

CD56、TTF-1、CK7 和 p63 在肺癌 EBUS-TBNA 标本中的表达及对分型诊断的价值

王贵良¹, 张庆¹, 侯刚², 王秋月², 黎威²

1. 沈阳市第十人民医院胸膜炎科, 辽宁 沈阳 110041;

2. 中国医科大学附属第一医院呼吸疾病研究所, 辽宁 沈阳 110001

【摘要】目的 观察神经细胞黏附分子 CD56 (CD56)、甲状腺转录因子-1 (TTF-1)、细胞角蛋白 7 (CK7) 和 p63 蛋白在肺癌患者超声支气管镜引导下的经支气管针吸活检(EBUS-TBNA)标本中的表达, 并探讨其在肺癌组织学分型中的诊断价值。**方法** 采用免疫组织化学染色 SP 法检测中国医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科 2014 年 9 月至 2017 年 8 月收治的 82 例肺癌患者 EBUS-TBNA 标本中 CD56、TTF-1、CK7 和 p63 的表达情况, 分析免疫表型在肺癌病理分型中的表达特点, 评估其鉴别诊断的敏感性和特异性。**结果** CD56 和 TTF-1 在肺小细胞肺癌中阳性表达率均为 94.3%, 其诊断小细胞肺癌的灵敏度均为 94.3%, 特异性分别为 97.9% 和 29.8%; TTF-1 和 CK7 在肺腺癌中的阳性表达率均为 89.2%, 其诊断肺腺癌的灵敏度均为 89.2%, 特异性分别为 26.7% 和 64.4%; p63 在肺鳞癌中的阳性表达率为 100.0%, 其诊断肺鳞癌的灵敏度和特异性分别为 100.0% 和 84.7%。TTF-1(+) / CD56(+) 诊断肺小细胞癌的敏感性和特异性分别为 91.4% 和 97.9%, TTF-1(+) / CK7(+) 诊断肺腺癌敏感性和特异性分别为 83.8% 和 77.8%。**结论** 肺癌患者 EBUS-TBNA 标本的 CD56、TTF-1、CK7 和 p63 免疫组织化学染色有助于肺癌的组织学分型。

【关键词】 超声支气管镜引导下的经支气管针吸活检; 肺癌; 神经细胞黏附分子 CD56; 甲状腺转录因子-1; 细胞角蛋白 7; p63

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2019)17—2177—04

Expression of CD56, TTF-1, CK7, and p63 in endobronchial ultrasound-guided tranbronchial needle aspiration samples of lung cancer and its diagnostic value in the classification of lung cancer. WANG Gui-liang¹, ZHANG Qing¹, HOU Gang², WANG Qiu-yue², LI Wei². 1. Department of Pleurisy, Shenyang Tenth People's Hospital, Liaoning 110041, Shenyang, CHINA; 2. Institute of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Liaoning 110001, Shenyang, CHINA

[Abstract] **Objective** To investigate the expression levels of neural cell adhesion molecule (CD56), thyroid transcription factor-1 (TTF-1), cytokeratin7 (CK7), and p63 in endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) samples of lung cancer and the diagnostic value in the classification of lung cancer. **Methods** The expression of CD56, TTF-1, CK7, and p63 in EBUS-TBNA samples of eighty-two patients with lung cancer from Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of China Medical University from September 2014 to August 2017 were detected by immunohistochemical SP method, to analyze the immunological phenotypical features in different histopathological types of lung cancer and to evaluate the sensitivity and specificity of differential diagnosis in the classification of lung cancer. **Results** The positive expression rates of CD56 and TTF-1 in small-cell lung cancer (SCLC) were 94.3% and 94.3%, and the sensitivity of CD56 and TTF-1 in the diagnosis of SCLC were 94.3% and 94.3%, and specificity were 97.9% and 29.8% respectively. The positive expression rates of TTF-1 and CK7 in lung adenocarcinoma (ADC) were both 89.2%, the sensitivity of TTF-1 and CK7 in the diagnosis of ADC were both 89.2%, and specificity were 26.7% and 64.4% respectively. The positive expression rate of p63 in lung squamous cell carcinoma (SCC) was 100.0%, the sensitivity and specificity of p63 in the diagnosis of SCC were 100.0% and 84.7%, respectively. The sensitivity and specificity of CD56(+) / TTF-1(+) in the diagnosis of SCLC were 91.4% and 97.9%, and the sensitivity and specificity of TTF-1(+) / CK7(+) in the diagnosis of ADC were 83.8% and 77.8%, respectively. **Conclusion** Immunohistochemical staining of CD56, TTF-1, CK7, and p63 in EBUS-TBNA samples of lung cancer is helpful for the classification of lung cancer.

[Key words] Endobronchial ultrasound-guided tranbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA); Lung cancer; Neural cell adhesion molecule (CD56); Thyroid transcription factor-1 (TTF-1); Cytokeratin7 (CK7); p63

肺癌是全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一^[1],在我国,肺癌是男性发病率和病死率最高的恶性肿瘤,是女性发病率仅次于乳腺癌和病死率最高的恶性肿瘤^[2]。肺癌的诊断和准确分期是选择何种治疗的前提,超声支气管镜引导下的经支气管针吸活检(endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration, EBUS-TBNA)在肺癌诊断、分期中具有较高的应用价值^[3-4],EBUS-TBNA标本组织小且易牵拉挤压,单纯形态学有时是难以确诊的^[5-6],特别是在低分化肿瘤和细胞成分少时。免疫组织化学染色在肺癌的诊断中有重要价值,目前世界卫生组织推荐应用免疫组织化学染色用于肺癌组织学分型^[7]。EBUS-TBNA标本可进行免疫组织化学染色及分子学的检测^[8],本研究通过对支气管内超声引导经支气管针吸活检标本的免疫组织化学染色结果进行分析,评价神经细胞粘附分子CD56(CD56)、甲状腺转录因子-1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)、细胞角蛋白7(cytokeratin7, CK7)和p63蛋白在肺癌组织学分型中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择中国医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科2014年9月至2017年8月行EBUS-TBNA检查,常规形态学未能确诊而经免疫组化明确组织学类型的82例肺癌患者为研究对象,排除肺外来源的恶性肿瘤,收集患者的临床病理资料,包含性别、年龄、肿瘤组织学分型、EBUS-TBNA样本免疫组织化学结果。

1.2 研究方法

1.2.1 EBUS-TBNA (1)取材:常规型电子支气管镜BF-260,超声支气管镜为UFC260W;穿刺针为NA-201SX-4022。(2)术前准备:①完善血常规、凝血功能、肺部CT等检查;②检查前禁食水6 h以上,签署常规气管镜知情同意书;③建立静脉通道。患者给予地西泮5 mg肌肉注射镇静,2%的利多卡因10 mL雾化吸入15 min,取平卧位,鼻导管吸氧,心电监测、血氧饱和度监测。(3)操作:常规电子支气管镜检查气道后,使用超声支气管镜,检查水囊,根据胸部CT提示病变部位,使用王氏定位法确定穿刺部位,通过超声探头明确肿物、淋巴结和血管的位置和相互关系,在超声实时引导下进行穿刺活检,根据获得的组织样本量,每部位穿刺2~4次,组织标本于1.5 mL EP管中10%的福尔马林固定送检,患者平稳后返回病房,穿刺后禁食水2 h。

1.2.2 免疫组化 EBUS-TBNA标本采用常规石蜡包埋,制成4 μm切片,经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(streptavidin peroxidase法, S-P),3%的过氧化氢

灭活内源性过氧化物酶,高温高压抗原修复,一抗4℃孵育过夜,滴加生物素标记的二抗孵育,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗后,二氨基联苯胺法(DAB)显色,苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.3 结果判读 CD56以细胞膜呈现黄色或者棕黄色为阳性,TTF-1和p63以细胞核呈现黄色或者棕黄色为阳性,CK7以细胞质和细胞膜呈现黄色或者棕黄色为阳性,病理结果由我院两位有经验的病理科医生审核。

1.3 统计学方法 应用SPSS 20.0软件进行数据统计分析,率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 82例患者中男性55例,女性27例;年龄30~74岁,平均(58.07±8.68)岁;小细胞肺癌35例,腺癌37例,鳞癌10例。

2.2 CD56、TTF-1、CK7和p63在肺癌患者EBUS-TBNA标本中的表达 CD56在不同的肺癌组织学类型中表达差异有统计学意义($\chi^2=70.2, P<0.05$),TTF-1在不同的肺癌组织学类型中表达差异有统计学意义($\chi^2=47.3, P<0.05$),CK7在不同的肺癌组织学类型中表达差异有统计学意义($\chi^2=24.4, P<0.05$),p63在不同的肺癌组织学类型中表达差异有统计学意义($\chi^2=33.6, P<0.05$),见表1。CD56在小细胞肺癌中高表达(图1),阳性表达率为94.3%(33/35),高于非小细胞肺癌的2.1%(1/47),差异有统计学意义($\chi^2=70.2, P<0.05$);TTF-1在肺腺癌中高表达(图2),阳性表达率为89.2%(33/37),高于非肺腺癌的73.3%(33/45),差异无统计学意义($\chi^2=3.2, P>0.05$);TTF-1在小细胞肺癌中高表达,阳性表达率为94.3%(33/35),高于非小细胞肺癌的70.2%(33/47),差异有统计学意义($\chi^2=7.4, P<0.05$);CK7在肺腺癌中高表达(图3),阳性表达率为89.2%(33/37),高于非肺腺癌的35.6%(16/45),差异有统计学意义($\chi^2=24.3, P<0.05$);p63在肺鳞癌高表达(图4),阳性表达率为100.0%(10/10),高于非肺鳞癌的15.3%(11/72),差异具有统计学意义($\chi^2=28.9, P<0.05$),见表1。

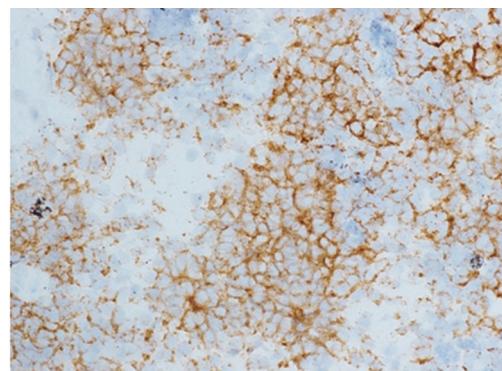


图1 CD56在小细胞肺癌的细胞膜阳性表达(S-P法×400)

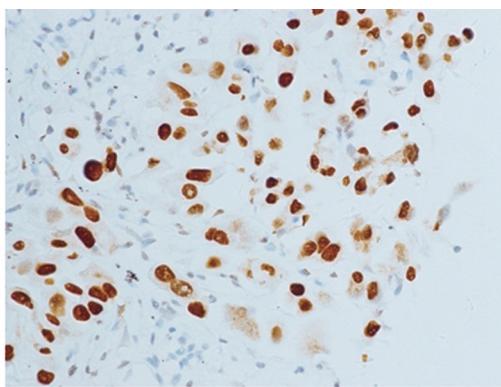


图2 TTF-1在肺腺癌细胞核中阳性表达(SP法×400)

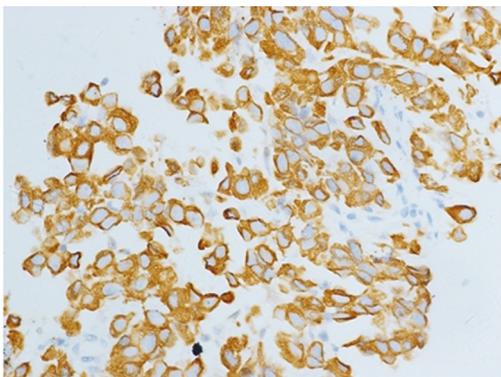


图3 CK7在肺腺癌细胞质和细胞膜中阳性表达(SP法×400)

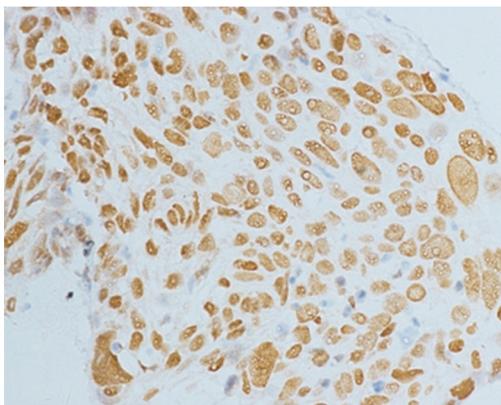


图4 p63在肺鳞癌细胞核中阳性表达(SP法×400)

表1 肺癌患者EBUS-TBNA标本中CD56、TTF-1、CK7和p63的阳性率比较[例(%)]

病理类型	例数	CD56	TTF-1	CK7	p63
小细胞肺癌	35	33 (94.3) ^a	33 (94.3) ^b	12 (34.3)	4 (11.4)
腺癌	37	1 (2.7)	33 (89.2) ^c	33 (89.2) ^d	7 (18.9)
鳞癌	10	0 (0)	0 (0)	4 (40.0)	10 (100.0) ^e
χ^2 值		70.2	47.3	24.4	33.6
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:三组患者之间两两比较,^aCD56在小细胞肺癌中的阳性表达高于腺癌和鳞癌($\chi^2=70.2, P<0.05$),^bTTF-1在小细胞肺癌中的阳性表达高于腺癌和鳞癌($\chi^2=7.4, P<0.05$),^cTTF-1在肺腺癌中的阳性表达高于鳞癌($\chi^2=3.2, P>0.05$),^dCK7在肺腺癌中的阳性表达高于鳞癌($\chi^2=24.3, P<0.05$),^ep63在肺鳞癌中的阳性表达高于腺癌($\chi^2=28.9, P<0.05$)。

2.3 CD56、TTF-1诊断小细胞肺癌和非小细胞肺癌的价值 CD56诊断小细胞肺癌的敏感性和特异性分别为94.3%、97.9%,阳性预测值和阴性预测值分别为95.1%、95.8%,TTF-1诊断小细胞肺癌的敏感性

和特异性分别为94.3%、29.8%,阳性预测值和阴性预测值分别为50.0%、87.5%。

2.4 TTF-1、CK7诊断肺腺癌和非肺腺癌的价值 TTF-1诊断肺腺癌的敏感性和特异性分别为89.2%、26.7%,阳性预测值和阴性预测值分别50.0%、75.0%,CK7诊断肺腺癌的敏感性和特异性分别为89.2%、64.4%,阳性预测值和阴性预测值分别为67.4%、87.9%。

2.5 p63诊断肺鳞癌和非肺鳞癌的价值 p63诊断肺鳞癌中敏感性和特异性分别为100.0%、84.7%,阳性预测值和阴性预测值分别为52.4%、100.0%。

2.6 TTF-1和CD56联合诊断小细胞肺癌和非小细胞肺癌的价值 TTF-1(+) / CD56(+)在小细胞肺癌中的阳性表达率为91.4% (32/35),高于非小细胞肺癌的2.1% (1/47),差异具有统计学意义($\chi^2=66.5, P<0.05$),其诊断小细胞肺癌的敏感性和特异性为91.4%、97.9%,阳性预测值和阴性预测值分别为97.0%、93.9%。

2.7 TTF-1和CK7联合诊断肺腺癌和非肺腺癌的价值 TTF-1(+) / CK7(+)在肺腺癌中的阳性表达率为83.8%(31/37),高于非肺腺癌的22.2%(10/45),差异具有统计学意义($\chi^2=52.2, P<0.05$),其诊断肺腺癌的敏感性和特异性分别为83.8%和77.7%,阳性预测值和阴性预测值分别为75.6%和85.4%。

3 讨论

肺癌分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,腺癌和鳞癌是非小细胞肺癌主要的组织学类型,肺癌治疗目前趋向于个体化和强调靶向治疗,小细胞肺癌主要是全身的化疗联合放疗,非小细胞癌患者目前推荐行表皮生长因子受体(EGFR)、间变型淋巴激酶(ALK)、酪氨酸激酶胰岛素受体(ROS1)等基因的检测以便进行相应的靶向药物的治疗,如EGFR突变患者,使用酪氨酸酶抑制剂靶向治疗可让患者获得一定的生存收益^[9-10],在鳞癌患者中,无论程序性死亡受体(PD)-L1是否有表达,PD-L1单抗Nivolumab治疗均能获得生存收益^[11],肺癌组织学明确分型有助肺癌的规范化治疗。近80%的中晚期肺癌患者是通过小样本取材确诊的^[12],EBUS-TBNA小样本结合免疫组织化学在肺癌组织学分型中具有较高的应用价值。

CD56是一种神经细胞黏附分子跨膜蛋白,在胎儿的发生发育和神经内分泌细胞相互联系中发挥重要的作用,广泛分布于神经外胚层来源的肿瘤中,是神经内分泌肿瘤的特异性指标,尤其是在小细胞肺癌中,CD56在小细胞肺癌的阳性率为90%~100%^[13-15],本研究中CD56在诊断小细胞肺癌中的敏感性和特异性分别为94.3%、97.9%,与既往研究相一致,CD56可作为小细胞肺癌的特异性的免疫标记物。

TTF-1是甲状腺特异性增强子结合蛋白,是一种主要表达于胚胎、甲状腺上皮、成人II型肺泡上皮的组织特异性转录因子,在甲状腺癌和肺腺癌中阳性表达^[16-17],

有助于原发性肺腺癌和转移性肺腺癌的鉴别^[18]。TTF-1在肺腺癌和小细胞肺癌均阳性表达^[19]。本研究中TTF-1在诊断肺腺癌中的敏感性和特异性分别为89.2%、26.7%，在诊断小细胞肺癌中的敏感性和特异为94.3%、29.8%，TTF-1诊断腺癌和小细胞癌均表现敏感性高而特异性低。免疫组织化学指标的联合有助于两者的诊断，TTF-1(+)/CD56(+)诊断小细胞肺癌的敏感性和特异性为91.4%、97.9%，TTF-1(+)/CK7(+)诊断肺腺癌的敏感性和特异性分别为83.8%和71.7%，联合CD56、TTF-1和CK7免疫组织化学染色有助于肺腺癌和小细胞肺癌的鉴别诊断。TTF-1在肺鳞癌组织中通常不表达，本研究TTF-1在肺鳞癌组织中无阳性表达，可作为与肺鳞癌鉴别诊断的标记物之一。

CK7主要广泛表达于乳腺、卵巢、胰腺、子宫内膜、膀胱和肺，在这些部位发生的腺癌中常阳性表达，CK7在肺腺癌中常阳性表达^[20]，本研究中CK7在诊断肺腺癌中的敏感性和特异性分别为89.2%、64.4%，与既往研究相一致^[20]，CK7在35.6%的非腺癌中阳性表达，因此，在肺腺癌鉴别诊断中，应该联合其他特异性较高的抗体。

p63是抑癌基因p53家族一员，在肿瘤的发生发展中起着重要的作用，广泛而有选择性的表达于人皮肤、肺、乳腺和泌尿生殖系统等，是肺鳞癌常用的免疫标记物，p63在诊断鳞癌中敏感性和特异性分别为100.0%、84.7%，与既往的文献报道相一致^[21-22]，p63在肺的非鳞癌中也有不同程度的表达。通常表现为局灶性低水平表达^[23]。而p63在肺鳞癌中的表现为弥漫性强阳性表达。因此在诊断肺鳞时，在形态学的基础上，应结合p63表达的强度和范围，同时联合其他免疫指标。

综上所述，肺癌患者EBUS-TBNA标本的CD56、TTF-1、CK7和p63免疫组织化学染色有助于肺癌的组织学分型。

参考文献

- [1] RAFIEMANESH H, MEHTARPOUR M, KHANI F, et al. Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8 (6): 1094-1102.
- [2] 陈万青, 左婷婷, 郑荣寿, 等. 2013年中国肺癌发病与死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(10): 795-800.
- [3] SIMON M, POP B, TOMA L, et al. Endobronchial ultrasound-one year of experience in clinical practice [J]. *Clujul Med*, 2017, 90(2): 188-195.
- [4] ROSSO L, FERRERO S, MENDOGNI P, et al. Ten-year experience with endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: single center results in mediastinal diagnostic and staging [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(Suppl 5): S363-S369.
- [5] PELOSI G, ROSSI G, BIANCHI F, et al. Immunohistochemistry by means of widely agreed-upon markers (cytokeratins 5/6 and 7, p63, thyroid transcription factor-1, and vimentin) on small biopsies of non-small cell lung cancer effectively parallels the corresponding profiling and eventual diagnoses on surgical specimens [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(6): 1039-1049.
- [6] 丁岚姚, 姚晨, 梅霞, 等. 免疫组化在肺小细胞癌和肺非小细胞癌活检标本中的鉴别诊断价值[J]. 中国医师杂志, 2014, 16(4): 488-490.
- [7] TRAVIS WD, BRAMBILLA E, BURKE AP, et al. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(9): 1240-1242.
- [8] ROOPER LM, NIKOLSKAIA O, CARTER J, et al. A single EBUS-TBNA procedure can support a large panel of immunohistochemical stains, specific diagnostic subtyping, and multiple gene analyses in the majority of non-small cell lung cancer cases [J]. *Hum Pathol*, 2016, 51: 139-145.
- [9] DOUILLARD JY, OSTOROS G, COBO M, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study [J]. *Brit J Cancer*, 2014, 110(1): 55-62.
- [10] YANG JC, WU YL, SCHULER M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16 (2): 141-151.
- [11] BRAHMER J, RECKAMP KL, BAAS P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer [J]. *New Eng J Med*, 2015, 373(2): 123-135.
- [12] KERR KM. Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology [J]. *Histopathology*, 2012, 60(4): 531-46.
- [13] ROOPER LM, SHARMA R, LI QK, et al. INSM1 demonstrates superior performance to the individual and combined use of synaptophysin, chromogranin and CD56 for diagnosing neuroendocrine tumors of the thoracic cavity [J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(11): 1561-1569.
- [14] ZHENG G, ETTINGER DS, MALEKI Z. Utility of the quantitative Ki-67 proliferation index and CD56 together in the cytologic diagnosis of small cell lung carcinoma and other lung neuroendocrine tumors [J]. *Acta Cytologica*, 2013, 57(3): 281-290.
- [15] 张宝燕, 李向红, 崔海宏. CD56、嗜铬蛋白A和突触素在小细胞肺癌中的表达及其临床诊断价值[J]. 诊断病理学杂志, 2009, 16(5): 340-342.
- [16] ARGON A, NART D, VERAL A. The value of cytokeratin 5/6, p63 and thyroid transcription factor-1 in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and non-small-cell lung cancer of the lung [J]. *Turk Patoloji Derg*, 2015, 31(2): 81-88.
- [17] ROSAI J. Immunohistochemical markers of thyroid tumors: significance and diagnostic applications [J]. *Tumori*, 2003, 89(5): 517-519.
- [18] EL-MAQSOUDE NM, TAWFIEK ER, ABDELMEGED A, et al. The diagnostic utility of the triple markers Napsin A, TTF-1, and PAX8 in differentiating between primary and metastatic lung carcinomas [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3123-3134.
- [19] 张雯雯, 孔庆暖, 韩增磊, 等. 小细胞肺癌组织CD56、CgA、Syn及TTF-1表达及联合诊断意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2013, 28(2): 109-111.
- [20] JAFARIAN AH, GHARIB M, MOHAMMADIAN ROSHAN N, et al. The Diagnostic Value of TTF-1, p63, HMWK, CK7, and CD56 Immunostaining in the Classification of Lung Carcinoma [J]. *Iran J Pathol*, 2017, 12(3): 195-201.
- [21] BIR F, AKSOY ALTINBOGA A, SATIROGLU TUFAN NL, et al. Potential utility of p63 expression in differential diagnosis of non-small-cell lung carcinoma and its effect on prognosis of the disease [J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20(3): 219-226.
- [22] 段楚晓, 付圣灵, 付向宁. CK5/6、p63、TTF-1和CK8/18在NSCLC组织中的表达及意义[J]. 华中科技大学学报, 2015, 44(2): 147-151.
- [23] TATSUMORI T, TSUTA K, MASAI K, et al. p40 is the best marker for diagnosing pulmonary squamous cell carcinoma: comparison with p63, cytokeratin 5/6, desmocollin-3, and sox2 [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014, 22(5): 377-382.

(收稿日期:2019-03-08)