

# GLUT1 和 Claudin-4 在胸水转移性肺腺癌细胞及反应性增生间皮细胞中的表达

汪露祥<sup>1</sup> 陈 龙<sup>1</sup> 吴献忠<sup>1</sup> 谢翠艳<sup>1</sup> 蒋 振<sup>1</sup> 方 威<sup>1</sup> 钟善传<sup>2</sup>

( 1. 黄山市人民医院 病理科 安徽 黄山 245000 2. 解放军第 532 医院 病理科 安徽 黄山 245000)

**【摘要】**目的: 探讨联合检测胸水中葡萄糖转运蛋白 1( GLUT1) 和紧密连接蛋白-4( Claudin-4) 对转移性肺腺癌细胞和反应性增生间皮细胞的鉴别诊断价值。方法: 应用免疫组化法检测 GLUT1 和 Claudin-4 在 30 例肺腺癌、25 例反应性增生间皮细胞胸水中的表达情况, 并分析二者单独及联合检测对肺腺癌诊断的灵敏度及特异性。结果: 肺腺癌细胞 GLUT1 和 Claudin-4 呈阳性, 反应性增生间皮细胞 GLUT1 和 Claudin-4 呈阴性。两种抗体联合检测对肺腺癌诊断的灵敏度和特异性分别为 100% 和 92.0%。结论: 联合检测胸水 GLUT1 和 Claudin-4 对转移性肺腺癌细胞和反应性增生间皮细胞的诊断及鉴别诊断具有重要的临床应用价值。

**【关键词】**葡萄糖转运蛋白 1; 紧密连接蛋白-4; 胸水; 肺腺癌; 间皮细胞

**【中图分类号】**R 734.2 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2015.06.007

## Expression of glucose transporter protein 1 and claudin-4 in adenocarcinoma cells and reactive mesothelial cells in the pleural effusion

WANG Luxiang ,CHEN Long ,WU Xianzhong ,XIE Cuiyan ,JIANG Zheng ,FANG Wei ,ZHONG Shanchuan

Department of Pathology ,Huangshan People's Hospital ,Huangshan 245000 ,China

**【Abstract】Objective:** To assess the diagnostic value by combined detecting the glucose transporter protein 1 ( GLUT1) and the tight junction protein ( claudin-4) in the pleural effusion in patients with metastatic adenocarcinoma of lung and reactive mesothelial cells. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of GLUT1 and claudin-4 in pleural effusion in 30 patients with adenocarcinoma of lung and 25 with reactive mesothelial cells , and the sensitivity and specificity were compared between combined evaluation and single detection. **Results:** Both GLUT1 and claudin-4 were positive in the pleural effusion of lung cancer patients and negative in reactive mesothelial cells. The sensitivity and specificity by combined detection of GLUT1 and claudin-4 were 100% and 92.0% in metastatic adenocarcinoma of lung. **Conclusion:** Combined detection of GLUT1 and claudin-4 is of important value in the diagnosis and differential diagnosis of adenocarcinoma cells and reactive mesothelial cells in the pleural effusion.

**【Key words】**glucose transporter protein 1; claudin-4; pleural effusion; lung adenocarcinoma; mesothelial cell

胸水细胞形态多样,有时腺癌细胞仅表现出轻度的异型性,而反应性间皮细胞却可能表现出重度的异型性。在常规胸水细胞学检查中,反应性间皮细胞及转移性肺腺癌细胞的鉴别诊断是胸水细胞学诊断的难点。胸水检查出恶性细胞,对患者的临床处理和预后判断都具有重要意义,因此,区分反应性间皮细胞及转移性腺癌具有重要临床价值。近年来,许多免疫标记物应用于胸水细胞蜡块的辅助诊断。然而,到目前为止还没有发现一个具有足够灵敏度和特异性的标志物,多种抗体的联合应用辅助胸水细胞学诊断成为研究热点。葡萄糖转运蛋白 ( GLUTs) 是介导哺乳动物细胞葡萄糖转运的主要载体,其中 GLUT1 是目前已知体内分布最为广泛的葡

萄糖转运体。近年来,不断有报道认为 GLUT1 表达于许多恶性肿瘤,而在反应性增生间皮细胞中不表达。Claudin-4 是一个紧密连接相关蛋白,在上皮细胞中广泛表达,而在间皮细胞中表达缺失。最近的研究表明, Claudin-4 在鉴别肺腺癌细胞和间皮瘤细胞中具有重要意义。本研究在细胞蜡块的基础上,行免疫组化联合检测 GLUT1 和 Claudin-4,鉴别反应性增生间皮细胞和转移性肺腺癌细胞,弥补单纯细胞学检测的局限性,为临床诊断、治疗及判断预后提供更为可靠的依据。

### 1 资料与方法

1.1 研究对象 收集安徽省黄山市人民医院病理

收稿日期: 2015-05-05

作者简介: 汪露祥( 1962-) ,男,主任医师 ( 电话) 13956278869 ( 电子信箱) 892847449@qq.com.

科 2011 年 12 月 ~ 2014 年 12 月 胸水病例共 55 例, 其中转移性肺腺癌 30 例, 男性 16 例, 女性 14 例, 年龄 45 ~ 77 岁(中位年龄 57 岁); 反应性增生间皮细胞胸水患者 25 例, 男性 13 例, 女性 12 例, 年龄 52 ~ 73 岁(中位年龄 58 岁)。所有病例均经活检或组织病理检查明确诊断。

1.2 细胞切片的制备 收集新鲜胸水标本 200 mL 左右, 室温下 3000 r/min 离心 10 min。取沉渣表层细胞, 经福尔马林固定, 石蜡包埋制成细胞块。切片 3 张, 1 张用于 HE 染色, 常规细胞学检查; 另 2 张分别用于 GLUT1 和 Claudin-4 免疫组化染色。

1.3 免疫组化染色 免疫组化染色采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, S-P) 法。石蜡切片厚 2 ~ 3 μm, 操作按试剂盒说明书进行, 胸水红细胞作为 GLUT1 内源性阳性对照, 已知 Claudin-4 阳性切片作为阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。GLUT1 抗体购自福州迈新生物有限公司, Claudin-4 抗体购自北京中杉金桥生物有限公司。

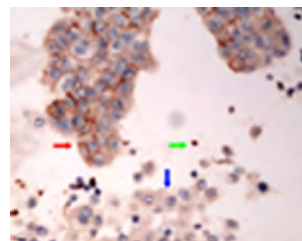
1.4 结果判定方法 GLUT1 和 Claudin-4 阳性颗粒均呈棕黄色, 阳性表达主要定位于胞膜, 胞质偶有弱表达, 两者均在细胞连接处更为明显。无色、染色浅与背景几乎一致及高倍视野下阳性细胞占同类细胞的 5% 以下为阴性; 阳性染色占 6% ~ 25% 为(+), 26% ~ 50% 为(++), 51% ~ 75% 为(+++), 75% 以上为(++++)。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用  $\chi^2$  检验。GLUT1 和 Claudin-4 联合检测的灵敏度和特异性采用平行试验方法。

## 2 结果

2.1 胸水细胞块 GLUT1 免疫组化染色结果 肺腺癌细胞 GLUT1 呈强阳性表达, 呈棕黄色颗粒外观,

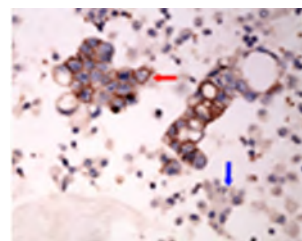
主要定位于胞膜, 红细胞也呈强阳性表达(图 1)。30 例肺腺癌细胞中有 28 例癌细胞 GLUT1 呈阳性表达, 占 93.3%。25 例反应性增生间皮细胞胸水患者中只有 1 例呈弱阳性表达(+), 占 4%, 且为胞膜淡浅着色。转移性肺腺癌细胞与反应性增生间皮细胞的 GLUT1 阳性率具有显著性差异( $P < 0.01$ ), 见表 1。



腺癌细胞胞膜呈强阳性表达(红色箭头), 红细胞作为阳性对照亦呈强阳性表达(绿色箭头), 间皮细胞呈阴性(蓝色箭头)。S-P 法,  $\times 400$

图 1 GLUT1 在肺腺癌细胞中的表达

2.2 胸水细胞块 Claudin-4 免疫组化染色结果 Claudin-4 在 29 例(29/30) 肺腺癌细胞中呈阳性表达, 大部分呈膜弥漫强阳性(图 2), 少部分呈膜中等强度染色。25 例反应性增生间皮细胞中仅 1 例呈弱阳性(+), 占 4%, 其余 24 例均为阴性。转移性肺腺癌细胞与反应性增生间皮细胞的 Claudin-4 阳性率具有显著性差异( $P < 0.01$ ), 见表 2。



腺癌细胞胞膜呈强阳性表达(红色箭头), 间皮细胞呈阴性(蓝色箭头)。S-P 法,  $\times 400$

图 2 Claudin-4 在肺腺癌细胞中的表达

表 1 胸水细胞 GLUT1 免疫组化染色结果

	例数	阳性例数(%)	表达水平					$\chi^2$ 值	P 值
			-	+	++	+++	++++		
肺腺癌	30	28(93.3)	2	2	7	11	8	43.660	0.000
反应性间皮细胞	25	1(4.0)	24	1	0	0	0		

表 2 胸水细胞 Claudin-4 免疫组化染色结果

	例数	阳性例数(%)	表达水平					$\chi^2$ 值	P 值
			-	+	++	+++	++++		
肺腺癌	30	29(96.6)	1	4	6	10	9	47.229	0.000
反应性间皮细胞	25	1(4.0)	24	1	0	0	0		

2.3 GLUT1 和 Claudin-4 联合检测在胸水中的诊断价值 从 GLUT1 和 Claudin-4 在胸水细胞的免疫组化结果来看,大部分肺腺癌细胞 GLUT1 和 Claudin-4 均呈阳性,而反应性增生间皮细胞 GLUT1 和 Claudin-4 呈阴性。通过计算两者联合检测的结果,二者平行法检测对转移性肺腺癌诊断的灵敏度为 100% ,特异性为 92.0%。见表 3。

表 3 联合检测 GLUT1 和 Claudin-4 对肺腺癌诊断的灵敏度和特异性

	GLUT1	Claudin-4	GLUT1 + Claudin-4
灵敏度(%)	93.3	96.6	100.0
特异性(%)	96.0	96.0	92.0

### 3 讨论

在胸水细胞学诊断中,常规细胞学涂片具有简便方便、快速经济等优点,但是由于涂片方法本身的局限性容易造成细胞厚薄不均、结构不清,甚至出现人工假象,给诊断带来干扰。近年来,液基细胞技术在胸水中的应用大大提高了细胞制片的质量。然而,转移性腺癌细胞与反应性增生间皮细胞有时在形态上十分相似,仅靠细胞学形态往往不足以诊断,需要进一步检查才能明确诊断。当胸水内的癌细胞仅表现为轻度的异型性时,常与反应性间皮细胞相混淆,导致临床高度怀疑恶性的胸水标本,反复的细胞学检查结果却未见恶性肿瘤细胞。近年来,以细胞蜡块为基础的免疫组化染色不断应用于细胞学诊断。本研究利用细胞蜡块技术,通过免疫组化方法联合检测 GLUT1 和 Claudin-4,评估它们对胸水转移性肺腺癌与反应性增生上皮细胞的鉴别诊断价值。

GLUT1 是目前已知体内分布最为广泛的葡萄糖转运蛋白,绝大多数组织细胞不能独立运输葡萄糖,需借助细胞膜上的葡萄糖转运蛋白通过易化扩散方式顺浓度梯度运输葡萄糖<sup>[1-3]</sup>。研究表明, GLUT1 仅在少量正常组织中表达,包括在红细胞、睾丸生精细胞、肾小管、周围神经束膜、血脑屏障的血管内皮细胞以及胎盘的滋养层和血管,在反应性增生间皮细胞中不表达<sup>[4]</sup>。肿瘤细胞的主要特点是持续快速的增殖,这种增长方式必然导致细胞对葡萄糖摄取增加以满足自身代谢需要。研究表明, GLUT1 在上皮源性恶性肿瘤中广泛表达,如肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾细胞癌以及一些头颈部肿瘤,另外, GLUT1 在恶性间皮瘤中也呈阳性表达<sup>[1,5]</sup>。这些都提示 GLUT1 可能作为恶性肿瘤的分子标志物。因此,在胸水细胞中 GLUT1 表达阳性提示上皮性肿

瘤细胞转移或恶性间皮瘤。本研究表明, GLUT1 在胸水转移性肺腺癌的灵敏度为 93.3% ,特异性为 96.0% ,可作为鉴别转移性肺腺癌细胞与反应性增生间皮细胞的分子标志物。

Claudins 是细胞间紧密连接骨架蛋白,有维持细胞极向排列的功能,而上皮性肿瘤的一个重要形态学特征就是癌细胞的排列极向消失,因此, Claudins 与上皮性肿瘤关系密切。另外,紧密连接完整性丧失造成癌细胞的凝聚力降低及侵袭性增加,也是肿瘤转移进程中重要的一步<sup>[6]</sup>。Claudin-4 是 Claudins 家族的主要成员之一,主要分布在肺、肾、小肠、结肠和脑组织中。近年的研究表明, Claudin-4 在原发性卵巢癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、胆管癌、子宫内膜癌、膀胱癌及前列腺癌等一系列恶性肿瘤中表达显著增高,而在胸腹水反应性增生间皮细胞中不表达,提示 Claudin-4 可用于鉴别腺癌细胞与反应性增生间皮细胞<sup>[7]</sup>。我们的研究表明, Claudin-4 在胸水转移性肺腺癌细胞的灵敏度为 96.6% ,特异性为 96.0% ,是鉴别胸水转移性肺腺癌与反应性增生间皮细胞的一个很好的指标。

在目前的临床病理诊断工作中, CK7( Cytokeratin 7, 细胞角蛋白 7) 和 TTF-1( Thyroid transcription factor-1, 甲状腺转录因子-1) 作为常规肺腺癌标记物,而 CR( Calretinin, 钙结合蛋白) 和 MC( Mesothelial cell, 间皮细胞蛋白) 作为间皮细胞标记物。有研究者对它们在鉴别胸水转移性肺腺癌细胞与反应性间皮细胞的意义进行分析,结果显示, CK7 与 TTF-1 联合标记对肺腺癌细胞的灵敏度为 88% ,特异性为 100%; CR 与 MC 联合标记对反应性间皮细胞的灵敏度为 60% ,特异性为 95%<sup>[8]</sup>。我们通过联合检测胸水 GLUT1 和 Claudin-4 在肺腺癌细胞与反应性增生间皮细胞的表达情况,发现具有两个重要意义。首先, GLUT1 和 Claudin-4 均表现为高度的灵敏度和特异性,二者联合标记对胸水转移性肺腺癌细胞的灵敏度和特异性分别为 100% 和 92.0% ,优于常规 CK7、TTF-1、CR 和 MC 四种抗体的联合检测,为临床病理诊断提供了更好的选择。其次,根据文献报道, GLUT1 表达于恶性间皮瘤<sup>[1,5]</sup>,而 Claudin-4 不表达<sup>[9]</sup>。因此, GLUT1 和 Claudin-4 联合检测可能对于胸水转移性肺腺癌细胞、恶性间皮瘤细胞和反应性增生间皮细胞的诊断和鉴别诊断都具有重要意义,有待更深入的研究。本研究为下一步的研究工作提供了重要的基础资料。

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217(2015)06-0541-03

## 促红细胞生成素联合维生素 C 对血透患者铁超载和肾性贫血的影响

张 婧,董雄军,邵云侠,唐丽娟,汤迎春,黄卫民

(芜湖市第二人民医院 肾内科,安徽 芜湖 241000)

**【摘要】**目的: 观察促红细胞生成素联合静脉用维生素 C 治疗维持性血液透析(MHD)患者铁过量的疗效。方法: 将芜湖市第二人民医院血液净化中心 32 名 MHD 患者,其血清铁蛋白(SF) >800  $\mu\text{g/L}$  和(或)转铁蛋白饱和度(TSAT) >50%, 随机分为实验组 and 对照组(每组各 16 名)。实验组患者于每次透析结束前 15 min 从泵后静脉滴注 1.0 g 维生素 C; 对照组给予等量生理盐水, 观察 3 个月, 记录两组患者实验前后血红蛋白(Hb)、SF、TSAT 和 C-反应蛋白(CRP)的变化。结果: 治疗 3 个月, 实验组患者 Hb 上升, SF、TSAT 和 CRP 下降, 与用药前比差异显著( $P < 0.01$ )。结论: 联合应用维生素 C 与促红细胞生成素可安全有效地提高 MHD 患者血红蛋白水平, 改善贫血, 控制铁超载。

**【关键词】**维持性血液透析; 铁超载; 肾性贫血; 维生素 C; 促红细胞生成素

**【中图分类号】**R 459.5 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2015.06.008

### Efficacies of erythropoietin combined with vitamin C in hemodialysis patients with iron overload and renal anemia

ZHANG Jing, DONG Xiongjun, SHAO Yunxia, TANG Lijuan, TANG Yingchun, HUANG Weimin

Department of Nephrology, Wuhu No. 2 People's Hospital, Wuhu 241000, China

**【Abstract】Objective:** To observe the efficacies of erythropoietin combined intravenous vitamin C in therapy of maintenance hemodialysis(MHD) in patients with iron overload. **Methods:** Thirty-two patients undergoing MHD in the blood purification center of Wuhu No. 2 People's Hospital were equally allocated to observational group and control group by whose serum ferritin >800 ng/mL and/or transferrin saturation(TSAT) >50%. The observational group received intravenous transfusion of vitamin C in dose of 1.0 g 15 min before completion of the dialysis, and the controls were given equivalent volume of saline. The two groups were maintained regarding the changes of hemoglobin(Hb), serum ferritin(SF), TSAT and C-reactive protein(CRP) before and after therapy during the three-course of dialysis. **Results:** The observational group had elevated Hb and decreased levels of SF, TSAT and CPR compared to pre-medication. The difference was significant( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Combined erythropoietin and vitamin C can effectively and safely improve the renal anemia and control the iron overload in patients undergoing maintenance hemodialysis.

**【Key words】**maintenance hemodialysis; iron overload; renal anemia; vitamin C; erythropoietin

收稿日期: 2015-04-28

作者简介: 张 婧(1982-), 女, 主治医师, (电话) 15021057650, (电子信箱) jingzhang721@163.com.

#### 【参考文献】

- [1] Minato H, Kurose N, Fukushima M, et al. Comparative immunohistochemical analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146 and desmin for distinguishing malignant mesothelioma from reactive mesothelial cells[J]. Am J Clin Pathol 2014, 141(1): 85-93.
- [2] Ikeda K, Tate G, Suzuki T, et al. Diagnostic usefulness of EMA, IMP3 and GLUT-1 for the immunocytochemical distinction of malignant cells from reactive mesothelial cells in effusion cytology using cytopspin preparations[J]. Diagn Cytopathol, 2011, 39(6): 395-401.
- [3] 俞晓燕, 孙子林. GLUT1 的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志 2012, 21(30): 3411-3414.
- [4] Kato Y, Tsuta K, Seki K, et al. Immunohistochemical detection of GLUT-1 can discriminate between reactive mesothelium and malignant mesothelioma[J]. Mod Pathol 2007, 20(2): 215-220.
- [5] Husain AN, Mirza MK, Gibbs A, et al. How useful is GLUT-1 in differentiating mesothelial hyperplasia and fibrosing pleuritis from epithelioid and sarcomatoid mesotheliomas? An international collaborative study[J]. Lung Cancer 2014, 83(3): 324-328.
- [6] 向若兰, 苏运超, 裴晓庆, 等. 紧密连接蛋白 claudin-4 的研究进展[J]. 生理科学进展 2012, 43(4): 310-314.
- [7] Ordonez NG. Value of claudin-4 immunostaining in the diagnosis of mesothelioma[J]. Am J Clin Pathol 2013, 139(5): 611-619.
- [8] 雷亚丽, 易红梅, 李艳春, 等. 联合抗体在胸水细胞块肺腺癌细胞和增生性间皮细胞中的表达及意义[J]. 国际病理科学与临床杂志 2013, 33(6): 481-485.
- [9] Afshar-Moghaddam N, Heidarpour M, Dashti S. Diagnostic value of claudin-4 marker in pleural and peritoneal effusion cytology: Does it differentiate between metastatic adenocarcinoma and reactive mesothelial cells[J]? Adv Biomed Res 2014, 18(3): 161.