

D2-40 在浆膜腔积液中的诊断价值

The Diagnosis Value of D2-40 in the Serous Cavity Effusion

ZHAO Ying, ZHANG Ji-xian, WU Xiao-dong

赵 莺, 张继贤, 吴晓东

(宁波大学医学院附属阳明医院, 余姚市人民医院, 浙江 宁波 315400)

摘要: [目的] 观察 D2-40 在浆膜腔积液间皮瘤细胞中的表达情况, 并与目前常用的间皮瘤抗体进行比较, 探讨其鉴别诊断价值。[方法] 采用细胞块技术对 88 例浆膜腔积液进行免疫组化检测, 观察 D2-40、Calretinin、CK5/6 的表达, 并通过受试者工作曲线(ROC)对检查结果分析, 根据各指标的 AUC 值探讨 D2-40 在浆膜腔积液中的诊断价值。[结果] D2-40、Calretinin、CK5/6 在恶性间皮瘤细胞中的阳性表达率分别为 89.3%、92.5%、71.4%, 转移性癌中表达率分别为 8.3%、12.5%、27.0%, 增生间皮细胞中阳性率分别为 83.3%、83.3% 和 66.7%。三种标志物在恶性间皮瘤、转移性腺癌及增生间皮细胞表达差异有显著性意义($P < 0.05$)。D2-40 灵敏度与 Calretinin 相当, 高于 CK5/6, 特异性高于 Calretinin、CK5/6。ROC 曲线下显示 D2-40 的 AUC 值高于 Calretinin 和 CK5/6。[结论] D2-40 有望成为鉴别上皮型间皮瘤和转移性腺癌的有价值的抗体。

主题词: 浆膜腔积液; D2-40; 鉴别诊断

中图分类号: R730.43 **文献标识码:** B

文章编号: 1671-170X(2014)11-0959-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.11.B018

浆膜腔积液细胞蜡块中鉴别恶性胸膜间皮瘤和腺癌是病理诊断中的难题, 免疫组织化学技术是目前主要的鉴别诊断手段。然而, 目前尚无对恶性间皮瘤细胞完全敏感或者特异的单一抗体。D2-40 是近年才商业化的抗 M2A 癌胚抗原的单克隆抗体, 该抗体可以选择性地表达于淋巴内皮细胞及淋巴组织起源的肿瘤。有报道显示, D2-40 在间皮瘤组织细胞中高度表达, 可用于间皮瘤的鉴别诊断^[1,2], 本研究拟采用细胞蜡块技术检测 D2-40 在恶性间皮瘤细胞中的表达情况, 并将 D2-40 与目前常用的间皮瘤抗体进行比较和评估。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集余姚市人民医院自 2005 年 1 月至 2013 年 8 月送细胞室检查的恶性胸腔积液标本 88 例, 其中转移性腺癌 48 例, 恶性上皮型间皮瘤 28 例, 反应性增生间皮细胞 12 例。其中, 48 例转移性腺癌原发部位: 肺癌 28 例, 卵巢癌 10 例, 胃癌 6 例, 乳腺癌 4 例; 28 例恶性间皮瘤原发部位: 胸膜恶性间皮瘤 22 例, 腹膜恶性间皮瘤 6 例; 12 例反应性间皮细胞为结核等非肿瘤性积液。恶性间皮瘤的诊断依据临床表现、影像

学、病理(细胞学与组织学)以及免疫组织化学确诊, 转移性腺癌经组织学或临床、影像及其他临床资料证实。所有病例胸腔积液均经过常规细胞学检查找到恶性肿瘤细胞。

1.2 标本处理

所有胸腔积液标本均经 500r/min 离心 10min, 弃上清液, 沉淀物先作普通图片, 每次 2 张, 常规细胞学检查, HE 染色, 树胶封固。剩余的离心沉淀物加入甲醛固定 6~12h, 拭镜纸包裹, 按常规组织病理学方法进行脱水, 石蜡包埋, 制成蜡块。

1.3 D2-40 免疫细胞化学检查

细胞蜡块连续切片, 切片厚度 4~6 μ m, 免疫细胞化学采用链球菌生物蛋白—过氧化酶(SP)法。免疫组织化学第一抗体分别选用 D2-40、CK5/6、Calretinin 试剂, 均购于 Dako 公司(即用型产品), 严格按照试剂盒说明书操作。为了客观的评价抗体的特异性, 每种抗体都用已知的阳性组织作为对照, 同时采用 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.4 评价标准

用半定量法评价, 只有细胞膜呈棕黄色判定为阳性。按如下方法评分: 0 分: 细胞膜无黄色颗粒; 1 分: 1%~10%的细胞膜呈黄色染色(+); 2 分: 11%~100%的细胞膜呈棕黄色染色(++). (+)~(++)均计为阳性。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 对 3 种标志物在不同组织中表达差异采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。灵敏度=真阳性病例数/(真阳性病例数+假阳性病例数) $\times$ 100%, 特异性=真阴性病例数/(真阴性病例数+假阴性病例数) $\times$ 100%, 对检查结果作图绘制 ROC 曲线, 计算曲线下面积(AUC)。根据 Wsets 标准^[3]进行评估诊断的价值。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

28 例上皮型间皮瘤细胞胞膜有 89.3%(25/28)D2-40 反应阳性, 免疫定位在细胞膜, 其中强阳性(++)21 例, 中等强度阳性(+)4 例; 48 例转移性腺癌仅有 8.3%(4/48)D2-40 局部弱阳性表达, 着色部位位于胞浆; 12 例增生间皮细胞 D2-40、Calretinin、CK5/6 呈弱阳性表达, 阳性率分别为 83.3%(10/12)、83.3%(10/12)和 66.7%(8/12)。28 例上皮型间皮瘤细胞 Cal-

基金项目: 浙江省余姚市科技局计划项目(2009Y05)

通讯作者: 张继贤, 副主任医师, 硕士; 宁波大学医学院附属阳明医院, 余姚市人民医院呼吸科, 浙江省宁波市余姚市城东路 800 号(315400); E-mail: jixianzhang2008@sina.com.cn

收稿日期: 2014-01-02; **修回日期:** 2014-03-16

Table 1 The expressions of D2-40,Calretinin,CK5/6 in malignant mesothelioma,metastatic adenocarcinoma and mesothelial cells

Antibody	Malignant mesothelioma				Metastatic adenocarcinoma				Mesothelial cells				H	P
	-	+	++	Positive rate(%)	-	+	++	Positive rate(%)	-	+	++	Positive rate(%)		
D2-40	3	4	21	89.3	44	4	0	8.3	2	10	0	83.3	68.358	0.00
Calretinin	2	6	20	92.5	42	6	0	12.5	2	10	0	83.3	59.856	0.00
CK5/6	8	11	9	71.4	35	13	0	27.0	4	8	0	66.7	20.622	0.00

retiniin 阳性率 92.5%(26/26),其中强阳性(++)20 例,中等强度阳性(+)6 例,Calretinin 胞浆和核阳性;48 例转移性腺癌有 12.5%(6/48)Calretinin 弱阳性表达。28 例间皮瘤细胞 CK5/6 阳性表达为 71.4%(20/28),其中强阳性(++)9 例,弱阳性(+)11 例,转移性腺癌 CK5/6 弱阳性表达 27.0%(13/48),Calretinin 和 CK5/6 在增生间皮细胞的阳性表达分别为 10 例和 8 例。D2-40、Calretinin、CK5/6 在恶性间皮瘤、转移性腺癌及增生间皮细胞中的表达有显著性差异($P<0.05$)(Table 1,Figure 1~6)。

2.2 ROC 的 AUC 值

D2-40、Calretinin、CK5/6 的灵敏度分别为 89.3%、92.5%和 71.4%,特异性分别为 91.7%、87.5%和 73.0%,AUC 值分别

为 0.611、0.596 和 0.577(Table 2)。

3 讨论

恶性间皮瘤与腺癌的鉴别诊断不论在组织学还是细胞学上都一直是病理诊断中的难题^[4],多数间皮瘤可以依靠临床、影像学及组织学明确诊断,但由于上皮型恶性间皮瘤在形态学上与腺癌极为相似,仅仅依靠组织学难以分辨,必须

Table 2 The sensitivity,specificity and area under curve of mesothelial positive mark

Antibody	Sensitivity(%)	Specificity(%)	AUC value
D2-40	89.3	91.7	0.611
Calretinin	92.5	87.5	0.596
CK5/6	71.4	73.0	0.577

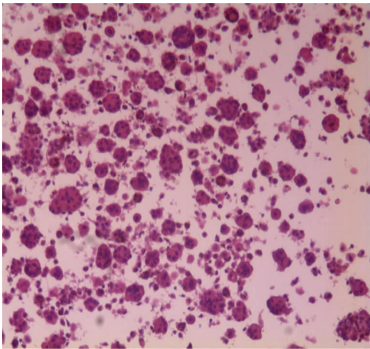


Figure 1 Mesothelial cells stain with HE(×400)

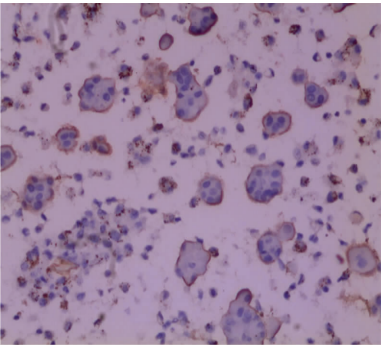


Figure 2 D2-40 positive expression in malignant mesothelioma (×200)

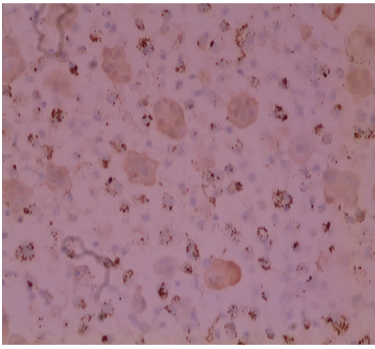


Figure 3 The positive expression of Calretinin(×200)

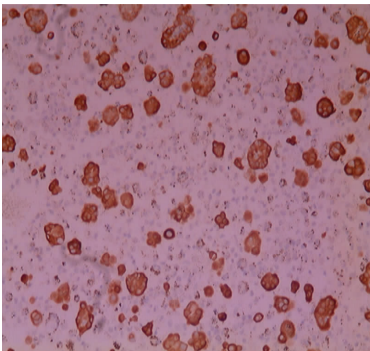


Figure 4 The positive expression of CK5/6(×200)

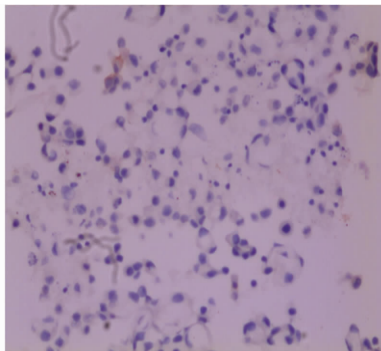


Figure 5 No expression of D2-40 in adenocarcinoma (×40)

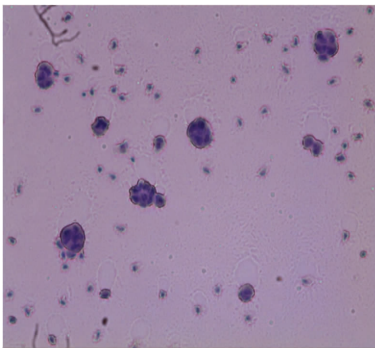


Figure 6 The positive expression of mesothelial cells(×40)

依靠免疫组织化学技术,目前常用方法就是采用对间皮瘤阳性的标志物^[5-8](如 Calretinin、WT1、CK5/6 等)以及间皮瘤阴性而腺癌阳性的标志物^[9-11](CEA、TTF1、MOC31)等联合诊断,然而到目前为止,没有任何单一的抗体对间皮瘤完全特异或者敏感^[1,12],因此寻找更为特异性抗体尤为重要。

D2-40 是近年上市的一种抗 M2A 癌胚膜抗原的单克隆抗体,该抗体可以选择性地表达于淋巴管内皮细胞以及淋巴组织起源的肿瘤和原发肿瘤的淋巴管浸润^[13]。最近有文献报道 D2-40 在间皮瘤中高度表达,如 Chu 等^[1]报道 33 例上皮型间皮瘤中 D2-40 全部胞膜阳性,阳性率达 100%,16 例混合型间皮瘤中 15 例(94%)上皮样成分为主的间皮瘤 D2-40 阳性表达。Ordóñez^[14]报道 28 例间皮瘤有 27 例 D2-40 阳性表达。笔者曾报道 27 上皮型间皮瘤有 25 例 D2-40 阳性表达^[15]。以上结果表明 D2-40 主要是在上皮型间皮瘤或者以上皮型为主的混合型间皮瘤中高度表达,其染色特征是胞膜阳性,因此,目前 D2-40 在上皮型间皮瘤的诊断中得到认可。然而, D2-40 浆膜腔积液中恶性间皮瘤细胞的表达情况报道较少,由于浆膜腔积液中往往混有巨噬细胞、红细胞、白细胞以及反应性间皮细胞等,这些细胞成团时又难与癌细胞相鉴别,而且如果单纯细胞涂片,收集细胞少,涂片厚薄不均等,所有这些对胸水中间皮瘤细胞与腺癌细胞的鉴别难度进一步加大。本研究采用细胞蜡块技术,在操作上克服了以往单纯涂片鉴别诊断中的缺陷,并且可以连续切片有利于观察,同时结合免疫组织化学技术观察 D2-40 在恶性胸膜间皮瘤和转移性腺癌的表达,研究结果显示 28 例上皮型间皮瘤中 25 例阳性表达,染色的特点主要胞膜阳性表达,其灵敏度和特异性分别为 89.3%和 91.7%,而转移性腺癌中仅有 4 例弱阳性表达,着色部位在胞浆,与常用的抗体比较,其灵敏度与 Calretinin 相当,特异性高于 Calretinin,与 CK5/6 相比灵敏度和特异性均优于 CK5/6,该结果与报道一致^[16],结合 ROC 曲线 AUC 值, D2-40 值高于 Calretinin 和 CK5/6,说明 D2-40 在恶性间皮瘤的诊断中有较高的价值。因此,笔者认为 D2-40 是目前除 Calretinin 外又一个对上皮型间皮瘤诊断有价值的标志物,不仅在组织学还是在细胞学上与腺癌的鉴别诊断中非常有用,值得推广使用。

参考文献:

- [1] Chu AY, Llizky LA, Pasha TL, et al. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(1): 105-110.
- [2] Ordóñez NG. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma: an update[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2005, 129(11): 1407-1414.
- [3] Sweta JA. Measuring the accuracy of diagnostic cystem[J]. *Science*, 1998, 240(4855): 1285-1293.
- [4] Robinson B, Lake R. Advances in malignant mesothelioma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(15): 1591-1603.
- [5] Wicczorek TJ, Krane JF. Diagnostic utility of calretinin immunohistochemistry in cytologic cell block preparations[J]. *Cancer*, 2000, 90(5): 312-319.
- [6] Foster MR, Johnson JE, Olson SJ, et al. Immunohistochemical analysis of nuclear versus cytoplasmic staining of WT1 in malignant mesothelioma and primary pulmonary adenocarcinoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2001, 125(10): 1316-1320.
- [7] Ordóñez NG. Value of thyroid transcription factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44 immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma [J]. *Am J Surg Pathol*, 2000, 24(4): 598-606.
- [8] Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases [J]. *Mod Pathol*, 2002, 15(1): 6-10.
- [10] Mimura-K, Ito A, Sakuma T, et al. Novel marker D2-40, combined with Calretinin, CEA and TTF-1: an optimal set of immunohistochemical markers for pleural mesothelioma [J]. *Cancer*, 2007, 109(5): 933-938.
- [11] Oates J, Edwards C. HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma[J]. *Histopathology*, 2000, 36(4): 341-347.
- [12] Lugli A, Forster Y, Haas P, et al. Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(10): 994-1000.
- [13] Arigami T, Natsugoc S, Uenosono Y, et al. Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymphnode micrometastasis in Pno gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(6): 688-693.
- [14] Ordóñez NG. The diagnostic utility of immunohistochemical and electron microscope in distinguishing between peritoneal mesotheliomas and serous carcinomas: a comparative study[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(1): 34-38.
- [15] Zhang JX, Zhao Y, Lu SH. Immunohistochemical features of malignant pleural epithelial mesothelioma and differential diagnosis with lung adenocarcinoma [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2013, 20(3): 221-225. [张继贤, 赵莺, 卢韶华. 免疫组化对恶性胸膜上皮型间皮瘤与肺腺癌鉴别诊断价值的探讨[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(3): 221-225.]
- [16] Bhalla R, Siddigui MT, Mandich D, et al. Diagnostic utility of D2-40 and podoplanin in effusion cell[J]. *Diagn Cytopathol*, 2007, 35(6): 342-347.