阳性的肺腺癌病例 10 例,每例各 2 枚显性转移淋巴结作为阳性对照;2010 年 8 月至 2011 年 5 月 5 例肺良性病变术中取 5 枚肺内或纵隔淋巴结作为阴性对照。

1.2 方 法

实验所使用一抗、二抗均购自北京中杉公司,鼠抗人 TTF-1 单克隆抗体(编号:SDT24)。

1.2.1 实验方法

取淋巴结蜡块制成 3 μm 厚切片 1 张(淋巴结最大径切片)。采用免疫组化 Envision 法:(1)预置石蜡切片置于 56℃ 烤箱过夜,二甲苯脱蜡,再于梯度乙醇水化,3%过氧化氢水室温孵育 10min;(2)抗原修复(柠檬酸抗原修复法,pH=6.0),温度达 120℃ 计时 2min,室温冷却,PBS 冲洗;(3)一抗孵育,抗体滴加后 4℃ 过夜;(4)PBS 冲洗,二抗孵育(室温下孵育 20min),PBS 冲洗;(5)DAB 显色,流水洗涤,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,切片干燥后中性树脂封片。

1.2.2 结果判定标准

石蜡切片中出现散在的单个细胞或直径 $\leq 2\text{mm}$ 的细胞团,其胞核内出现褐色颗粒为阳性,即存在淋巴结微转移^[5,6],阳性判定以阴性对照为基础。无黄色颗粒为阴性,即无微转移。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计学软件分析数据,微转移率间比较行 Fisher 确切概率法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 淋巴结中 TTF-1 表达

54 例 N₀ 期肺腺癌共 893 枚淋巴结中,检出 9 例共 21 枚 TTF-1 表达阳性淋巴结(图 1),即 9 例 N₀ 期患者存在淋巴结微转移,阳性淋巴结检出率为 2.4%(21/893)。HE 染色显示微转移淋巴结边缘见数个上皮样细胞,呈条索状排列(图 2)。

10 例阳性对照患者转移淋巴结 TTF-1 均阳性表达,5 枚阴性对照淋巴结 TTF-1 表达均阴性。

2.2 淋巴结微转移与肺腺癌临床病理特征的关系

淋巴结微转移的发生与肺腺癌分化程度、肿瘤

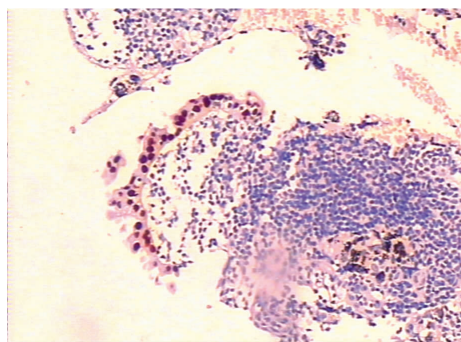


图 1 N₀ 期肺腺癌淋巴结 TTF-1 散在细胞核内表达(IHC×100)

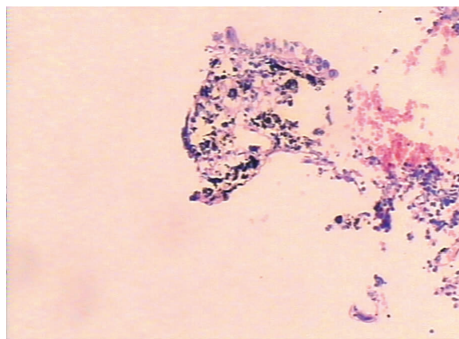


图 2 微转移淋巴结边缘见数个上皮样细胞,条索样排列(与图 1 同一位置,HE×100)

表 1 淋巴结微转移与肺腺癌临床病理学特征的关系

临床病理特征	例数	淋巴结微转移		P 值
		阳性例数	阳性率(%)	
年龄(岁)				
<55	7	2	28.6	>0.05
≥55	47	7	14.9	
性别				
男性	33	3	9.09	>0.05
女性	21	6	28.6	
肿瘤位置				
周围	47	4	8.51	<0.05
中央	7	5	71.4	
T 分期				
T ₁	27	4	14.8	>0.05
T ₂ ~T ₄	27	5	18.5	
分化程度				
低	21	8	38.1	<0.05
中+高	33	1	3.03	

位置有关($P<0.05$),而与年龄、性别、T分期无关($P>0.05$),见表1。

3 讨论

肺癌的发病率居恶性肿瘤的首位。Pfannschmidt等^[7]的大样本回顾性分析指出,I期与II期NSCLC的5年生存率有显著差异,而Ia期与Ib期之间、Ib期与IIa期之间却无统计学差异(分别为68.5%、66.6%、55.3%);针对术后N分期(pN)的分析发现,随N分期的增高,5年生存率呈明显下降趋势(N_0 63.7%, N_1 47.3%),显示淋巴结转移受累对术后生存期影响明显。研究资料^[8]表明,有区域淋巴结微转移的NSCLC患者其5年中位生存期明显短于无淋巴结微转移患者,提示NSCLC淋巴结微转移与术后复发及生存期存有相关性。早期NSCLC预后不理想的结果可能与手术时就已经存在的淋巴结微转移有关^[9]。

目前临床上诊断肺癌淋巴结转移的常规手段是基于区域淋巴结的常规病理检测,且每枚淋巴结取1~2张石蜡切片行HE染色,该方法简便、实用,对显性淋巴结转移漏诊率低,但其受主观影响较大,对发现和评估淋巴结微转移价值甚微。免疫组化是目前在检测淋巴结微转移中比较成熟,采用较多的一种方法,该方法敏感性较高^[10],同时又可以直接通过显微镜进行形态学观察,减少病理医师误诊率。

在NSCLC淋巴结微转移研究中,目前仍没有统一的灵敏度、特异性均较好的微转移标志物,广谱细胞角蛋白抗体AE1/AE3抗体应用较多,但正常淋巴结中CK表达率达10%~63%^[11],其假阳性率限制了其临床应用。TTF-1属于Nkx-2基因家族,是一种DNA结合蛋白,分子量为38kD,在肺、甲状腺和部分间脑都有表达。TTF-1在胚胎肺组织、正常肺组织及肺癌的组织中均有表达^[3]。TTF-1在肺癌不同的组织类型中有不同的表达,在肺腺癌和小细胞肺癌的表达量要比肺鳞癌和大细胞肺癌中的表达量要高^[12],并在其转移淋巴结中表达^[13]。目前尚未发现TTF-1在正常淋巴结中表达。本研究TTF-1在肺腺癌中的阳性表达率为94.7%,表达缺失可能为肺腺癌存在TTF1基因错义突变和同义突变^[12]。本组原发灶TTF-1表达阳性病例中,常规HE检测明确淋巴结转移的淋巴结TTF-1表达均阳性,阴性对照组淋巴结TTF1均无表达。提示针对原发灶TTF-1表达阳性病

例,行免疫组化检测淋巴结TTF-1表达可以发现常规HE染色难以发现的淋巴结微小转移灶,从而有助于诊断肺癌淋巴结微转移。本结果提示淋巴结微转移的发生与肺腺癌的分化程度、生长部位有关,而与患者年龄、性别、T分期无关。

评估NSCLC淋巴结微转移对更准确的术后分期、制定合理的个体化治疗方案及临床预后评估等均有重要意义。

参考文献:

- [1] 刘宏,叶玉坤,汪栋.非小细胞肺癌淋巴结微转移研究进展[J].肿瘤学杂志,2011,17(7):481-484.
- [2] Nakamura N,Miyagi E,Murata SI,et al. Expression of thyroid transcription factor-1 in normal and neoplastic lung tissues [J]. Mod Pathol, 2002, 15(10):1058-1067.
- [3] Santisteban P,Bernal J. Thyroid development and effect on the nervous system:a review [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2005, 6(3): 217-218.
- [4] DeFelice M,Silberschmidt D, DiLauro R, et al.TTF-1 phosphorylation is required for peripheral lung morphogenesis, perinatal survival, and tissue-specific gene expression[J]. J Biol Chem, 2003, 278(37): 35574-35583.
- [5] AJCC. Cancer Staging Manual [M]. 7th Ed. New York: Springer, 2009.
- [6] UICC. TNM Classification of Malignant Tumors[M]. 7th Ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2009.
- [7] Pfannschmidt J,Muley T,Bülzebruck H, et al. Prognostic assessment after surgical resection for non-small cell lung cancer:experiences in 2083 patients [J]. Lung Cancer, 2007, 55(3): 371-377.
- [8] Mineo TC, Ambrogi V, Pompeo E, et al. Immunohistochemistry-detected microscopic tumor spread affects outcome in en bloc resection for T3-chest wall lung cancer[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2007, 31(6): 1120-1124.
- [9] Herpel E, Muley T, Schneider T, et al. A pragmatic approach to the diagnosis of nodal micrometastases in early stage non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(8): 1206-1212.
- [10] Mario N,Monica F,Alessandro P,et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction detection of lymph node lung cancer micrometastasis using carcinoembryonic antigen marker[J]. Chest, 2005, 128(3): 1539-1544.
- [11] Tezel C,Ersev A,Kiral H,et al. The impact of immunohistochemical detection of positive lymph nodes in early stage lung cancer[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 54(2): 124-128.
- [12] Bai XY,Shen H. Mutational analysis of thyroid transcription factor-1 gene (TTF-1) in lung carcinomas [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2008, 44(1-2): 17-25.
- [13] Boggaram V. Thyroid transcription factor-1(TTF-1/Nkx2.1/TITFI) gene regulation in the lung [J]. Clin Sci(Lond), 2009, 116(1): 27-35.