

甲状腺过氧化物酶在细针抽吸甲状腺肿瘤细胞中的表达及意义

曲 卫¹, 蒋 玲^{2*}, 张延美³, 刘志民^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003; 2. 山东大学临床学院齐鲁医院内分泌科, 济南 250012; 3. 山东省新泰市人民医院, 新泰 271200)

[摘要] **目的:** 观察甲状腺过氧化物酶(TPO)在细针抽吸甲状腺肿瘤细胞中的表达, 评价 TPO 免疫化学染色对良、恶性甲状腺肿瘤的鉴别诊断价值。 **方法:** 应用免疫化学染色法观察 TPO 在 71 例手术切除的甲状腺肿瘤组织细针抽吸物(FNA)涂片及组织冰冻切片中的表达, 阳性判定按照 80% 以上甲状腺细胞染色为阳性。 **结果:** TPO 在恶性组织的 FNA 细胞涂片与组织切片标本中的表达均低于良性甲状腺肿瘤, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而 FNA 细胞涂片与组织切片 TPO 表达阳性率无显著差异。图像分析结果显示恶性甲状腺肿瘤细胞的 TPO 染色强度明显低于良性甲状腺组织细胞, 两者平均密度值、相对光密度值和着色的颜色强度均有显著差异(P 均 < 0.05); 而 FNA 细胞涂片和组织切片间无显著差异。甲状腺肿瘤囊液涂片中良、恶性细胞的 TPO 表达阳性比分别为 20/22、0/4, 两者有显著差异($P < 0.05$)。以 H-E 染色为参考, FNA 细胞涂片阳性及阴性预告值分别为 95.74%、91.67%, 组织切片染色为 100%、66.47%, 囊液涂片染色为 97.44%、88.46%。 **结论:** TPO 在良性甲状腺细胞中的表达明显高于恶性甲状腺肿瘤细胞; TPO 免疫化学染色可用于甲状腺针吸细胞, 作为诊断甲状腺良、恶性肿瘤的辅助手段。

[关键词] 甲状腺肿瘤; 碘化物过氧化物酶; 免疫组织化学; 活组织检查, 细针

[中图分类号] R 736.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1315-05

Thyroperoxidase expression in fine needle aspirated thyroid tumor cells and its clinical relevance

QU Wei¹, JIANG Ling^{2*}, ZHANG Yan-mei³, LIU Zhi-min^{1*} (1. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Endocrinology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012; 3. The People's Hospital of Xintai, Xintai 271200)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe thyroperoxidase (TPO) expression in fine needle aspirated thyroid tumor cells and to assess the value of TPO immunostaining in differential diagnosis of benign and malignant thyroid tumors. **Methods:** Fine needle aspiration (FNA) samples and frozen tissue sections of 71 surgically resected thyroid tumor specimens were immunostained by with hTPO MoAb47. The staining results were considered positive if 80% or more thyroid cells were positively stained. **Results:** TPO expression levels in FNA samples and frozen tissue sections of malignant tumors were lower than those of benign tumors ($P < 0.01$), and there was no difference in the results of FNA and frozen tissue sections. We also found that the TPO staining intensity of malignant tumors was markedly lower than that of benign tumors, with significant differences found between the mean densities, relative optic densities, and the intensities of staining color (all $P < 0.05$), but with no significant difference found between the results of FNA samples and frozen tissue sections. TPO staining was positive in 20 of the 22 smears of the benign cystoma and in none of the 4 smears of malignant cystoid lesion ($P < 0.05$). Taking the results of H-E staining as the control, the sensitivity of FNA samples was 95.74% and the specificity was 91.67%; of frozen tissue section were 100% and 66.47%; and of the cystoid lesions smears were 97.44% and 88.46%, respectively. **Conclusion:** TPO expression level is obviously higher in benign thyroid tumors than those in the malignant ones. FNA samples can be used for TPO immunocytochemistry staining as an adjuvant tool for distinguishing benign and malignant tumors.

[KEY WORDS] thyroid neoplasms; iodide peroxidase; immunohistochemistry; biopsy, fine-needle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1315-1319]

细针穿刺细胞学(FNAC)检查对良、恶性甲状腺结节的诊断符合率高于 B 超及核素扫描, 是术前鉴别甲状腺结节性质的主要手段之一, 但在临床应用过程中, 由于受涂片质量、取材的细胞数目、检查医师经验等因素影响, 其准确性受到限制。因此寻找一种敏感性高、特异性强的肿瘤标志物, 并应用于分析甲状腺

细针穿刺物(FNA)标本, 以及评价其是否具有鉴别甲状腺结节的价值, 成为当前研究的热点。

[作者简介] 曲 卫, 博士生, 主治医师, E-mail: qw106@sohu.com

* Corresponding authors. E-mail: jiangling76@hotmail.com;

lzm@sh163.net

甲状腺过氧化物酶(TPO)是甲状腺激素生物合成所必需的关键酶。研究发现,在良恶性甲状腺肿瘤中,TPO表达具有明显差异^[1]。因此,本研究采用人TPO单克隆抗体 MoAb47,对比研究不同病理类型的甲状腺肿瘤术后 FNA 标本和组织冰冻切片标本的 TPO 免疫化学表达情况。

1 材料和方法

1.1 研究对象 71 例标本取自山东大学齐鲁医院、青岛医学院附属医院、青岛市立医院、济南军区总医院,为 2002 年 11 月至 2003 年 4 月手术切除的甲状腺肿瘤组织,所有标本病理诊断以中国肿瘤病理学分类为依据^[2]。恶性甲状腺肿瘤 24 例(乳头状腺癌 17 例,滤泡状腺癌 2 例,未分化癌及低分化癌 3 例,髓样癌 2 例),男 8 例、女 16 例,平均年龄(43.0±14.7)岁(17~74 岁);良性甲状腺肿瘤 47 例(甲状腺腺瘤 20 例,结节性甲状腺肿 27 例,其中腺瘤或结节伴不典型增生者 6 例),男 13 例、女 34 例,平均年龄(46.5±11.2)岁(20~76 岁)。所有患者中有 26 例合并囊性病变,其中乳头状癌并囊性变者 4 例,其余为囊腺瘤或结节性甲状腺肿囊性变。所有病例均未经过药物或颈部放射治疗。

1.2 免疫组织化学染色

1.2.1 试剂 小鼠抗人 TPO 单克隆抗体(MoAb47)由 Alexis 公司(法国)提供,购自深圳晶美生物制品公司北京分公司,防脱片剂多聚赖氨酸、生物素标记的羊 IgG 及 SP(链霉素标记的过氧化物酶)复合物均购自福建迈新生物制品公司。

1.2.2 标本采集 FNA 细胞涂片标本:用 22G(7 号)针头 10 ml 一次性干燥空针,在手术切下的甲状腺肿瘤组织中多点、反复负压抽吸 3~5 次,抽出物直接涂片 2~8 张。室温下晾干 5~10 min,以 4℃ 丙酮固定 10 min,然后放入保湿密闭的切片盒中,置于-20℃冰箱中冷冻保存待用。

组织冰冻切片标本:手术切下的甲状腺组织经-24℃快速冷冻,切制成 5 μm 厚的切片。室温下晾干 10 min,以 4℃丙酮固定 5 min,然后放入保湿密闭的切片盒中,置于-20℃冰箱中冷冻保存待用。

1.2.3 标本处理 免疫细胞化学染色(ICC)或组织化学染色(IHC):所取细胞涂片或冰冻切片经蒸馏水洗涤后,放入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,经 3%过氧化氢于室温孵育 10~20 min,用蒸馏水和 PBS 清洗,山羊血清封闭 30~40 min。甩去血清,加入 1:50(ICC)或 1:100(IHC)鼠抗人 TPO 抗体(MoAb47),4℃冰箱过夜,PBS 清洗 3 min×3

次,加入生物素标记的山羊抗小鼠 IgG,孵育 30 min,PBS 清洗 3 min×3 次,加入链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液孵育 30 min,PBS 清洗 3 min×3 次,DAB 显色剂显色,苏木精复染,脱水,透明,树脂封片,显微镜下观察。用 PBS 替代一抗作阴性对照和用已知人 TPO 阳性的正常甲状腺组织切片作阳性对照。

1.2.4 定性分析结果判定 染色强度分级:双人双盲法进行观察,以滤泡上皮细胞和甲状腺瘤细胞胞质内有棕黄色颗粒且染色强度高于背景非特异性染色为着色细胞。根据有无着色细胞及其数量和分布情况分为 5 级:I 级,着色细胞少于 20%;II 级,着色细胞约 20%~40%左右,呈散在分布者;III 级,着色细胞数 40%~60%,散在分布多者;IV 级,着色细胞约 60%~80%,分布较密者;V 级,着色细胞 > 80%,呈丛集分布者。

TPO 染色阳性结果判定:按照 1994 年 De Micco 所创的阳性判定方法^[3],凡细胞或组织中有 80% 以上的细胞着色(V 级)判定为阳性,反之,20% 以上的细胞未着色(I~IV 级)则判定为阴性,结果以阳性率表示。

1.2.5 染色结果定量分析 采用 MCID Analysis Evaluation 7.0 图像分析软件,对染色结果定量分析。在每例 FNA 细胞涂片或组织切片中随机抽取 5~10 个视野,测定阳性细胞的平均密度值、相对密度(ROD)值和色彩强度值,计算其均值,再求出每组标本的平均密度值(density level)、相对光密度值(density-ROD)和色彩强度值(color intensity)。平均密度值与色彩强度值的高低与染色强度成反比。

1.3 TPO 免疫组织化学染色的方法学评价 将两组免疫化学染色结果与 H-E 染色的病理诊断结果进行比较,计算敏感性、特异性和准确率以及阳性预告值、阴性预告值等指标。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,对 TPO 表达阳性率进行 χ^2 检验,条件不满足者用精确概率法检验;对等级资料的非参数检验,采用 Ridit 分析;对图像分析测得的平均密度值、ROD 值和色彩强度值进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 TPO 免疫染色情况 TPO 免疫阳性物质为棕黄色颗粒,存在于甲状腺滤泡细胞的胞质中,除甲状腺滤泡细胞和少数肿瘤外,部分标本的淋巴细胞也可见着色。良性甲状腺肿瘤细胞中 TPO 染色阳性者占 80%~100%,主要表达于甲状腺滤泡细胞的

胞质中, 强阳性染色较多, 分布也较密集, 滤泡腔内的分泌物及胶质成分亦有阳性表达; 囊液中脱落细胞 TPO 免疫染色阳性数亦在 80% 以上(图 1)。恶性甲状腺肿瘤细胞中, TPO 免疫阳性物质明显少于

良性细胞, 主要表达于少量瘤细胞的胞质中, 分布较弥散, 阳性细胞数 < 80%, 且染色强度均显著低于良性甲状腺瘤细胞; 囊液中脱落细胞 TPO 免疫染色阳性数亦 < 80%(图 2)。

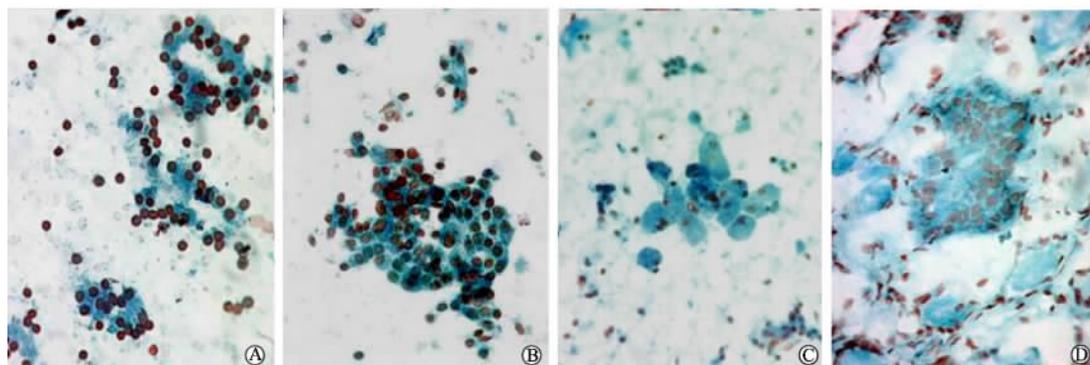


图 1 良性甲状腺肿瘤组织的 TPO 染色

Fig 1 TPO immunostaining in benign thyroid tumors (SP, ×200)

A: FNA smear of nodular goiter; B: FNA smear of thyroid adenoma; C: Cystic desquamative cells smear; D: Tissue section of nodular goiter with atypical proliferation

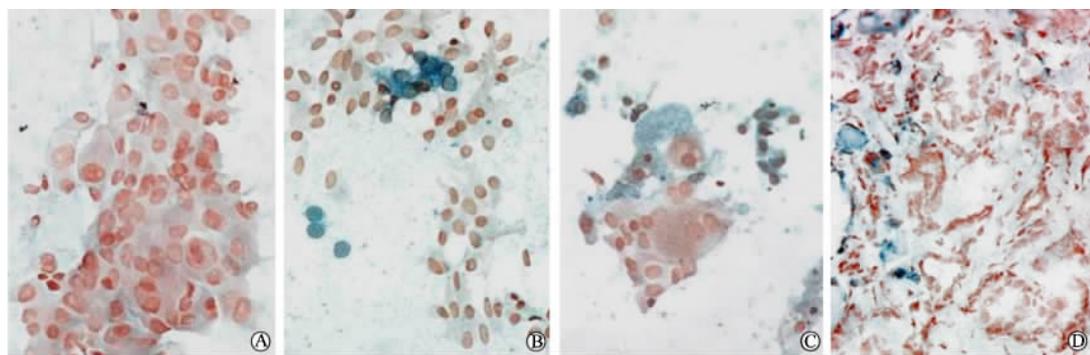


图 2 恶性甲状腺肿瘤组织的 TPO 染色

Fig 2 TPO immunostaining of malignant thyroid tumors (SP, ×200)

A: FNA smear of undifferentiated carcinoma; B: FNA smear of medullary carcinoma; C: Cystic desquamative cells smear of papillary carcinoma; D: Tissue section of follicular carcinoma

2.2 定性分析结果 如表 1 所示, TPO 在恶性组织的 FNA 细胞涂片与组织切片标本中的表达均低于良性甲状腺肿瘤, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。相同性质的甲状腺肿瘤 FNA 细胞涂片与组织切片 TPO 表达阳性率一致。不同分化类型的甲状腺恶性肿瘤细胞的 TPO 表达有差异, 其中滤泡状癌, 乳头状癌表达相对较高, 髓样癌和未分化癌表达强度较低 (P 均 < 0.05)。甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿及伴有不典型增生的良性甲状腺细胞中, TPO 表达情况基本相同, 无明显差别 (P 均 > 0.05)。甲状腺肿物囊液涂片中良、恶性细胞的 TPO 表达阳性比

别为 20/22、0/4, 两者有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 定量分析结果 如表 2 所示, 恶性甲状腺肿瘤细胞的 TPO 染色强度明显低于良性甲状腺组织细胞, 两者平均密度值、相对光密度值和着色的颜色强度均有显著差异 (P 均 < 0.05)。FNA 细胞涂片和组织切片的 TPO 免疫染色的平均密度值、相对光密度值和着色的颜色强度均一致。

2.4 TPO 免疫染色的方法学评价 表 3 可见 TPO 免疫染色在 FNA 涂片及组织切片中均有较高的敏感性、特异性和准确率, 甚至在囊液脱落细胞涂片中也显示了较好的敏感性、特异性和准确率。

表 1 不同类型的良、恶性甲状腺肿瘤细胞中 TPO 免疫表达情况及阳性率

Tab 1 Immunostaining results of TPO in different thyroid tumors tissue slices and FNA smears

Group	FNA smears							Tissue slices						
	n	I	II	III	IV	V	Positive rate(%)	n	I	II	III	IV	V	Positive rate(%)
Malignant thyroid tumor	24	6	8	6	2	2	8.33 ^{△△}	24	8	8	4	3	1	4.17 ^{**}
Papillary carcinoma	17	2 ^a	6 ^a	5 ^a	2 ^a	2 ^a	11.64	17	3 ^b	8 ^b	3 ^b	2 ^b	1 ^b	5.88
Follicular carcinoma	2	0 ^a	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0	2	0 ^b	0 ^b	1 ^b	1 ^b	0 ^b	0
Medullary carcinoma	2	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0	2	2 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0
Undifferentiated carcinoma	3	3 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0	3	3 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0
Benign thyroid tumor	47	0	0	1	1	45	95.74	41	0	0	1	2	38	92.68
Thyroid adenoma	20	0 ^c	0 ^c	1 ^c	1 ^c	18 ^c	90.00	20	0 ^d	0 ^d	1 ^d	2 ^d	17 ^d	85.00
Thyroid nodule	27	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	27 ^c	100.00	21	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d	21 ^d	100.00

^a: $\chi^2=7.9181, P<0.05$; ^b: $\chi^2=9.9030, P<0.05$; ^c: $\chi^2=0.4275, P<0.05$; ^d: $\chi^2=0.6192, P<0.05$; ^{**} $P<0.01$ vs tissue sections of benign thyroid tissues; ^{△△} $P<0.01$ vs FNA smears of benign thyroid tissues

表 2 良、恶性甲状腺肿瘤组织切片和 FNA 涂片中甲状腺滤泡细胞 TPO 表达程度定量分析结果

Tab 2 Quantitative analysis of TPO expression in benign or malignant thyroid tumor tissue slices and FNA smears

Image analysis	FNA smears		Tissue slices	
	Benign tumor (n=47)	Malignant tumor (n=24)	Benign tumor (n=41)	Malignant tumor (n=24)
Density	153.97±13.25	217.82±20.95 [*]	151.23±11.54	219.35±17.72 [*]
Density-ROD	0.2250±0.0618	0.0913±0.0341 [*]	0.2296±0.0565	0.1020±0.0313 [*]
Color intensity	0.6012±0.1103	0.8599±0.0660 ^{**}	0.5795±0.1005	0.8784±0.0614 ^{**}

^{**} $P<0.01$, ^{*} $P<0.05$ vs benign thyroid tumors

表 3 TPO 在甲状腺 FNA 涂片、囊液脱落细胞涂片及组织切片中免疫化学表达效果的比较

Tab 3 Comparison of TPO immunostaining results in thyroid tumor FNA smears, cystic desquamative cells smears, and frozen tissue sections

Specimen	n	Positive ratio		Sensitivity	Specificity	PV positive	PV negative	Accuracy
		Benign case	Malignant case					
FNA smear	71	45(47)	2(24)	0.9574	0.9167	0.9574	0.9167	0.9437
Cystic smear	26	20(22)	0(4)	0.9091	1.000	1.000	0.6667	0.9231
Tissue slice	65	38(41)	1(24)	0.9268	0.9583	0.9744	0.8846	0.9385

3 讨论

TPO 主要分布在甲状腺细胞质和内质网,为成熟甲状腺细胞微粒体中的主要成分,具有重要的生理功能。研究^[4]发现,TPO 基因的某些突变与甲状腺癌有关,一些突变类型可引起所编码合成的 TPO 蛋白发生结构异常,并且功能上呈无活性状态。细胞癌变本质是干细胞在增殖分化过程中,受到外界各种致癌因素干扰,使其无法按既定程序向成熟阶段演变,从而导致细胞停留在比较幼稚的阶段。因此,细胞分化程度的高低是良、恶性肿瘤的主要区别之一。TPO 的合成是分化良好的甲状腺细胞的功能之一,当甲状腺肿瘤细胞的分化停滞,使得调节 TPO 基因表达的核转录因子调控失常或者细胞生

物学功能异常时,TPO 的合成将受到影响,呈现出不同程度的低表达或无表达状态。本研究结果表明,TPO 在良性甲状腺细胞中高表达(表达率 80%~100%),在恶性甲状腺肿瘤细胞中表达低下,并且与肿瘤组织的分化程度和组织细胞类型有关。未分化和低分化的肿瘤细胞往往无表达,髓样癌及神经内分泌细胞来源的甲状腺癌细胞也呈无表达;分化程度较好的甲状腺恶性肿瘤细胞中,TPO 也呈不同程度的低表达。图像分析结果也显示,恶性甲状腺肿瘤组织切片和 FNA 细胞涂片的 TPO 染色强度、平均密度值等明显低于良性甲状腺细胞。提示在大多数恶性甲状腺肿瘤细胞内,TPO 的含量或者结构上发生了异常。以往研究^[5,6]发现良、恶性甲状腺肿瘤的 TPO 基因序列存在差异,一些类型的甲状

腺癌中 TPO 基因发生突变而产生了序列较为短小的 TPO 类型, 这些突变引起所编码合成的 TPO 蛋白发生结构异常。

判断甲状腺结节的性质, 对治疗方案的选择具有重要的临床意义。本研究在 FNA 细胞涂片标本中所获得的结果, 显示了人 TPO 的单克隆抗体 MoAb47 对良、恶性甲状腺肿瘤的鉴别具有良好的敏感性和特异性, 阳性及阴性预告值分别达到 95.74% 和 91.67%。并且 TPO 在 FNA 标本和组织切片标本中的表达基本一致, 甚至在囊液涂片中亦显示出了较好的准确度, 提示该项标记物能提高 FNAC 检查对良、恶性甲状腺肿瘤的鉴别诊断能力。De Micco 等^[3]研究总结了几种抗人 TPO 的特异性抗体在良、恶性甲状腺肿瘤组织中的表达情况, 发现其中单克隆抗体 MoAb47 对恶性细胞的低表达或无表达的敏感性达 100%, 而高表达则提示为良性, 其他单克隆或多克隆抗体也有相似结果, 但其中 MoAb47 的敏感性和特异性是最佳的。Christensen 等^[1]也报告了该抗体对于甲状腺肿瘤良、恶性鉴别的敏感性达 100%, 特异性 96%, 但样本量较小。文献^[7,8]在较大样本的研究中得出的敏感性和特异性介于 80%~98%。本研究获得的敏感性和特异性分别为 95.74% 和 91.67%, 与前人报告接近。

Cristofaro 等^[5]认为 TPO 免疫染色在“灰色领域”滤泡性甲状腺癌中具有独特价值。而本研究因样本量所限, 未能发现该标记物在评价滤泡性甲状腺癌中的优势。近期更多免疫化学、定量 PCR 研究表明, TPO 能提高 FNAC 检查在良、恶性甲状腺肿瘤鉴别方面的应用, 其中免疫化学方法最有希望应用于甲状腺细针穿刺标本细胞学检查中。另外, 本研究发现 TPO 在囊液涂片标本中良、恶性甲状腺细胞的表达同样具有明显差异, 将有助于利用囊液中的脱落细胞鉴别诊断乳头状癌的囊性变与甲状腺囊腺瘤等。

FNAC 检查, 具有微创、快速、廉价等优点, 对临床可疑甲状腺癌的诊断具有独特价值。本研究显示, TPO 对甲状腺结节的 FNAC 检查具有辅助诊断价值, 且将免疫化学方法应用于 FNA 标本染色, 使该项标记物的检测更加简便易行, 使该技术在临床上易于推广。本研究的局限性在于某些类型的甲状

腺癌(如滤泡性甲状腺癌)的标本例数较少, 无法深入探讨和比较, 在今后的研究中还需扩大样本量作进一步分析。此外, 如能结合其他标记物如端粒酶^[9]、P53^[10]、半乳糖凝集素 3(galactin-3)^[11]等对甲状腺肿瘤的 FNA 标本有鉴别意义的指标, 将会进一步提高 FNAC 标本的诊断价值。

[参考文献]

- [1] Christensen L, Blichert-Toft M, Brandt M, et al. Thyroperoxidase (TPO) immunostaining of the solitary cold thyroid nodule[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2000, 53:161-169.
- [2] 刘复生主编. 中国肿瘤病理学分类[M]//上海: 科学技术文献出版社, 2001:447-457.
- [3] De Micco C, Zoro P, Garcia S, et al. Thyroid peroxidase immunodetection as a tool to assist diagnosis of thyroid nodules on fine-needle aspiration biopsy[J]. Eur J Endocrinol, 1994, 131: 474-479.
- [4] Medeiros-Neto G, Gil Da Costa MJ, Santos CL, et al. Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in the thyroperoxidase gene[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83: 4162-4166.
- [5] Cristofaro JD, Silvy M, Lanteaume A, et al. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes[J]. Endocrine Related Cancer, 2006, 13:485-495.
- [6] Le-Fourn V, Ferrand M, Franc JL. Differential expression of thyroperoxidase mRNA splice variants in human thyroid tumors[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1689: 134-141.
- [7] Faroux MJ, Theobald S, Pluot M, et al. Evaluation of the monoclonal antibody antithyroperoxidase MoAb47 in the diagnostic decision of cold thyroid nodules by fine-needle aspiration[J]. Pathol Res Pract, 1997, 193: 705-712.
- [8] De Micco C, Vassko V, Henry JF. The value of thyroid peroxidase immunohistochemistry for preoperative fine-needle aspiration diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid cancer[J]. Surgery, 1999, 126: 1200-1204.
- [9] 蒋玲, 董建军, 张晓黎, 等. 良性及恶性甲状腺肿瘤端粒酶活性的表达[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18:136-137.
- [10] Haugen BR, Woodmansee WW, McDermott MT. Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumours[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2002, 56: 281-290.
- [11] 张延美, 蒋玲, 曲卫, 等. 半乳糖凝集素 3 表达在良恶性甲状腺肿瘤鉴别中的意义[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 21: 121-125.

[收稿日期] 2006-09-01

[修回日期] 2006-11-05

[本文编辑] 贾泽军