



第 1 章 免疫组织化学的发展现状

人类的历史有多长，医学的历史就有多长，这是因为疾病是与生命相伴而至的。医学的任何一个进步都是建立在当时科学与技术发展的相应水平上的，因此，了解医学的历史也就是了解科学技术的发展史。医学的目的是解除人体的病痛，其核心是疾病的诊断和治疗两个环节，而这两个环节的关系可以明确为：任何疾病的有效治疗均来源于正确的诊断。在当今医学发展的现状下，虽然疾病的诊断手段有几十种之多，但就其准确性来说，首推病理诊断，即病理组织学诊断要比化验、放射、核素等任何一种诊断方法更准确、更可信、更有权权威性。而在病理诊断的大家族中，免疫组织化学（以下简称免疫组化）已成为其中的一种常用手段。

一、病理诊断的历史回顾

人类对疾病进行准确可信的病理诊断的历史并不长久，将其发展过程中的主要事件归纳如下（表 1-1）。

表 1-1 病理诊断发展过程的主要事件

年代	作者	事件
1632 年	Severino	肿瘤切开后观察的书
1661 年	Malpighi	放大镜观察的报告
1761 年	Morgagni	肿瘤与外科方面的书

(续表)

年代	作 者	事 件
1829 年	Horner	首篇病理论文
1832 年	Hodgkin	报告 7 例尸检结果的论文
1858 年	Virchow	发表《细胞病理学》
1863 年	Paget	发表《外科病理学》
1897 年	Mallory 和 Wright	发表组织学技术的书
1914 年	Mallory	发表《病理组织学原则》
1919 年	Ewing	发表《肿瘤病》
1924 年	McFarland	发表《外科病理学》
1926 年	Karsner	发表《人体病理学》
1928 年	Papanicolaou	发表细胞学方面的书
1951 年		电镜应用于病理诊断
1974 年		免疫组化用于病理诊断

由此可见，诊断病理学开始于 19 世纪，到 20 世纪的第 2 个 25 年中达到光学显微镜诊断的辉煌。随之而起的是电子显微镜，在 20 世纪第 3 个 25 年中成为诊断病理的发展高峰。进入 20 世纪最后 25 年，取而代之的便是免疫组化了。

二、免疫组织化学的发展

病理诊断的确立是建立在大体及组织学水平的观察中找到“特征性”形态表现基础上的。从组织学水平而言，除常规苏木精-伊红(HE)染色外，病理组织学曾发展了几十种至几百种的“特殊”染色方法，以帮助寻找“特征性”组织学改变。这些特殊染色是建立在组织和细胞内化学成分不同的基础上的，因而称为组织化学方法。当免疫学的理论和技术一步步发展后，利用免疫学的核心——抗原抗体结合这一原理，从组织细胞水平进行抗原抗体反应，于是就产生了免疫组织化学技术。回顾起来，其主要的发展过

程见表 1-2。

表 1-2 免疫组化的发展过程

年代	研究者	事 件
1941 年	Coons	实用免疫荧光技术
1948 年	Fagraeus	进一步发展免疫荧光技术
1970 年	Sternberger	抗体酶标记技术
1974 年	Taylor	证实组织中的浆细胞免疫组化
1975 年	Kohler 和 Milstein	单克隆抗体技术
1981 年	Hsu	ABC 法
90 年代以来		SP 法 原位杂交及原位 PCR 免疫组化法

由此可见，诊断免疫组化开始于 20 世纪 70 年代，发展高峰是 80 年代，90 年代已在国外病理科列入病理技术室的常规工作。国内病理科与国外相比，约晚 10 年的进程，即 90 年代开始在诊断病理工作中普及。

三、免疫组织化学的优点

免疫组化的应用，已经使组织和细胞中所有具备抗原性的成分均可以用来制备相应的抗体，然后进行组织和细胞中相应抗原的定位显示。目前主要是针对组织细胞中的各种蛋白质、肽类、酶类、激素类、糖类和脂质类抗原。与组织化学的显示原理相比，免疫组化的优点主要有：

1. 特异性强 由于免疫学的基本原理是抗原与抗体的“一对一”的特异结合，因此，免疫组化从理论上讲也是“一对一”的组织细胞中抗原的特定显示，如角蛋白（keratin）显示上皮成分、白细胞共同抗原（LCA）显示淋巴细胞成分。只是当组织细胞中存在交叉抗原时才会出现交叉反应。

2. 敏感性高 在应用免疫组化的起始阶段，由于技术上的限

制，只有直接法、间接法等敏感性不高的技术，那时的抗体只能稀释到几分之一、几十分之一。现在由于抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶复合物法（ABC法）或链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法（SP法）的出现，使抗体稀释到几千分之一、上万分之一，甚至几亿分之一时仍可在组织细胞中与抗原结合，这样高敏感性的抗体抗原反应，使免疫组化的方法越来越方便地应用于常规诊断工作。

3. 定位准确，形态与功能相结合 虽然聚合酶链反应（PCR）方法已经广泛地应用于疾病的诊断，但由于不能在组织和细胞内进行明确的定位而限制了 PCR 在病理组织学上的应用。免疫组化则可在组织和细胞中进行抗原的准确定位，因而可以同时针对不同抗原在同一组织或细胞中进行定位观察，这样就可以进行形态与功能相结合的研究，对于病理学研究的深入是十分有意义的。

四、免疫组织化学的应用

（一）提高病理诊断准确性

在临床医师看来，病理诊断是毋庸置疑的，癌就是癌、结核就是结核，是不可能有误的，国外对病理诊断报告的质量控制标准是石蜡切片要 100% 正确，术中快速诊断要 98% 正确。但在实际工作中要做到 100% 正确是不可能的，一是因为技术水平问题而误诊，二是因为目前认知水平有限、鉴别诊断的手段不够而做不出诊断，在免疫组化应用以前，约有 10% 的肿瘤诊断是困难的。对这些病例进行免疫组化检查后，依据抗体的种类、数量及检验员经验的不同，最后获得正确诊断的数目达疑难病例总数 50%~80% 不等，也就是说，有一半以上的疑难病例，通过免疫组化检查，获得了正确诊断（作者所做实验的结果是 50%）。比如来源不明的淋巴结转移性肿瘤，用角蛋白抗体获阳性，就支持癌的诊断，用波形蛋白抗体获阳性则支持肉瘤的诊断，用甲状腺球蛋白抗体获阳性则支持甲状腺癌的诊断，用 S-100 蛋白抗体获阳性，则支持黑素瘤的

诊断，这样就为临床处理提供了可靠的依据而不仅仅诊断为一个来源不明的淋巴结转移瘤。由此可见，应在所有的病理科普遍应用免疫组化方法，以利于肿瘤的临床诊治。

（二）激素受体及生长因子检测对预后及治疗的意义

激素受体和各种生长因子对正常组织的功能调节是必不可少的，同时也影响着肿瘤的生物学行为。应用免疫组化方法，可对肿瘤内各种激素受体与生长因子进行定位、定量分析，目前，这一方法已广泛应用于肿瘤临床工作。

对乳腺癌与激素受体关系的研究已有了较明确的结论，即雌激素受体阳性的乳腺癌预后优于阴性者，而且阳性者对内分泌治疗反应好、无瘤生存期延长。相似的结果也见于子宫内膜癌和卵巢癌。目前已有针对癌细胞核内的激素受体的免疫组化方法，检测核内的激素受体可作为乳腺癌对激素反应性的更重要的预测指标。

作为激素调节蛋白的组织蛋白酶 D(cathepsin D)和 pS2 也是激素受体功能过程中的标记。已经证明，两者也与乳腺癌的预后有关。同时，表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGF-R) 也是肿瘤预后判断的指征之一，表达 EGF-R 者，无瘤生存期延长。

（三）癌基因蛋白的临床应用

对癌基因 (oncogenes) 在肿瘤生物学中的价值已有大量的研究，在瘤细胞内常表现为瘤基因的扩增、突变、移位等，其活性的异常则通过 mRNA 瘤蛋白 (oncoprotein) 的水平增加表达出来，用免疫组化的方法可对这些瘤蛋白进行定位和定量的检测，以探讨其临床意义。虽然瘤基因的种类繁多，但目前已有肿瘤临床意义的却十分有限，主要是 c-erbB-2、c-myc、ras 和 p53。

在乳腺癌的研究中发现表达 c-erbB-2 的浸润性乳腺癌者预后差。恶性度高者阳性率高。导管内癌中粉刺癌为阳性，筛状癌

则为阴性。在卵巢癌中阳性率为 30%，而且提示，阳性表达的卵巢癌者预后要差。c-myc 是作用于核内 DNA 的瘤基因，可刺激 DNA 的合成。c-myc 的过度表达促进肿瘤的生长和发展，因而肿瘤的侵袭性增加。对宫颈癌、小细胞肺癌的研究已证实，表面 c-myc 增加者存活期缩短。

p21 是一种 ras 瘤蛋白，已发现在肝细胞癌、大肠癌中表达增高，在卵巢癌亦有过度表达的报道。对于其预后意义仍有一些不同的看法。

在肿瘤抑制基因中了解最多的人体肿瘤是视网膜母细胞瘤敏感基因、大肠癌消除基因和 p53 三种。p53 蛋白结合在特定的 DNA 特定片段上，对细胞通过 G1 期起到阻断作用，分为突变型与野生型两种。突变型 p53 蛋白半衰期长，在癌细胞内可较多积聚，故易于用免疫组化方法测出。目前发现 p53 基因突变是人体癌症中最常见的，可见于 70% 的大肠癌，30%~50% 的乳腺癌、50% 的肺癌，其中小细胞癌达 100%。

（四）对肿瘤细胞增生程度的评价

肿瘤细胞增生是否活跃直接影响着临床治疗与预后。传统上判断一个肿瘤是否生长活跃是靠病理组织学观察细胞分裂象的多少来决定的，但由于计数不准确以及影响因素太多而临床应用价值有限。其他方法还有银染色核仁组成中心区（AgNOR）的染色、³H-胸腺嘧啶摄入放射自显影、流式细胞术（FCM）等，但实践证明其中以免疫组化法对瘤细胞增生抗原进行定位定量最为简便、可靠，主要是通过 Ki-67 和增殖细胞抗原（proliferation cell nuclear antigen, PCNA）的单克隆抗体来实现的。这些肿瘤增生抗原已证明与许多肿瘤的预后有关，即 Ki-67 或 PCNA 阳性细胞多者，其恶性度增高，预后不良，其中以恶性淋巴瘤、乳腺癌较为明显。而且在乳腺癌的研究中发现 Ki-67 阳性者，淋巴结转移率高，并与激素受体的表达呈负相关。

（五）发现微小转移灶

用常规病理组织学方法在一个组织中认出单个转移性肿瘤细胞或几个细胞是不可能的，而采用免疫组化方法则十分有助于微小转移灶的发现。如对一组常规病理切片证实为阴性的乳腺癌淋巴结，经免疫组化检查后，其淋巴结转移率可达 23%~26%，即有 1/4 的以往认为无淋巴结转移的患者已具有淋巴结转移，这对于进一步的治疗和预后都十分有意义。

同样，在对骨髓的免疫组化检查中发现，用常规方法认为无骨髓受累的乳腺癌患者中有 21% 发现了骨髓中的转移灶，这种微小转移灶的发现，为临床治疗提供了可靠的依据。

（六）在肿瘤分期上的意义

肿瘤是原位还是有浸润发生以及有无血管、淋巴管的侵袭是与肿瘤分期密切相关的。常规病理组织学方法对于上述问题的判断有时是十分困难的，但用免疫组化法检查可获得明确的结果。如采用层粘连蛋白 (laminin) 和 IV 型胶原的单克隆抗体可以清楚地显示基底膜的主要成分。一旦证实上皮性癌突破了基底膜，就不是原位癌，而是浸润性癌了，其预后意义是不同的。已见到对乳腺癌、大肠癌、子宫颈癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、前列腺癌及恶性黑色素瘤等肿瘤应用免疫组化研究基底膜的报道。

采用第 VIII 因子相关蛋白、UEA 凝集素等显示血管和淋巴管内皮细胞的免疫组化方法则可清楚地显示肿瘤对血管或淋巴管的浸润情况，对许多肿瘤的良好恶性鉴别以及有无血管或淋巴管的浸润，这是主要的鉴别依据，同时也有治疗及预后意义。

（七）指导肿瘤的治疗

应用免疫组化的检查结果不仅对肿瘤的诊断和鉴别诊断起到必不可少的作用，近来发现，在肿瘤的治疗上也有应用前景。如许多肿瘤对化疗不敏感，是由于瘤细胞内多药耐药基因 (multidrug resistant gene) 编码的酶的活性增加所致。如二氢叶酸还原酶以

及 P-糖蛋白增加，用免疫组化方法可以检查细胞内的这些酶或糖蛋白，以了解肿瘤是否有耐药性。其他还有 p24 蛋白、热休克蛋白、 β 生长转化因子等，也可通过免疫组化方法得到定位定量检查，探讨肿瘤的有效治疗途径。

由于肿瘤生物学领域的研究近年来有了一系列重要的进展，使许多肿瘤临床医师感到不知从何入手来拓展其新知识的临床应用。从病理组织学角度来说，当务之急是病理与临床密切配合，先将已经成熟的基础研究结果应用于肿瘤的诊断和治疗，其中免疫组织化学方法获得的参考价值尤其直接明了，应及早应用，让患者获益。

（八）免疫性疾病的辅助诊断

人体的免疫性疾病，主要是自身免疫性疾病，如肾小球肾炎、皮肤自身免疫性疾病等，可用免疫组化方法对组织细胞内的免疫球蛋白、补体、免疫复合物等进行检测。

（九）病原微生物的检查

人体疾病的致病微生物中有的在常规病理检查中不易发现，尤其是病毒性致病微生物，由于其分子水平的结构，在细胞水平上难以发现，通过免疫组化方法则可明确发现病原体抗原的部位以及定量。

五、免疫组织化学应用中的注意事项

在日常病理诊断工作中，随着免疫组化应用的普及和深入，逐渐出现了两种不正确的倾向：一是认为免疫组化可以代替一切，遇到任何困难都求助于免疫组化，甚至当 HE 诊断与免疫组化诊断有矛盾时，以免疫组化诊断为准；另一种是认为免疫组化不可信而不应用。上述两种认识都存在着片面性。充分认识到免疫组化的优点，充分发挥免疫组化的作用，同时针对工作中的一些问题及时

加以克服，才是可取的态度。

（一）免疫组化结果的判断原则

随着免疫组化方法的广泛应用，越来越多的问题也随之出现，有必要统一对免疫组化染色结果阳性与阴性判断的原则。

1. 必须设对照 参见第 2 章六、免疫组织化学染色注意事项

（二）正确设计对照方法。每批染色都要以特异性的阳性对照和阴性对照为基础，才能对染色结果做出判断。这一技术操作不可省去。没有阳性对照，就不能做出真正阴性结果的判断；同理，没有阴性对照，也就不能做出真正阳性结果的判断。因而，没有对照的免疫组化染色，即使做出了判断也是不可信的。另外，须认真阅读厂家的产品说明书。

2. 抗原表达必须在特定部位 阳性表达必须在细胞和组织特定的抗原部位才能视为阳性，如 LCA 在细胞膜上，角蛋白（keratin）在细胞浆内，S-100 在胞浆和胞核内，早期膜抗原（EMA）在细胞膜上。不在抗原所在部位的阳性表达一概不能视为阳性。

3. 阴性结果不能视为抗原不表达 即阴性结果不能认为具有否定意义；阳性表达有强弱、多少之分，哪怕是只有少数细胞阳性（只要是在抗原所在部位）也要视为阳性表达，不能认为个别细胞阳性而不作阳性看待。

4. 免疫组化与 HE 切片诊断应以 HE 切片诊断为准 当免疫组化诊断结果与 HE 切片诊断不一致时，应再结合临床资料，如性别、年龄、部位、X 线等影像学及实验室结果综合分析，不能用免疫组化检查结果推翻 HE 切片诊断。这一点在文献中及工作实践中都有过教训。

（二）对假阴性和假阳性的认识

目前，免疫组化技术较普遍应用的过氧化物酶—抗过氧化物酶（PAP）、ABC 及 SP 法虽已规范化，但在日常工作中有时存在着假阴性和假阳性问题。从工作实践中归纳起来，假阴性的主要原因：

抗体已失活或浓度不当或抗体本身达不到应有的敏感度，不论是自产抗体、国外赠送的抗体还是商品化的抗体，都会有抗体不能显示相应抗原的现象；②抗原丢失或减弱，当标本处理不及时更容易出现，如固定不良、温度过高；③操作步骤不当，即技术上的失误，如反应时间不够或过久、洗脱不够等。假阳性的原因还包括：抗体与多种抗原有交叉反应；②抗体与组织中某些成分的非特异性结合；③内源性酶的显色；④肿瘤或病变中有其他组织残留，尤其是肿瘤中残余极少的正常组织，而正常组织此时又有一定程度的增生或萎缩时，易将其误认为肿瘤成分；⑤抗原的弥散或被瘤细胞吞噬而使抗原在不该出现的部位出现，如霍奇金病 RS 细胞中的免疫球蛋白；⑥异位抗原的表达，对于这一点目前还有争论，如浆细胞有的表达角蛋白，是异位抗原表达还是交叉反应尚未肯定。

（三）抗原的“例外”表达

目前免疫组化所用抗体大多数为商品化的单克隆抗体，从理论上说一种抗体只能与其相应的一种抗原起免疫反应，如角蛋白，开始应用时曾认为只标记上皮细胞中的角蛋白，因而具有无可争议的鉴别诊断作用。但近几年来陆续发现角蛋白也可表达于非上皮性组织和肿瘤，如平滑肌（小肠、血管、子宫）、舌肌、心肌、羊膜绒毛膜间质、星形胶质细胞、小脑浦肯野细胞、骨肉瘤、软骨肉瘤、神经鞘瘤、胶质瘤、横纹肌肿瘤、平滑肌肿瘤、恶性纤维组织细胞瘤、浆细胞瘤、恶性黑色素瘤、淋巴结的树突状细胞、上皮样血管肉瘤、未分化大细胞淋巴瘤、尤因瘤。反之，波形蛋白（vimentin）亦见于多种上皮组织和肿瘤，如：肾癌、乳腺癌、肺癌等。目前多用细胞的分化不同阶段其抗原性有相应变更来解释这些抗原的“例外”表达。

（四）抗原的联合表达

在免疫组化诊断工作中还应注意一些肿瘤和正常组织细胞存在着抗原的联合表达的问题，即一种细胞表达多种抗原。因此，仅一种抗体的检测阳性是不够的，而要应用一组抗体去检测才可能

弄清问题，如有的肺癌可同时表达角蛋白、波形蛋白、结蛋白（desmin, DM）、神经细丝 neurofilament）4 种抗原，如果形态上分化较差而仅 vimentin 显示阳性，就有可能误解为肉瘤，如果仅做 desmin 显示阳性，又可能误解为肌源性肿瘤。同理，横纹肌肉瘤可同时表达角蛋白、波形蛋白和结蛋白，如果仅角蛋白显示阳性，可能会误解为癌。

胸腺瘤也可呈现联合表达 CK/KER 和 LCA。EMA 除对腺上皮肿瘤表达外，对上皮样肉瘤、脊索瘤、滑膜肉瘤、横纹肌肉瘤也有阳性表达，还对大细胞淋巴瘤、浆细胞瘤、脑膜瘤有交叉反应；LCA 是白细胞标记物，但对大细胞淋巴瘤、浆细胞瘤和 RS 细胞往往呈阴性反应；CEA 是内胚层来源的上皮主要标记物，但对血细胞来源的肿瘤（绿色瘤、髓细胞白血病）、颗粒细胞瘤、恶性纤维组织细胞瘤呈阳性反应；S-100 除对黑色素瘤、脂肪肉瘤和神经鞘瘤表达外，还与肌上皮、色素细胞、软骨细胞、树突状网状细胞、某些低分化上皮肿瘤有交叉反应；神经元特异性烯醇酶（NSE）为神经内分泌肿瘤首选的标记，还与某些乳腺癌、大细胞淋巴瘤呈阳性反应；胎甲球（AFP）除肝细胞外，还与生殖细胞瘤、卵黄囊瘤、睾丸胚胎瘤有交叉反应；亮氨酸-7（Leu-7）对少枝细胞瘤、神经鞘瘤、神经内分泌肿瘤及黑色素瘤表达，还对尤因肉瘤、肾母细胞瘤、软骨肉瘤表达。CD34 作为首选的血管源性肿瘤的标记物（血管肉瘤、血管外皮瘤、上皮样血管内皮瘤、卡波济肉瘤），还对上皮样肉瘤、皮肤隆突性纤维肉瘤、孤立性纤维性肿瘤也有表达。此外还作为胃肠道间质肿瘤标记物（70%表达）。

一种新的抗体问世时，都认为是“特异”性的，但用了一段时间后发现，往往并非完全特异，如一组肌肉标记物最初被认为对平滑肌和骨骼肌细胞类型是特异的，但结蛋白（DM）和肌动蛋白（SMA, MSA）均对肌纤维母细胞和纤维组织细胞表达，SMA 还可在肌纤维母细胞瘤、结节性筋膜炎纤维瘤中表达。而 SMA 在横纹肌肉瘤罕见表达。另外如 CD68（KP-1）虽然作为组织细胞标

记物,但目前认为具有广谱的反应性和非特异性,在颗粒细胞瘤、神经鞘瘤、神经纤维瘤以及纤维肉瘤和其他肿瘤包括癌和黑色素瘤有表达。缺乏对组织细胞谱系的可靠性以及在不同肿瘤中反应,从而标记物反应性本身不能引导出正确的诊断。

目前,了解最多的是中间丝 (intermediate filament, IF) 的联合表达,现在人们认识到一些不同谱系的非肿瘤组织至少表达一种 IF 这种 IF 联合表达不仅是一种发生于进行分化的胚胎组织中的短暂现象,而且还出现于已停止分化的正常的成人细胞中。除了正常细胞外,IF 的联合表达还出现在联合表达两种或更多 IF 的细胞所起源的良性和恶性肿瘤中,出现这种情况的原因是由于肿瘤细胞保留了与其起源细胞相同的 IF 成分,或者是由于在肿瘤细胞中出现了与其相应的正常细胞所不同的另一种 IF 联合表达方式。角蛋白与波形蛋白的联合表达出现在多种器官的癌中,例如肾脏、肺脏、卵巢、甲状腺。还出现在一些肉瘤中,例如滑膜肉瘤、上皮样肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、尤因肉瘤。据报道,角蛋白与波形蛋白的联合表达还出现在少数几例间变的大细胞淋巴瘤中。在多种神经内分泌肿瘤中可出现角蛋白与神经丝的联合表达。结蛋白与波形蛋白的联合表达出现在某些平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、促纤维生成性小圆细胞瘤中。在一些上皮样肉瘤中,偶尔出现角蛋白,波形蛋白和神经丝联合表达的报道,而在皮肤与唾液腺混合瘤中常常有角蛋白、波形蛋白和神经胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 的联合表达。

最近对内因子 (IF) 蛋白复合体在良恶性细胞中表达情况的认识表明角蛋白、结蛋白、神经丝、GFAP 以及波形蛋白不能再作为上皮、肌肉、神经、胶质、间叶分化的单一标记物。尽管如此,IF 蛋白联合表达并没有否定 IF 免疫染色在诊断病理学中的应用价值。除此之外,人类肿瘤中,IF 蛋白的联合表达在这些肿瘤的鉴别诊断中以及判断不明组织来源的转移瘤的原发部位时,可能是一个较好的辅助性特征。IF 蛋白的联合表达可能还会使人们认识到

新的临床病理诊断依据。例如：促纤维生成性小圆细胞瘤最重要的诊断依据是肿瘤细胞内有结蛋白和角蛋白的联合表达。因此，熟悉各种组织和肿瘤在抗原上的联合表达是做好免疫组化诊断工作必要的前提。

（五）应用“反证法”确保免疫组化检查在病理诊断中的准确性

在国外的一些病理诊断工作中可见到有些病理学医师抓住免疫组化的优点，极力提倡应用免疫组化方法，反之，有些病理医师抓住免疫组化的缺点，极力反对免疫组化方法。作者在免疫组化诊断工作中逐步摸索了一些准确性方面的体会，尤其是在通过电子显微镜证实诊断的情况下，再来检验免疫组化的阳性和阴性表达，将归纳为免疫组化的“反证法”，既要有阳性抗体的结果，又要有阴性抗体的结果，这样，才能确保诊断的可靠性。例如，1例未分化肿瘤，其原发部位及组织来源都不清楚时，根据HE切片怀疑恶性黑素瘤，如果仅做S-100染色，结果阳性，病理报告为黑素瘤，这样显然是错误的。如果采用“反证法”，即选用黑素瘤可以表达阳性的一组抗体（S-100、HMB45、vimentin、NSE、Leu-7、Leu-M1、CgA）和黑素瘤不表达的一组抗体（keratin、EMA、LCA、desmin、Synaptophysin），当这两组正、反两方面结果都支持黑素瘤时，才能最后发出黑素瘤的病理报告。当然，这样做在常规工作中难以达到，但从严谨、科学的角度则是必须的。

常见肿瘤免疫组化应用中反证法参考抗体见表 1-3。

表 1-3 常见肿瘤反证法参考抗体

肿瘤类型	阳性表达	阴性表达
上皮性肿瘤	Keratin（大、小分子量）	S-100
	EMA	Melanoma
		LCA
间皮肿瘤	Keratin	CEA
	EMA	CD15

(续表)

肿瘤类型	阳性表达	阴性表达
淋巴瘤	Vimentin	
	LCA	
B细胞性	CD20	CD45RO
	CD45R	CD15
T细胞性	CD45RO	CD20
	CD43	
组织细胞性	Leu-22	
	CD68	CD20
	LN2	CD45RO
		CD15
霍奇金病		CD43
	CD15	CD20
	CD30	CD45RO
		LCA
黑素瘤	HMB45	Keratin
	S-100	EMA
	Vimentin	LCA
	NSE	NF
	Leu-7	Synaptophysin
	Leu-M1	Desmin
	LN2	
	LN3	
	Chromogranin A	
横纹肌肿瘤	Desmin	LCA
	Vimentin	S-100
	Myoglobin	Melanoma
	NSE	
	Leu-7	
平滑肌肿瘤	Desmin	Keratin
	Actin	EMA
	Vimentin	S-100

(续表)

肿瘤类型	阳性表达	阴性表达
尤因肉瘤	Myosin	HMB45
	Vimentin	Desmin
	Laminin	Myoglobin
	NSE	S-100
	Keratin	Chromogranin
	Leu-7	
血管肿瘤	NF	
	CD31	
	CD34	
	Factor VIII	Keratin
	UEA	EMA
	血型抗原	S-100
	Vimentin	Desmin
		GFAP
		NF
		CEA
恶性纤维组织细胞瘤		Leu-7
	α -1AT	Keratin
	α -1ACT	NSE
	Vimentin	S-100
	Desmin	NF
	EMA	Myogob
神经内分泌肿瘤	Lysozyme	LCA
	Synaptophysin	LCA
	Chromogranin A	Melanoma
	NSE	Vimentin
	Leu-7	
	Bombesin	
	Keratin	
	NF	
	EMA	