

免疫组化在甲状腺肿瘤中的诊断价值

甲状腺癌病理形态学诊断是个难点，尤其是滤泡癌，要有侵袭性证据，如包膜及血管侵犯；乳头状癌要有核的特征性改变方可诊断。而滤泡型乳头状癌，这类肿瘤同滤泡性肿瘤类似，不含有乳头状结构，但肿瘤细胞核有乳头状癌细胞核特征，故而诊断中难以明确。

大多数甲状腺癌起源于滤泡上皮，如分化好的乳头状癌及滤泡性癌均可见肿瘤细胞类似正常滤泡上皮并含有胶质，然而分化差的癌或未分化癌很少看到滤泡上皮分化，此时需要通过免疫组化确诊。甲状腺髓样癌起源于滤泡旁细胞，组织形态学多样，时有类似滤泡上皮分化，易误诊为乳头状癌或滤泡性癌，此时也要通过免疫组化检测神经内分泌标记得以确诊。

此外，在鉴别甲状腺原发性癌与转移性肿瘤时，免疫组化也起到非常重要作用。

一、甲状腺滤泡上皮细胞标记

对诊断分化差的甲状腺癌及未分化癌或间变性癌时，应用甲状腺滤泡上皮细胞标记如甲状腺球蛋白（Thyroglobulin）、甲状腺转录因子（TTF-1）、PAX8有重要辅助诊断价值。此外，甲状腺乳头状癌中的鞋钉样亚型与其他部位，如乳腺、肺、卵巢等的微乳头状癌形态学类似，因此，需要加以鉴别。

1 甲状腺球蛋白（Thyroglobulin, Tg）：是甲状腺滤泡上皮分泌的660 ku糖蛋白，每个Tg约有2个甲状腺素(T4)和0.5个三碘甲状腺原氨酸(T3)分子，储存在滤泡腔中。经水解可生成甲状腺素和3, 5, 3'-三碘甲状腺原氨酸。

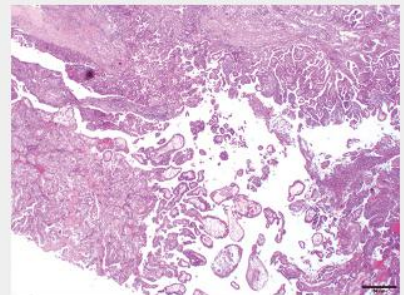
Tg表达于甲状腺滤泡上皮及其胶质。几乎100%的甲状腺乳头状癌表达Tg，在其他甲状腺肿瘤中表达情况：>75%的滤泡性癌及50-90%的分化差的甲状腺癌表达Tg。而未分化癌或间变性癌则一般不表达Tg，因此，在诊断未分化癌时不能因为Tg阴性而否定其诊断。

2 甲状腺转录因子（TTF-1）：是含有同源结构域的Nkx2基因家族成员之一。该基因定位于染色体14q13，其编码的蛋白产物含有371个氨基酸残基，相对分子质量为3.8×10⁴，是一个含有螺旋-转角-螺旋结构的转录因子。TTF-1的表达定位于肺、甲状腺、前脑的上皮和垂体，并在胎盘形成过程中起到提高转录活性的作用，在上述器官发育成熟过程中起着至关重要的作用。

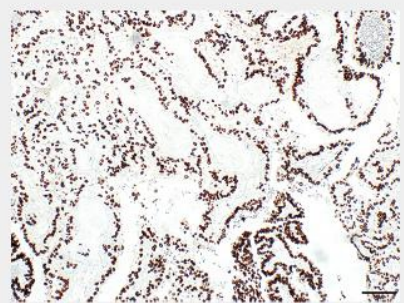
TTF-1表达于正常甲状腺滤泡上皮及滤泡旁细胞和肺泡上皮。>90%的分化好的甲状腺乳头状癌、滤泡性癌及髓样癌表达TTF-1，嗜酸细胞癌则表达率低。<20%的未分化癌表达TTF-1。大约70-80%的肺腺癌表达TTF-1，少数肺鳞癌及其他部位如泌尿道、乳腺及胃肠道的腺癌也可表达TTF-1。此外，TTF-1的克隆号也非常重要，相比8G7G3/1，SPT24在肺腺癌中特异性高。

分化差的甲状腺癌要与转移性分化差的肺腺癌鉴别，此时TTF-1则无帮助，需要结合Tg和PAX8来辅助诊断。尽管未分化癌TTF-1表达率低，但如果阳性则诊断价值就大。需要明确的是，少部分分化差的甲状腺癌、未分化癌及鞋钉样型的甲状腺乳头状癌可以表达Napsin A，因此，TTF-1及Napsin A不能用于鉴别肺腺癌与甲状腺上述原发癌。此外，TTF-1不能用于鉴别分化差的甲状腺乳头状癌与髓样癌。

3 PAX8：胚胎发育过程中PAX8对甲状腺、肾、部分中枢神经系统、内耳、眼、wolffian管和Müllerian管器官的形成起关键作用。与TTF-1一样，>90%的滤泡性癌及分化差的甲状腺癌表达PAX8，几乎100%的甲状腺乳头状癌表达PAX8。重要的是，>2/3的甲状腺未



甲状腺乳头状癌H.E × 40



IHC: PAX8, 细胞核强阳性表达

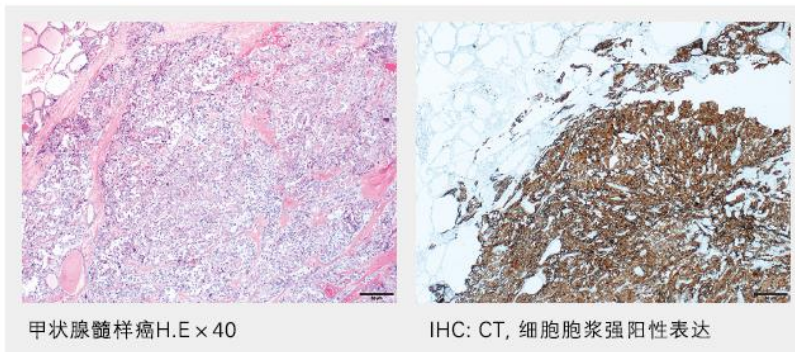
分化癌表达PAX8，因此，PAX8对诊断未分化癌非常有价值。PAX8也可表达于部分髓样癌。

当然，PAX8可表达于肾癌、女性生殖道及胸腺癌，也表达于部分胰腺癌、膀胱癌及肺鳞癌。PAX8可表达于部分神经内分泌肿瘤，包括来源于甲状腺旁腺的肿瘤。少数非上皮性肿瘤如横纹肌肉瘤可表达PAX8。

二、甲状腺滤泡旁细胞标记

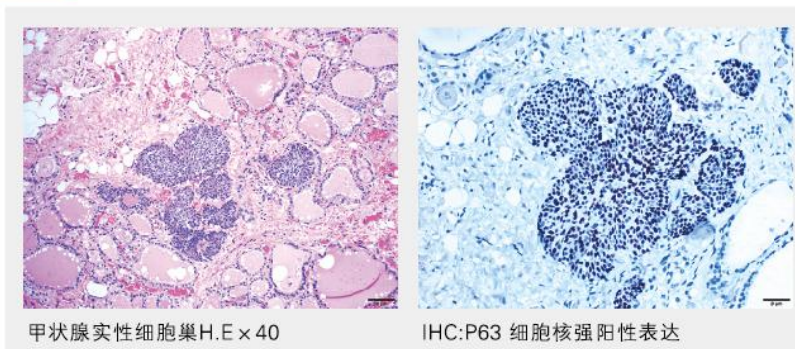
1 降钙素：降钙素（calcitonin, CT）是一种含有32个氨基酸的直线型多肽类激素，是由甲状腺的滤泡旁细胞（parafollicular cells, 又称C细胞）产生。>95%的甲状腺髓样癌表达CT，而滤泡上皮来源的肿瘤则不表达。但其他部分的神经内分泌肿瘤也可表达CT。因此，CT对鉴别甲状腺滤泡上皮性肿瘤与髓样癌价值非常大。

2 单克隆CEA(mCEA)：mCEA与CT一样，在甲状腺肿瘤中，是髓样癌相对特异的标记，尤其是在CT阴性时。当然与CT一样，单克隆CEA也可表达于其他部位的神经内分泌肿瘤。更为常见是可表达于胃肠道腺癌。



三、实性细胞巢标记

实性细胞巢与C细胞增生、微小髓样癌及微小乳头状癌需要鉴别。实性细胞巢一般表达P63、CK19及Galectin-3，但不表达CT、Tg和TTF-1。因此应用P63、CK19、Galectin-3和CT可以很好地将实性细胞巢与C细胞增生、微小髓样癌及微小乳头状癌鉴别。

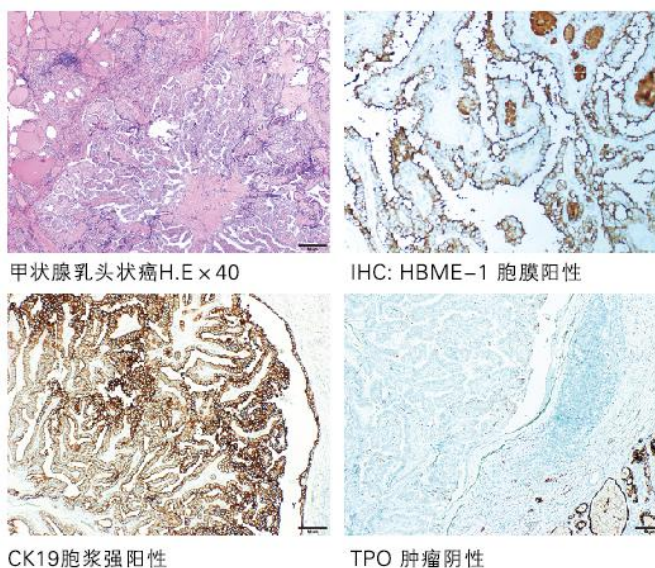


四、运用免疫组化鉴别良恶性滤泡性肿瘤

实际工作中，分化好的甲状腺癌与甲状腺瘤鉴别有时非常困难。尤其是当滤泡型乳头状癌的细胞核特征不明显时，其与滤泡性腺瘤、结节性甲状腺肿鉴别非常困难。然而区分甲状腺恶性是非常重要的，因为肿瘤的转归和临床处置是截然不同的。

联合运用HBME-1、CK19、galectin-3及TPO四个抗体可以很有效地将乳头状癌与其他良性甲状腺病变区分。

HBME-1是间皮细胞标记，高达80%的甲状腺乳头状癌阳性表达HBME1，阳性表达模式为细胞膜。CK19及galectin-3在甲状腺乳头状癌中呈强阳性表达，当然在滤泡性癌及滤泡性腺瘤中也有部分表达。在其他甲状腺良性病变及正常甲状腺组织一般不表达或弱表达。TPO在甲状腺癌中不表达，而在甲状腺良性病变呈强阳性表达。因此，联合运用HBME-1、CK19、galectin-3及TPO四个抗体可以很有效地将乳头状癌与其他良性甲状腺病变区分。



除以上标记物外，BRAF基因的突变是已知最常见的甲状腺乳头状癌的基因变异，发生率约为35–70%。而其中绝大多数(>95%)的突变发生在核苷酸1799(T1799A)的蛋白质残基600(V600E)中，BRAF的V600E突变与甲状腺乳头状癌的病理学改变有密切联系。在高细胞型乳头状癌中其发生率为70–80%，而在普通乳头状癌中的发生率约为60%。许多BRAF阳性的甲状腺肿瘤在镜下表现出经典的乳头状结构伴有灶性突出或边界不清的高细胞征象。而在甲状腺乳头状癌的滤泡亚型中，BRAF的V600E突变发生率则只有约10%。另一种BRAF基因的点突变K601E，整体上比较罕见，大多出现在甲状腺乳头状癌的滤泡亚型中。在未分化和低分化甲状腺癌中也可以观察到BRAF的V600E突变。而在甲状腺滤泡癌和甲状腺良性肿瘤中是没有BRAF的V600E突变的。因此，BRAF基因可以用来作为鉴别甲状腺乳头状癌和其他相关类型的甲状腺肿瘤分子标志物。

技术小贴士

免疫组化染色数据的有效性不仅取决于正确的操作和质量控制，而且也取决于合理的判读。

十年前，病理学家要理解病理领域所有的IHC文献是不可能的，但在今天，这显然是不可能的。一个简单的关于抗原修复的检索，相关文章数以万计，这主要是由样本制备过程中的巨大差异、数以千计的抗体种类、组织切片复杂性及评估特定染色强度的主观性造成的。IHC可以对组织中成分进行染色，显示其表达部位，但是也存在风险和陷阱，因此需要整个实验各个过程（从固定、染色、判读到报告）严格操作。将免疫学原理和免疫组化过程中各个步骤结合起来进行比较发现，目前许多操作规范的实验室中仍存在相同的问题。本期围绕这一问题重温Taylor CR之前发表的关于“免疫组化整体实验”的方法，意图强调实验过程中参数控制和责任归属，以总结IHC过程不足，同时整理了不同固定剂的推荐用途和局限性，供大家参考：

表1. 免疫组化-整体实验各要素分析

实验过程因素	质量保证问题	责任归属
检测指标的选择：诊断问题	免疫组化指标选择的适用性	外科病理医生，有时临床医生
样本采集和管理	标本采集、固定、前处理、切片	病理医生/技术员
技术/方法	试剂、抗体、抗原修复、流程、自动化（或手工方法）	病理医生/技术员
分析问题	敏感性和特异性、专业人员相关资质	病理医生/技术员
结果：验证和报告	相关阳性对照和阴性对照的标准；报告的内容和格式；所需时间	病理医生/技术员
判读，意义	病理学家经验；判读的专业资质；诊断；预后意义；其他相关数据	外科病理医生和/或临床医生

Taylor CR, Cote RJ (2005) Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist, 3rd edn.

表2. 常用固定剂：用途和局限

固定剂	主要/推荐用途	局限性
酒精	常规细胞学标本；痛风疑似病例；用于冰冻切片、涂片和风干固定	甲醇和乙醇会使细胞收缩，如果固定过度，会导致组织变脆
乙醇福尔马林固定液	用于固定不完全组织的补充固定；主要用于脂肪标本的固定（便于检出淋巴结）	酸性pH，易形成福尔马林色素沉淀
B-5	造血和淋巴组织	染色前，部分需要先去染色素；经此固定后，组织不能储存；难以进行核酸的提取
Bouin's	胃肠道和泌尿生殖组织	缓慢消除小的钙和铁沉积物；溶解红细胞；难以进行核酸的提取
酸性脱钙液	不需要分子检测的较大骨标本	染色效果相对差，难以进行核酸的提取，长时间浸泡会溶解样本
EDTA脱钙液	骨活检标本初步诊断或辅助诊断（转移），骨抽吸物	
福尔马林	常规处理	溶解尿酸结晶；如果处理前固定时间>24h，能溶解乳腺微钙化灶；随时间递进会降低高分子核酸；非缓冲福尔马林溶液易形成福尔马林色素沉淀物
戊二醛	电子显微镜	可导致PAS假阳性染色；光学显微镜下，组织固定2–4h，然后转移到缓冲液中直至进一步处理；难以进行核酸的提取
Hollande's	胃肠道活检和内分泌组织、小薄层组织和骨组织	苦味酸成分限制其在分子检测的应用，难以进行核酸的提取
Michel传输介质	肾活检标本转运；需免疫荧光检测的病例	组织处理前用PBS洗涤
Zenker's	骨髓活检	抗原保存差，渗透缓慢，含汞，溶解红细胞，可以溶解含铁血黄素，固定后银染效果差，难以进行核酸的提取

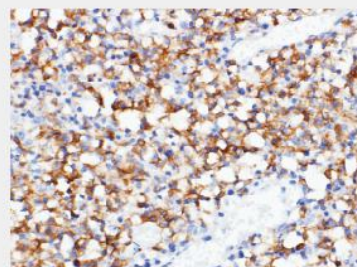
新品速递

一直以来，由于单克隆抗体技术进入壁垒较高，研发周期长，国内在单克隆抗体的规模化生产技术一直落后于国外，国内仅有少数几家生物技术公司生产仅用于蛋白研究的兔多克隆抗体，但质量良莠不齐，且可应用于病理科日常诊断级别的单克隆抗体更是少之又少。随着国内生物科学技术的进步以及国家扶持力度的加大，国内企业与国外企业在抗体研发和生产方面的差距逐步缩小。2012年，迈新公司组织研发团队，潜心攻关，突破抗体规模化生产技术瓶颈，开始陆续推出“MX”迈新自有克隆抗体，经严格试验（数千例）对比验证，此部分抗体各项性能指标均达到同类抗体国际先进水平，获得了一致好评。2016年，迈新紧跟最新研究热点，新推出PD-1/PD-L1自有克隆抗体，一经上市，反响热烈。现为广大病理同仁介绍如下：

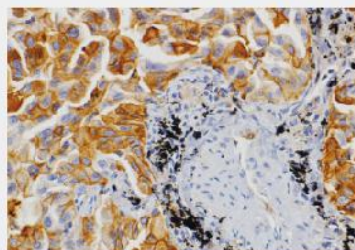
PD-1

PD-1是广泛存在并有T细胞调控作用的CD28/CTLA-4家族成员之一。它包括有酪氨酸为基础的抑制性motif免疫受体（ITIM），并在外周性免疫耐受机制和自身免疫性疾病中起着重要的作用。在反应性淋巴组织增生性病变组织中它在生发中心亮区中相关性T淋巴细胞上表达，这种表达模式表明PD-1在生发中心细胞克隆选择中起着一定的作用。对外部和自身性抗原的免疫应答通常要求应答要有特殊性，能够清除病原体和肿瘤细胞，又得有自限性以维持免疫耐受。感应和维持T淋巴细胞的免疫耐受是通过PD-1及其存在于非造血细胞中的配体（PD-L1）来限制T淋巴细胞免疫应答效应并在免疫介导的组织损害性疾病中起保护作用。但是这种PD-1/PDL通路也会受到病原微生物和肿瘤的侵占，使机体免疫力下降，造成炎症迁延不愈或使肿瘤细胞避开机体免疫监视而造成肿瘤在体内存活。

PD-1现被推荐为新的血管母T细胞淋巴瘤标记物，同CD10和Bcl-6对比，因为该抗体只表达少量B淋巴细胞，所以在血管免疫母T细胞淋巴瘤中更特异、更有效。



血管免疫母T细胞淋巴瘤PD-1（迈新编号：MAB-0734，克隆号：MX033）染色，肿瘤细胞胞质阳性



肺鳞癌PD-L1（迈新编号：RMA-0732，克隆号：MXR033）染色，肿瘤细胞胞膜阳性

PD-L1

程序性细胞死亡配体1（PD-L1）也称CD274或B7-H1，是一个I型跨膜蛋白，参与细胞调节和免疫反应。PD-L1蛋白广泛表达于抗原提呈细胞、活化T/B细胞、巨噬细胞、胎盘滋养层细胞、心肌内皮和胸腺皮质上皮细胞。已先后在人类乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、胰腺癌、黑色素瘤等肿瘤中检测到PD-L1蛋白表达，与肿瘤的免疫逃逸机制相关。研究表明，肿瘤细胞以及肿瘤微环境中抗原提呈细胞表达的PD-L1均可经PD-1/PD-L1信号通路肿瘤抗原特异性T细胞的活化，下调T细胞介导的肿瘤免疫应答。因此，干预PD-1/PD-L1信号有望成为肿瘤免疫治疗的新策略。

更多产品资讯请关注迈新最新一期产品目录（2017-2018），今后我们将整理更多迈新自有克隆抗体信息给广大病理同仁参阅！

欢迎来电索取迈新《2017年产品目录》
垂询热线：400-8899-853

New

