

· 论著 ·

全自动免疫组化法与手工免疫组化法检测卵巢癌ALK蛋白表达的对比分析

1. 北京大学深圳医院妇产科 (广东 深圳 518036)

2. 北京大学深圳医院病理科 (广东 深圳 518036)

罗文姬¹ 李瑞珍¹ 罗清平¹ 余光银² 魏蔚霞¹

【摘要】目的 探讨全自动免疫组化法与手工免疫组化法检测ALK(anaplastic lymphoma kinase, ALK)在卵巢癌中的表达,并对两者进行比较。**方法** 选取53例卵巢癌组织的石蜡病理,应用抗体ALK(D5F3)全自动IHC法联合抗ALK(5A4)手工IHC法分别检测卵巢癌中ALK蛋白水平,并对两种方法进行比较。**结果** 抗ALK(D5F3)检测发现ALK在卵巢癌组织中表达,阳性率9.43%(5/53),而抗ALK(5A4)组化法未检测出卵巢癌组织中有ALK蛋白表达。**结论** ALK蛋白在卵巢癌中有表达,抗D5F3全自动IHC法优于抗5A4手工免疫组化法,抗D5F3联合全自动免疫组化法敏感度更高。

【关键词】 卵巢癌; 间变性淋巴瘤激酶(ALK); 全自动免疫组化(IHC)

【中图分类号】 R737.31; R446.6

【文献标识码】 A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2019.05.014

Comparative Study of ALK Antibody in Ovarian Cancer between Manual and Automatic Immunohistochemical Detection

LUO Wen-ji, YU Guang-yin, LI Rui-zhen, et al. Department of Gynaecology and Obstetrics, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

[Abstract] Objective To investigate the detection and comparison of ALK (ALK) in ovarian cancer by automatic immunohistochemistry and manual immunohisto-chemistry. **Methods** The paraffin pathology of 53 ovarian cancer tissues was selected, and ALK protein levels in ovarian cancer were detected by ALK (D5F3) automatic IHC method combined with ALK (5A4) manual IHC method, and the two methods were compared. **Results** Anti-alk (D5F3) test showed that ALK was expressed in ovarian cancer tissues with a positive rate of 9.43% (5/53), while anti-alk (5A4) histochemistry method did not detect the expression of ALK protein in ovarian cancer tissues. **Conclusion** ALK protein is expressed in ovarian cancer. The automatic IHC method against D5F3 is superior to the manual immunohistochemical method against 5A4.

[Key words] Ovarian Cancer; ALK; Automated Immunohistochemistry

卵巢癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤之一,具有隐匿性,早期不易被发现,且具有易转移、预后差等特点。尽管卵巢癌对手术和化学治疗提高生存率,但易复发及化疗耐药。分子靶向药物治疗选择性高,不良反应轻,成为恶性肿瘤治疗越来越重要的组成部分。ALK蛋白在肺癌中诊断中有意义,ALK的靶向药物于2013年我国FDA批准了克唑替尼用于临床治疗非小细胞肺癌(NSCLC)。当前很少的文献涉及探讨ALK在卵巢癌的作用,本文采用传统免疫组化抗ALK(5A4)结合罗氏抗ALK(D5F3)增强免疫组化法检测ALK基因在卵巢恶性肿瘤的表达,探讨ALK与卵巢恶性肿瘤发生、发展的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料 选择2016年7-2019年3月在我科就诊的53例经病理确诊的卵巢癌患者,年龄19-66岁,平均年龄42.3岁。所有患者均未进行放化疗。每列标本的病理组织学诊断均由2位病理科医师重新复核,并确定肿瘤百分比不能少于10%。

1.2 方法

ALK抗体试剂:一、即用型兔单克隆D5F3抗体和OptiView DAB免疫组化试剂盒以及增强扩增试剂盒。所用仪器为罗氏公司Ventana BenchMark XT全自动免疫组化染色仪。二、即用型快捷免疫组化

MaxVision™ 3试剂盒(鼠/兔), 抗体克隆号与编号相对应: MAB-0281鼠单抗(克隆号5A4)手工IHC染色。

公司提供的阳性片作为对照。

1.3 结果判定 ALK阳性: 肿瘤细胞中存在有棕黄色颗粒状胞浆染色(任何百分比的阳性肿瘤细胞)。应当排除已知的染色元素。ALK阴性: 肿瘤细胞内不存在棕黄色颗粒状胞浆染色。

如免疫细胞化学呈阳性反应, 提示卵巢癌细胞中有ALK蛋白表达, 且主要位于细胞质。

2 结果

53例卵巢癌全自动抗D5F3染色5例着色, 阳性率9.43%(5/53), 手工抗5A4免疫组化法均未着色, 见表1。5例D5F3染色的卵巢癌病理分型中, 全部属于上皮性肿瘤, 其中2例为浆液性囊腺癌, 1例为粘液性囊腺癌, 2例为子宫内膜样癌, 生殖细胞肿瘤和混合生殖细胞肿瘤未见染色。不同病理类型ALK表达情况详见表2。

3 讨论

检查结果显示Ventana全自动免疫组化方法对53例标本进行ALK蛋白检测发现卵巢癌组织中有ALK表达, 检测阳性率为9.4%(5/53)。D5F4抗体未在卵巢组织检测出。与印永祥等研究结果比较, 其使用D5F4抗体在卵巢癌组织ALK的表达阳性率为1.64%(1/61)^[1]基本一致。与Mino-Kenudson等^[2]报道常规手工ALK IHC法无法用于临床筛查, 其灵敏度低的研究结果一致。53例中有卵巢子宫内膜样癌2例, 卵巢浆液性癌2例, 卵巢粘液性癌1例。手工免疫组化法未在卵巢组织中检测出ALK表达, 因此, 说明Ventana全自动免疫组化法更灵敏。中国ALK基因阳性NSCLC诊断专家共识(2013)指出常规IHC检测结果无论阳性信号强弱如何, 均需另行Ventana进行最终验证^[3], 可见全自动检测方法的可靠性。抗体D5F3(Ventana)较手工IHC检测ALK蛋白状态更敏感。ALK(D5F3)全自动IHC法是较好地ALK筛查手段之一。

分析Ventana(D5F3)全自动免疫组化法的优点在于引入了增强DAB染色液+扩增盒, ①因染色增强而被检测出ALK蛋白的表达, 手工IHC因缺少增强及扩增盒。②ALK蛋白在卵巢癌组织中弱表达, 导致卵巢癌组织ALK基因未被检测出。因此研究方法及

选择合适的试剂也是临床研究的关键。也有研究表明^[4]中未采用染色仪和信号扩增激素, 手工IHC染色灵敏度和染色强度均下降。其通过4种不同抗体分别是D5F3(Ventana)抗体D5F3(Cell Signaling)抗体、1A4/1H7(OriGene)抗体、5A4(Abcam)抗体检测NSCLC, 采用手工IHC与全自动IHC染色的比较, 以D5F3染色结果为标准, 4种手工抗体与全自动结果的一致性分别为96.7%、91.7%、96.7%、76.7%。4种抗体手工IHC着色的阳性细胞数量均下降(30%~100%), 染色强度减弱。《指南》也推荐抗体D5F3联合全自动IHC检测方法灵敏度高, 可应用于临床诊断^[5]。

1994年ALK在间变性大细胞淋巴瘤基因(anaplastic large cell lymphoma, ALCL)的一个亚型中被发现^[6]。随后, 在多种肿瘤非小细胞肺癌、前列腺癌、肉芽肿性皮肤松弛症^[7-9]中发现ALK基因重排。因此认为ALK是强致癌基因^[10-11]。朱翔^[12]等525例肺癌病例中ALK IHC阳性率为5.14%(27/525)。沈勤^[13]等采用Ventana-IHC筛查NSCLC的ALK阳性检出率为6.7%(38/566)。

化疗耐药是有效治疗卵巢癌的重大障碍。为了克服耐药和提高卵巢癌患者的总生存期, 靶向治疗已成为研究最前沿。克唑替尼是第一个针对ALK的靶向治

表1 两种不同检测方法的比较

	D5F3	5A4
阳性	5	0
阴性	48	53
	53	53

表2 不同病理类型ALK表达情况

病理类型	例数	ALK阳性
上皮性肿瘤		
浆液性	14	2
粘液性	12	1
子宫内膜样	6	2
透明细胞	1	0
浆粘性肿瘤	1	0
生殖细胞肿瘤		
畸胎瘤	3	0
无性细胞瘤	2	0
卵黄囊瘤	2	0
混合型生殖细胞肿瘤		
性索间质肿瘤	6	0
纯型间质肿瘤	0	0
1. 颗粒细胞	3	0
2. 卵泡膜瘤	2	0
卵泡膜-纤维瘤	1	0

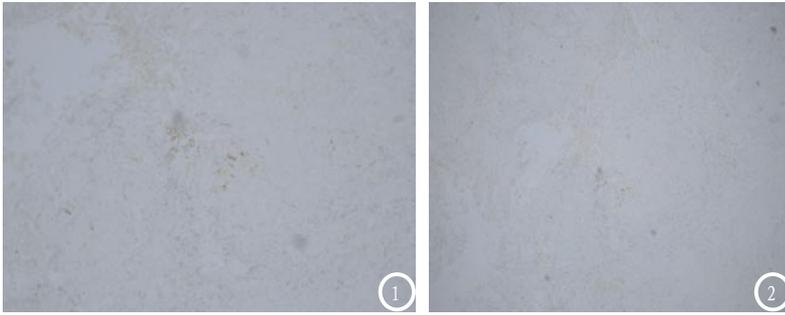


图1-2表示ALK在卵巢癌细胞中有表达。图1 50倍，个别可疑阳性。图2 100倍。

疗药物。国内学者如Ren H^[14]等使用无偏和全球磷酸化蛋白质组学的方法，在69例中国原发性卵巢肿瘤组织中发现4例肿瘤组织中ALK异常表达和磷酸化。并报道了ALK在卵巢浆液性癌有2%到4%的阳性率。邓梅君^[15]等应用抗ALK (5A4) 鼠克隆抗体IHC法检测人卵巢癌细胞系SKOV3细胞中有ALK蛋白表达，但其对克唑替尼治疗不敏感，即对克唑替尼表现为原发耐药。多种研究均表明卵巢中均有ALK表达。目前卵巢癌没有很好的靶向治疗药物。ALK的靶向药物目前有色瑞替尼是针对ALK突变。目前治疗用于肺非小细胞肺癌能否用于ALK阳性表达的卵巢癌患者有待于进一步研究。

综上所述，ALK蛋白在卵巢癌中有表达，推荐抗体D5F3联合全自动IHC检测方法灵敏度高，可应用于临床诊断。本研究希望为卵巢癌患者提供临床治疗依据，以保障患者的靶向治疗，卵巢癌细胞是否对ALK抑制剂敏感有待增大样本进一步研究。

参考文献

- [1] 印永祥,杨清海,赵华等.间变性淋巴瘤激酶基因在上皮性卵巢癌上的初步研究[J].中国妇幼保健,2015,30(11):1763-1765.
- [2] Mino-Kenudson M,Chirieac LR,Law K,et al.A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry[J].Clin Cancer Res,2010,16(5):1561-1571.
- [3] 张绪超,陆舜,张力等.中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊断专家共识(2013版)[J].中华病理学杂志,2013,42(6):402-406.
- [4] 沈勤,王璇,余波等.手工免疫组化检测非小细胞肺癌ALK蛋白表达的对比分析[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(3):271.
- [5] Lindeman N I,Cagle P T,Beasley MB,et al.Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the college of American pathologists international association for the study of lung cancer,and association for molecular pathology[J].J Mol Diagn,2013,15(4):415-453.
- [6] MORRIS S W,KIRSTEIN M N,VALENTINE M B,et al.Fusion of a kinase gene ALK,to a nucleolar protein gene, NPM,in non-Hodgkin's lymphoma[J].Science,1995,267(5196):316-317.
- [7] Rikova K,Guo A,et al.Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer[J].Cell,2008,131(6):1190-1203.
- [8] 宋蓉蓉,任国平,刘晓燕等.前列腺癌间变性淋巴瘤激酶基因改变与蛋白表达及其临床意义[J].中华病理学杂志,2015,44(6):382-385.
- [9] 刘静,王恒湘,阎洪敏等.肉芽肿性皮肤松弛症继发间变性淋巴瘤激酶阴性间变性大细胞淋巴瘤一例并文献复习[J].白血病·淋巴瘤,2016,25(11):672-675.
- [10] LINE, LI L, GUAN Y,et al. Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast,colorectal,and non-small cell lung cancers[J].Mol Cancer Res,2009,7(9):1466-1476.
- [11] KELLEHERFC,MCDERMOTT R.The emerging pathogenic and therapeutic importance of the anaplastic lymphoma kinase gene[J].Eur J Cancer,2010,46(13):2357-2368.
- [12] 朱翔,李红威,曹宝山等.525例肺癌中ALK阳性病例临床病理特征研究及检测方法探讨[J].中国肺癌杂志,2014,17(3):226-231.
- [13] 沈勤.ALK阳性非小细胞肺癌的免疫组化染色筛查以及EML4-ALK融合亚型异质性的研究[D].南京:南方医科大学,2017.
- [14] REN H,TAN Z P, ZHU X,et al.Identification of anaplastic lymphoma kinase as a potential therapeutic target in ovarian cancer[J].Cancer Res,2012,72(13):3312-3323.
- [15] 邓梅君,刘俊,李贵玲.克唑替尼对人卵巢癌细胞系SKOV3细胞增殖的影响[J].医药导报,2017,7(36):727-730.

【收稿日期】 2019-05-08