

利普液基细胞学联合免疫细胞化学在细针穿刺诊断甲状腺结节中的价值

康璇¹,段宇²

(¹南京医科大学附属江宁医院内分泌科,江苏 南京 211100;²南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:利用利普液基细胞学(LPT)技术及免疫细胞化学技术,评价半乳糖凝集素-3(Galectin-3)和甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase,TPO)在甲状腺良恶性结节中的诊断价值。方法:甲状腺细针穿刺标本 80 例 LPT 技术制细胞涂片,用免疫细胞化学方法检测穿刺标本中 Galectin-3 与 TPO 的表达情况,并与甲状腺术后组织病理相比较,评价 Galectin-3 和 TPO 在甲状腺良恶性病变中的表达率。结果:术前行细针穿刺细胞学(fine needle aspiration cytology, FNAC)检查的 80 例患者术后病理确诊为甲状腺癌 51 例(其中甲状腺乳头状癌 49 例、甲状腺滤泡状腺癌 2 例),良性病变 29 例(含慢性淋巴细胞性甲状腺炎 2 例、滤泡性腺瘤 7 例、结节性甲状腺肿 20 例)。免疫组化检测 Galectin-3 在甲状腺乳头状癌和滤泡性腺瘤中明显高表达,分别为 93.8%和 100%,总阳性率为 94%(47/51);TPO 在慢性淋巴细胞性甲状腺、结节性甲状腺肿和滤泡性腺瘤中明显高表达,阳性表达率分别为 100%、100%和 85.7%,总阳性表达率为 96.7%(28/29)。结论:液基细胞学技术与免疫细胞化学分析相结合在甲状腺结节 FNAC 标本诊断中有重要的临床意义,细胞分子标志物 Galectin-3 和 TPO 可用于甲状腺恶性肿瘤的鉴别诊断,提高了甲状腺癌的术前诊断率,值得在临床细胞病理学诊断中推广应用。

[关键词] 甲状腺良恶性结节;利普液基细胞学技术;免疫细胞化学;半乳糖凝集素-3;碘化物过氧化物酶

[中图分类号] R446.8

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2015)04-561-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20150423

甲状腺结节是一种常见的内分泌疾病,发生率为 19%~67%^[1],近年来发病率逐渐升高,大多数结节为良性,恶性结节约占 5%。一般起病隐匿,无明显临床症状,且生物学特性多变,随着超声应用的普及,甲状腺结节的检出率大幅提高,但是,现有的影像学、免疫学及病理学诊断技术仍存在一定的局限性和误诊率,尤其是术前诊断的准确率尚不满意。目前,甲状腺细针穿刺细胞学检查(fine needle aspiration cytology, FNAC)仍被公认为一种经济而准确性最高的细胞病理学检查^[1-2]。实际工作中,乳头状增生和乳头状癌、滤泡型乳头状癌和滤泡性腺瘤以及滤泡型乳头状癌和增生性结节的区分有一定难度,尤其是细胞病理提示良性病变的细胞被检测有透明核出现,甚至有少量核沟出现的情况时^[3]更不易判断。此外,传统细胞涂片由于背景不清晰,细胞重叠,脱片率高、血细胞干扰多等问题,容易造成误诊和漏诊^[4]。因此,亟须寻找特异的肿瘤标志物及制片方法协助临床病理诊断^[5]。半乳糖凝集素-3(Galectin-3)主要存在于细胞质,大多数的学者认为, Galectin-3 在正常甲状腺及良性甲状腺病变组织中表达阴性或低表达,而乳头状癌几乎所有病变部位均为阳性。甲状腺过氧化物酶(TPO)在甲状腺良性结节中高度表达而在恶性病变中表达较低甚至不表达。本研究拟通过

术前细针穿刺细胞学结合利普液基学技术及免疫细胞化学分析的方法测定细胞分子标志物 Galectin-3 与 TPO 在甲状腺细胞病理的表达情况,并与术后组织病理相比较,评价上述 2 种指标在甲状腺良恶性疾病诊断上的意义,以期提高甲状腺癌术前诊断的准确率,减少误诊和漏诊。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2012 年 12 月~2014 年 5 月在本院内分泌科就诊的甲状腺结节患者 80 例,术前行甲状腺细针穿刺,制备利普液基细胞学(LPT)薄片以及传统细胞涂片。

LPT 试剂(LGM 公司,美国);兔抗人 Galectin-3 单克隆抗体(Epitomics 公司,美国);MoAb 单克隆抗体 47、鼠抗人 TPO 抗体(Abcam 公司,美国);DAB 显色液以及 MaxVision™2 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 取材

患者取平卧位,垫高肩背部,颈部过伸,充分暴露甲状腺部位;75%酒精对穿刺部位进行消毒,在超声定位引导下使用连接 25G 针头的 5 ml 注射器,选

取3处不同部位进针,多点取样,分别进行2~3次迅速穿刺,拔出针头,局部压迫15~20 min。将抽吸物吹打于3张清洁载玻片上,进行涂片,95%乙醇固定,HE染色;剩余部分抽吸物置于含细胞保存液的离心管(EP管)中,以备细胞涂片的制备。

1.2.2 LPT 制片步骤

甲状腺细针穿刺标本和细胞保存液一同放置到EP管中,反复冲洗2~3次;旋涡振荡2 min左右,使得保存管中的标本充分混匀;另取15 ml的EP管加入3 ml细胞清洁液;将震荡后的标本缓慢倒入含细胞清洁液的EP管中,置离心机2 500 r/min离心10 min;弃去上清液,依据沉淀物的量,在离心管中加入相当于细胞团体积4~5倍的细胞基液,旋涡振荡混匀;取细胞混悬液50 μ l于清洁载玻片上按同一方向缓慢排液制片,制备约15 mm直径的薄涂片,不可反复涂片防止细胞重叠。制备涂片2张,分别标记为Galectin-3和TPO,置于通风橱干燥15~20 min后,95%乙醇对涂片进行固定。

1.2.3 免疫细胞化学法染色步骤

流水冲洗已经固定的细胞涂片;1%TritonX-100孵育10 min,PBS冲洗2~3 min;修复抗原:在柠檬酸盐缓冲液中对Galectin-3进行热修复20 min;在EDTA缓冲液中对TPO进行热修复20 min,置室温自然冷却后取出玻片;再次PBS液冲洗;加一抗37 $^{\circ}$ C 1 h或4 $^{\circ}$ C冰箱过夜;加相应的二抗室温孵育15 min;PBS液冲洗;后续操作按照MaxVision™2试剂盒说明进行DAB显色;苏木精复染;乙醇梯度脱水;二甲苯脱脂透明;中性树胶封固。每组使用已知阳性的细胞涂片作为阳性对照,使用PBS液代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 结果判定

“金标准”指的是手术后组织病理学诊断结论,对免疫细胞化学结果进行观察时使用的是双盲法,判定阳性结果的依据是胞浆中有黄-棕色颗粒的出现,部分Galectin-3中有着色细胞核,部分TPO中有着色细胞膜。参考相关文献得出评分Galectin-3的方法^[6]:阳性判定为细胞被染色数量>10%,阴性判定则相反;参照De Micco法得出评分TPO的方法^[7]:阳性判定为染色细胞数>80%,阴性判定则相反,结果用阳性率进行表示。

1.3 统计学方法

使用软件SPSS18.0对特异度、敏感度、诊断准确度以及阳性和阴性预测值进行计算,特异性=真阴性/(真阴性+假阳性),敏感性=真阳性/(真阳性+

假阴性),准确度=(真阳性+真阴性)/(所有阳性+所有阴性),进行显著性检验时使用的是 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺良恶性结节中 Galectin-3 的表达

免疫细胞化学染色时Galectin-3主要定位于细胞质,49例乳头状癌中,46例Galectin-3呈阳性或强阳性表达,3例呈阴性表达。2例滤泡性腺癌均呈阳性表达。29例良性结节主要呈阴性表达,仅1例不典型腺瘤呈阳性或弱阳性表达。Galectin-3阳性率在良性和恶性结节间的差异有统计学意义($P < 0.01$,表1)。Galectin-3的敏感性为94.1%、特异性为96.5%、准确度为95%。

2.2 甲状腺良恶性结节中 TPO 的表达

免疫细胞化学染色时TPO主要定位于胞质,甲状腺乳头状癌中TPO的表达多呈阴性,3例呈阳性表达。滤泡性腺癌2例,1例呈阳性,另1例呈阴性。29例良性病变中,28例呈阳性表达,1例呈阴性表达。TPO表达在良性和恶性结节间的差异有统计学意义($P < 0.01$,表1)。TPO的敏感性为96.5%、特异性为92.1%、准确度为93.8%。

2.3 Galectin-3 及 TPO 联合表达

以Galectin-3阳性且TPO阴性者为恶性肿瘤的判断标准,符合后者条件的恶性肿瘤为47例,良性病变0例。与术后组织病理的“金标准”比较,在鉴别甲状腺良恶性结节时,二者联合标记的特异性强。

3 讨论

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤之一,术前准确的诊断是进一步手术治疗的基础,细针穿刺是甲状腺病变术前首选的诊断方法,病理诊断的关键前提是有良好的标本和优质的制片。但常规FNAC中,由于甲状腺组织血管丰富,非常容易出血,常导致标本不满意,从而影响诊断,采用利普液基细胞制片技术可尽量减少出血的干扰,背景干净,没有红细胞干扰,细胞单层平铺,形态结构清晰。对于诊断甲状腺结节中某些不典型的病变,传统细胞涂片方法行HE染色检查的敏感性及其特异性均不高。本试验在利普液基细胞制片的基础上结合了免疫细胞化学的分析方法后特异性90.8%,敏感性88.9%,准确性89.1%,较传统细胞涂片的检查方法有了显著的提高。

Galectin-3属半乳糖凝集素家族成员之一,后者

表 1 Galectin-3 和 TPO 在甲状腺病变组织中的表达

组 别	n	Galectin-3			TPO		
		阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)
甲状腺乳头状癌	49	46	3	93.8	4	45	8.1
甲状腺滤泡状腺癌	2	2	0	100.0	0	2	0.0
慢性淋巴细胞性甲状腺炎	2	0	2	0.0	2	0	100.0
滤泡性腺瘤	7	1	6	14.2	6	1	85.7
结节性甲状腺肿	20	0	20	0.0	20	0	100.0

是一种结合 β -半乳糖苷的凝集素^[8],主要存在于细胞质中,在细胞的一系列生理和病理过程中起着重要的作用,包含了细胞的黏附、生长、细胞凋亡、肿瘤转移、炎症反应等^[9],并已在甲状腺癌、结肠癌和乳腺癌等许多人类肿瘤和细胞系中检测到^[10]。Galectin-3 在甲状腺细胞增殖的不同阶段起着不同的作用,亦有研究观察到肿瘤进展入侵的边缘 Galectin-3 强度较肿瘤中心下降^[11]。1995 年,甲状腺乳头状癌被发现与其有紧密的联系,Galectin-3 在甲状腺乳头状癌中表达明显高于正常水平^[12],随后,国内外的一系列相关研究相继证实了这一观点。有研究表明 Galectin-3 在甲状腺髓样癌、甲状腺未分化癌以及良性甲状腺疾病对照组中表达比较弱甚至不表达,而在甲状腺乳头状癌和甲状腺滤泡状癌中却呈高度表达。因此,Galectin-3 在甲状腺癌诊断中具有的意义和价值也得到了更多研究的证实。通常情况下,本文认为腺瘤和结节性甲状腺肿等良性病变以及正常甲状腺中不表达 Galectin-3^[13],但有研究发现 Galectin-3 表达阳性的甲状腺良性病变也有癌变可能,Coli 等^[13]检测发现良性甲状腺结节中存在不典型增生的病灶中表达 Galectin-3 提示了不典型增生的腺瘤存在潜在恶性。本研究结果与国外大多数学者一致。Galectin-3 由此被验证为一线免疫标记物,能够比较可靠地对甲状腺良恶性病变进行鉴别。

就 TPO 来说,它是种糖基化血红蛋白,在甲状腺细胞顶缘细胞膜,核周膜和内质网中都有存在,能够直接参与甲状腺细胞中碘化酪氨酸的偶联、酪氨酸的碘化及碘的氧化,是甲状腺激素合成的关键酶^[14]。Christensen 等^[15]用免疫组化方法检测甲状腺良、恶性病变中 TPO 的表达情况,发现大部分甲状腺良性病变 TPO 呈阳性表达,而恶性病变者 TPO 呈阴性表达。TPO 的合成是正常甲状腺滤泡细胞的重要功能之一。当甲状腺肿瘤细胞的分化异常时,TPO 的合成将受到影响,呈现出不同程度的低表达或表达缺失。甲状腺恶性肿瘤一定程度上与 TPO 基因的某些突变相关,TPO 蛋白在编码合成时有结构异常的状况出现,使得在恶性甲状腺肿瘤细胞中

TPO 发生了低表达的状况^[16]。本组研究中 TPO 在甲状腺良恶性结节表达的差异有统计学意义,表明 TPO 在甲状腺良恶性结节的鉴别中有重要价值。

本研究显示,利用 LPT 技术联合免疫细胞化学检测甲状腺病变的细针穿刺标本中 Galectin-3 阳性和 TPO 阴性能高度提示甲状腺恶性肿瘤,能有效提高甲状腺穿刺标本的制片质量,提高甲状腺穿刺细胞学的诊断准确性,减少临床误诊率和漏诊率,提高术前诊断率,以避免部分良性患者接受不必要的手术,或者误诊为良性结节延误治疗时机等,具有重要的临床指导意义。

[参考文献]

- [1] Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas; management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging[J]. Ann Intern Med, 1997, 126(3): 226-231
- [2] Paunovic I, Isic T, Havelka M, et al. Combined immunohistochemistry for thyroid peroxidase, galectin-3, CK19 and HBME-1 in differential diagnosis of thyroid tumors [J]. APMIS, 2012, 120(5): 368-379
- [3] Rossi ED, Raffaelli M, Mule' A, et al. Simultaneous immunohistochemical expression of HBME-1 and galectin-3 differentiates papillary carcinomas from hyperfunctioning lesions of the thyroid [J]. Histopathology, 2006, 48(7): 795-800
- [4] Renshaw AA, Gould EW. Why there is the tendency to "overdiagnose" the follicular variant of papillary thyroid carcinoma [J]. Am J Clin Pathol, 2002, 117(1): 19-21
- [5] Yousaf U, Christensen LH, Rasmussen AK, et al. Immunohistochemical staining for thyroid peroxidase (TPO) of needle core biopsies in the diagnosis of scintigraphically cold thyroid nodules [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2008, 68(6): 996-1001
- [6] Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions [J]. Lancet, 2001, 357(9269): 1644-1650