

# 浸润性乳腺癌细胞学分级及其与激素受体等表达的关系

朱立强, 柳红(徐州医学院病理学教研室 221002)

**【摘要】目的** 探讨浸润性乳腺癌细胞学分级的临床意义及其与雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子 2(HER2)表达的关系。**方法** 对细针吸取细胞学(FNAC)诊断为“高度癌疑”及“乳腺癌”的 47 例细胞学标本进行细胞学分级,并采用免疫细胞化学方法检测细针吸取乳腺癌细胞 ER、PR、HER2 的表达,应用卡方检验对免疫细胞化学染色结果与术后免疫组织化学染色结果进行统计学分析,应用 spearman 相关分析对细胞学分级与 ER、PR 及 HER2 的表达关系进行统计学分析。**结果** (1)术前穿刺涂片诊断为“高度可疑乳腺癌”及“乳腺癌”的 47 例女性患者,经术后病理组织学证实均为乳腺癌,细胞学诊断准确率为 100%。其中 1 级 13 例,2 级 19 例,3 级 15 例。(2)利用免疫细胞化学染色对术前细针吸取细胞标本 ER、PR 及 HER2 表达进行检测,其阳性率分别为 55.32%、53.19% 及 19.15%。相对应的石蜡切片经免疫组织化学染色检测,ER、PR 及 HER2 的表达阳性率 55.32%、55.32% 及 17.02%。两种染色方法结果经卡方检验,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(3)术前乳腺癌细胞学分级与 ER、PR 的表达呈负相关( $P < 0.01$ ),与 HER2 的表达呈正相关( $P < 0.01$ )。**结论** FNA 是术前诊断乳腺癌准确、易行的方法之一。乳腺癌术前细针吸取细胞学分级联合免疫细胞化学染色可在术前提供更多肿瘤的相关信息,可能成为指导术前新辅助化疗、术式选择的有用指标。

**【关键词】** 乳腺癌; 细胞学分级; 雌激素受体; 孕激素受体; 人表皮生长因子 2

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.20.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)20-2490-02

**Cytologic grading of invasive breast carcinoma and its correlation with the status of hormone receptors** ZHU Li-qiang, LIU Hong (Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Jiangsu 221002, China)

**【Abstract】Objective** To evaluate the importance of cytologic grading of invasive breast carcinoma and its association with the status of ER, PR and HER2 on fine needle aspiration cytology (FNAC) material. **Methods** The cytologic grading was evaluated in 47 cases of breast carcinoma which were diagnosed as the FNAC. ER, PR and HER2 status, and were determined by immunocytochemistry on cytologic smears and compared with the histologic results by immunohistochemistry. The Correlation between cytologic grading and ER, PR and HER2 status was analyzed by using the Spearman correlation coefficient. **Results** (1) All the cases of breast carcinoma diagnosed by FNAC were confirmed by histopathology. The sensitivity was 100%. There were 13 cases in grade 1, 19 cases in grade 2 and 15 cases in grade 3 among them. (2) The positive rates of ER, PR and HER2 on cytologic smears by immunocytochemistry were 55.32%, 53.19% and 19.15%, respectively. While the positive rates on the corresponding tissue sections were 55.32%, 55.32% and 17.02%, respectively. There was no statistical significance between the results of two methods ( $P > 0.05$ ). Cytologic grade was negatively correlated with ER and PR was positivity correlated with HER2 positivity ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** FNAC is one of the most simple, accurate and quickest methods on diagnosis of breast carcinoma. The combination of cytologic grading and prognostic markers can provide more information than usual methods on tumor biologic behavior and could be a useful parameter to be taken into consideration when selecting neoadjuvant therapy and operative procedure.

**【Key words】** breast cancer; cytologic grade; ER; PR; HER2

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。近年来发病率呈明显上升趋势,且年龄趋于年轻化。乳腺癌的成功治疗主要依赖于早期诊断和适当的术前及术后治疗。细针吸取细胞学是临床上常用的术前诊断乳腺癌的方法之一<sup>[1]</sup>,但其应用往往局限于病变的良恶性判别上。然而,随着细胞学分级及免疫细胞化学的广泛应用,使得细针吸取细胞学能够在术前为临床提供更多、更可靠的肿瘤的生物特征及预后信息。本研究应用细针吸取细胞学标本进行乳腺癌的诊断及分级,利用免疫细胞化学染色检测雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子 2(HER2)的表达情况,探讨其相关性及其临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2009 年 9 月至 2011 年 3 月在徐州医学院附属医院细胞室经穿刺细胞学诊断为“高度可疑乳腺癌”及“乳腺癌”的女性患者 47 例,年龄 34~81 岁,平均 53.7 岁。穿刺前均未接受放疗、化疗及激素治疗,术后经病理组织学证实均为浸润性乳腺癌。

**1.2 穿刺、涂片** 细针穿刺由经验丰富的细胞学医师进行操

作,穿刺选用 10 mL 一次性注射器,7 号针头。碘伏、75%乙醇常规消毒患侧乳腺或淋巴结,以左手拇指和食指固定肿块(或在超声引导下进行),右手将针头刺入肿块,当刺入肿块后,将空针回抽 5 mL 产生一定的负压,针头在肿块内前后或上下进退多点抽吸,以获取不同部位的细胞。有少量组织进入针芯后,放弃负压拔出针头,将抽吸细胞部分涂于未经处理的普通玻片上行常规刘氏染色(快速瑞氏染色)作细胞学诊断并分级,部分涂于经防脱预处理的玻片上,95%乙醇固定,行免疫细胞化学染色观察 ER、PR、HER2 的表达情况。

**1.3 免疫细胞化学染色** 一抗采用福州迈新生物技术开发有限公司的 ER、PR、HER2 即用型抗体。检测系统采用福州迈新生物技术开发有限公司 EliVision 试剂盒。95%乙醇固定的细胞涂片稍水洗后,采用枸橼酸盐修复液微波修复(持续加热 250 s 至沸腾,维持在沸腾状态加热 450 s)。自然冷却至室温,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,也可免去此抗原修复步骤。加 3%过氧化氢溶液作用 5~8 min 消除内源性过氧化物酶。PBS 溶液洗涤(2 min×3 次)。加第一抗体,于湿盒中 4℃过夜。

PBS 溶液洗涤(2 min×3 次)。滴加二步法 EliVision 试剂盒中的试剂 A(Polymer enhancer), 室温下孵育 20min。PBS 溶液洗涤(2 min×3 次)。加入试剂盒中的试剂 B(Polymerized HRP2 Anti Mouse/Rabbit IgG), 室温下孵育 30 min。PBS 溶液洗涤(2min×3 次)。DAB 显色, 在显微镜下观察显色反应, 适时候用流水冲洗已终止显色反应。苏木精复染, 盐酸乙醇分化、自来水冲洗返蓝、脱水、透明、中性树脂封固。同时, 利用已知阴性及阳性的涂片进行阴阳性的对照。

**1.4 细胞学分级** 盲法邀请两位有多年诊断经验的细胞学医师参照 Robinsin 等<sup>[2]</sup>及 Emiko 等<sup>[3]</sup>的分级方法(表 1)对所有穿刺细胞涂片逐项进行打分评估, 将每一病例的 7 项参数分数相加, 总分 7~11 分为 1 级, 12~16 分为 2 级, 17~21 分为 3 级。

表 1 乳腺癌细胞学分级标准

观察指标	得分		
	1 分	2 分	3 分
坏死	少量或无	少量	大量
细胞离散度	多数成团	部分成团, 部分散在	大多散在
细胞大小	<3 个 RBC	3~4 个 RBC	>4 个 RBC
核浆比	<50%	50%~80%	>80%
核多形性	较规则	轻度异型	显著异型
核染色质颗粒	较细致	中等粗细	粗糙
核仁	不明显	可见	明显或多形

**1.5 免疫细胞化学染色结果判定** 只记录单个或单层平铺的癌细胞, ER、PR 的阳性表达位于细胞核, HER2 的阳性表达位于细胞膜。阳性程度的评分参照表 2<sup>[4]</sup>。0 或 + 判定为阴性。++ 或 +++ 判定为阳性。

表 2 穿刺细胞涂片行免疫细胞化学染色阳性程度的打分系统

着色类型	分值	判定结果
<10% 的肿瘤细胞未染色或弱染色	0	阴性
>10% 的肿瘤细胞微弱染色	+	阴性
>10% 的肿瘤细胞中等染色	++	阳性
>10% 的肿瘤细胞强染色	+++	阳性

**1.6 免疫组织化学结果判定** ER、PR 的阳性表达位于细胞核, 呈棕黄色颗粒, 当超过 10% 肿瘤细胞表达, 则认为属于阳性; HER2 阳性表达于细胞膜, 判读标准同《乳腺癌 HER2 检测指南》<sup>[5]</sup>。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS11.5 统计软件包进行统计学分析, 应用卡方检验对免疫细胞化学染色结果与术后免疫组织化学染色结果进行统计学分析, 应用 spearman 相关分析对细胞学分级与 ER、PR、HER2 的表达关系进行统计学分析。检验水准  $\alpha=0.05, P<0.05$  差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 乳腺癌术前细胞学诊断结果** 47 例女性乳腺癌变患者术前经 FNA 涂片诊断为“高度可疑乳腺癌”5 例、“乳腺癌”42 例, 经术后病理组织学证实均为乳腺癌。如果以高于“高度可疑乳腺癌”的诊断结果作为细胞学检查的阳性结果, 则穿刺细胞学对乳腺癌的诊断准确率为 100%, 未出现假阳性病例。

**2.2 免疫细胞化学与免疫组织化学染色结果** 本组 47 例乳腺癌在术前 FNA 涂片上进行免疫细胞化学染色检测 ER、PR、HER2 的表达, 同时, 在术后组织切片上进行了相应的免疫组织化学染色。ER、PR 的阳性表达位于细胞核, HER2 阳性表达于细胞膜, 呈棕黄色颗粒。细胞涂片上, 只记录单个或单层成团的癌细胞, 出现深于背景的棕黄色颗粒为阳性细胞(见图 1~3)。ER 阳性率为 55.32%(26/47), PR 的阳性率为

53.19%(25/47), HER2 阳性率为 19.15%(9/47)。相对应的石蜡切片经免疫组织化学检测, ER 阳性率为 55.32%(26/47), PR 的阳性率为 55.32%(26/47), HER2 阳性率为 17.02%(8/47)。其中 1 例细胞涂片 HER2 表达为阳性, 而对应的石蜡切片为阴性; 1 例石蜡切片 PR 为阳性表达, 而对应的细胞涂片为阴性。ER、PR、HER2 在乳腺癌细胞及相应组织中的表达结果经卡方检验, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.3 乳腺癌细胞学分级与 ER、PR、HER2 表达的相关性** 47 例患者经 FNA 明确诊断后进一步做细胞学分级。其中细胞学 1 级 27 例, 2 级 48 例, 3 级 36 例。细胞学分级与 ER、PR 的表达呈负相关( $P<0.01$ ), 与 HER2 的表达呈正相关( $P<0.01$ )(表 3)。

表 3 细胞学分级与 ER、PR、HER2 阳性表达的相关性

细胞学分级	ER		PR		HER2	
	-	+	-	+	-	+
1	2	11	2	11	13	0
2	8	11	9	10	17	2
3	10	5	10	5	8	7

**3 讨 论**

乳腺癌的死亡率增长快和保乳手术率低, 主要是因为乳腺癌早期诊断率低。如果早期发现乳腺癌, 治愈的机会很大。乳腺肿块是乳腺病最常见的症状, 为明确肿块的性质, 过去多采用切除或切取活检, 患者精神及经济负担都较大, 诊断周期长, 不能完全满足临床医生及患者的要求。细针吸取细胞学(FNA)是术前诊断乳腺癌的快速准确、经济简便、创伤小的重要方法之一。据美国一些医学中心的资料, 对可触及的肿物, FNA 是一极好的诊断工具。对癌诊断的敏感性、特异性均可达到 99%<sup>[6]</sup>。越来越多的临床医生信任细胞学报告并以此作为进一步治疗的依据, 并期待给予更多的预后和肿瘤的分子生物学信息。

随着免疫细胞化学(immunocytochemical, ICC)技术的发展, 越来越多的研究表明, 用 ICC 技术不仅可以协助细胞学诊断, 提高细胞学的确诊率, 而且可用于手术前激素受体及其他预后指标的检测<sup>[4,7]</sup>。免疫细胞化学染色与常规组织病理标本的处理基本相同, 其染色结果不但准确, 且稳定性强、可重复性高<sup>[8]</sup>。而近年来, 研究者通过基因表达谱分析或免疫组化技术对乳腺癌进行了分子分型, 将乳腺癌大致的分为腺腔 A 型[ER/PR(+), HER2(-)]、腺腔 B 型[ER/PR(+), HER2(+)]、HER2 过表达型[ER(-), PR(-), HER2(+)]及基底细胞样(basal-like)型[ER(-), PR(-), HER2(-)]<sup>[9-10]</sup>。且各亚型乳腺癌均有不同的预后。Carey 等<sup>[11]</sup>报道的 496 例乳腺癌, 随访期为 8.1~11.2 年, 结果显示, HER2 过表达型和基底样亚型的预后最差, 而腺腔 A 型预后最好, 且差异具有统计学意义( $P<0.001$ )。本研究利用免疫细胞化学在术前进行 ER、PR、HER2 的检测, 其结果与术后的病理学及免疫组织化学结果近似, 差异无统计学意义。因而, 可在术前利用 FNA 标本进行近似的分子分型, 有助于术前掌握乳腺癌的生物学特征及预后信息。对于失去手术机会的患者, FNAC 及 ER、PR、HER2 的表达情况可为临床提供可靠的诊断及治疗依据。

乳腺癌细胞学分级是根据乳腺癌细胞学的特征建立了半定量的评分系统, 以往研究表明, 细胞学分级与组织学分级及淋巴结转移具有很好的相关性, 因而细胞学分级可用于术前预测组织学分级及肿瘤的侵袭性<sup>[2-3]</sup>。本研究利用细针吸取细胞学进行乳腺癌的诊断及分级, 并分析细胞学分级与 ER、PR、HER2 表达的关系, 结果显示细胞学分级与(下转第 2494 页)

临床上推广使用<sup>[6-7]</sup>。(3)传统血细胞分析仪法:因其具有稳定性好、重复性好、精密度高、计数准确、测定速度快等优点,已广泛应用于临床<sup>[8-10]</sup>。但传统的电阻抗法不能将血小板与 NPPs 如小红细胞、红细胞碎片、白细胞碎片、细菌和真菌以及免疫复合物区分开来,造成计数不准。另外还有一种间接法,即血涂片法:该法是用抗凝血液推片,经染色后,在厚薄适中处计数 1 000 个红细胞并同时计数所见到的血小板,求得血小板/红细胞之比。再将此比值×红细胞数(通过一般血液分析仪数得),求得血小板数。该法可以直观地“间接”计数血小板,还可观察血小板的大小、形态、有无聚集等,但此法的缺点就是不能定量,无法精确计数血小板。SYSMEX XE-5000 全自动血细胞分析仪在红细胞/血小板检测通道采用鞘流电阻抗法,在网织红细胞检测通道采用荧光染色结合流式法两种方法计数血小板,分别表示为 PLT-I 和 PLT-O。但由于 PLT-I 法中血小板与红细胞是在同一个通道内通过颗粒大小来加以鉴别的,PLT-I 分别在 25~250 fL 和 2~35 fL 范围内分析红细胞和血小板。因此,血小板与“非血小板颗粒”测量的信号常有交叉误判,影响其计数,造成计数不准,在网织红细胞检测通道的激光流式法因采用了 DNA/RNA 核酸荧光染色,能通过荧光辨认其内含的 DNA 和 RNA 等物质,因此对一些临床特殊样本如出现较多的细胞碎片、小红细胞、巨大血小板样本时有较强的抗干扰能力。但是 PLT-O 法的缺点就是试剂成本昂贵,如果临床常规标本都使用 PLT-O 法测定的话,检验成本会很高,阻碍其在临床上的推广。

根据本实验表明:在正常体积血小板组中无论血小板的数量是正常、增高还是减低,PLT-I 和 PLT-O 与 PLT-M 之间的结果都不具有统计学差异。所以笔者建议,常规标本可以使用 PLT-I 通道检测,当血小板直方图、MPV、MCV 出现异常时,建议使用 PLT-O 通道复查,以在节约试剂成本的同时保证血

小板结果的可靠性。

### 参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:123-137.
- [2] 丛玉隆. 当代血液分析技术与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:33-39.
- [3] 肖木洲,杨平英,郑惠红,等. 血细胞分析仪测定血小板影响因素分析[J]. 现代医药卫生,2009,25(18):2836.
- [4] 李果,粟军,彭黎明. 血小板直方图与计数结果影响因素探讨[J]. 华中医杂志,2004,28(2):125-126.
- [5] 王金芳,杜再娥. 仪器法与手工法对低血小板计数的对比分析[J]. 宁夏医学杂志,2005,27(9):629-630.
- [6] 朱忠勇. 准确计数血小板方法学研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2002,23(3):131-132.
- [7] 林顺宝,郑德柱,刘文星,等. 血小板检测及临床意义探讨[J]. 临床检验杂志,2003,21(1):17-18.
- [8] 郭玉娥,赵洪泉,赵志明. 血细胞分析仪计数血小板的影响因素[J]. 中国误诊学杂志,2006,5(1):152-153.
- [9] Ruzicka K, Veitl M. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology [J]. Arch Pathol Lab Med, 2001,125(3):391.
- [10] Briggs C, Harrison P, Grant D, et al. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE-2100 [J]. Clin Lab Haematol, 2000, 22(6):345-350.

(收稿日期:2011-05-11)

(上接第 2491 页)

ER、PR 表达呈负相关,与 HER2 呈正相关。可推测低细胞级别的乳腺癌主要为腺腔型,而 HER2 过表达型主要出于高细胞学级别组中,因而术前细胞学分级可能成为术前预测肿瘤预后的一个有用的指标,而且细胞学分级无需额外的取材及花费,在任何医院都可以施行。

综上所述,术前细胞学分级简单易行,利用免疫细胞化学对 ER、PR、HER2 的检测结果可靠,细胞学分级联合分子分型可更准确地了解乳腺癌细胞的形态学及生物学特性,对术前了解患者乳腺癌的恶性程度及预后提供必要的参考指标,从而为乳腺癌患者制订个体化的治疗方案,提高乳腺癌患者生存率。

### 参考文献

- [1] Tanaka K, Shoji T, Tominaga Y, et al. Statistical analysis of diagnostic failure of fine needle aspiration cytology (FNAC) in breast cancer[J]. J Surg Oncol, 2001, 76(2): 100-105.
- [2] Robinsin IA, McKee G, Nicholson A, et al. Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas[J]. Lancet, 1994, 343(8903): 947-949.
- [3] Emiko T, Yang Q, Tang W, et al. Cytologic grading of invasive breast carcinoma: correlation with clinicopathologic variables and predictive value of nodal metastasis [J]. Acta cytol, 2000, 44(4): 587-591.
- [4] 《乳腺癌 HER2 检测指南》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(10): 631-633.

- [5] Rita N, Cecilia B, Pellegrino C, et al. Immunocytochemical evaluation of HER-2/neu on fine-needle aspirates from primary breast carcinomas[J]. Diagn Cytopathol, 2003, 28(3): 142-146.
- [6] Ariga R, Bloom K, Reddy VB, et al. Fine-needle aspiration of clinically suspicious palpable breast masses with histopathologic correlation[J]. Am J Surg, 2002, 184(5): 410-413.
- [7] Sneige N. Utility of cytologic specimens in the evaluation of prognostic and predictive factors of breast cancer: current issues and future directions [J]. Diagn Cytopathol, 2004, 30(3): 158-165.
- [8] 王超,周小鸽,余小蒙. 细胞块免疫细胞化学和原位杂交在针吸细胞学中应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2006, 22(1): 96-97.
- [9] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors[J]. Nature, 2000, 406(17): 747-752.
- [10] Liu H, Fan Q, Zhang Z, et al. Basal-HER-2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers[J]. Hum Pathol, 2008, 39(2): 167-174.
- [11] Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study[J]. JAMA, 2006, 295(21): 2492-2502.

(收稿日期:2011-05-25)