

• 检验技术与方法 •

免疫细胞化学染色在乳腺癌诊断中的应用价值及质量控制

贺才标¹, 吴涛², 朱娅萍¹, 叶红³, 胡志勇³, 王林³, 陈勇³, 魏贝³

(1. 湖北省天门市妇幼保健院检验科, 湖北天门 431700; 2. 湖北省天门市中医院放射科, 湖北天门 431700; 3. 湖北省天门市第一人民医院病理科, 湖北天门 431700)

摘要:目的 探讨乳腺癌患者癌细胞 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 表达的应用价值及质量控制。方法 采用细针吸取细胞学涂片或术中细胞学印片获取标本, 联合免疫细胞化学染色, 研究 53 例乳腺癌患者癌细胞 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 的生物学表达, 并与免疫组织化学染色进行对照分析。结果 53 例乳腺癌患者 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 的生物学表达分别为 73.58%、58.49%、56.60%、68.63%、81.13%, ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 阳性病例和阳性强度, 免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色之间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 免疫细胞化学染色可替代免疫组织化学染色, 在乳腺癌的术前诊断、治疗方案的选择、以及预后的判断具有重要的意义。全过程的质量控制是做好乳腺癌免疫细胞化学染色的关键。

关键词: 乳腺癌; 免疫细胞化学技术; 质量控制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.045 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2014)14-1923-03

Application value and quality control of immunocytochemical staining in diagnosis of breast cancer

He Caibiao¹, Wu Tao², Zhu Yaping¹, Ye Hong³, Hu Zhiyong³, Wang Lin³, Chen Yong³, Wei Bei³

(1. Department of Clinical Laboratory, Tianmen Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Tianmen, Hubei 431700, China; 2. Department of Radiology Laboratory, Tianmen Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianmen, Hubei 431700, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Tianmen Municipal First People's Hospital of Hubei, Tianmen, Hubei 431700, China)

Abstract: **Objective** To investigate the application value and quality control of breast cancer cells PR, ER C-erbB-2, P53, Ki67 expressions in the patients with breast cancer. **Methods** The specimens were obtained by the fine needle aspiration cytological smear or intraoperative imprint cytology. The biological expressions of ER, PR, C-erbB-2, P53, Ki67 were detected by the immunocytochemical staining, the detection results with those detected by the immunohistochemical staining were performed the comparative analysis. **Results** The biological expressions of ER, PR, C-erbB-2, P53, Ki67 in 53 cases of breast cancer were 73.56%, 58.49%, 56.60%, 68.63%, 81.13% respectively; ER, PR, C-erbB-2, P53, Ki67 had no statistical significant differences in positive cases and positive intensity between the immunocytochemical staining and the immunohistochemical staining ($P>0.05$). **Conclusion** The immunocytochemical staining can replace the immunohistochemical staining and has the important significance in the preoperative diagnosis of breast cancer, therapeutical scheme selection and prognosis judgment. The whole process quality control is the key to do the breast cancer immunocytochemical staining well.

Key words: breast cancer; immunohistochemistry; quality control

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 发病率呈逐年上升趋势, 严重威胁着女性的身体健康, 早期及时的诊治乳腺癌是提高患者生存期最重要的因素^[1]。近些年来, 有学者采用细胞学的方法, 观察乳腺癌患者 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 的指标, 以求了解乳腺肿瘤性质和生物学表达, 达到合适选择治疗方案的目的^[2]。本文采用细针针吸细胞涂片/术中细胞印片获取标本, 以及联合免疫细胞化学染色技术对 53 例乳腺癌患者 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 的生物学表达及其临床应用价值进行了研究, 并探讨乳腺癌免疫细胞化学染色的质量控制。现将有关结果分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 53 例乳腺癌患者系本院门诊或住院的女性病人, 年龄 26~74 岁, 平均 52.2 岁。肿块部位发生在左侧乳腺 29 例、右侧乳腺 24 例, 肿块大小在 0.5~8.0 cm, 同侧腋窝

淋巴结转移 27 例。所有病例均经术后病理学证实。

1.2 取材方法 门诊首诊患者, 局部消毒采用 7~8 号针头作细针吸取细胞学检查, 将抽吸物制成涂片; 住院患者在做手术中冰冻快速检查同时, 切取较小病变组织作细胞学印片。

1.3 检测方法 取涂片/印片, 根据制片的数量多少, 有选择性的作 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 免疫细胞化学染色。ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 染色检测试剂盒由福州迈新生物技术开发有限公司提供。采用 SP 两步法进行免疫细胞化学染色, 浓缩型 DAB 显色试剂盒, 操作步骤按照说明书进行。具体染色方法如下: 预先准备好经 APES 处理过的载玻片, 将制成的细胞学涂片/印片均经过 10% 中性福尔马林固定 10 min, 然后用 3% 双氧水室温孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活化, 蒸馏水浸泡 2 min; 高压修复 1.5 min; 滴加一抗, 室温放置 1 h, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min×3; 滴加 A 试剂, 室温孵育 30

min,磷酸盐缓冲液冲洗 3 min×3;滴加 B 液,室温孵育 20 min,PBS 冲洗 3 min×3;DAB 溶液显色,自来水终止显色;苏木素复染细胞核、脱水、透明、封片。用已知的阳性片作为阳性对照,以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。然后在显微镜下观察 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 免疫细胞化学染色结果,并与组织病理学对照。结果判断标准^[7]: (1)ER、PR、P53、Ki67 免疫细胞化学染色阳性物质均定位于细胞核,以癌细胞核内见棕黄色颗粒为阳性细胞。无细胞着色为阴性(-);阳性细胞数小于或等于 25%为弱阳性(+);阳性细胞数 26%~50%为中等阳性(++);阳性细胞数大于 50%为强阳性(+++)。(2)、C-erbB-2 免疫细胞化学染色阳性物质定位于细胞膜,以出现明显棕褐色物质为阳性。无细胞着色为阴性(-),阳性细胞数小于 10%,但膜染色不完全为弱阳性(+);阳性细胞数 10%~30%,膜染色完全,为中等阳性(++);阳性细胞数大于 30%,膜染色完全,为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理 患者细胞学涂片/印片作 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 免疫细胞化学染色的结果与手术切除组织的免疫组织化学染色的结果进行对照研究。应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。两种方法阳性病例采用配对 χ^2 检验,阳性反应强度一致性采用 Kappa 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 53 例乳腺癌免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色结果对比分析 由表 1 可见,采用免疫细胞化学染色,ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 阳性率分别为 73.58%、58.49%、56.60%、68.63%、81.13%,ER、PR、C-erbB-2、P53 免疫细胞化学染色阳性例数均略高于免疫组织化学染色例数,Ki67 免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色例数相等。各项检测指标免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色比较,经 χ^2 检验两者之间差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 53 例乳腺癌免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色结果对比(n)

检测项目	n	免疫细胞 化学法(+)	免疫组织 化学法(+)	P
ER	53	39	38	>0.05
PR	53	31	28	>0.05
C-erbB-2	53	30	27	>0.05
P53	51	35	33	>0.05
Ki67	51	43	43	>0.05

2.2 53 例乳腺癌免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色强度对比分析 由表 2 可见,53 例乳腺癌免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色强度对比分析,ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 两方法比较,强度一致性分别为 34、25、24、30 和 38 例,强度不一致分别为 4、3、3、3 和 5 例,且 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 强度不一致表现为免疫细胞化学染色高于免疫组织化学染色一个等级,但各项指标免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色比较,经 kappa 检验两者之间差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

综合上述两组对比分析,采用术前细针吸取细胞学方法或

术中印片细胞学的方法获取检验标本,做与乳腺癌有关生物学指标的免疫细胞化学染色,可代替病理的免疫组织化学染色。

表 2 乳腺癌免疫细胞化学染色与免疫组织化学染色强度对比分析(n)

检测项目	阳性	强度一致	强度不一致	P
ER	38	34	4	>0.05
PR	28	25	3	>0.05
C-erbB-2	27	24	3	>0.05
P53	33	30	3	>0.05
Ki67	43	38	5	>0.05

3 讨 论

3.1 免疫细胞化学染色技术在乳腺癌诊断中的应用价值 检测患者 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 等生物学指标的表达与否,在乳腺癌诊断与治疗中具有十分重要的意义。传统的是术后免疫组织化学染色方法进行检测,随着科学的进步和人们认识的提高,在患者术前利用免疫细胞化学染色(ICA)检测与肿瘤诊断、治疗以及预后判断有关的生物学指标,具体是采用针吸细胞学(FNA)制片或其他方法获取某一组织的细胞或细胞簇涂片,进行免疫细胞化学染色,从而得到肿瘤某些生物学指标参数的方法。国外学者采用 ICA 方法检测乳腺癌的生物学表达其特异性和精确性高达 95%以上^[3-4]。国内研究相继报道,陈婉嫻等采用针吸细胞 HE 染色涂片,经退色处理开展免疫细胞化学染色取得了满意的效果^[5]。宋安辉等^[2]、王焱等^[6]相继开展了乳腺癌患者性激素受体 C-erbB-2 的免疫细胞化学染色技术,并用于术前判断乳腺癌的预后并指导治疗。本文是采用细针针吸细胞学涂片或术中细胞学印片获取标本开展免疫细胞化学染色,其结果显示 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 的阳性例数和阳性强度略高于术后免疫组织化学染色,与文献^[2,8]报道的相似,但经统计学处理,各项指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。免疫细胞化学染色检测的 ER、PR、C-erbB-2 等某些生物学指标已应用于乳腺癌的诊断、治疗、预后分析中^[6]。因此,开展细针针吸细胞学或术中印片细胞学,联合免疫细胞化学染色,可以代替免疫组织化学染色技术,在术前/术中对于乳腺癌诊断、治疗方案的选择以及预后的判断意义十分重大。

3.2 免疫细胞化学染色技术在乳腺癌诊断中的质量控制 乳腺癌免疫细胞化学染色的质量控制主要有:(1)正确的取材,制作良好的细胞学涂片或印片是做好 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 染色的前提。在制片过程中要注意不要用力过猛,防止细胞退变变形,退变变形的细胞其抗原也会不同程度的受损,影响染色结果;而且制片时应尽量均匀的涂抹每张玻片,力求使细胞以单细胞层的状态平铺在玻片上,防止涂片上细胞层过厚,过厚的细胞层易出现假阴性的结果。(2)正确的固定细胞学标本,是做好 ER、PR、C-erbB-2、P53、Ki67 染色的基础。固定的目的是最大限度的保存细胞的抗原性^[9]。乳腺癌的细胞学涂片固定液一般采用 10%的中性福尔马林效果较好。实验证明,乳腺癌的 ER、PR、HER2 等染色用中性福尔马林可以降低假阴性的发生率,其效果强于 95%的乙醇。(3)做好乳腺癌细胞的抗原修复过程,是保证 ER、PR、C-erbB-(下转第 1927 页)

乙肝携带状态而不接受治疗。

TBA 和 ALT 是反映肝损伤的有效指标,在常规实验室检测中,升高的 ALT 水平提示肝细胞损伤,并与乙肝感染患者发生肝硬化的风险息息相关。国内许多学者已开展相关研究^[5-7],本研究中分析了 TBA、ALT 水平与 HBV 感染模式的关系,患者血清 TBA 水平与 HBV 感染模式无关($P>0.05$)。而血清 ALT 水平以大三阳活性最高,小三阳次之,1,5 阳性组最低($P<0.05$),可见 ALT 活性可在一定程度上反映 HBV 复制及传染性强弱。本研究同时分析了 3 种不同乙肝感染模式中 DNA 拷贝数分别与 TBA、ALT 的相关性,结果显示在 HBeAg 阴性患者中 HBV-DNA 拷贝数与血清 ALT 水平存在显著正相关关系($P<0.05$),即随着 DNA 拷贝数的增加,血清 ALT 水平增高。在大三阳患者中 HBV-DNA 与血清 ALT 都处于较高水平,而在小三阳和 1,5 阳性的患者中 HBV-DNA 检测不仅可以直观反映病毒复制状态,而且与肝脏损害程度呈正相关关系。国外有研究认为在 HBeAg 阴性的感染者中 ALT 水平高于正常值上限的 0.5 倍与进展性肝纤维化相关,并且男性 ALT >30 IU/L 或女性 ALT >19 IU/L 加上 HBV-DNA 高于 10^5 copies/mL 说明患者为活动性慢性乙肝患者^[8]。HBV 感染的临床表现众多,若在国内同样建立起 HBV-DNA 和 ALT 的临界值将对乙肝患者病情的综合判断以及长期管理具有重要意义。

参考文献

[1] Anna S, Lok F, Brian J, et al. Chronic Hepatitis B[J]. Hepatolo-

(上接第 1924 页)

2、P53、Ki67 染色成功的关键。乳腺癌的抗原修复,一般采用高压热修复法,操作过程中要注意修复的压力和时间的控制;取出细胞学涂片前,要等待缓冲液冷却后方可进行后续的操作过程,否则容易造成脱片;柠檬酸盐缓冲液的量必须保证所有细胞学涂片都能浸泡到,用过的缓冲液应弃掉,不能重复使用。(4)做好显色反应过程的质量控制,也是确保检测结果可靠性的重要环节。DAB 显色时间长短,由于不同的标本,细胞的分化程度的差异化,细胞抗原含量不尽相同,其显色的时间不可能完全一致。对于抗原含量较多的标本,应防止显色时间过长而导致的背景着色和非特异性染色。此外,注意 PBS 冲洗要充分,滴加试剂要足量等环节的控制。(5)、做好乳腺癌标本的免疫细胞化学染色各项的阳性对照和阴性对照,包括内、外对照试验。此外,新购进的试剂一定要做预试验,找出最理想的抗体效价。做好检测试剂保存条件(如温度)的管理工作,杜绝使用过期试剂。

总之,乳腺癌免疫细胞化学质量控制是多方面的,应从标本的采集、制作、固定、抗原修复、染色反应以及试剂的管理等工作入手,注重细节管理,操作力求做到标准化、规范化。加强全过程的质量管理工作,才能确保检测结果的准确性和可靠性。

参考文献

[1] 陈灿铭,陈小松,马传栋,等.乳腺癌分子分型与预后关系的研究

gy, 2007, 45(2):507-539.

- [2] Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus; nucleic acid testing versus immunoassay methods[J]. Mol Diagn Ther, 2007, 10(2):77-91.
- [3] YS Kim. Definition, diagnosis, and prevalence of occult hepatitis B virus infection[J]. Korean J Gastroenterol, 2013, 62(3):143-147.
- [4] Assy N, Beniashvili Z, Djibre A, et al. Lower baseline ALT cut-off values and HBV-DNA levels better differentiate HBeAg(-) chronic hepatitis B patients from inactive chronic carriers[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(24):3025-3031.
- [5] 贺岩, 罗梅, 孙艳艳. HBV-DNA 载量与 HBsAg、HBeAg 和 ALT 水平的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19):2015-2017.
- [6] 姜伟超. 650 例慢性乙肝患者 HBV-M、HBV-DNA 同步检测分析[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2013, 22(2):210-213.
- [7] 王治兰, 刘卫平, 王贵强. 慢性 HBV 感染肝脏病理变化和生化 ALT 及病毒学关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(5):457-459.
- [8] Ijaz B, Ahmad W, Javed FT, et al. Revised cutoff values of ALT and HBV-DNA level can better differentiate HBeAg(-) chronic inactive HBV patients from active carriers[J]. Virology Journal, 2011, 86(8):765-768.

(收稿日期:2014-01-08)

[J]. 中华外科杂志, 2008, 46(18):1400-1403.

- [2] 宋安辉, 王镇美. 免疫组化两步法在乳腺癌细胞学诊断中的应用[J]. 广州医药, 2007, 38(4):50-52.
- [3] Vetto J, Pommier R, Schmidt W, et al. Accurate and cost-effective evaluation of breast wasses in males[J] Am, J Surg, 2011, 169(5):519-522.
- [4] Green B, Dowley A, Turnbull LS, et al. Impact of fine-needle aspiration cytology, ultrasonography and mammography on open biopsy rate in patients with benign breast disease[J]. Br J Surg, 2012, 82(11):1509-1511.
- [5] 陈婉娴, 王念黎. 乳腺肿块针吸细胞学 HE 染色涂片的免疫细胞化学染色[J]. 临床与实践病理学杂志, 2002, 18(5):570-571.
- [6] 王焱, 马榕, 康俊升, 等. 乳腺癌术前性激素受体和 C-erbB-2 检测的临床意义[J]. 实用医药杂志, 2004, 21(8):681-683.
- [7] 王崇杰, 王建丽, 牟洁, 等. 乳腺癌术前核芯针穿刺检测 ER、PR、C-erbB-2、Ki-67 的临床研究[J]. 中国现代普外科进展, 2011, 14(7):517-520.
- [8] Bozzetti C, Nizzoli R, Naldi N, et al. Breast cancer res treat, 2010, 32(2):221-228.
- [9] 刘岩, 王珩, 赵银环. 细胞学涂片免疫细胞化学染色技术的质量控制[J]. 医学信息, 2013, 26(3):447.

(收稿日期:2013-12-28)