

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.013

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.013>

## 胸水细胞蜡块在晚期肿瘤诊断及肺腺癌 *EGFR/ALK/ROS1* 检测中的应用

王双双, 孙怡, 赵苏苏, 高丽丽, 李惠

(江苏省中医院, 南京中医药大学附属医院病理科, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 分析胸水细胞蜡块在晚期肿瘤诊断及肺腺癌*EGFR/ALK/ROS1*检测中的应用价值。**方法:** 收集胸水细胞学制片后剩余的细胞标本制备蜡块, 行HE染色, 对来源不同的肿瘤选择不同的抗体进行免疫组织化学标记, 联合HE形态学及免疫组织化学结果对恶性胸水进行肿瘤分类, 同时对明确诊断为肺腺癌的病例, 进行*EGFR/ALK/ROS1*基因状态的检测。**结果:** 79例患者中, 60例检出恶性肿瘤细胞, 15例为增生的间皮细胞, 4例为极少量异型细胞, 免疫组织化学难以做出准确标记。60例恶性肿瘤细胞中, 腺癌51例, 小细胞癌4例, 鳞状细胞癌3例, 梭形细胞肉瘤1例, 弥漫大B细胞淋巴瘤1例。51例腺癌中, 结合免疫组织化学标记及临床病史, 肺腺癌43例, 乳腺癌2例, 卵巢高级别浆液性癌2例, 胃癌2例, 结肠癌1例, 肝癌1例。在43例肺腺癌中, 22例患者进行了*EGFR/ALK/ROS1*基因检测, 结果显示*EGFR*突变率为54.5%(12/22例), *ALK*, *ROS1*基因融合突变率分别为9.1%和4.5%(2/22例和1/22例)。**结论:** 利用胸水标本制备细胞蜡块, 结合免疫组织化学标记有助于晚期肿瘤的诊断, 并为肺腺癌患者个体化治疗方案的选择提供帮助。

**[关键词]** 胸水细胞蜡块; 免疫组织化学; *EGFR*; *ALK*; *ROS1*

## Application of cell blocks of pleural effusion in diagnosis of advanced tumors and detection of *EGFR/ALK/ROS1* in lung adenocarcinoma

WANG Shuangshuang, SUN Yi, ZHAO Susu, GAO Lili, LI Hui

(Department of Pathology, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine,  
Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**Abstract** **Objective:** To analysis the application value of cell block of pleural effusion in the diagnosis of advanced cancer and detection of *EGFR/ALK/ROS1* in lung adenocarcinoma. **Methods:** The remaining cytological specimens after routine smear were collected to prepare pleural effusion cell block. HE staining was preformed. Different antibodies were selected according to different origins of tumor. We classify tumors of malignant pleural effusion combined with HE morphology and immunohistochemistry results. At the same time, the *EGFR/ALK/ROS1*

收稿日期 (Date of reception): 2019-07-16

通信作者 (Corresponding author): 李惠, Email: lihui19830401@163.com

gene status was detected in cases with a clear diagnosis of lung adenocarcinoma. **Results:** In 79 patients, 60 cases were found cancer cells, 15 cases were proliferating mesothelial cells and 4 cases were atypical cells difficult to make an accurate judgment. Sixty malignant cases, 51 cases were adenocarcinoma, 4 cases small cell carcinoma, 4 cases squamous cell carcinoma, 1 case spindle cell sarcoma, and 1 case diffuse large B-cell lymphoma. According to immunohistochemistry and clinical history, 43 cases were lung adenocarcinoma, 2 cases breast cancer, 2 cases ovary carcinoma, 2 gastric adenocarcinoma, 1 colon cancer, and 1 liver cancer. Forty-three lung adenocarcinoma cases, the *EGFR/ALK/ROS1* gene tests were detected in 22 patients. The results showed that the *EGFR* mutation rate was 54.5% (12/22), and the *ALK* and *ROS1* gene fusion mutation rates were 9.1% and 4.5% (2/22 and 1/1), respectively. **Conclusion:** Pleural effusion cell blocks, combined with immunohistochemical staining can help the diagnosis of advanced tumors and provide assistance in the selection of individualized treatment options for patients with lung adenocarcinoma.

**Keywords** pleural effusion cell blocks; immunochemistry; *EGFR*; *ALK*; *ROS1*

胸水在许多疾病尤其是恶性肿瘤常见的临床表现, 人体任何系统的恶性肿瘤均可发生胸水转移, 其中以肺癌、胃肠道癌、卵巢癌、乳腺癌、恶性淋巴瘤等最为常见, 因此准确诊断胸水的肿瘤细胞类型及来源对临床治疗具有重大意义<sup>[1-2]</sup>。文献报道, 肺癌转移引起的恶性胸水占有恶性胸水的48.6%<sup>[3]</sup>。有报道<sup>[4]</sup>显示约17%肺癌患者首诊时已伴有胸腔积液。伴有恶性胸水的肺癌患者已失去最佳手术治疗机会, *EGFR/ALK/ROS1*是肺癌靶向治疗的重要靶点, *EGFR/ALK/ROS1*基因状态已成为晚期肺腺癌指导治疗和判断预后的重要指标。因此充分利用胸水细胞学标本进行相应的检测, 对肿瘤的诊断及指导临床治疗具有重要意义。本研究结合南京中医药大学附属医院(以下简称我院)病理科应用胸水细胞学标本常规开展的细胞蜡块工作, 以及在细胞标本中对晚期肺腺癌患者进行相关的基因检测, 来探讨胸水细胞蜡块组织在病理诊断及晚期肺腺癌个体化治疗中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从南京中医药大学附属医院2015年1月至2017年12月胸水细胞蜡块标本中选取资料完整的79例, 其中男45例, 女34例, 年龄25~88(平均67.5)岁。本研究已获得南京中医药大学附属医院医学伦理委员会审批。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞涂片和细胞蜡块组织学切片的制备

79例均为胸水标本, 常规细胞学涂片, 利用

剩余胸水制作细胞蜡块, 细胞蜡块制作步骤: 标本于试管2 500 r/min离心5 min, 弃上清留沉淀, 吸管混匀后加入倒有95%乙醇的软管中, 自然沉降20 min, 离心弃上清, 剪去软管上部, 用干净镊子将沉降转移到吸水纸上, 包好于脱水机中进行组织处理, 制成石蜡细胞块。

#### 1.2.2 免疫组织化学

用Roche BenchMark XT全自动免疫组织化学染色机进行免疫组织化学染色。根据细胞学涂片和细胞石蜡切片HE染色镜下所见, 以及临床病史选择免疫组织化学抗体, 对于来源不明的腺癌, 常规选择CK7, CK20, Villin, TTF1, NapsinA, CDX-2标记; 临床怀疑女性生殖系统疾病的病例增加ER, PR, CA125, Pax-8标记; 对于怀疑神经内分泌肿瘤的病例加做CD56, Syn, CgA; 怀疑乳腺癌的病例加做ER, GCDFP15, GATA3; 对于异型增生的细胞, 不能区分为腺癌或间皮增生的病例, 增加CR, MC。考虑鳞状细胞癌的病例用免疫组织化学P40、P63和CK5/6来证实。所用抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 常规设置阳性和阴性对照。TTF1, CDX-2, ER, PR, GATA3, P40, P63为细胞核着色, CK7, CK20, Villin, NapsinA, GCDFP15, CgA, Syn, CR均为细胞质着色, CD56, MC为细胞膜着色, CA125为细胞膜或细胞质着色。

#### 1.2.3 细胞蜡块 DNA 提取及 RNA 提取

对于诊断为肺腺癌的病例, 胸水细胞蜡块常规脱蜡, 提取细胞DNA及RNA用于后续检测。使用试剂盒(厦门艾德生物医药科技有限公司)提取组织DNA模板, Eppendorf BioPhotometer核酸定量仪(德国Eppendorf公司)测定DNA含量及OD<sub>260</sub>

与OD<sub>280</sub>比值;使用石蜡样本分离试剂盒(RNeasy FFPE Kit, 德国QIAGEN公司)提取石蜡组织RNA, Eppendorf核酸定量仪测定RNA含量及OD<sub>260</sub>与OD<sub>280</sub>比值。

#### 1.2.4 EGFR 基因突变和 ALK, ROS1 基因融合检测

EGFR基因突变行突变阻滞扩增系统(ADx-ARMS)法。ALK, ROS1基因融合检测采用RT-PCR法。检测的突变点为EXON-19 E746\_A750del(1)(2), EXON-21 L858R和 EXON-20 T790M等29个位点。ADx-ARMS法及RT-PCR法按说明书操作, 试剂盒均购自厦门艾德生物医药科技有限公司(EGFR基因: 11218112101X; ALK, ROS1基因: 01218092701X)。EGFR/ALK/ROS1基因融合均在Agilent Stratagene Mx3000实时荧光定量PCR仪(美国Agilent Technologies公司)中进行扩增。

## 2 结果

### 2.1 细胞蜡块 HE 特点

不同组织类型的肿瘤细胞在石蜡切片中具有特征性的表现, 腺癌细胞呈单个、簇状和腺管

样、乳头状排列方式;鳞状细胞癌呈巢团状, 可见细胞间桥及角化;小细胞癌、淋巴瘤及其他软组织肿瘤形态上与相应的组织学相似。

### 2.2 免疫组织化学结果

79例样本中, 15例为增生的间皮细胞, 4例为极少量异型细胞, 免疫组织化学难以做出准确标记, 60例为恶性肿瘤细胞, 其中腺癌51例, 小细胞癌4例, 鳞状细胞癌3例, 梭形细胞肉瘤1例, 恶性淋巴造血系统肿瘤(弥漫大B细胞淋巴瘤)1例。结合免疫组织化学标记及临床病史, TTF-1, NapsinA阳性者支持为肺腺癌43例, ER, GATA3, GCDPF15阳性为乳腺癌2例, 卵巢高级别浆液性癌2例(Pax8, WT1, CA125阳性), 胃癌2例(CK7, MUC5AC, CDX-2阳性), 结肠癌1例(CK20, MUC2, CDX-2阳性), 肝癌1例(AFP, Argrose-1阳性)。小细胞癌CD56, CgA, Syn阳性, P40, P63, CK5/6阳性者支持诊断为鳞状细胞癌, 梭形细胞肉瘤表达SMA, Desmin, 弥漫大B细胞淋巴瘤表达LCA, CD20, CD79a(表1)。

表1 胸水细胞蜡块免疫组织化学分型诊断结果(n=60)

Table1 Results of immunohistochemical of cell blocks(n=60)

类型	n	百分率/%	阳性免疫标志物
肺腺癌	43	71.67	TTF-1(41/43), NapsinA(35/43)
肺小细胞癌	4	6.67	CD56(2/4), CgA(1/4), Syn(2/4)
鳞状细胞癌	3	5.00	P40(2/3), P63(2/3), CK5/6(1/3)
乳腺癌	2	3.33	ER(2/2), GATA3(2/2), GCDPF15(2/2)
卵巢高级别浆液性癌	2	3.33	Pax8(2/2), WT1(2/2), CA125(1/2)
胃腺癌	2	3.33	CK7(2/2), MUC5AC(2/2), CDX-2(2/2)
结肠腺癌	1	1.67	CK20(1/1), MUC5AC(1/1), CDX-2(1/1), MUC2(1/1)
肝癌	1	1.67	Hep(1/1), AFP(1/1), Argrose-1(1/1)
梭形细胞肉瘤	1	1.67	SMA(1/1), Desmin(1/1)
弥漫大B细胞淋巴瘤	1	1.67	LCA(1/1), CD20(1/1), CD79a(1/1)

### 2.3 基因检测结果

在43例肺腺癌中, 22例患者进行了EGFR/ALK/ROS1基因检测, 结果显示EGFR突变率为54.5%(12/22例), 其中L858R突变7例, 19del突变5例, 其余10例未见EGFR突变。ALK融合基因检出率为9.1%(2/22), 均为EML4-ALK融合, ROS1融合

基因检出率为4.5%(1/22), 融合类型为SLC34A2-ROS1/CD74-ROS1/EZR-ROS1。

## 3 讨论

胸腔积液的细胞学检查是判断良、恶性肿瘤



的主要手段。目前传统的细胞学涂片法虽然具有简洁、快速等优点,但由于细胞量较少和涂片厚薄不均及背景杂质等因素的影响,通常给诊断带来困扰<sup>[5-6]</sup>,尤其是对于需要鉴别肿瘤来源的病例,无法行免疫组织化学标记,我院病理科常规开展细胞蜡块工作,细胞蜡块技术不仅能够富集肿瘤细胞且可多次取材,同时HE染色细胞无皱缩和变性,细胞蜡块的最大优点是可以长期保存并反复连续切片,可以进行免疫组织化学标记,提高诊断的准确性,帮助判断肿瘤细胞的原发部位<sup>[7]</sup>。本研究选取资料完整的79例患者的胸水标本,收集胸水细胞学制片后剩余的细胞标本制备蜡块,行HE染色,与细胞涂片比较,细胞石蜡切片的形态更加接近组织学切片,可出现明显的组织学结构,大大提高了阳性检出率。51例腺癌中,多数病例可以出现良好的腺腔,或乳头状结构,鳞状细胞癌也是表现了其特有的特征,具有细胞间桥或角化细胞,小细胞癌中细胞呈短梭形或卵圆形,细胞分散或相互黏附,有时与淋巴细胞不易鉴别。其余恶性肿瘤均与其相应的组织学特点相似,因此需要细胞诊断医师长期的诊断经验,不断交流和学习才能做出正确的诊断。

本研究60例诊断为恶性肿瘤的细胞蜡块均可通过免疫组织化学来确定肿瘤类型及肿瘤原发灶(肺、消化道、乳腺及卵巢等)。鳞状细胞癌阳性标记为P40, P63和CK5/6,小细胞癌阳性标记为CD56, CgA, Syn,同时,对于不明来源的腺癌也可以通过相对特异的抗体明确肿瘤的来源或缩小寻找范围<sup>[8]</sup>, CK7, CK20, Villin组合可以鉴别大部分的腺癌起源, TTF1和NapsinA对于肺腺癌的诊断具有较好的敏感性和特异性<sup>[8-9]</sup>, CDX-2是胃肠道起源腺癌的敏感和特异性标志物, ER, GCDP15和GATA3对乳腺来源的肿瘤具有一定的特异性, MC, CR是间皮细胞标记抗体,用于鉴别间皮细胞和腺上皮细胞<sup>[10]</sup>。本研究根据临床提供的线索,采用以上不同免疫组织化学标记对79例胸水细胞蜡块进行标记,60例可以明确诊断及确定原发灶,同时明确15例为增生的间皮细胞,另外4例由于异型细胞过少,免疫组织化学结果不理想,不能做出诊断,建议临床再次送检。免疫组织化学标志物种类繁多,其敏感性和特异性各异,因此要求细胞学诊断医师能够掌握各种肿瘤细胞免疫标志物的表达特点,对胸水细胞学作出更加精确的诊断,同时结合临床检查资料等帮助临床寻找原发灶。

近年来,随着肺癌驱动基因的发现和靶向药物的应用,个体化靶向治疗理念深入人心,2019版

NCCN指南的更新,更加明确了NSCLC在治疗前应检测EGFR/ALK/ROS1/BRAF/PD-L1基因状态的临床要求,但是由于后两者的阳性率低<sup>[11]</sup>,前三者的检测显得更加重要。很多晚期肺癌患者,由于身体一般状况差,可能已完全丧失手术机会,也不能耐受支气管镜、肺穿刺等创伤性检查获取病理组织标本,而胸腔积液容易获得,损伤小,成为病理诊断的可选标本。胸水标本制成细胞蜡块行HE、免疫组织化学染色确诊为肺腺癌后,常规使用蜡块标本提取核酸进行EGFR/ALK/ROS1基因状态的检测。本研究的43例肺腺癌中,22例患者进行了EGFR/ALK/ROS1基因检测,结果显示EGFR突变率为54.5%(12/22例),与文献<sup>[12]</sup>报道的55%相似。ALK融合基因检出率为9.1%(2/22),均为EML4-ALK融合,ROS1融合基因检出率为4.5%(1/22),融合类型为SLC34A2-ROS1/CD74-ROS1/EZR-ROS1,与文献<sup>[13]</sup>报道相比较,ALK融合基因检出率稍低,ROS1融合基因检出率稍高,其原因一方面为本研究样本量稍低,另一方面由于肿瘤存在异质性。

胸水细胞块在实际工作中也会存在不足,如果可以获得手术标本或活检标本则首选手术及活检标本做相应的检测,但是对于难以获取组织学样本的肺腺癌患者而言,胸水细胞蜡块不失为一种有效、可靠的检测方法。

## 参考文献

1. 李庆国. 细胞块石蜡切片检查对恶性浆膜腔积液的诊断价值[J]. 临床工程, 2015, 30(3): 111-113.  
LI Qingguo. Effectiveness of cellblock paraffin-embedded sections in diagnosis of malignant serous cavity effusion[J]. China Medical Devices, 2015, 30(3): 111-113.
2. 阎红琳, 袁静萍, 刘琳, 等. 细胞蜡块结合免疫细胞化学在浆膜腔积液病理诊断中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(12): 1414-1415.  
YAN Honglin, YUAN Jingping, LIU Lin, et al. Application of cell blocks combined with immunocytochemistry in pathological diagnosis of serous cavity effusion[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2016, 32(12): 1414-1415.
3. Light RW. Pleural diseases[M]. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2006[J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.
5. 林静, 李美琼, 农林琳. 胸腔积液细胞块联合免疫组织化学在

- 肺腺癌与间皮细胞增生鉴别诊断中的应用[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(3): 338-339.
- LIN Jing, LI Meiqiong, NONG Linlin. Application of pleural effusion cell block combined with immunohistochemistry in differentiation diagnosis of lung adenocarcinoma and mesothelial cell hyperplasia[J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2016, 32(3): 338-339.
- 许晓琼, 肖创清, 张一帆, 等. 多项指标检测对恶性胸腔积液的鉴别诊断价值[J]. 山西医药杂志, 2014, 43(6): 609-610.
  - XU Xiaqiong, XIAO Chuangqing, ZHANG Yifan, et al. Many indicators value detection in the differential diagnosis of malignant pleural effusion[J]. Shanxi Medical Journal, 2014, 43(6): 609-610.
  - 陈晶, 江伟, 李雷, 等. 改良快速胸水及腹水脱落细胞块制备的体会[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(9): 1057-1058.
  - CHEN Jing, JIANG Wei, LI Lei, et al. Experience in the preparation of improved rapid exfoliated cells from pleural fluid and ascites[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 30(9): 1057-1058.
  - Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Comparison of monoclonal napsin A, polyclonal napsin A, and TTF-1 for determining lung origin in metastatic adenocarcinomas[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 138(5): 703-711.
  - 张同海, 王劲松, 黄文斌, 等. 联合检测TTF1、CK5 / 6、p63和napsinA在肺鳞癌和腺癌鉴别诊断中的价值[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(8): 918-920.
  - ZHANG Tonghai, WANG Jinsong, HUANG Wenbin, et al. Combined detection of TTF1, CK5 / 6, p63 and napsinA in the differential diagnosis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2012, 28(8): 918-920.
  - 张丽华, 王雪晴, 王国庆, 等. 细胞蜡块在晚期腺癌诊断和肺腺癌个体化治疗中的应用价值[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(2): 166-170.
  - ZHANG Lihua, WANG Xueqing, WANG Guoqing, et al. Application value of cell block in diagnosis of advanced adenocarcinoma and individualized therapy of lung adenocarcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 30(2): 166-170.
  - Ready N, Hellmann MD, Awad MM, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 568): outcomes by programmed death ligand 1 and tumor mutational burden as biomarkers[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(12): 992-1000.
  - Ho HL, Chang FP, Ma HH, et al. Molecular diagnostic algorithm for epidermal growth factor receptor mutation detection in Asian lung adenocarcinomas: comprehensive analyses of 445 Taiwanese patients with immunohistochemistry, PCR-direct sequencing and Scorpion/ARMS methods[J]. Respirology, 2013, 18(8): 1261-1270.
  - 许春伟, 王海艳, 吴永芳, 等. 2 771 例肺肿瘤临床病理特征分析[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(2): 173-184.
  - XU Chunwei, WANG Haiyan, WU Yongfang, et al. 2 771 cases of clinicopathological analysis of pulmonary neoplasm[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(2): 173-184.

**本文引用:** 王双双, 孙怡, 赵苏苏, 高丽丽, 李惠. 胸水细胞蜡块在晚期肿瘤诊断及肺腺癌 EGFR/ALK/ROS1 检测中的应用[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(5): 1159-1163. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.013

**Cite this article as:** WANG Shuangshuang, SUN Yi, ZHAO Susu, GAO Lili, LI Hui. Application of cell blocks of pleural effusion in diagnosis of advanced tumors and detection of EGFR/ALK/ROS1 in lung adenocarcinoma[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(5): 1159-1163. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.013