

免疫组织化学检测结果判读进展

本文整理和节选自：杨军，康安静，苏宝山等. 免疫组织化学检测结果判读进展 [J/CD]. 中华临床医师杂志：2014，8(20)：3699-3703.

免疫组织化学(IHC)是病理学诊断、鉴别诊断及特异性分子靶标筛选、鉴定的最重要技术手段之一，也是肿瘤个体化治疗相关靶标检测的基础性平台技术。但自IHC应用以来，尽管已有多种IHC判读标准和方法，但由于分级标准差异大和主观性强以及对IHC结果准确性和精细化要求的提升，一系列问题随之产生，其中最突出和最关键的问题就是IHC结果判读标准的一致性问题。目前，IHC结果判读方法主要有按阳性细胞百分比分级、阳性细胞的染色强度分级、兼顾阳性染色的强度及百分比分级等三种，但考虑到不同学者使用的分级界值却存在较大差异，不仅不能良好解释IHC检测分子的生物学功能，其临床意义也不明确，还会给临床医师解读带来严重影响了结果的可靠性。同时，由于高敏感性、高特异性生物检测技术的发展，也为IHC的判读带来新的困难；此外，肿瘤个体化治疗对生物靶标的检测又提出了精细化的要求(如：近年来ASCO/CAP关于乳腺癌HER2+++的阳性临界值的调整)。因此，总结和分析一种新的IHC结果判读标准和方法，可为实现IHC标准化和制定规范化的IHC结果判读标准提供重要参考。

IHC 检测结果判读的要素

IHC是为数不多的具有原位组织细胞学特征的重要检测技术之一，准确、客观的IHC检测结果不仅要明确目标分子的亚细胞定位和细胞类型(即表达模式)，也要检测该分子的阳性(或阴性)和表达强度，为客观评价目标分子的生物功能提供极具价值的信息，这也是IHC独特的技术优势。

1. IHC 检测指标的表达模式：

在组织细胞中，所有生物分子均具有与其生物功能具有密切相关的精确的亚细胞学定位。大多生物分子可定位于细胞膜、细胞核或细胞质等单一亚细胞区域。但也发现部分生物分子可同时定位于细胞质和细胞核或者定位于细胞质和细胞膜等多种亚细胞区域。因此，确定目标分子的表达模式是IHC结果评判的首要内容。有文章在前人工作的基础上，根据生物分子的亚细胞定位将其分为：胞核型、胞膜型、胞质型、质/膜型、质/核型等五种不同表达模式。

(1) 胞核型分子定位于细胞核，在细胞基因扩增、DNA修复、染色体重塑、细胞复制等过程中发挥重要作用。IHC染色的阳性颗粒均匀分布于整个细胞核、核膜下或不规则分布于细胞核的不同分区，其清晰的核定位特征为胞核型分子的精确定量分析提供了可能。

(2) 胞膜型分子定位于细胞膜，多为细胞膜蛋白、信号通路的重要受体，不仅在细胞信号传导中发挥极其重要的作用，也是许多细胞因子、药物作用的靶点，因而在肿瘤的个体化治疗中的重要性日益显现。IHC染色的阳性颗粒分布于细胞膜表面，并彼此连接形成完整而规则的网格状结构，也可因目标分子表达量和在细胞膜分区的不同呈现深浅不一、厚薄不均、区域缺如和断续的不完整型结构。而在典型极性特征的细胞(如腺体细胞、腺癌细胞)中，胞膜型分子可仅定位于腔缘的微绒毛处，呈特殊的“腔缘型”表达或定位于极性细胞基底部和两侧膜呈“U”型膜表达。

(3) 胞质型分子定位于细胞质，绝大多数的分子均呈胞质型表达。IHC染色的阳性颗粒以弥漫型或局限型定位于细胞质。前者阳性颗粒弥漫而均匀地分布于整个细胞质内(包括胞体和突起)，后者阳性颗粒呈小斑点状或斑片状局限于胞质中的某一部位(如核

周或胞质一侧)，形状不规则。

(4) 质/膜型分子同时定位于细胞质和细胞膜。IHC染色的阳性颗粒同时定位于细胞质和细胞膜。此类分子为数不少，可因表达细胞类型而异。如CD3、CD5、CD30、bcl-2、CA125、CA199、CD99等多为质/膜型分子，而CD15在霍奇金淋巴瘤R-S细胞中呈胞膜型表达，但在胃肠道腺癌中则呈胞质型表达。

(5) 质/核型分子可同时定位于细胞质和细胞核内。IHC染色的阳性颗粒同时定位于细胞质和细胞核。此类靶分子多具有核定位功能，且核内表达量更能反映其生物活性和功能。最常见的质/核型分子为S-100、HMB45等同时显示为胞质、胞核阳性。

2. IHC 检测指标的表达强度和阳性细胞百分比：

IHC是检测目标分子在原位组织学结构中的表达情况。在IHC结果判读中，表达强度与目标分子表达量呈正相关，是指单位面积内阳性信号的强弱(棕黄色颗粒的多少)，显示的是单位面积内该生物分子的表达数量，也就是单个细胞中该分子的表达量。表达强度一般分为阴性(无着色)、弱阳性(微弱的淡黄色)、中等阳性(黄色)和强阳性(强的棕黄色)4个等级，也可简化为阴性和阳性两个等级。而阳性细胞百分比是一项可以量化的指标，尤其适用于胞核型分子表达结果的判断，但是对于胞浆性和胞膜型分子而言，其阳性细胞界值的判定是以弱阳性、中等阳性还是强阳性细胞为标准仍值得商榷。在实际工作中，由于以弱阳性细胞为阳性界值进行阳性细胞百分比计算的准确性和实际意义有限。因此，借鉴ASCO/CAP关于乳腺癌HER2检测结果判定中阳性临界值确定的成功经验，作者以为以“中等强度阳性”作为阳性细胞界值进行阳性细胞百分比计算较为适宜，且更利于实际操作。所以，作者提出：阳性细胞百分比的含义应是指在现有IHC敏感性和特异性条件下，判定为中等阳性以上的细胞(阳性细胞)在同类型细胞中的比例。在某种程度上，靶分子的阳性细胞百分比较单个细胞的表达强度而言，具有更为重要的生物学意义。因此，在IHC结果判读中，应重视阳性细胞百分比的临床价值。

IHC 结果判读标准和方法

众所周知，肿瘤组织是由肿瘤实质细胞和间质共同组成，即使同一张组织切片中不同视野下肿瘤实质细胞和间质比例均存在很大差异，同时，不同肿瘤细胞的大小（单个细胞的横断面）也不相同，而不同病例之间的差异就更为悬殊。加之，相同倍率下不同型号显微镜的视野面积也有差异，使得相同视野下肿瘤细胞的绝对数量并无可比性。可见，在传统IHC判读方案中直接进行若干高倍视野下阳性计数并不能准确估算阳性细胞在同类型细胞中的百分比。此外，由于尚缺乏一个能被各方接受的判读标准，以及判读者认知水平、关注点以及分级界值的不同，导致IHC结果判读结果差异大、重要信息解读不充分、临床价值不大等问题。因此，有文章在整合现有IHC结果判读标准的基础上，提出的一种以表达模式为基础的IHC检测结果判读标准和方法（表1）。

表1. 免疫组织化学检测结果判读标准和方法

表达模式	判读标准	判读方法
胞核型 (可精确计数, 如ER、PR、Ki67, 精细化判读有重要的临床指导价值)	0级: 无阳性细胞:0% I级: 阳性细胞数:1%~10% II级: 阳性细胞数:11%~20% III级: 阳性细胞数:21%~30% IV级: 阳性细胞数:31%~40% V级: 阳性细胞数:41%~50% VI级: 阳性细胞数:51%~60% VII级: 阳性细胞数:61%~70% VIII级: 阳性细胞数:71%~80% IX级: 阳性细胞数:81%~90% X级: 阳性细胞数:91%~100%	在低倍镜下(4×或10×)浏览整张切片, 观察目标细胞中(如肿瘤实质细胞)细胞核着色情况和胞核阳性细胞的分布状态, 选择高表达区域, 计数5个高倍(20×或40×)视野中阳性细胞在同类型细胞中的百分比作为整张切片的判读结果, 既可以计数资料方式以百分比报告, 也可按照0~10级的等级资料分级报告
胞膜型 (因其药物靶点价值备受关注, 如Her-2, 建议以此作为胞膜型分子的判读标准, 但对于典型极性细胞胞膜型分子的判读按照其表达模式如腔缘型或“U”型膜型进行判读。)	0(阴性): 无着色; + (弱阳性): 任何比例的细胞呈现微弱、不完整膜着色(区别0与++之间的表达强度); ++ (阳性): >10%的细胞呈现弱至中等强度、完整但不均匀膜棕黄着色; +++ (强阳性): >30%的细胞呈现强、完整膜棕褐着色 <i>该文认为ASCO/CAP将乳腺癌HER2 “>10%的细胞呈现强、完整膜棕褐着色”判读为“+++”的标准过于宽松, 不利于客观评价“++与+++之间的差异”。</i>	在低倍镜下(4×或10×)浏览整张切片, 确定要观察的目标细胞(如肿瘤实质细胞)的细胞膜着色和网格状分布情况, 对于在低倍镜下(4×或10×)不能明确阳性细胞的情况下, 转换较高放大倍数(20×、40×)进行观察, 按照目标细胞膜彼此间连接形成的网格状结构的完整性、着色强度、均匀程度及其在同类型细胞所占的比例, 进行分级。
胞质型 多数分子的表达模式, 考虑阳性细胞百分比有更强的临床价值, 借鉴Her-2判读标准优化及分级界值确定经验, 同时考虑IHC判读标准和报告格式的一致性, 采用类似于胞膜型分子检测判读标准。	0(阴性): 无着色 + (弱阳性): ≤10%的细胞呈现不同程度的细胞质着色 ++ (阳性): 10%~30%的细胞呈现强的棕褐着色的细胞质着色, 或≤70%的细胞呈现弱或中等强度的细胞质着色 +++ (强阳性): >30%的细胞呈现强的棕褐着色的细胞质着色或>70%的中等强度细胞质着色	在低倍镜下(4×或10×)浏览整张切片, 观察目的细胞(如肿瘤实质细胞)中细胞质阳性细胞的分布情况, 选择高表达区域, 计数5个高倍(20×或40×)视野中细胞着色强度和阳性细胞数(或面积)占视野下(或整张切片内)同类型细胞的百分比, 最后按照阳性细胞百分数所在区间进行分级
质/核型	同胞质型	按照胞质型标准判读,同时标注核阳性细胞比例。也可按表达模式的优势原则参照胞核型或胞质型分子标准判读
质/膜型	同胞质型	按照胞质型标准判读,同时标注膜阳性细胞比例。也可按表达模式的优势原则参照胞质型或胞膜型分子标准判读

总之，随着IHC的广泛应用及对其结果判读的精细化要求日益提升，制定统一的IHC判读标准成为实现IHC标准化的重要内容。文章在深入分析生物分子表达模式、染色强度、阳性百分比的临床意义和现有IHC判读标准的基础上，根据目标分子的表达模式分别制定相应的判读标准和方法，该IHC判读标准不仅详尽地展示了被检分子的生物信息，也使得相同表达模式分子之间的比较更具同质性和可靠性，对于实现IHC判读的标准化，提升IHC技术在病理诊断、鉴别诊断和指导肿瘤个体化治疗中的临床价值具有重要意义。但是，仍需要多中心的大样本临床研究进一步验证该方法在实际应用中的可操作性和临床意义，尤其是对于胞质型分子的阳性分级界值的确定仍需进一步商榷。

恶性间皮瘤鉴别诊断中的免疫组化简述

恶性间皮瘤 (malignant mesotheliomas , MMs) 包括一组大多发生于胸膜、也可发生于腹膜、心包膜或睾丸鞘膜的病变。其形态学多变, 鉴别诊断需考虑到大量原发及继发性肿瘤。

临床上, MM可分为弥漫性MM及局限性MM, 前者可能与石棉接触史有关, 后者与石棉的关系尚不明确。组织学上, MM分为四种主要组织学亚型: 上皮样、双相型、肉瘤样及促结缔组织增生性。上皮样及双相型是MM最常见的亚型, 二者共计约占全部MM的70-90%, 不同的研究中各自比例不一。尽管弥漫性MM的预后均较差, 但肉瘤样MM及促结缔组织增生性MM相比上皮样MM来说, 预后更差, 且对胸膜外肺切除无效, 因此在病理报告中分出这些亚型很重要。双相型MM含有上皮样成分、以及肉瘤样或促结缔组织增生性成分, 但每一种成分应不少于肿瘤组织的10%。临床实践中, 如果仅取几个组织块进行检查, 则常见少许不同于主要成分的肿瘤病灶。这种情况对于肿瘤分型没有影响, 但在其他方面均为肉瘤样的肿瘤组织中哪怕只是查见极少的上皮样成分, 也可能有助于正确诊断MM。

MM的不同形态学亚型可发生于任何部位。除了上述主要亚型之外, 上皮样及肉瘤样MM还有一些少见生长方式, 如上皮样MM中的透明细胞、蜕膜样、腺样囊性、印戒样、小细胞样, 及肉瘤样MM中的淋巴组织细胞样及异源性MM。这些罕见组织学生长方式尚没有独立于上皮样或肉瘤样亚型之外的预后意义, 重要的是认识到这些形态属于MM的形态学谱系, 尤其是在小活检时。

病理工作者在诊断MM时, 需结合此前恶性疾病的病史、影像学及临床表现, 因为诸多良性及恶性病变、原发及继发肿瘤均可发生于、或侵犯体腔。即使掌握了上述资料, 由于MM形态多样、成分复杂, 加之极易与反应性病变更混淆, 仅根据形态学表现, 有时候仍难以确诊。因此免疫组化在MM的鉴别诊断中极为重要。

上皮样MM

体腔内最常见的恶性病变是转移癌。要诊断上皮样MM, 必须做一系列免疫组化。有建议提出要用包括一种广谱角蛋白、至少两种间皮标记及两种癌相关标记的免疫组化套餐。这可能并不是那么严格, 因为抗体的选择取决于肿瘤在胸膜或腹膜的位置、形态学表现、此前有无恶性病史、临床及影像学表现。此外, 抗体的效果及实验室经验均影响抗体的选择。每一实验室均应对典型上皮样MM的抗体免疫组化检查相关流程进行标准化, 并选择那些敏感性和特异性在80%以上的抗体用于MM免疫组化检查。胸膜腔、腹膜腔上皮样MM和转移癌鉴别诊断时免疫组化标志物的相关情况见表1。部分结果在不同研究中可能不一致, 这是由于组织固定及处理中的部分因素、免疫组化所用抗体及预处理的相关因素、阳性染色判断标准不同造成的。

部分间皮标记及角蛋白在高分化上皮样MM中总是阳性, 尤其是CK5/6、7、8、18、19, 而低分化上皮样MM、多形性或肉瘤样MM中则部分或全部间皮标记为阴性、或仅局灶阳性。建议将广谱角蛋白加入免疫组化套餐, 以鉴别上皮样MM和体腔原发或继发非上皮性肿瘤, 如恶性黑色素瘤、淋巴瘤、肉瘤(上皮样肉瘤、上皮样血管内皮瘤、上皮样血管肉瘤、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤)。所谓的间皮标记对于上皮样MM也并不特异, 部分间皮来源的其他肿瘤或非间皮来源的肿瘤也呈calretinin、CK5/6、thrombomodulin、WT-1或podoplanin (D2-40) 阳性。胸腺瘤及胸腺癌表达CK5/6, 且calretinin及thrombomodulin也可能阳性; 而上皮样血管肉瘤及上皮样血管内皮瘤表达thrombomodulin及podoplanin (D2-40)、滑膜肉瘤及促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤中calretinin可局灶阳性。

双相型MM

双相型MM具有上皮样和肉瘤样或促结缔组织增生性成分, 每种成分在肿瘤中不低于10%。由于上皮样成分对部分间皮标记及细胞角蛋白总是阳性, 而肉瘤样或促结缔组织增生性成分则可为阳性或阴性, 因此免疫组化对双相型MM的诊断帮助极大。鉴别诊

断包括其他双相性肿瘤, 如转移性癌肉瘤、具有分化较好成分的多形性癌、肺母细胞瘤、双相型滑膜肉瘤。有时候间质成分可能类似肉瘤样肿瘤成分。在鉴别双相型MM和滑膜肉瘤时, 细胞角蛋白作用不大, 因为两种肿瘤中CK5/6、7、8、18、19在上皮样成分均为阳性, 偶见肉瘤样成分也呈阳性反应。滑膜肉瘤也可表达“间皮性”标记物calretinin及D2-40, Bcl-2及Ber-EP4在滑膜肉瘤中多为阳性, 而很少表达于MM。最可靠的是滑膜肉瘤中有t (X; 18) 染色体易位, 产生SYT-SSX1或SYT-SSX2嵌合体, 这在MM中是没有的。

肉瘤样MM

肉瘤样MM是指90%以上的肿瘤组织为肉瘤样细胞构成。肉瘤样MM在胸膜出现的最多, 但尚不清楚这是由于部分研究中取样偏倚所致、还是发生于胸膜之外的其他体腔时诊断有难度所致。肉瘤样MM诊断中, 典型大体特征非常重要, 如浆膜面显著弥漫性增厚、伴内脏器官受累。肺内存在肿物提示原发性肺部肿瘤、而不是MM。

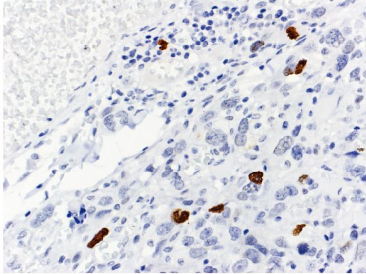
肉瘤样MM的形态多变, 可类似任何肉瘤、也可是几种形态类型的混合。最常见生长方式为纤维肉瘤样或恶性纤维组织细胞瘤样, 即梭形细胞排列呈席纹状、散乱或丛状。部分肉瘤样MM类似伴瘤巨细胞的多形性恶性纤维组织细胞瘤。肉瘤样MM也可具有平滑肌肿瘤的特点。极为罕见的亚型为伴不同成分的肉瘤样MM, 其特点为具有骨肉瘤、软骨肉瘤或横纹肌肉瘤等恶性成分。该类型并不包括局灶具有化生性骨化的MM、具有横纹特征的MM, 这两个特点常见于上皮样或肉瘤样MM中。淋巴组织细胞样MM由组织细胞样恶性细胞松散构成, 伴反应性淋巴细胞及浆细胞显著增生。

未完待续……

新抗体推荐

NEW

PHH3 (RAB-0693)



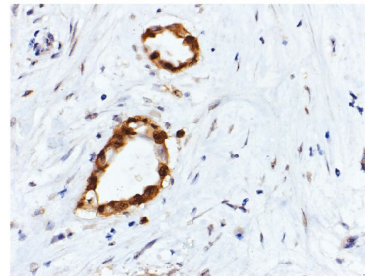
横纹肌肉瘤PHH3(迈新编号: RAB-0693)染色, 有丝分裂期肿瘤细胞核阳性, MaxVision3试剂盒(KIT-5230), DAB染色

磷酸化组蛋白H3 (PHH3) 是标记细胞有丝分裂的特异性标记物, 可用于鉴别细胞凋亡体和核碎片。可用于中枢神经系统肿瘤、黑色素瘤、软组织肿瘤、乳腺癌等, 提供细胞有丝分裂信息, 用于辅助指导肿瘤病理分级, 预后判断等。最近亦有文章指出PHH3可作为有效的胃肠道间质肿瘤 (GISTs) 有丝分裂的辅助标记, 相比于Ki-67会表达于除G0期外的整个细胞周期, PHH3作为新推出的有丝分裂特异性标志物, 只表达于G2和M期, 其和核分裂计数具有更好的正相关关系, 且已在很多不同的肿瘤和良性组织中得到了证实, 且病理医生之间诊断的一致性更高。该文章认为PHH3免疫组化染色能比核分裂计数更容易找到有丝分裂细胞, 且更快检测到病变的增殖区。此外, 在固定不足的情况下, PHH3 MI的量化要优于核分裂计数。

参考: Shin Y1, Hyeon J1, Lee B1, et al. PHH3 as an Ancillary Mitotic Marker in Gastrointestinal Stromal Tumors. J Pathol Transl Med, 2015; 49(1): 23-9

S100P (MAB-0697)

S100P是S100蛋白家族的一个成员, 在肿瘤中异常表达会通过各种信号通路对肿瘤的生长、增殖、入侵和转移起到重要作用。最早发现于在胎盘组织中高表达。在胰腺导管腺癌中高表达, 而在良性的胰腺导管和腺泡腺中不表达。据报道, S100P在所有的导管内乳头状粘液性肿瘤的浸润成分中表达, 包括神经、淋巴结和微小浸润。90%原发癌胆管活检S100P强阳性, 而良性的活检组织S100P阴性, 因此, 在胆管活检标本中, S100P可以帮助我们区分癌与反应性上皮变化。同时S100P也是尿路上皮癌特异性的标志物之一。



胰腺导管浸润癌S100P(迈新编号: MAB-0697)染色, 肿瘤细胞核/胞浆阳性, MaxVision3试剂盒(KIT-5230), DAB染色

技术贴士

合理的组织固定是确保高质量的标本检查的必要条件, 本期主要从标本尺寸、固定时间等方面探讨影响固定的因素。

表1.影响固定的因素

影响因素	建议	可能带来的阴性结果
标本尺寸	理想的组织切片厚度为3mm; 最大4mm	组织切片过厚导致固定不充分
固定时间	随固定剂种类不同: 福尔马林——6-8h Bouin's——不超过18h B-5——2-4h, 然后转入福尔马林溶液	固定不足导致组织变形或染色太差; 用一些固定剂 (酒精, B-5) 固定过度会使得组织易脆或导致抗原活性缺失
渗透率	取决于每一种固定剂的扩散程度, 福尔马林渗透速率大约在1mm/h	筋膜和胶囊对固定剂来说是天然的物理屏障, 且会减缓渗透速率。必须在固定前先切开。
温度	室温对多数组织固定是理想的, 固定温度最高不能超过45℃	升温可以提高固定效率, 但同样也加快组织自溶, 导致细胞形态差或染色不合格
pH和缓冲液	甲醛分解产生甲酸, 甲酸导致pH降低, 而缓冲液能帮助避免pH降低, 并且是pH只维持在6.8-7.2之间	甲酸可以与血红蛋白反映产生福尔马林色素并沉积在组织中, 容易被误读为微生物或其它色素 (如黑色素, 铁); 这种色素可以通过将组织切片放在Lugol碘液中进行短时间内浸泡去除。
渗透压	不要将组织放在水中或留在生理盐水中时间过长; 如果不能做到及时固定, 则可以冷藏, 放置在盐水浸泡的纱布上, 或浸泡在等渗盐水中短暂保存	如果放在低渗溶液中, 细胞会裂解

编者语: 进入个性化医疗时代, 辅助检测已具有诊断和个性化治疗的意义, 作为一名合格的病理工作者, 应掌握使用何种检测技术进行辅助诊断是最佳的, 影响检测结果准确性的因素有哪些, 如何确保实现高质量的检测结果, 才更有益于和临床进行沟通。从本期开始, 我们将优选国内外文章整理、编译成系列技术小贴士, 以供分享。如若您有关于免疫组化方面的技术经验, 欢迎来稿分享, 我们将提供精美礼品, 并将优秀文章选登在后续的《迈新园地》或官方微信“迈新诊断”中, 以悦享更多的病理同行。