

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.015

薄层液基细胞学联合细胞 DNA 定量分析技术在恶性胸腔积液诊断中的应用价值*

汪少华¹, 李丹², 黄丛改¹, 王洁琼¹, 万宇¹, 咎潇¹, 杨波¹, 杨志惠^{1△}

(西南医科大学附属医院:1. 病理科;2. 肿瘤科, 四川泸州 646000)

[摘要] 目的 探讨薄层液基细胞学(TCT)和 DNA 定量分析技术(DNA-ICM)联合诊断在恶性胸腔积液中的应用价值。方法 收集 678 例伴有胸腔积液的住院患者标本,其中 269 例恶性胸腔积液标本作为试验组,另外 409 例良性胸腔积液标本作为对照组,标本离心后分别采用 TCT 和 DNA-ICM 进行检测。结果 TCT 检查的灵敏度高于 DNA-ICM 分析,但特异度低于 DNA-ICM 分析。TCT 在恶性胸腔积液诊断中的灵敏度为 79.6%、特异度为 84.8%,DNA-ICM 分别为 56.5%、95.1%,灵敏度差异有统计学意义($P<0.01$);而 TCT 与 DNA-ICM 联合诊断的灵敏度为 90.0%、特异度为 89.5%,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 TCT 和 DNA-ICM 联合诊断可提高恶性胸腔积液的检出率,减少漏诊,在恶性胸腔积液的诊断中有重要的应用价值。

[关键词] 胸腔积液;薄层液基细胞学;DNA 倍体;DNA 定量分析系统

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)14-2402-05

Application of thin-cytological test combined with DNA-image cytometry in the diagnose of malignant pleural effusion*

WANG Shaohua¹, LI Dan², HUANG Conggai¹, WANG Jieqiong¹,
WAN Yu¹, ZAN Xiao¹, YANG Bo¹, YANG Zhihui^{1△}

(1. Department of Pathology;2. Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the value of thin-cytological test (TCT) combined with DNA-image cytometry (DNA-ICM) in the diagnosis of malignant pleural effusion. **Methods** A total of 678 cases of hospitalized patients with pleural effusion were collected, 269 cases of malignant pleural effusion were used as the experimental group, and 409 cases of benign pleural effusion were used as the control group. TCT and DNA-ICM were used to detect the samples after centrifugation. **Results** The sensitivity of TCT was higher than that of DNA-ICM analysis, while the specificity was lower. The sensitivity, specificity of TCT and DNA-ICM in the diagnosis of malignant pleural effusion were 79.6%, 84.8% and 56.5%, 95.1%, respectively. The difference of sensitivity was significant ($P<0.01$). The sensitivity and specificity of combined diagnosis of TCT and DNA-ICM were 90.0% and 89.5%. The difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The combined diagnosis of TCT and DNA-ICM can improve the detection rate of malignant pleural effusion and reduce missed diagnosis. It has important application value in the diagnosis of malignant pleural effusion.

[Key words] pleural fluids; thin-cytological test; DNA ploidy; DNA-image cytometry

胸腔积液是许多疾病常见的临床体征,许多恶性胸腔积液(MPE)疾病早期发现和治疗能显著提高患者的生存率^[1]。胸腔积液的细胞学检查目前被认为是获得诊断的首选和主要途径^[2]。然而细胞学是一种高度依赖形态学的检查方法,需要经过严格培训和经验丰富的病理医生及高质量的制片技术。若病理医生诊断经验不足,或因长期阅片造成的视力疲劳等

均会造成假阳性及假阴性^[3-4]。DNA 定量分析技术(DNA-ICM)是一种建立在基因水平上新兴的全自动检查方法^[5]。本研究旨在研究薄层液基细胞学(TCT)联合 DNA-ICM 技术来鉴别 MPE,减少诊断过程中的人为误差,探讨 MPE 最佳的检测方法,为临床诊断和评估 MPE 提供依据,现将研究结果报道如下。

* 基金项目:四川省教育厅重点项目(18ZA0529);四川省卫生与计划生育委员会普及应用项目(18PJ024)。 作者简介:汪少华(1982-),主治医师,博士,主要从事细胞病理基础与临床研究。 △ 通信作者, E-mail: yzhih73@swmu.edu.cn。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 7 月至 2018 年 6 月在西南医科大学附属医院住院的 678 例胸腔积液患者为试验组,其中男 372 例,女 306 例,年龄 16~91 岁。269 例 MPE 患者,其中男 152 例,女 117 例,年龄 16~91 岁,转移性腺癌 208 例,转移性鳞癌 30 例,大细胞癌 7 例,小细胞癌 12 例,间皮瘤 6 例,淋巴瘤 4 例,未分型 2 例。409 例良性胸腔积液标本作为对照组,所有研究对象均经临床和病理诊断证实。每例患者胸腔积液标本均采用 TCT 和 DNT-ICM 检查。本研究所有研究对象均知情同意,并经过医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 制片及染色 取 100 mL 胸腔积液标本,离心机在室温下,以 1 500 r/min 离心 15 min,取沉淀进行复悬,应用新柏氏液基细胞保存,采用膜式薄层液基细胞学制片(美国豪洛捷医疗技术公司)制片,每例制成 2 张薄层细胞学片,1 张薄层细胞片行 HE 染色进行 TCT 检查,1 张行 Feulgen DNA 染色,全自动细胞 DNA 图像定量分析系统(厦门麦克奥迪医疗诊断有限公司)作 DNA 定量分析。

1.2.2 TCT 诊断 由病理科有丰富细胞学诊断经验的职称为中级及以上医师完成 TCT 阅片及诊断,查找恶性肿瘤细胞。TCT 诊断结果分 4 级,Ⅰ级:未查见恶性肿瘤细胞;Ⅱ级:查见异型细胞;Ⅲ级:查见可疑恶性肿瘤细胞;Ⅳ级:查见恶性肿瘤细胞(包括转移性癌和恶性间皮瘤等)。参照文献[6]以Ⅰ级定为阴性判断标准,Ⅱ级、Ⅲ级和Ⅳ级定为阳性。

1.2.3 DNA-ICM 诊断 由全自动细胞图像扫描分析系统对每例 5 000 个以上胸腔积液细胞核进行自动聚焦扫描处理^[7]。该系统同时测定每个细胞核 DNA 的 132 个参数特征,自动对被检细胞进行分类和计数,自动打印 DNA 倍体分析直方图和细胞点阵分布图,主要通过测定染色体细胞核积分光密度(IOD)值来判断细胞核 DNA 的含量,并以二倍体细胞(G1/G0)DNA 指数(DNA index,DI)为 1,正常细胞 DI 值多为 1 左右;当 DI 为 2 时,多为四倍体细胞(G2/M 期)。DI 为 1.1~1.9 和 2.1~2.9 的细胞被认为是异倍体细胞。当异倍体细胞 DI 在 1.1~1.9 形成峰值,或有 3 个以上的细胞 DI≥2.5 时,可作为 DNA-ICM 诊断 MPE 的阳性指征。通常将 DNA-ICM 诊断结果分为 3 级,Ⅰ级:正常标准,无明显异倍体细胞峰及异倍体细胞;Ⅱ级:可疑恶性标准,查见少量 DNA 倍体异常细胞(1~2 个细胞,DI≥2.5);Ⅲ级:恶性标准,查见大量 DNA 倍体异常细胞(3 个或 3 个以上细胞,DI≥2.5)及异倍体细胞峰。其中 DI≥2.5 以上的标本玻片需经有经验的细胞病理学医生在显微镜下阅

片,以防系统将深染杂质和拥挤重叠的细胞核误认为恶性细胞造成假阳性。在统计学分析时将Ⅰ级定为阴性胸腔积液,Ⅱ级和Ⅲ级定为阳性胸腔积液。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计数资料以率表示,比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCT 和 DNA-ICM 诊断结果比较 在 TCT 诊断结果为炎性胸腔积液、异型细胞、可疑恶性及恶性肿瘤对应的 DNA 倍体阳性率分别为 7.2%、37.0%、47.6%、55.4%,见表 1。

表 1 TCT 检查和 DNA-ICM 分析比较(n)

TCT 诊断结果	n	DNA-ICM		
		0	0~<3	≥3
炎性积液	402	366	11	18
异型细胞	27	17	4	6
可疑恶性	63	45	11	19
恶性肿瘤	186	78	17	86

2.2 TCT、DNA-ICM 与临床病理结果比较 经临床和病理证实的 269 例 MPE,TCT 诊断为Ⅱ~Ⅳ级者 214 例,DNA-ICM 发现少量异倍体细胞及以上 152 例。409 例对照组胸腔积液标本中,TCT 检测有 62 例假阳性,而 DNA-ICM 检测只有 20 例出现假阳性,见表 2、图 1~2。

2.3 TCT 与 DNA-ICM 诊断灵敏度及特异度的比较

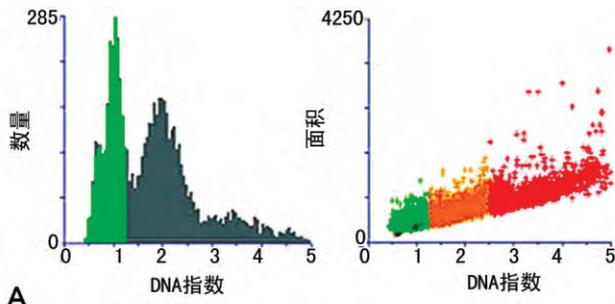
TCT 在 MPE 诊断中的总体灵敏度为 79.6%,DNA-ICM 的总体灵敏度为 56.5%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。TCT 和 DNA-ICM 在 MPE 诊断中的特异度分别为 84.8%、95.1%,DNA-ICM 特异度虽然高于 TCT,但两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 TCT 或 DNA-ICM 与联合诊断的比较

TCT 单独诊断灵敏度远高于 DNA-ICM,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步比较,29 例患者在 TCT 诊断良性积液,而 DNA-ICM 分析中出现 DNA 倍体异常细胞,TCT 与 DNA-ICM 联合诊断灵敏度为 90.0%,特异度为 89.5%,联合诊断的特异度虽有所降低,但是灵敏度差异有统计学意义($P < 0.01$)。

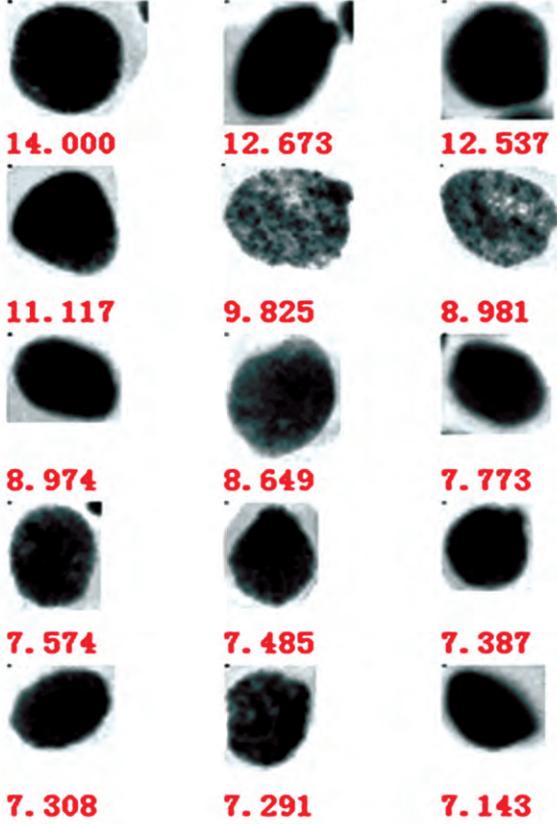
表 2 TCT 和 DNA-ICM 在 MPE 中检测中的灵敏度和特异度分析(n)

组别	n	TCT				DNA-ICM		
		Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅳ级	0	0~<3	≥3
试验组	269	55	16	45	153	117	34	118
对照组	409	347	11	18	33	389	9	11

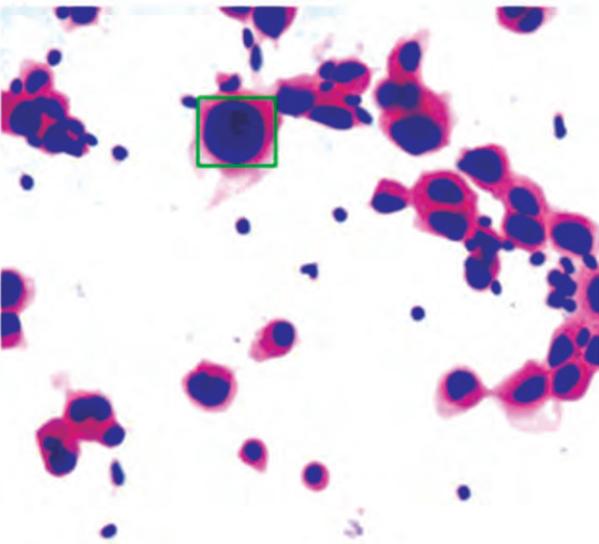


A

细胞核图像及DI值



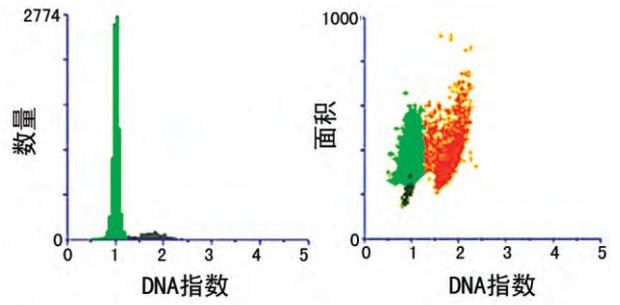
B



C

A: DNA 指数直方图及散点图; B: 细胞核图像及 DI 值; C: Feulgen DNA 染色细胞形态(×200)

图 1 恶性胸腔积液标本 DNA 倍体检测

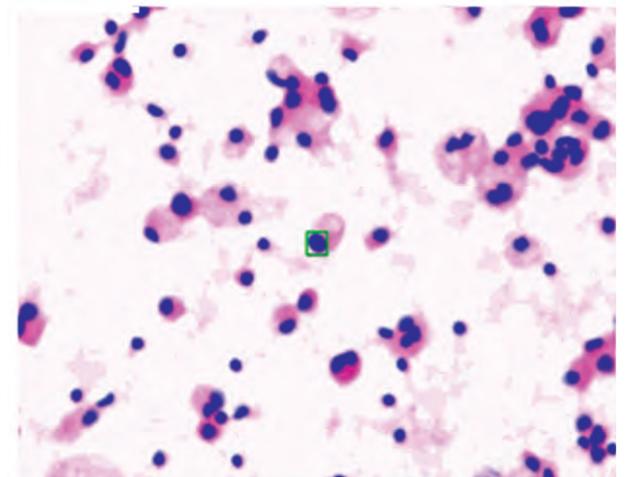


A

细胞核图像及DI值



B



C

A: DNA 指数直方图及散点图; B: 细胞核图像及 DI 值; C: Feulgen DNA 染色细胞形态(×200)

图 2 良性胸腔积液标本中 DNA 倍体检测

3 讨 论

临床上有胸腔积液的病例很多,为患者抽胸腔积液除了可减轻症状外,也可从细胞病理角度明确胸腔积液的性质。判断是恶性肿瘤还是其他非肿瘤性疾病引起的胸腔积液,是细胞病理学诊断的难点^[6,8]。MPE 的诊断方法有很多种,包括胸腔积液脱落细胞学检查、DNA 倍体定量分析、影像学检查、肿瘤标志物检查、胸腔积液分子标记、胸腔镜活检等。其中,胸腔镜活检组织病理学是最准确的检查方法,被称为金标准^[9-10]。细胞病理学检查是诊断胸腔积液最常用的经典检查方法,尤其是对于不能耐受胸腔镜等有创检查的患者。但是细胞学检查的灵敏度变化与细胞病理医生的经验、送检标本的质量,肿瘤的分型和分化程度有关。

DNA 倍体定量分析是肿瘤早期检测中的重要一环,通过 DNA 倍体分析进行胸腔积液良恶性的诊断在国内外已有大量文献报道,在北美、欧洲已是常规临床检测方法之一^[11-12]。细胞 DNA 定量分析目前大多数是采用流式细胞仪(FCM)或计算机图像分析仪(ICM),但 FCM 的设备昂贵,必须制备单细胞悬液,操作更复杂,不适合基层医院开展。DNA-ICM 分析通过全自动数码显微镜扫描标本玻片的每一个视野,全自动检测细胞内 DNA 的含量变化来判定细胞是否发生癌变,采用自主分析系统并使用具体数据作为描述肿瘤生物学和形态学的特点,可发现先于形态学改变的恶性细胞^[13-14]。因此测定其细胞 DNA 含量可以作为临床诊断 MPE 的客观依据之一。

本研究发现,TCT 检查的灵敏度高于 DNA-ICM 分析,但特异度低于 DNA-ICM 分析。TCT 在 MPE 诊断中的灵敏度为 79.6%、特异度为 84.8%,DNA-ICM 分别为 56.5%、95.1%,灵敏度差异有统计学意义($P < 0.01$)。虽然相比 TCT,DNA-ICM 可以提供很多更客观的诊断信息,但是本研究发现 DNA-ICM 也有假阳性和假阴性,推测 DNA-ICM 出现假阳性的原因可能是少数炎性胸腔积液中的细胞可出现退变或核固缩,这些细胞在 Feulgen 染色时,可出现 $DI \geq 2.5$ 的异倍体细胞。这时需要反复检查,并且结合 TCT 结果和免疫组织化学结果以鉴别炎性或 MPE。DNA-ICM 出现假阴性的原因主要是对成团的癌细胞不能识别,MPE 中以转移性腺癌最为常见,腺癌细胞常聚集成团,DNA-ICM 有时不能识别而造漏诊。

进一步研究分析发现如果 TCT 与 DNA-ICM 分析联合诊断,灵敏度可提高为 90.0%,特异度变为 89.5%。实验表明,与单独 TCT 或 DNA-ICM 分析相比较,联合诊断可明显提高灵敏度,胸腔积液阳性

检出率明显增多,但是特异度与单独 DNA 倍体分析有所降低。这一结果与在宫颈的研究报道一致^[4,15]。另外,在对照组的良性胸腔积液中,TCT 诊断 11 例异型细胞,18 例可疑恶性肿瘤,33 例恶性肿瘤,而 DNA-ICM 结果只有 20 例假阳性。而且在 TCT 诊断的 402 例炎性胸腔积液中 DNA-ICM 发现了 29 例阳性标本。这是因为细胞学诊断主要依赖细胞形态结构特点,TCT 制片技术虽然成熟,但是因为胸腔积液不仅成分复杂,更重要的是正常间皮细胞在炎症等各种刺激因素的作用下可出现增生,甚至非典型增生,这些增生与的间皮与转移性癌,特别是高分化癌细胞在镜下,从形态学上细胞病理学医师很难鉴别。DNA-ICM 通过检测细胞 DNA 含量变化来判定细胞是否发生癌变,不会受细胞形态改变的影响,因此联合诊断有利于 MPE 的早期准确诊断。

综上所述,DNA-ICM 在胸腔积液的诊断中有效弥补了 TCT 诊断可能引起的漏诊和误诊。TCT 联合 DNA-ICM 较单纯 TCT 或 DNA-ICM 在胸腔积液诊断方面具有更好的灵敏度和较高的特异度,可以减少 TCT 诊断中细胞病理医师的人为因素和 DNA-ICM 固有缺陷造成的漏诊和误诊,进一步保证胸腔积液诊断工作的质量,有较大的临床应用价值。

参考文献

- [1] LIU C, HUANG L, ZHANG X, et al. Combination of DNA ploidy analysis and miR-21 or miR-24 in screening malignant pleural effusion[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2018, 26(3): 376-381.
- [2] 闫威,朱翔,贺蓓,等. 薄层液基细胞学检测法与常规细胞学检测法在恶性胸腔积液诊断中的价值[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2015, 36(6): 926-929.
- [3] 朱晓娟,赵华,詹惠英. DNA 倍体分析在宫颈病变筛查中的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(9): 1294-1296.
- [4] 韩永良,涂露霞,王洁. 常规细胞学与 DNA 定量分析联合诊断在宫颈 CINⅢ 及以上级别病变中的应用[J]. *诊断病理学杂志*, 2015, 22(10): 631-633, 650.
- [5] ZHAO M, YANG L, FU X, et al. Endoscopic Ultrasound guided fine needle aspiration cytology combined with automated quantitative DNA cytometry can improve the value in the detection of pancreatic malignancy[J]. *Pancreas*, 2018, 47(1): 40-52.
- [6] THOMAS S C, DAVIDSON L, MCKEAN M E. An investigation of adequate volume for the diagnosis of malignancy in pleural fluids[J]. *Cytopathology*, 2011, 22(3): 179-183.
- [7] KUNDU R, HANDA U, MOHAN H. Mohan role of D-

- NAflow cytometry and Immunocytochemical analysis in diagnosis of malignant effusions[J]. *Diagn Cytopathol*, 2012, 40(10):887-892.
- [8] CONNER J R, CIBAS E S, HORNICK J L, et al. Wilms tumor 1/cytokeratin Dual-Color immunostaining reveals distinctive staining patterns in metastatic melanoma, metastatic carcinoma, and mesothelial cells in pleural fluids an effective first-line test for the workup of malignant effusions[J]. *Cancer Cytopathol*, 2014, 122(8):586-595.
- [9] PORCEL J M, PALMA R, BIELSA S, et al. TTF-1 and napsin A on cell blocks and supernatants of pleural fluids for labeling malignant effusions[J]. *Respirology*, 2015, 20(5):831-833.
- [10] LIU J, LUO X, WANG W, et al. Clinicopathological study of 9 cases of megakaryocytes in pleural and peritoneal fluids[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(33):e11923-11928.
- [11] WANG M, HAO C, MA Q, et al. DNA image cytometry test for primary screening of esophageal cancer: a population-based multi-center study in high-risk areas in China [J]. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28(4):404-412.
- [12] FRITCHER E G, BRANKLEY S M, KIPP B R, et al. A comparison of conventional cytology, DNA ploidy analysis, and fluorescence in situ hybridization for the detection of dysplasia and adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus[J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(8):1128-1135.
- [13] GHIZONI J S, SPERANDIO M, LOCK C, et al. Image cytometry DNA ploidy analysis; correlation between two semi-automated methods[J]. *Oral Dis*, 2018, 24(7):1204-1208.
- [14] SHI A Q, WANG M, XIANG L, et al. Value of automatic DNA image cytometry for diagnosing lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1):915-923.
- [15] WONG O G, HO M W, TSUN O K, et al. An automated quantitative DNA image cytometry system detects abnormal cells in cervical cytology with high sensitivity[J]. *Cytopathology*, 2018, 29(3):267-274.

(收稿日期:2019-01-18 修回日期:2019-03-06)

(上接第 2401 页)

- [19] SEN U, MISHRA P K, TYAGI N, et al. Homocysteine to Hydrogen sulfide or hypertension[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2010, 57(2):49-58.
- [20] ZHANG W L, SUN K, CHEN J X, et al. High plasma homocysteine levels contribute to the risk of stroke recurrence and all-cause mortality in a large prospective stroke population[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 118(3):187-194.
- [21] 任志静. H 型高血压及 H 型正常高值血压与左心室重构的关系探讨[D]. 天津:天津医科大学, 2016.
- [22] 马倩倩, 申萌楠, 申晓曦. 正常高值血压合并高同型半胱氨酸血症患者血清 D-二聚体, 胱抑素 C 及血浆同型半胱氨酸水平与颈动脉重构的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2017, 11(2):188-192.
- [23] 黄丹丹, 陈玲. 血清同型半胱氨酸水平与缺血性脑血管病患者颈动脉粥样硬化的相关性研究[J]. *川北医学院学报*, 2016, 31(6):832-834.
- [24] 焦坤, 冯玉宝, 苏平. 同型半胱氨酸与血压变异性的关系研究[J/CD]. *世界最新医学信息文摘(电子版)*, 2016, 16(8):55-56.
- [25] 艾民, 颜昌福, 莫晔, 等. 攀枝花地区 H 型高血压血浆同型半胱氨酸水平与脑卒中的相关性分析[J]. *四川医学*, 2018, 39(10):38-40.
- [26] 刘俊明, 张雯, 赵亮, 等. 冠状动脉介入术与血浆脑钠肽的关系及预后的研究[J/CD]. *中西医结合心血管病杂志(电子版)*, 2018, 6(23):92-93.
- [27] 李金兰, 张小宁, 戴黎, 等. 急性脑梗死合并高血压与血浆同型半胱氨酸水平的关系[J]. *临床神经病学杂志*, 2014, 27(1):40.
- [28] ROTHWELL P M, HOWARD S C, DOLAN E, et al. Prognostic significance of visit-to-visit variability, maximum systolic blood pressure, and episodic hypertension[J]. *Lancet*, 2010, 375(9718):895-905.
- [29] ROTHWELL P M, HOWARD S C, DOLAN E, et al. Effects of beta blockers and calcium-channel blockers on within-individual variability in blood pressure and risk of stroke[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(5):469-480.
- [30] 林从娟. H 型高血压患者血压变异性与靶器官损害的临床研究[D]. 福州:福建医科大学, 2015.
- [31] 王喆. 苯磺酸氨氯地平叶酸片治疗 H 型高血压的临床价值[D]. 合肥:安徽医科大学, 2017.
- [32] 温晓娟, 王瑞英, 李宇新, 等. H 型高血压患者血压变异性变化及其与颈动脉粥样硬化的相关性[J]. *当代医学*, 2017, 23(18):11-14.

(收稿日期:2019-01-28 修回日期:2019-04-20)