

2种免疫细胞化学染色方法在脑脊液转移性肺腺癌诊断中的应用

王一凡¹, 张兰兰^{1,2}, 杨巧¹, 付欣³, 张义磊², 郭英¹, 陈佳¹

(1. 西安大兴医院病理科, 西安 710016; 2. 西安交通大学基础医学院, 西安 710065; 3. 空军军医大学第一附属(西京医院)医院病理科, 西安 710032)

摘要 **目的:**探讨2种免疫细胞化学染色方法在脑脊液转移性肺腺癌诊断中的应用。**方法:**收集2016年1月至2023年12月有肺腺癌病史并脑脊液转移的病例11例,行脑脊液细胞学检查;对照组为11例脑脊液转移性肺腺癌的苏木精-伊红染色或巴氏染色样本,实验组为相应对照组重制片或褪色后行免疫细胞化学染色的样本,同时分析11例病例的临床资料、细胞学形态、诊断方法及免疫细胞化学染色结果。**结果:**对照组镜下见数个异型细胞聚集成团或单个细胞散在分布,细胞胞浆中等到丰富,细胞核大、深染,部分细胞可见明显核仁,实验组做TTF-1、NapsinA免疫细胞化学染色证实为转移性肺腺癌。**结论:**肺腺癌脑膜转移患者预后极差,脑脊液细胞学的明确诊断对临床意义重大;在脑脊液标本量有限且仅有极少量异型细胞的情况下,重制片或褪色后行免疫细胞化学染色,能做出明确诊断,以辅助临床进行治疗。

关键词 脑脊液; 转移性肺腺癌; 褪色; 免疫细胞化学染色

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)08-1171-05

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.010

Application of two immunocytochemical staining methods in the diagnosis of cerebrospinal fluid metastatic lung adenocarcinoma

WANG Yifan¹, ZHANG Lanlan^{1,2}, YANG Qiao¹, FU Xin³, ZHANG Yilei², GUO Ying¹, CHEN Jia¹. (1. Department of Pathology, Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710016, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710065, China; 3. Department of Pathology, Xijing Hospital, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract **Objective:** To investigate the application of two immunocytochemical staining methods in the diagnosis of cerebrospinal fluid metastatic lung adenocarcinoma. **Methods:** From January 2016 to December 2023, 11 patients with a history of lung adenocarcinoma and cerebrospinal fluid metastasis were collected for cerebrospinal fluid cytology. The control group included 11 cases of metastatic lung adenocarcinoma in cerebrospinal fluid stained with hematoxylin and eosin or Papanicolaou staining, and the experimental group included the re-prepared or faded samples of the corresponding control group for immunocytochemical staining. The clinical data, cytological morphology, diagnostic methods and immunocytochemical staining results of the 11 cases were analyzed. **Results:** In the control group, several atypical cells were observed in clusters or single cells scattered, with moderate to abundant cytoplasm, large and dark nuclei, and some cells had obvious nucleoli. In the experimental group, the metastatic lung adenocarcinoma was confirmed by TTF-1 and NapsinA immunocytochemical staining. **Conclusion:** The prognosis of patients with leptomeningeal metastasis from lung adenocarcinoma is extremely poor. The definite diagnosis of cerebrospinal fluid cytology is of great significance for clinical practice. When the amount of cerebrospinal fluid specimens is limited and there are only a small number of atypical cells, immunocytochemical staining after re-preparing or fading can make a definite diagnosis to assist clinical treatment.

Keywords cerebrospinal fluid; metastatic lung adenocarcinoma; colour fading; immunocytochemical staining

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.82260319)

[通信作者] 张兰兰, E-mail: 416619916@qq.com; 陈佳, E-mail: 1101621284@qq.com

[收稿日期] 2024-07-05

脑膜转移是恶性肿瘤严重的并发症,死亡率高,发生率约为5%,多来源于肺癌、乳腺癌和恶性黑色素瘤^[1]。非小细胞肺癌脑膜转移的发生率约为3.4%~3.8%^[2],其中肺腺癌最常见,通常缺乏特异性的临床及影像学表现。脑脊液肿瘤细胞检测是诊断软脑膜转移的金标准,可明确有无脑膜转移,虽然敏感度仅为57.1%^[3],但临床意义重大。异型细胞量极少的情况下光镜无法确诊,也无法包埋细胞块做后续工作。本文旨在研究实用易操作的技术方法,采用可重制片或将玻片褪色后复染免疫细胞化学染色方法(immunocytochemical staining, ICC)进一步明确诊断。

1 材料与方法

1.1 一般资料 本文为多中心研究,收集2016年1月至2023年12月有肺腺癌病史并脑脊液转移的病例,其中西安大兴医院2例、成都市第一人民医院2例、西京医院7例,共11例,其中男8例,女3例,年龄41~72岁,中位年龄54岁。均行脑脊液细胞学检查,对照组为11例脑脊液转移性肺腺癌的苏木精—伊红(HE)染色或巴氏染色样本,实验组为相应对照组重制片或褪色后行ICC的样本,镜下异型细胞量少,实验组做ICC证实为转移性肺腺癌,见表1。

表1 患者一般情况、临床表现、制片染色方式及ICC结果

病例序号	年龄/岁	性别	病史	临床表现	头部CT	制片及染色方式	ICC
1	58	男	肺腺癌	恶心、呕吐	无异常	HE染色,褪色后ICC	TTF-1(+)
2	50	男	肺腺癌	行走不稳	无异常	HE染色,褪色后ICC	TTF-1(+)、NapsinA(+)
3	47	男	肺腺癌	头痛、恶心	提示脑转移	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)
4	58	男	肺腺癌	头痛、呕吐	无异常	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)、NapsinA(+)
5	54	女	肺腺癌	头痛	无异常	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)、NapsinA(+)
6	41	男	肺腺癌	癫痫发作	无异常	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)
7	72	男	肺腺癌	头痛	无异常	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)、NapsinA(+)
8	63	男	肺腺癌	恶心、呕吐	提示脑转移	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)
9	55	女	肺腺癌	头痛	无异常	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)、NapsinA(+)
10	47	男	肺腺癌	头痛,中枢系统感染	无异常	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1(+)
11	46	女	肺腺癌	恶心呕吐	无异常	巴氏染色,重制片ICC	TTF-1染色失败

1.2 脑脊液制片及ICC制作方法 (1)脑脊液穿刺:腰椎穿刺术,脑脊液单次采集标本量1~2 mL;(2)液基薄层甩片法制片:将脑脊液全部加入液基细胞制片仓内,以1 250 r/min离心5 min,将脑脊液中的细胞全部甩至载玻片上(黏附胶片,保证褪色过程中细胞不丢失);(3)固定:离心完成后将含有细胞的载玻片立即放置95%乙醇固定15 min;(4)染色:HE细胞染色或巴氏染色;(5)诊断:阅片仅见个别异型细胞,需要做ICC证实;(6)褪色:病例1、病例2脑脊液细胞量很少,无法重新制片,只能将原来HE切片褪色重新做ICC:①将原HE切片放置二甲苯中静置,直至盖玻片松动,轻轻去下盖玻片再将载玻片放置二甲苯缸内静置10 min,脱去切片上的封片树胶;②将二甲苯中的切片取出放置在新的二甲苯缸中,洗去多余的树胶,将切片树胶脱干净;③将带有二甲苯的切片放置在无水乙醇中,洗去切片中的二甲苯,此步骤可以重复两次,直至二甲苯

洗干净;④将切片静置在95%乙醇中10 min×2次,脱去切片中的伊红;⑤将切片静置在85%乙醇中10 min×2次,脱去切片中的伊红;将切片静置在75%乙醇中10 min×2次,脱去切片中的伊红;⑥水洗1 min,洗去乙醇;⑦将切片放置在盐酸分化液(1%盐酸)中,脱去苏木精,边褪边观察,直到切片中无色为止;⑧水洗,晾片,切片晾干为止。病例3~病例10重新制片行ICC;(7)ICC:①烤片:切片室温自然干燥,在55℃烤片机上略微烤片(1~2 min),ICC不用脱蜡,将切片放置蒸馏水中浸泡待用;②修复:将切片放在装有EDTA抗原修复液内(pH 9.0)的锅内,液体为沸腾状态,盖上锅盖,继续加热10 min,时间到以后将锅从电磁炉中取下,用自来水冲洗冷却至室温,锅内温度低至室温后取出切片;③水洗:用免疫组化笔在玻片上圈出细胞区域,用PAS缓冲液清洗3次;④封闭:3%过氧化氢水溶液处理10 min,灭活内源性过氧化物酶的活性;⑤一抗:在圈内滴

加一抗 TTF-1 或 NapsinA 100 μ L, 室温静置 1 h; ⑥水洗: 用 PAS 缓冲液清洗 3 次; ⑦二抗: 在圈内滴加二抗 100 μ L, 室温静置 20 min; ⑧水洗: 用 PAS 缓冲液清洗 3 次; ⑨显色: 滴加 DAB 显色液 100 μ L, 静置 5 min; ⑩水洗: 用 PAS 缓冲液清洗 3 次; ⑪复染: 常用苏木精复染 5 s 即可; ⑫复染后自来水清洗数秒; ⑬脱水、透明、封片。因细胞片是自然风干, 一定注意烤片时间及温度, 且不能使用高压修复, 防止掉片。

2 结果

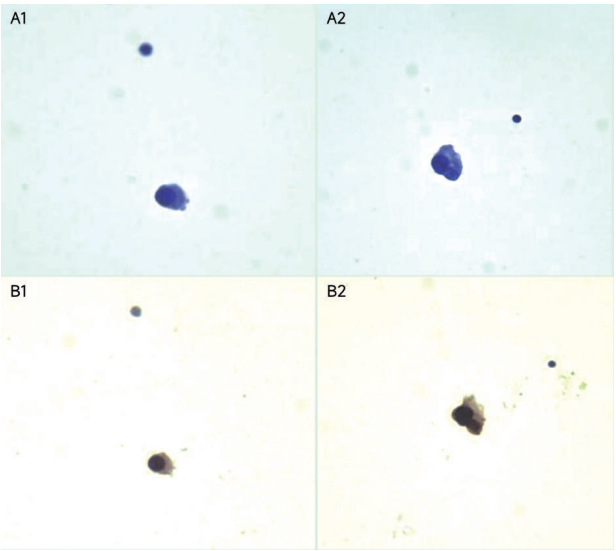
2.1 褪色后 ICC 染色结果 病例 1 和病例 2, 液基制片后行 HE 染色, 显微镜下观察到数个异型细胞聚集成团或单个细胞散在分布(图 1A1、图 1A2、图 2C1、图 2C2), 细胞胞浆中等至丰富, 核大且深染, 部分细胞可见明显核仁。由于这两例样本的细胞量极少, 因此选择将 HE 染色的玻片褪色后行 TTF-1 染色, 结果显示核强阳性表达(图 1B1、图 1B2、图 2D1、图 2D2)。由于病例 1 样本量过少, 无法进行重制片操作; 而对于病例 2, 剩余样本进行了液基重制片, 并进一步染 NapsinA, 结果显示胞浆颗粒状阳性。这一方法的优势在于能够同时观察 HE 细胞形态和 ICC 染色结果。结果显示, 病例 1 TTF-1 染色阳性, 病例 2 TTF-1 和 NapsinA 染色均阳性, 结合患者的肺腺癌病史, 证实脑脊液中的异型细胞为肺腺癌细胞转移。

2.2 重制片 ICC 染色结果 病例 3~病例 11 均为外院病例, 采用液基制片和巴氏染色方法。显微镜下观察到大多数异型细胞以单个散在分布为主, 细胞胞浆丰富, 细胞核大, 深染, 且核膜不规则(图 3E1、图 3E2)。与 HE 染色相比, 巴氏染色细胞核仁不明显。将剩余的脑脊液样本重制片后行 ICC 染色, 结果显示, TTF-1 在病例 8 和病例 9 中呈核阳性, NapsinA 在病例 4 中显示胞浆颗粒状阳性(图 3F1、图 3F2)。结合患者的肺腺癌病史, 证实了脑脊液中的异型细胞为肺腺癌细胞转移。

2.3 ICC 染色结果汇总 在细胞量极少的情况下, 可将原片褪色后行 ICC 染色; 而在细胞量充足的情况下, 可重制片行 ICC 染色。最终结果显示, 11 例病例中有 10 例 TTF-1 染色阳性, 5 例 NapsinA 染色阳性, 均证实了脑脊液中的异型细胞为肺腺癌细胞

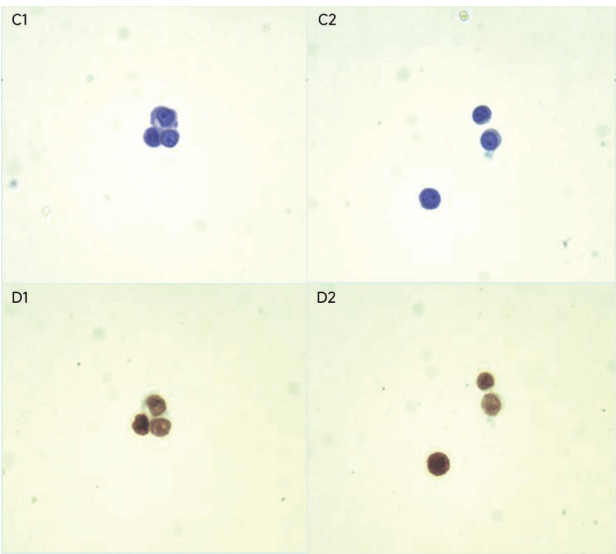
转移。在本研究中, 2 例因细胞量少选择了褪色后 ICC 染色, 9 例细胞量充足的样本则进行了重制片 ICC 染色。

2.4 组织学结果 显微镜下可见异型腺体在纤维间质中浸润性生长(图 4G)。通过免疫组织化学染色(IHC), TTF-1 染色结果为阳性(图 4H), 进一步证实该患者为肺腺癌。



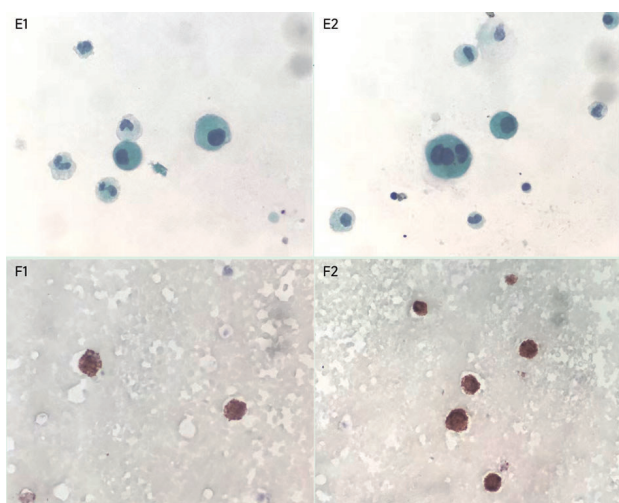
A1、A2: 对照组见单个异型细胞, 胞浆丰富, 核增大深染 (HE \times 40); B1、B2: 实验组异型细胞 TTF-1 阳性 (ICC \times 40)。

图1 病例1的脑脊液细胞学染色表达情况



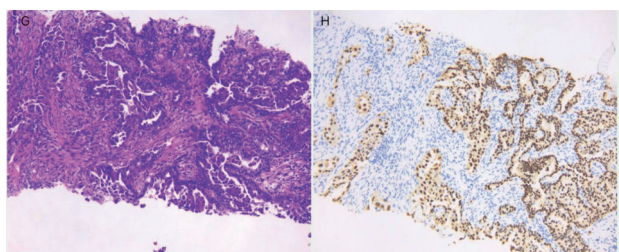
C1、C2: 对照组见单个分布的的异型细胞, 核大深染, 核膜稍不规则, 核仁明显 (HE \times 40); D1、D2: 实验组异型细胞 TTF-1 阳性 (ICC \times 40)。

图2 病例2的脑脊液细胞学染色表达情况



E1、E2:对照组见单个分布的的异型细胞,胞浆丰富,核大深染,核膜稍不规则(巴氏 $\times 40$);F1、F2:实验组异型细胞NapsinA阳性(ICC $\times 40$)。

图3 病例4的脑脊液细胞学巴氏染色及NapsinA染色表达情况



G:组织学结果,肺腺癌,异型腺体浸润性生长(HE $\times 40$);H:TTF-阳性(ICC $\times 20$)。

图4 病例1肺腺癌的组织学形态及TTF-1染色表达情况

3 讨论

肺癌最常见的亚型是肺腺癌^[4],病因目前尚不明确,容易发生于女性及吸烟者,脑膜转移是其最严重的并发症之一,任何阶段均可发生脑膜转移^[5],肺腺癌常转移至胸膜引起胸痛及胸腔积液,但本研究发现病例2首发症状为神经系统侵犯导致的行走不稳,全方位检查确诊为肺腺癌脑转移。60%的脑膜转移可能由脑实质中的转移性病灶直接侵犯引起或经血管转移至脑膜引起^[6],最终确诊依靠脑脊液中的肿瘤细胞。脑脊液通常送检量极少,仅1~2 mL,且提取困难,导致脑脊液细胞学阳性率偏低。目前认为脑脊液样本量是影响细胞病理学检测的重要因素,并且良好的制片可以辅助提高脑膜转移癌的诊断。对于提高脑脊液细胞学阳性率,薄

层液基细胞学技术已在大多数检测细胞学标本泛使用^[7],它具有更高的细胞回收率和更好的保存作用,残留液体也可在如免疫细胞化学评估和分子中继续应用。正常情况下脑脊液细胞量少,以个别淋巴细胞、单核细胞为主,本研究镜下见少量单个核大、深染的细胞,胞浆丰富,核染色质粗糙,核膜稍不规则,异型细胞量过少光镜无法做出明确诊断。由于脑脊液是所有细胞学中标本量最少的,无法进行常规包埋和琼脂包埋。TTF-1、NapsinA是肺腺癌最常用的免疫标志物^[8],TTF-1表达率高达75%~85%,呈弥漫一致的核的强阳性表达;NapsinA表达率高达70%~90%,胞浆颗粒状阳性表达,因此本研究将原片褪色后或剩余样本重新制片后选取最常用的肺腺癌标记物TTF-1、NapsinA进行标记,除病例11 TTF-1染色失败外,其余10例结果均显示阳性,其中5例行NapsinA染色,结果均阳性,结合临床肺腺癌病史、形态学及ICC,最终诊断为肺腺癌转移。

病例1、病例2染色方法的优势是可以同时观察同一肿瘤细胞的HE形态及ICC结果,对比更明显,判读结果更精准。因阳性细胞量极少,HE染色玻片中极少量异型细胞单个散在分布,为防止操作过程中单个细胞脱落影响诊断结果,有以下几点注意事项:(1)制片时采用黏附胶片提高细胞与玻片的黏附性,防止细胞脱落;(2)褪色步骤中玻片在95%乙醇固定液中固定两轮共20 min;(3)ICC开始前玻片不建议高温烤片需自然晾干;(4)减少修复时间,组织学切片修复20 min,脑脊液单个细胞仅需10 min;(5)修复后自来水冲洗缩短冷却时间,减少玻片在修复液中停留的时间。病例1的TTF-1染色胞浆有极弱的阳性,我们考虑存在少量非特异性着色,对于如何消除或减弱泛染现象,分析具体原因:(1)3%过氧化氢水溶液处理时间不足,未完全灭活内源性过氧化物酶的活性;(2)加一抗时,抗体浓度稍高;(3)室内温度超过25℃。病例2步骤1时间延长,结果正常未出现非特异性着色。

临床表现方面,由于肿瘤细胞在软脑膜中的播散,导致脑脊液循环受阻,因而产生颅内压增高以及大脑脑膜损害等相应表现^[9],但是表现并不特异,如头痛、恶心、呕吐、视觉障碍、听力损失和神经认知障碍等。脑膜转移癌影像学一经确诊提示预后

极差^[10],但目前有脑膜转移症状阳性的患者中,影像学阳性率不足20%。本文病例1的3次影像学报告均无明显阳性表现,患者意识淡漠经脑脊液细胞学确诊为肺腺癌转移,5个月后意识丧失,重度昏迷,抢救无效死亡。病例2确诊肺腺癌颅内转移20个月仍存活,可能与积极治疗有关。一旦出现肿瘤脑膜转移,临床应予以高度重视。

肺腺癌一旦发生脑膜转移患者生存期短、预后极差^[11],在影像学确诊率极低的情况下,脑脊液细胞学的明确诊断对临床意义重大。在脑脊液标本量有限且仅有极少量异型细胞的情况下,重新制片或褪色后行ICC染色,能做出明确诊断辅助临床进行治疗。

参考文献:

- [1] OZCAN G, SINGH M, VREDENBURGH J J. Leptomeningeal metastasis from non-small cell lung cancer and current landscape of treatments[J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American association for cancer research*, 2023, 29(1): 11-29.
- [2] ZHANG Y J, LI H, ZHONG R, et al. Detection of meningeal metastasis in the cerebrospinal fluid in lung adenocarcinoma: case report[J]. *Clinical lung cancer*, 2020, 21(5): e493-e496.
- [3] JIANG B Y, LI Y S, GUO W B, et al. Detection of driver and resistance mutations in leptomeningeal metastases of NSCLC by next-generation sequencing of cerebrospinal fluid circulating tumor cells[J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American association for cancer research*, 2017, 23(18): 5480-5488.
- [4] HUTCHINSON B D, SHROFF G S, TRUONG M T, et al. Spectrum of lung adenocarcinoma[J]. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, 2019, 40(3): 255-264.
- [5] PELLERINO A, BRASTIANOS P K, RUDÀ R, et al. Leptomeningeal metastases from solid tumors: recent advances in diagnosis and molecular approaches[J]. *Cancers*, 2021, 13(12): 2888.
- [6] DANKNER M, LAM S, DEGENHARD T, et al. The underlying biology and therapeutic vulnerabilities of leptomeningeal metastases in adult solid cancers[J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 732.
- [7] ARGON A, UYAROĞLU M A, NART D, et al. The effectiveness of the liquid-based preparation method in cerebrospinal fluid cytology[J]. *Acta cytologica*, 2013, 57(3): 266-270.
- [8] ISO H, HISAKANE K, MIKAMI E, et al. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression and the efficacy of combination therapy with immune checkpoint inhibitors and cytotoxic chemotherapy in non-squamous non-small cell lung cancer[J]. *Translational lung cancer research*, 2023, 12(9): 1850-1861.
- [9] LEE S J, LEE J I, NAM D H, et al. Leptomeningeal carcinomatosis in non-small-cell lung cancer patients: impact on survival and correlated prognostic factors[J]. *Journal of thoracic oncology: official publication of the international association for the study of Lung Cancer*, 2013, 8(2): 185-191.
- [10] CHAKRABARTY N, MAHAJAN A, PATIL V, et al. Imaging of brain metastasis in non-small-cell lung cancer: indications, protocols, diagnosis, post-therapy imaging, and implications regarding management[J]. *Clinical radiology*, 2023, 78(3): 175-186.
- [11] NIE N F, ZHOU H D, ZHANG K J, et al. Genotyping of cerebrospinal fluid in lung cancer patients with leptomeningeal metastasis[J]. *Thoracic cancer*, 2022, 13(18): 2574-2583.

本文引用格式:

王一凡, 张兰兰, 杨巧, 等. 2种免疫细胞化学染色方法在脑脊液转移性肺腺癌诊断中的应用[J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(8): 1171-1175. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.010

WANG Y F, ZHANG L L, YANG Q, et al. Application of two immunocytochemical staining methods in the diagnosis of cerebrospinal fluid metastatic lung adenocarcinoma [J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2024, 41(8): 1171-1175. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.010