

网络出版时间: 2019-1-17 10:57 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20190117.1056.004.html>

鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 对淋巴结检出数量不足结直肠癌标本的临床病理评价

刘仙花^{1,2}, 余英豪¹, 齐兴峰¹, 吴在增¹, 胡顺奇¹, 熊喜生¹, 向娟¹, 郑智勇¹, 曲利娟¹, 叶显宗¹

摘要:目的 探讨鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色在淋巴结检出数量不足的结直肠癌(colorectal cancer, CRC)标本脉管侵犯评估中的应用及意义。方法 收集 133 例淋巴结检出数量 <12 枚的 CRC 标本, 分别行 HE 染色及鸡尾酒抗体双重免疫组化染色, 比较两种方法在脉管侵犯筛查效果中的差异, 并分析应用鸡尾酒抗体免疫组化染色证实的脉管侵犯与临床病理特征及患者总生存期(overall survival, OS)的关系。结果 (1) 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色及 HE 染色对脉管侵犯的检出率分别为 42.9% (57/133) 和 21.8% (29/133), 差异有显著性 ($P < 0.001$)。 (2) 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化证实的脉管侵犯与 Dukes 分期、浸润深度、临床分期、淋巴结转移、肿瘤出芽相关 ($P < 0.05$)。 (3) 脉管侵犯、侵犯位置深度、程度及脉管侵犯灶数 ≤ 2 个灶且癌栓细胞数量 ≥ 5.5 个与患者 OS 密切相关 ($P < 0.05$)。结论 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色对脉管侵犯评估优于常规 HE 染色切片观察, 与肿瘤分期、淋巴结转移及出芽情况密切相关, 是患者预后的独立影响因素, 可作为淋巴结检出数量不足 CRC 病例的补充检测指标。

关键词: 结直肠肿瘤; 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK; 脉管侵犯; 预后; 临床病理

中图分类号: R 735.3; R 365 文献标志码: A 文章编号: 1001-7399(2019)01-0014-05

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2019.01.004

淋巴结分期是结直肠癌(colorectal cancer, CRC)手术切除标本病理预后评估指标的重要组成部分。然而, 在实际工作中部分病例不能检出足够数量的淋巴结, 可能会导致术后淋巴结状态和分期的低诊断, 也使病理分期、预后评估的价值降低^[1]。脉管侵犯是恶性肿瘤发生淋巴结转移或远处转移的前提条件, 也是各实体肿瘤研究中重要的临床病理参数^[2]; 常规 HE 染色在脉管侵犯的评估中其检出率低、重复性差。本文拟通过鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色, 评估淋巴结检出数量不足 CRC 的病例中脉管侵犯状态, 并分析其与临床病理特征及患者预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 选取解放军福州总医院 2008~2010 年经外科手术切除并经确诊, 具有完整随访资料, 且检出淋巴结数目 <12 枚的 133 例 CRC 标本, 同时排除

合并其他恶性肿瘤及临床资料不全者, 患者年龄 25~86 岁, 平均 58.2 岁; 男性 84 例, 女性 49 例, 男女比为 1.7:1。按 2016 美国癌症联合委员会(AJCC)发布的 TNM 分期标准进行肿瘤病理分期, 肿瘤组织学类型根据 WHO(2010) 消化系统肿瘤分类标准进行, 并根据文献进行肿瘤出芽评估^[3]及肿瘤错配修复(mismatch repair, MMR)状态的判读^[4]。

1.2 方法 133 例手术切除标本分别行常规 HE 染色和双重免疫组化染色, 一抗及二抗均购自福州迈新公司。免疫组化染色步骤如下: 石蜡切片脱蜡、水化后 EDTA 抗原热修复 20 min; 内源性过氧化物酶阻断 10 min; 滴加即用型混合一抗(即鼠抗 D2-40、CD34、兔抗 CK 按工作浓度混合调制的鸡尾酒抗体) 37 °C 湿盒内孵育 1 h; 滴加混合型二抗(即鼠抗-碱性磷酸酶和兔抗-过氧化物酶按一定比例混合) 室温孵育 20 min; DAB 试剂显色 15 min; AP-red 试剂显色 15 min; 苏木精复染, 流水冲洗 5 min; 湿片组织经 75% 乙醇 10 s 烤干冷却至室温后, 中性树脂胶加盖玻片封固。染色时设阴阳性对照。

1.3 判读标准 D2-40/CD34 脉管内皮细胞(包括淋巴管和血管)呈胞质、胞膜着色, 标记为红色; CK 上皮细胞呈胞质着色, 标记为棕黄色, 用于识别脉管内癌栓。脉管侵犯判定标准根据文献介绍的 Delphi 法^[5], 即脉管围绕肿瘤细胞巢(CK 染色呈棕黄色)超过一半判为阳性。脉管侵犯阳性病例再进一

接受日期: 2018-10-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81301787)

作者单位: ¹ 联勤保障部队第九〇〇医院病理科/福建医科大学福州临床医学院/厦门大学附属东方医院 福州 350025

² 福建医科大学基础医学院 福州 350004

作者简介: 刘仙花, 女, 硕士, 医师。E-mail: 425056739@qq.com

叶显宗, 男, 博士, 主治医师, 通讯作者。E-mail: yexian-zong@126.com

步观察侵犯发生位置、侵犯程度及癌细胞数量。其中脉管侵犯位置以固有肌层为界,分为壁内脉管侵犯(发生在黏膜、黏膜下层和固有肌层)、壁外脉管侵犯(超出固有肌层)和壁内外脉管同时侵犯3组^[6]。脉管侵犯程度通过计数脉管侵犯阳性的蜡块数及灶数分为局部侵犯、中度侵犯、广泛侵犯3个级别;即仅检出1个灶的脉管侵犯,判为局部侵犯;检出脉管侵犯>1个灶,但局限于1个蜡块,判为中度侵犯;脉管侵犯>1个灶,并分布于不同蜡块,判为广泛侵犯。并应用在线工具 Cut-off Finder(<http://molpath.charite.de/cutoff/index.jsp>) 确定脉管侵犯灶数 Cut-off 值^[7];应用相同的方法确定脉管侵犯灶数≤2个灶时癌栓细胞数的 Cut-off 值,2个 Cut-off 值的敏感性和特异性如表1所示。本实验 HE 及双重免疫组化染色切片结果均由两位资深病理医师按相关标准共同做出判断。

1.4 随访 以电话及信件形式进行随访,本组133例CRC患者均获得随访,最长随访时间114个月,最短随访时间0.5个月,生存时间为0.5~114个月,中位总生存期(overall survival, OS)为76个月,5年病死率为54.9%(73/133)。

1.5 统计学方法 应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。HE切片和D2-40/CD34-CK双重免疫组化染色切片,对脉管侵犯评估的优劣性比较采用一致性Kappa检验和Wilcoxon符号秩检验,采用 χ^2 检验和Fisher确切概率法分析其与临床病理特征的相关性;单因素生存分析采用Kaplan-Meier法,组间比较用Log-rank检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色与 HE 染色对脉管侵犯检测的比较 133例CRC标本中双重免疫组化染色检出脉管侵犯阳性57例(42.9%),阴性76例(57.1%);HE染色检测脉管侵犯阳性29例(21.8%),且其中2例经免疫组化染色后证实为回缩裂隙,而非脉管侵犯。鸡尾酒抗体双重免疫组化染色法能证实HE染色切片观察的脉管侵犯,也能排除可能存在的假阳性(图1~4)还能发现一些HE切片下难以观察的微小脉管癌栓。因此双重免疫组化染色法除了能提升检出率

(一致性Kappa检验, $P < 0.001$)以外,还能发现更多的脉管侵犯病灶(Wilcoxon符号秩检验, $P < 0.001$)。一致性分析显示,HE染色和双重免疫组化染色在脉管侵犯评估呈中度一致性(Kappa系数=0.477, $P < 0.001$,表2)。采用Wilcoxon符号秩检验比较HE染色和双重免疫组化染色判读同时存在脉管侵犯的27例平均癌栓灶数/蜡块,统计结果显示:双重免疫组化染色检出平均癌栓灶数/蜡块值为2.44,明显高于HE染色的1.51($Z = -0.410$, $P < 0.001$)。若以双重免疫组化染色结果作为脉管侵犯评定的金标准,HE染色评定方法的敏感性和特异性则分别为100%、97.3%。

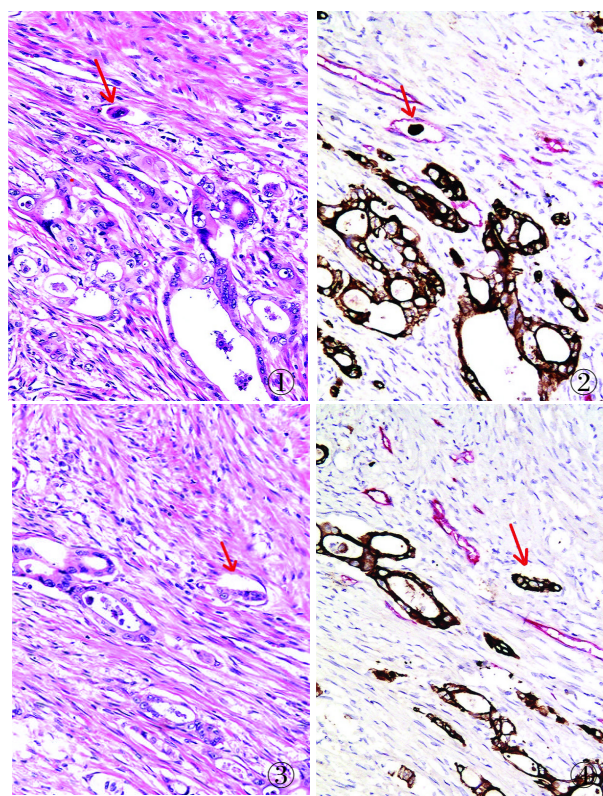


图1 HE染色下的脉管侵犯(红色箭头) 图2 应用鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色验证图1所示的脉管侵犯(红色箭头) 图3 HE染色下人工裂隙与肿瘤脉管侵犯不易区分(红色箭头) 图4 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色证实图3为人工裂隙(红色箭头)

2.2 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色筛查脉管侵犯阳性患者临床病理分析 免疫组化筛查脉管侵犯阳性组与患者性别、年龄、肿瘤大小、发生部位、组织学类型及MMR状态等无明显相

表1 脉管侵犯灶数、癌栓细胞数 Cut-off 值

组别	Cut-off 值	AUC(95% CI)	敏感性	特异性
脉管侵犯灶数(n=57)	1.5	0.71	72.2%(56%~84.2%)	71.4%(50%~86.2%)
癌栓细胞数(n=43)	5.5	0.81	76.5%(52.7%~90.4%)	73.1%(53.9%~86.3%)

关性($P > 0.05$), 与 Dukes 分期、浸润深度、临床分期、淋巴结转移及肿瘤出芽等病理特征有相关性($P < 0.05$, 表 3)。

表 2 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色与 HE 染色脉管侵犯评估比较

分组	鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK		合计	Kappa 系数	P 值
	双重免疫组化染色阳性	阴性			
HE					
阳性	27	2	29	0.477	<0.001
阴性	30	74	104		
合计	57	76	133		

表 3 脉管侵犯与 CRC 临床病理特征的关系

临床病理参数	n	脉管侵犯*		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
性别					
男	84	50	34	0.528	0.475
女	49	26	23		
年龄(岁)					
≥60	71	45	26	2.420	0.16
<60	62	31	31		
肿瘤部位					
右半结肠	19	9	10	4.638	0.098
左半结肠	46	22	24		
直肠	68	45	23		
肿瘤直径(cm)					
≥5	43	24	19	0.046	0.853
<5	90	52	38		
组织学类型					
普通腺癌	105	64	41	2.956	0.092
黏液+印戒细胞癌	28	12	16		
Dukes 分期					
A 期	26	21	5	11.160	0.011
B 期	47	28	19		
C 期	52	25	27		
D 期	8	2	6		
浸润深度					
T1+T2	32	25	7	7.575	0.007
T3+T4	101	51	50		
临床分期					
I+II	73	49	24	6.582	0.014
III+IV	60	27	33		
淋巴结转移					
无	73	49	24	6.582	0.014
有	60	27	33		
肿瘤出芽					
1分	36	31	5	27.72	<0.001
2分	59	34	25		
3分	26	10	16		
4分	12	1	11		
MMR 状态					
pMMR	115	65	50	0.134	0.801
dMMR	18	11	7		

* 以鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色确定

2.3 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化筛查脉管侵犯及侵犯位置、程度和癌栓细胞数与 CRC 患者预后分析 133 例淋巴结检出数 < 12 枚的 CRC 中, D2-40/CD34-CK 抗体双重免疫组化染色检出脉管侵犯阳性 57 例(42.9%), 进一步按脉管侵犯发生位置、侵犯程度以及脉管侵犯灶数 ≤ 2 个灶的病例癌栓细胞数量进行分组。按发生位置分为壁内侵犯者 27 例(47.4%, $n = 57$), 壁外侵犯者 21 例(36.8%), 壁内外均有侵犯者 9 例(15.8%)。脉管侵犯程度评估局部侵犯者 25 例(43.9%, $n = 57$), 中度侵犯者 21 例(36.8%), 广泛侵犯者 11 例(19.3%)。其中 43 例(75.4%, $n = 57$) 检出脉管侵犯灶数 ≤ 2 个灶, 以癌栓细胞数 5.5 为 Cut-off 值, ≥ 5.5 者 20 例(46.5%, $n = 43$), < 5.5 者 23 例(53.5%)。双重免疫组化染色证实脉管侵犯阳性组的平均 OS 为 58.3 个月, 明显低于脉管侵犯阴性组的 72.2 个月($P < 0.001$, 图 5)。采用 Kaplan-Meier 曲线法和 Log-rank 检验对脉管侵犯发生位置、侵犯程度与 CRC 患者 OS 的单因素生存分析, 脉管侵犯局限于固有肌壁内组的 OS 最好, 固有肌壁外脉管侵犯组次之, 肌壁内外均有侵犯组最差($P = 0.023$, 图 6); 侵犯程度分组的局部侵犯组 OS 最佳

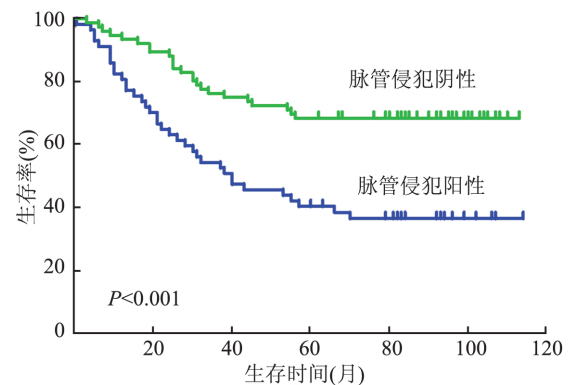


图 5 鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色证实脉管侵犯阳性组与阴性组患者 OS 比较

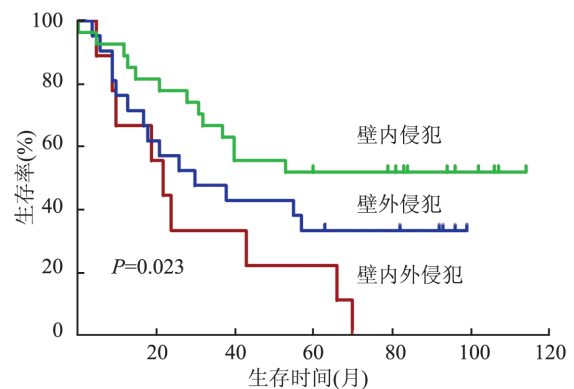


图 6 不同脉管侵犯位置患者 OS 比较

($P < 0.001$) ,中度侵犯组的 OS 也要优于广泛侵犯组 ($P < 0.001$,图 7) 。进一步分析脉管侵犯灶数 ≤ 2 个灶的病例癌栓细胞数量对患者预后的影响 ,结果显示癌栓细胞数量 < 5.5 组与癌栓细胞数量 ≥ 5.5 组的 OS ,差异有显著性 ($P = 0.019$,图 8) 。

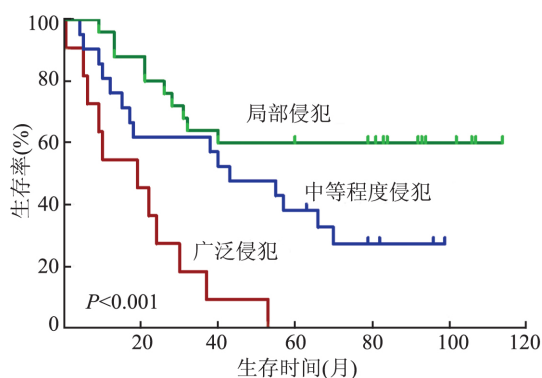


图 7 不同脉管侵犯程度患者 OS 比较

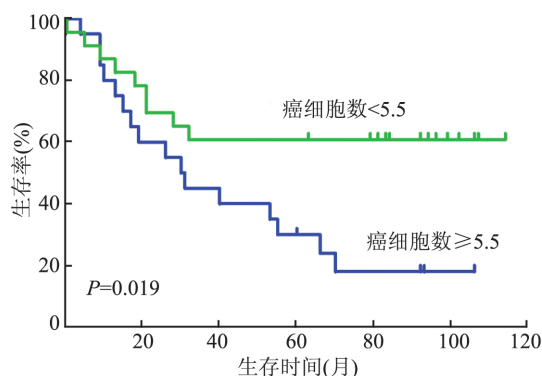


图 8 ≤ 2 个灶脉管侵犯 ,不同癌栓细胞数量患者 OS 比较

3 讨论

CRC 手术切除标本的淋巴结评估是 TNM 分期的重要组成部分 ,尽管此前国内外学者关于淋巴结检出数量的研究结论存在分歧 ,目前普遍认为检出 12 枚以上的淋巴结才能更好的准确分期及预后评价^[8] 。然而 ,由于一些主客观因素的影响 ,有时难以获取足够数量的淋巴结用于术后病理评价。肿瘤的脉管侵犯虽然被认为是独立于淋巴结转移的预后因素^[9] ,但可能对淋巴结检出不足具有一定的辅助价值。目前 ,依靠 HE 染色光镜观察脉管侵犯对病理医师鉴别较为困难 ,如何提升不同病理医师间的可重复性或减少分歧已成为临床工作中亟待解决的问题。本组应用鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色对 CRC 淋巴结检出数量不足的 CRC 标本进行脉管侵犯检测 ,并进行回顾性分析 ,比较该方法的预后判断价值。

应用鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 检测的方法

具有一定优势:(1)与 HE 染色或单一抗体免疫组化染色的光镜观察相比 ,该方法能在同一平面更好地呈现脉管与可疑癌栓间的关系;(2)鸡尾酒抗体的应用也能在一定程度上减少工作量、节省时间 ,并有利于成本控制 ,在临床实践中可操作性强 ,易于推广。此外 ,对一些病变比较局限的病例 ,鸡尾酒抗体的应用也能节省组织 ,避免重复切片后出现标本不足、无法评估的困难;且鸡尾酒抗体中的 CK 染色对脉管内肿瘤细胞的识别 ,在微小脉管侵犯的应用也优于单一抗体的免疫组化染色 ,如能大规模应用于特定临床样本 ,其优势就会体现得更为明显。但该方法也存在一些不足 ,首先联合应用鸡尾酒抗体中 CD34、D2-40 区分淋巴管和血管较为困难 ,这不利于进一步预测淋巴道或者血道转移;其次脉管内瘤细胞数量较少时 ,判读有一定的主观性。肠癌的淋巴道转移和血道转移同样重要 ,已有多个国内外研究小组发现两者均与患者预后不良相关 ,并认为肌壁外的血管侵犯与预后关系更为密切 ,提出以该指标作为分期偏早的部分肿瘤患者术后辅助治疗的依据^[10-11] 。因此 ,通过鸡尾酒抗体法在同一层面展露两方面的信息并不会造成误判或给予临床治疗释放错误信息。本组中有 43 例标本(瘤栓灶数 ≤ 2 个灶)以 5.5 为 Cut-off 值来划分的两组病例 ,在生存分析曲线上差异有显著性 ($P < 0.05$) 。提示当微小癌栓细胞数超过 5.5 个可能显著影响患者的预后。

淋巴结转移作为 TNM 分期的重要组成部分 ,与其他临床病理特征有一定的关联 ,如癌组织的浸润深度、出芽情况等;也有研究发现淋巴结转移与脉管侵犯之间呈正相关^[12] ,但在本组中因所检测的标本皆为淋巴结检出数量不足标本 ,故临床病理分析中未发现显著的正相关性。本实验使用的鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 检测方法不仅能显示淋巴道转移 ,也能观察血道转移 ,这可能是两者间关联性减弱的原因之一。MMR 状态是近年 CRC 分析的热点 ,MMR 状态也可能与 CRC 临床病理特征有关^[13] ;由于本组中 dMMR 病例数较少 (18 例 ,13.5%) ,未发现脉管侵犯状态与之相关 ,尚有待于进一步扩大样本量分析。

文献报道脉管侵犯可以作为 CRC 患者不良预后的独立危险因素 ,以鸡尾酒抗体 D2-40/CD34-CK 双重免疫组化染色法进行检测 ,能更好的区分裂隙和脉管 ,有利于识别脉管内癌栓 ,也能勾勒出一些较小的癌栓 ,基于该方法的半定量分析能更好的反映脉管侵犯与患者预后的关系。因此 ,我们建议将该

方法作为淋巴结检出数量不足 CRC 标本的补充检测指标。

参考文献:

- [1] Park I J, Yu C S, Lim S B, *et al.* Ratio of metastatic lymph nodes is more important for rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(11): 3274–3281.
- [2] 陆明, 胡孔旺, 王宜文, 等. 叉头框 M1 在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(8): 847–852.
- [3] Ueno H, Murphy J, Jass J R, *et al.* Tumour ‘budding’ as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer [J]. *Histopathology*, 2002, 40(2): 127–132.
- [4] 刘仙花, 余英豪, 叶显宗. 林奇综合征临床病理筛查的相关进展 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2018, 33(3): 277–282.
- [5] Kojima M, Shimazaki H, Iwaya K, *et al.* Pathological diagnostic criterion of blood and lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an objective pathological diagnostic system using the Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum [J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(7): 551–558.
- [6] Betge J, Pollheimer M J, Lindtner R A, *et al.* Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting [J]. *Cancer*, 2012, 118(3): 628–638.
- [7] Budczies J, Klauschen F, Sinn B V, *et al.* Cutoff finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51862.
- [8] Edge S B, Compton C C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(6): 1471–1474.
- [9] Lim S B, Yu C S, Jang S J, *et al.* Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2010, 53(4): 377–384.
- [10] Parnaby C N, Scott N W, Ramsay G, *et al.* Prognostic value of lymph node ratio and extramural vascular invasion on survival for patients undergoing curative colon cancer resection [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(2): 212–219.
- [11] Bosch S L, Teerenstra S, de Wilt J H, *et al.* Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions [J]. *Endoscopy*, 2013, 45(10): 827–834.
- [12] Chang H C, Huang S C, Chen J S, *et al.* Risk factors for lymph node metastasis in pT1 and pT2 rectal cancer: a single-institute experience in 943 patients and literature review [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(8): 2477–2484.
- [13] 赵喜连, 郝彦凤, 白文启, 等. 错配修复蛋白和 p53 蛋白表达与结直肠癌的临床病理关系及其相关性 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(4): 370–374.

Application of D2-40/CD34-CK cocktail antibodies for colorectal cancer with insufficient lymph node harvest

LIU Xian-hua^{1,2}, YU Ying-hao¹, QI Xing-feng¹, WU Zai-zeng¹, HU Shun-qi¹, XIONG Xi-sheng¹, XIANG Juan¹, ZHENG Zhi-yong¹, QU Li-juan¹, YE Xian-zong¹

(¹ Department of Pathology, 900 Hospital of the Joint Logistics Team/Clinical Medical College of Fujian Medical University/Dongfang Hospital of Xiamen University, Fuzhou 350025, China;

² School of Basic Medical Science, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT Purpose To investigate the value of application of D2-40/CD34-CK cocktail antibodies by double immunohistochemical staining for assessment of lymphovascular invasion (LVI) and to determine its prognostic significance in colorectal cancer with insufficient lymph node harvest. **Methods** Specimens from 133 cases of colorectal cancer with less than 12 lymph nodes were selected. HE staining and double immunohistochemical staining of the cocktail antibodies were performed to compare the difference of the two methods in screening for LVI. The relationship between LVI confirmed by cocktail antibody immunohistochemical staining and clinicopathological characteristics and overall survival (OS) of patients was analyzed. **Results** (1) The detection rates of cocktail antibody double immunohistochemical staining and HE staining for LVI were 42.9% (57/133) and 21.8% (29/133) with statistically significant differ-

ence ($P < 0.001$). (2) The presence of LVI confirmed by double staining was significantly associated with Dukes staging, depth of invasion, clinical stages, lymph node metastasis and tumor budding ($P < 0.05$). (3) The presence of LVI, the location and extent of LVI, and the number of tumor cells in thrombus ≥ 5.5 for cases with LVI ≤ 2 clusters, were significantly associated with OS ($P < 0.05$). **Conclusion** D2-40/CD34-CK cocktail antibodies double staining is superior to routine HE staining in assessing LVI. LVI is intimately associated with tumor stage, lymph nodes metastasis and tumor budding, and it is an independent prognostic factor for CRC patients. It should be a supplementary examination for these patients with insufficient lymph node harvest.

Key words: colorectal neoplasm; D2-40/CD34-CK cocktail antibodies; lymphovascular invasion; prognosis; clinicopathological