

恶性浆膜腔积液脱落细胞中P21 ras蛋白表达状况及其意义

宋荣峰, 张焜和, 靳文剑, 陈江, 祝金泉, 吕农华

宋荣峰, 靳文剑, 江西省肿瘤医院内科 江西省南昌市 330029
张焜和, 陈江, 祝金泉, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化
病研究所 江西省南昌市 330006

江西省科技厅科技攻关项目, No. F980508

通讯作者: 张焜和, 330006, 江西省南昌市永外正街, 南昌大学
第一附属医院消化研究所. yfyzkh@sina.com

电话: 0791-8692507

收稿日期: 2006-11-15 接受日期: 2006-12-18

Expression of P21 ras protein in malignant serous cavity effusions and its significance

Rong-Feng Song, Kun-He Zhang, Wen-Jian Jin, Jiang Chen, Jin-Quan Zhu, Nong-Hua Lv

Rong-Feng Song, Wen-Jian Jin, Department of Internal Medicine, Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang 330029, Jiangxi Province, China

Kun-He Zhang, Jiang Chen, Jin-Quan Zhu, Nong-Hua Lv, Institute of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by the Key Science and Technology Development Program of Jiangxi Province No. F980508

Correspondence to: Kun-He Zhang, Institute of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Yongwai Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyzkh@sina.com

Received: 2006-11-15 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of P21 ras protein in the exfoliative cells from malignant serous cavity effusions and its diagnostic value.

METHODS: Exfoliative cells in fresh specimens of serous cavity effusions were collected after centrifugation, and cell smears were prepared for cytological diagnosis, by which the specimens were divided into benign or malignant groups. The remained exfoliative cells were processed with a "standardized" procedure: removing red cells, fixing in paraformaldehyde, adjusting the cell concentration, and finally, cell smears were prepared and P21 ras immunocytochemistry were performed (SP method).

RESULTS: A total of 108 effusion specimens were collected, including 53 malignant and 55

benign one. In the immunocytochemical staining of P21 ras, 39 of 53 malignant effusions were positive (73.6%), and most of them were strongly positive. The positive results were observed in 12 of 55 (21.8%) benign effusions, most of which were weakly positive. The positive rates ($\chi^2 = 29.02$, $P < 0.001$) and expression intensity ($Uc = 6.786$, $P < 0.001$) of P21 ras were significantly different between malignant and benign effusions. The sensitivity, specificity and diagnostic accordance rate of P21 ras immunocytochemistry in the diagnosis of malignant effusions were 73.6%, 78.2% and 75.9%, respectively.

CONCLUSION: P21 ras immunocytochemical staining of exfoliative cells is positive in most malignant effusions, but negative in most benign ones, implicating that it is valuable for the diagnosis of malignant effusions.

Key Words: P21 ras protein; Serous cavity effusion; Immunocytochemistry

Song RF, Zhang KH, Jin WJ, Chen J, Zhu JQ, Lv NH. Expression of P21 ras oncoprotein in malignant serous cavity effusions and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(8):893-896

摘要

目的: 检测浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白表达状况, 探讨其对恶性浆膜腔积液的诊断价值。

方法: 将新鲜浆膜腔积液离心后收集脱落细胞, 取部分细胞涂片进行常规细胞学诊断, 据此将积液分为良性与恶性两组。对余下脱落细胞作“标准化”处理, 包括去除红细胞、多聚甲醛固定、调整细胞浓度、制备细胞涂片, 然后进行P21 ras蛋白免疫化学染色(SP法)。

结果: 共108例浆膜腔积液, 恶性53例, 良性55例。39例恶性积液P21 ras蛋白免疫化学染色阳性(73.6%), 且多为强阳性或阳性; 12例良性积液P21 ras蛋白染色阳性(21.8%), 且多为弱阳性或阳性, 两组间阳性率($\chi^2 = 29.02$, $P < 0.001$)及阳性强度($Uc = 6.786$, $P < 0.001$)的差异均有

■背景资料

随着恶性肿瘤发病率的升高, 恶性胸/腹水不断增多。细胞学检查是目前诊断恶性胸/腹水的主要手段, 但其敏感性低、经验性强, 难以满足临床需要, 人们一直在寻找有效的诊断新技术。

■研究前沿

免疫化学染色可辅助常规细胞病理学诊断。对胸/腹水脱落细胞进行免疫细胞化学染色,检测肿瘤相关蛋白的表达,对恶性脱落细胞的诊断及其与良性脱落细胞的鉴别有较大的价值,成为近年来恶性胸/腹水诊断研究的热点。

显著性统计学意义。P21 ras蛋白免疫化学染色诊断恶性积液的敏感度为73.6%,特异度为78.2%,诊断符合率达75.9%。

结论:浆膜腔积液中脱落细胞P21 ras蛋白免疫化学染色在肿瘤细胞多为阳性,良性细胞多为阴性,对恶性体腔积液的诊断有较大的价值。

关键词: P21 ras蛋白; 浆膜腔积液; 免疫细胞化学染色

宋荣峰, 张焜和, 靳文剑, 陈江, 祝金泉, 吕农华. 恶性浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白表达状况及其意义. 世界华人消化杂志 2007;15(8):893-896

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/893.asp>

0 引言

浆膜腔积液是常见的临床病症,按病因可分为良性与恶性两大类。随着恶性肿瘤发病率的升高,恶性浆膜腔积液不断增多,在老年性积液中高达70%左右。细胞学检查一直是恶性浆膜腔积液的主要诊断手段,但其敏感性低、经验性强,难以满足临床需要^[1]。因此,恶性积液诊断及其与良性积液的鉴别常困扰临床医务人员。近年来,通过体腔积液脱落细胞免疫化学染色辅助细胞学诊断倍受关注^[2],人们试图通过检测肿瘤相关蛋白的表达,为恶性细胞的诊断提供帮助。恶性积液中转移癌细胞可来源于全身各种肿瘤,必须针对“通用”的肿瘤相关抗原进行免疫化学染色,才有可能取得良好的诊断效果。ras基因是迄今为止研究最多的原癌基因之一,其突变普遍存在于各种恶性肿瘤,并与肿瘤的发生、进展和转移密切相关^[3],他所编码的P21 ras蛋白在多种肿瘤中有较高的阳性表达率^[4],因而是恶性肿瘤的一个广谱标志物。因此,对P21 ras蛋白进行免疫化学染色可能在恶性积液的诊断及其与良性积液的鉴别中具有较大的价值。迄今为止,我们未检索到P21 ras蛋白在恶性浆膜腔积液的诊断应用研究报道,其具体价值如何尚不清楚。为此,我们采用ras蛋白的mAb对浆膜腔积液脱落细胞进行免疫细胞化学染色,探讨其对恶性浆膜腔积液的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料 108例浆膜腔积液标本来自108例不同患者,其中胸水71例,腹水32例,心包积液4例,盆腔灌洗液1例。所有病例均为2001-10/2002-10在

南昌大学第一附属医院的住院患者。根据细胞学诊断结果将标本分为良性与恶性积液两组。

1.2 方法 取新鲜标本50-100 mL,常规离心收集细胞沉淀。如为血性积液,用氯化铵溶液破坏红细胞。取部分细胞沉淀涂片,由本院细胞室高年资医师作出细胞学诊断。余下的细胞沉淀进行“标准化”处理^[5],包括10 g/L多聚甲醛-PBS固定、用1 g/L BSA-PBS洗涤、调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$,然后涂片,干燥后置-85℃冰箱保存备用。

1.2.1 免疫细胞化学染色 采用SP酶标法(试剂盒购于北京中山生物技术有限公司),一抗为鼠抗人P21 ras单克隆抗体(Santa Cruz公司产品),二抗为通用型生物素标记的羊抗鼠IgG,酶系统为辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, DAB显色。PBS代替一抗作为阴性对照。操作按试剂盒说明书进行。

1.2.2 结果判断 (1)阳性细胞的判断: P21 ras蛋白免疫化学染色呈棕黄色颗粒样着色,以胞膜明显,也见于胞质。将染色强度分为III级: I级无着色,计为阴性; II级为浅黄色, III级为棕黄色,均计为阳性; (2)阳性标本的判断: 高倍视野下,计数100个细胞,计算出阳性细胞百分比。阳性细胞 $\geq 80\%$ 计为强阳性+++ , 20%-79%计为阳性++ , 6%-19%计为弱阳性+ , 0-5%计为阴性-。+~+++均计为阳性标本, -计为阴性标本。

统计学处理 计数资料采用卡方检验,等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。并计算P21 ras蛋白免疫化学染色诊断恶性体腔积液的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及诊断符合率。

2 结果

2.1 临床资料 108例浆膜腔积液的患者中,男57例,女51例,年龄14-78(平均51.2)岁。细胞学检查诊断为恶性积液者53例,良性积液55例。恶性积液中,胸腔积液33例,腹腔积液17例,心包积液3例。良性积液中,胸腔积液38例,腹腔积液15例,心包积液1例,腹腔灌洗液1例。

2.2 P21 ras蛋白免疫化学染色结果 肿瘤细胞以胞膜着色为主,有时细胞核及核周也着色,呈棕黄色颗粒沉淀样;间皮细胞、淋巴细胞不明显(图1A-B)。在53例恶性积液中,有39例染色呈阳性,阳性率73.6%,且其中36例呈阳性或强阳性++~+++ ,占92.3%。55例良性积液中,12例染色阳性,阳性率21.8%,且多为阳性或弱阳性+~

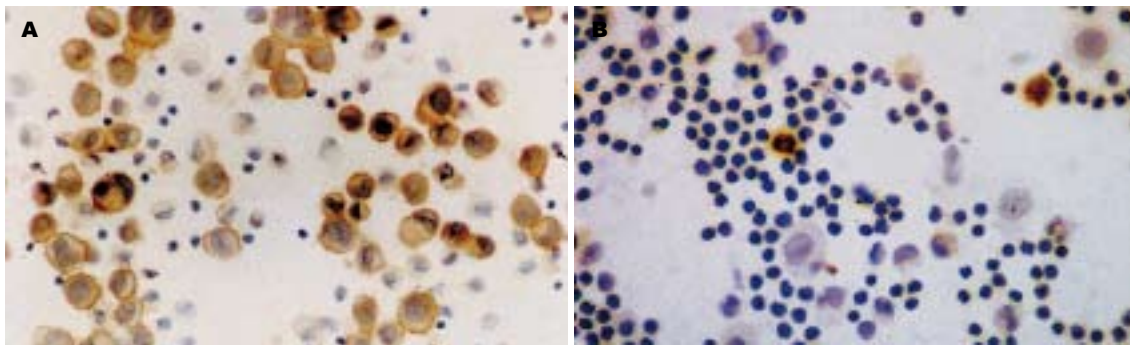


图 1 浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白免疫细胞化学染色($\times 400$). A: 恶性; B: 良性.

++(表1). 经卡方检验, 良性与恶性积液脱落细胞免疫化学染色阳性率差异有显著性意义($\chi^2 = 29.02$, $P < 0.001$). 经秩和检验, 良性与恶性标本脱落细胞免疫化学染色的阳性强度差异也有显著性意义($U_c = 6.786$, $P < 0.001$).

2.3 P21 ras蛋白表达对恶性积液的诊断价值 浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白免疫化学染色对恶性积液具有较好的诊断价值, 敏感度为73.6%, 特异度为78.2%, 阳性预测值为76.5%, 阴性预测值为75.4%, 诊断符合率为75.9%.

3 讨论

恶性浆膜腔积液一直是临床诊断难题, 人们不断寻求有效的实验诊断方法^[6-9]. 将免疫细胞化学染色应用于浆膜腔积液脱落细胞的各种肿瘤相关抗原表达的检测, 有助于提高恶性积液诊断的准确性^[10-11]. Nomoto *et al*^[12]比较了常规细胞学检查、免疫细胞化学染色及PCR-RFLP检测K-ras基因突变3种方法对胰腺癌腹膜转移的检出率, 其中脱落细胞免疫细胞化学染色敏感性最高. 目前, 在常规细胞检查的基础上应用免疫细胞化学染色技术已成为良恶性体腔积液鉴别诊断中一项重要的辅助手段^[12,13]. ras基因家族突变是人类肿瘤最常见的癌基因事件之一, 并认为是肿瘤发生、发展中的一个共同通路^[3], 但ras基因突变在人类肿瘤的阳性检出率较低, 尚不具有临床实用价值, 而其表达产物的阳性检出率高, 对肿瘤有较大的诊断价值^[14]. 我们对108例浆膜腔积液脱落细胞进行P21 ras蛋白免疫细胞化学染色, 肿瘤细胞着色大多呈阳性或强阳性, 而良性脱落细胞染色大多为阴性, 如为阳性也多为弱阳性, 细胞着色浅淡, 阳性强度在恶性与良性积液之间的差异有极显著性意义($P < 0.001$). 恶性标本脱落细胞P21 ras蛋白免疫化学染色的阳性率为73.6%, 明显高于良性积液($P < 0.001$), 对诊断恶性积液的敏

表 1 体腔积液脱落细胞抗P21 ras蛋白免疫细胞化学染色结果

积液类型	n	阳性例数(%)	阳性强度			
			-	+	++	+++
恶性	53	39(73.6)	14	3	25	11
良性	55	12(21.8)	43	5	7	0

感度、特异度、诊断符合率等5项诊断效率指标均达75%左右. 因此, P21 ras蛋白免疫细胞化学染色对恶性积液的诊断有较大的价值.

浆膜腔积液中的部分肿瘤细胞不表达P21 ras蛋白, 而部分良性脱落细胞有较弱表达, 近年来对P21 ras蛋白在细胞信号转导中的作用机制的深入了解可对此作出解释. P21 ras是细胞内信号转导通路的开关分子, 当其定位于细胞膜时与GTP结合形成P21 ras-GTP复合体即被激活, 使细胞内信号转导系统开放; 因P21 ras具有GTP酶活性, 可将GTP水解为GDP后便失活, 使信号转导系统关闭. P21 ras并不是一直位于细胞膜上, 当他在蛋白激酶C(PKC)的作用下发生磷酸化时, 与细胞膜的结合减弱而移至内质网、高尔基体和粒线体等细胞器内^[15]. ras基因突变后所表达的突变型P21 ras蛋白其GTP酶活性减弱以致持续与GTP结合而使信号转导系统一直开放, 细胞无休止地分裂和增殖而发生恶性转化. 因此, 正常细胞与肿瘤细胞相比, 只是P21 ras蛋白在细胞膜内侧的表达量存在差异, 在良性细胞检出P21 ras蛋白也就不奇怪, 同样, 因肿瘤细胞ras基因并非均存在突变, 部分肿瘤细胞不能检查P21 ras也属正常.

4 参考文献

- 1 Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Bocking A. Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol* 1999; 20: 350-357
- 2 Politi E, Kandaraki C, Apostolopoulou C, Kyritsi T, Koutselini H. Immunocytochemical panel for

■同行评价

目前, 利用P21 ras蛋白进行免疫化学染色对恶性肿瘤积液的诊断尚未达成共识意见, 探索其对恶性浆膜腔积液的诊断价值具有较大的临床意义. 该文立意新颖, 材料与方法设计合理, 临床资料与结果可信, 统计学处理正确, 是一篇具有较高水平的论文.

- distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. *Diagn Cytopathol* 2005; 32: 151-155
- 3 Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386: 193-205
- 4 Gulbis B, Galand P. Immunodetection of the p21-ras products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors: a review. *Hum Pathol* 1993; 24: 1271-1285
- 5 Kuenen-Boumeester V, van Loenen P, de Bruijn EM, Henzen-Logmans SC. Quality control of immunocytochemical staining of effusions using a standardized method of cell processing. *Acta Cytol* 1996; 40: 475-479
- 6 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 陈陵, 王东旭. 肝素酶表达鉴别良、恶性腹水无价值. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1111-1114
- 7 廖应雷, 施丕华, 段丽平. 联合检测CA19-9和CA125鉴别良恶性腹水. 世界华人消化杂志 2006; 14: 823-826
- 8 黄家森, 杨剑, 周仁荣, 胡健. 腹水/血清肿瘤标志物对良恶性腹水的鉴别价值. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1533-1536
- 9 朱樑, 张忠兵, 谢渭芬, 胡和平, 张兴荣, 刘苏, 陈伟忠. 多功能腹膜检查针对良恶性腹水的诊断价值. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1839-1841
- 10 Comin CE, Novelli L, Boddi V, Paglierani M, Dini S. Calretinin, thrombomodulin, CEA, and CD15: a useful combination of immunohistochemical markers for differentiating pleural epithelial mesothelioma from peripheral pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 529-536
- 11 Carella R, Deleonardi G, D'Errico A, Salerno A, Egarter-Vigl E, Seebacher C, Donazzan G, Grigioni WF. Immunohistochemical panels for differentiating epithelial malignant mesothelioma from lung adenocarcinoma: a study with logistic regression analysis. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 43-50
- 12 Nomoto S, Nakao A, Kasai Y, Inoue S, Harada A, Nonami T, Takagi H. Peritoneal washing cytology combined with immunocytochemical staining and detecting mutant K-ras in pancreatic cancer: comparison of the sensitivity and availability of various methods. *Pancreas* 1997; 14: 126-132
- 13 Chhieng DC, Yee H, Schaefer D, Cangiarella JF, Jagirdar J, Chiriboga LA, Jagirdar J, Chiriboga LA, Cohen JM. Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions. *Cancer* 2000; 90: 194-200
- 14 Ruiz-Godoy R LM, Garcia-Cuellar CM, Herrera Gonzalez NE, Suchil BL, Perez-Cardenas E, Sacnchez-Perez Y, Suarez-Roa ML, Meneses A. Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 73-78
- 15 Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Perez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD, Philips MR. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* 2006; 21: 481-493

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评议

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评议, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚.