维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)06－0718－04

DNA 倍体及核形态参数检测在肾细胞癌预后判断中的价值

赵 涌[1], 赵 敬[1], 杨 敏[1], 李圆圆[1], 彭 斌[2], 蒲立新[3]

(1.重庆医科大学基础医学院病理学教研室;2.重庆医科大学卫生统计学教研室,重庆 400016;
3.电子科技大学金盘多媒体技术研究所,成都 610054)

【摘 要】目的:探讨图像细胞术测定肾细胞癌 DNA 倍体和核形态参数在预后判断上的价值及其与病变分级的关系. 方法:根据 Fuhrman 等建议的病理分级系统对 47 例肾细胞癌进行分级,肿瘤组织切片经 Feulgen 染色后,应用图像分析仪测量肾细胞癌的 DNA 倍体以及细胞核形态参数并结合临床随访资料进行统计分析. 结果:平均 DNA 倍体分布在 Fuhrman Ⅰ～Ⅱ级主要为 2C,≥5C 的细胞少于 10%,Ⅲ～Ⅳ级中 2C 细胞少于Ⅰ～Ⅱ级,≥5C 的细胞超过 20%,各组间 DNA 倍体参数之间差异有显著性($P<0.01$). 瘤细胞核面积、周长和形状因子等参数在Ⅰ～Ⅳ级间差异都具有显著性($P<0.01$). 随访资料中 Fuhrman Ⅰ～Ⅱ级复发及死亡数为 2/16,而Ⅲ～Ⅳ级为 8/12,两组比较,复发转移及死亡率差异有显著性($P<0.01$) 平均 DNA 倍体和细胞核形态参数在健存组与复发死亡组之间差异有显著性($P<0.01$). 结论:提示肾细胞癌 Fuhrman 分级Ⅰ～Ⅱ级预后较好,Ⅲ～Ⅳ级预后差 用图像细胞术进行细胞核 DNA 倍体及核形态参数测定,对肾细胞癌预后判断有应用价值.

【关键词】肾细胞癌;病理学分级;预后;图像细胞术;DNA 倍体
【中国图书分类法分类号】R737.11;R394.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－03－16

Prognostic value of DNA ploidy and nuclear morphometry in renal cell carcinoma

ZHAO Yong, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the prognostic value of DNA ploidy and nuclear morphometry, and its relations to nuclear grading in renal cell carcinoma. *Methods*: Pathological grading were done in 47cases of renal cell carcinoma in accordance with the system proposed by Fuhrman et al. Feulgen staining were performed in the tumor histological slides, and the technique of image cytometry was used to quantitate nuclear DNA ploidy and nuclear morphological parameters. The results combined with the data of clinical follow up were analyzed. *Results*: The mean DNA ploidy in grade Ⅰ～Ⅱ was mainly 2C, ≥5C cells less than 10%; the 2C cells in grade Ⅲ～Ⅳ were lower than in grade Ⅰ～Ⅱ, ≥5C cells were more than 20%. Among the four grades DNA ploidy were statistically different ($P<0.01$). There were significant differences in the nuclear area, perimeter and shape factor among the groups of grade Ⅰ～Ⅳ ($P<0.01$). According to the data of clinical follow up, the number of relapse, metastasis and death in the group of Fuhrman grade Ⅰ～Ⅱ (2/16) was statistically lower than in the group of Fuhrman grade Ⅲ～Ⅳ (8/12) ($P<0.01$). There were significant differences in DNA ploidy and nuclear morphological parameters between groups of the living and dead ($P<0.01$). *Conclusion*: Our research suggests that Fuhrman grade Ⅰ～Ⅱ show a favorable prognosis while grade Ⅲ～Ⅳ show a poor one in patients with renal cell carcinoma. The measurment of DNA ploidy and nuclear morphological parameters by image cytometry (ICM) have an important value for predicting the prognosis of renal cell carcinoma.

【Key words】Renal cell carcinoma; Pathology grading; Prognosis; Image cytometry; DNA ploidy

近年有研究者提出肾细胞癌核形态分级可独立测定肿瘤恶性程度,对肾癌的预后判断有重要应用价值,也有作者认为测定瘤细胞 DNA 含量及倍体可帮助预测肾细胞癌患者预后[1～4],但都尚存争议. 笔者利用计算机图像分析系统对 47 例肾细胞癌进行了细胞核形态参数和瘤细胞 DNA 倍体测定,以探讨其与肿瘤细胞分级、及生物学行为的关系.

作者介绍:赵 涌(1956－),男,副教授,硕士,
主要研究方向:泌尿、生殖系统肿瘤.

1 材料和方法

1.1 材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

选取重庆医科大学病理学教研室 1995 年～2002 年间存档的肾细胞癌标本 47 例，其中男性 30 例，女性 17 例，年龄 35～78 岁，(平均年龄 57 岁，中位数年龄 65 岁)。复查所有病例的病理诊断，并按 Fuhrman(1982)提出的标准(Ⅰ级：肿瘤核直径 10μm，小而圆，核仁不明显或无核仁；Ⅱ级：肿瘤核直径 15μm，高倍镜下见核轻度不规则，可见到核仁；Ⅲ级：肿瘤核直径 20μm，低倍镜下形态不规则，核仁明显；Ⅳ级：肿瘤核直径 20μm，见明显的畸形核和分叶核，核仁显著。)进行病理分级。所选的每 1 例肿瘤组织块都附有部分正常肾组织。收集临床病理资料，并进行随访，28 例(61.7%)获得随访资料，随访时间 10 个月～88 个月，平均随访时间为 41 个月。5 例死亡，生存者 23 例其中 3 例发现肺转移灶，1 例发生鼻腔转移。

1.2 方法

所有标本石蜡包埋组织重新制成 5μm 厚切片，脱蜡，水化，进行 Feulgen 染色，亮绿衬染。选取染色清晰、无折叠、细胞轮廓分明的组织切片 400 倍放大，用 Golden Disic 真彩色病理图像分析系统(电子科技大学金盘多媒体研究所研制)测量肾癌细胞核的各种形态指标和 DNA 倍体含量。

(1)细胞核形态定量测定　每张切片测定 90～150 个瘤细胞，检测参数：细胞核面积、周长、最大径、等效直径及核形状因子等。所得数据经计算机自动处理。

(2)细胞核 DNA 含量检测　每张切片随机测定约 90～130 个瘤细胞核的积分光密度(IA)，同时每张切片测量 40～50 个小淋巴细胞 DNA 含量作为二倍体(2C)对照。计算机按单个癌细胞核积分光密度与淋巴细胞核平均积分光密度的比值统计出 DNA2c、3c～4c 和≥5c 癌细胞的百分率。

1.3 统计学分析

应用计算机统计软件进行，肾细胞癌细胞核 DNA 倍体、平均核面积和形状因子与 Fuhrman 分级的关系采用方差分析(Least Squares Means)，肾细胞癌 Fuhrman 分级与预后的关系用秩和检验，肾细胞癌细胞核 DNA 倍体和形态参数与预后的关系采用 T 检验(统计方法选择和计算过程由重庆医科大学统计学教研室教师完成)

2 结　果

2.1 肾细胞癌细胞核形态参数和 DNA 倍体与 Fuhrman 分级的关系

结果见表 1 所示：Fuhrman 病理分级四组之间细胞核 DNA 倍体率在肾细胞癌Ⅰ级癌细胞以 2C 为主，少数 3C～4C、≥5C 细胞偶见(图 1)；Ⅱ级组 3～4C 细胞明显高于Ⅰ级组，≥5C 细胞增多；Ⅲ级组 3C～4C 细胞明显高于Ⅰ级Ⅱ级组、≥5C 细胞比率增高，但低于Ⅳ级组；Ⅳ级组：3C 以上细胞多于 2C 细胞，特别是异倍体(≥5C)细胞显著增多(图 2)。

Fuhrman 病理分级从Ⅰ～Ⅲ级各组的核平均面积逐渐增加，各组间面积参数值差异有显著性($P<0.01$)，Ⅲ级与Ⅳ级间核平均面积无显著差异($P>0.05$)。核周长及核形状因子参数值从Ⅰ～Ⅳ级，随组织学分级的增高而相应的增高。各组间核周长和形状因子值差异有显著性($P<0.01$)。



图 1　肾细胞Ⅰ级，DNA 倍体以 2C 为主
Feulgen 染色，亮绿衬染 × 400

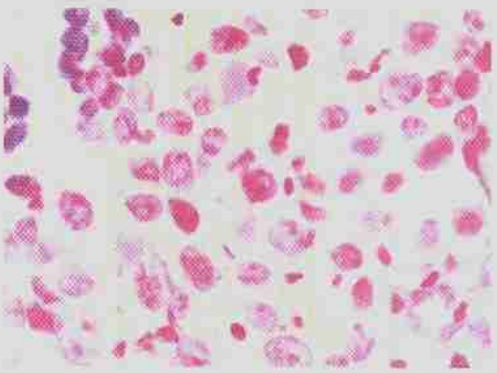


图 2　肾细胞癌Ⅳ级，DNA 倍体以 3C 以上为主
Feulgen 染色，亮绿衬染 × 400

表 1　肾细胞癌细胞核 DNA 倍体、平均核面积和形状因子与 Fuhrman 分级的关系

Fuhrman 病理分级	病例数(%)	细胞数	2C 细胞数(%)	3C～4C 细胞数(%)	≥5C 细胞数(%)	平均核面积(μm)	平均核周长(μm)	形状因子
Ⅰ级	11(23.4)	1210	963(79.58)	174(14.38)	73(6.03)	97.51	39.82	1.34
Ⅱ级	16(34.0)	1844	1176(63.77)	489(26.51)	179(9.71)	154.17	54.87	1.55
Ⅲ级	13(27.7)	1450	689(47.51)	462(31.86)	299(20.62)	224.94	75.44	1.94
Ⅳ级	7(14.9)	751	224(29.82)	326(43.40)	201(26.67)	225.12	90.41	2.07

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 肾细胞癌分级、DNA 倍体、核形态参数与预后的关系

有随访资料的患者分为两组，Fuhrman Ⅰ～Ⅱ级共 16 例，其中复发及死亡各 1 例。Ⅲ～Ⅳ级共 12 例，其中 3 例复发转移，4 例死亡(见表 2)。各组比较，复发转移及死亡率差异有显著性($\chi^2=8.0047$; $P<0.05$)。健存者组平均非二倍体细胞所占比例为 34.1%，复发转移及死亡者组为 55.2%，后者非 2 倍体细胞所占比例明显高于前者。19 例健存病例的平均核面积、核周长和形状因子等参数与 9 例有复发转移及死亡的病例相比，差异具有显著性意义($P<0.01$)(见表 3)。

表 2 肾细胞癌 Fuhrman 分级与预后的关系

分级	病例数(人)	健存(人)	复发/转移(人)	死亡(人)
Ⅰ级	7	7	0	0
Ⅱ级	9	7	1	1
Ⅲ级	8	4	2	2
Ⅳ级	4	1	1	2

表 3 肾细胞癌细胞核 DNA 倍体和形态参数与预后的关系

分组	病例数	细胞总数	2C 细胞数(%)	3C～4C 细胞数(%)	≥5C 细胞数(%)	平均核积(μm)	平均核周长(μm)	形状因子
健存	19	2167	1429(65.94)	521(24.04)	217(10.01)	145.44	52.21	1.53
死亡、复发	9	998	447(44.79)	336(33.67)	215(21.54)	217.11	80.96	1.98

3 讨 论

3.1 Fuhrman 病理分级与肾细胞癌 DNA 倍体、细胞核形态参数及临床预后的关系

Fuhrman 等[3](1982)提出的以瘤细胞核直径、异型性、核仁和染色质类型等参数为依据的 4 级病理分级系统，突出了形态学对预后判断的意义，虽被部分研究者接受，但仍有争议，因而未能在病理诊断上广泛应用。通过对肾细胞癌的细胞核分级与细胞核主要形态参数、DNA 倍体状态以及临床预后等进行了相关性研究表明：DNA 倍体及核形态参数及预后在 Fuhrman Ⅰ～Ⅳ级各组比较差异有显著性意义($P<0.01$)，见表 1、2。在本组病例 DNA 倍体与病理分级和临床预后上有着显著的联系，该结果与一些文献报告的结果趋一致[1～5]。这种基于瘤细胞核形态的分级(Fuhrman 分级)系统对肾细胞癌患者的预后判断有重要参考价值：Ⅰ～Ⅱ级多为局限性肿瘤，预后较好；Ⅲ～Ⅳ级常伴有浸润转移，复发和死亡率高，预后差。

预后有关的瘤细胞核形态参数中，多数报道认为重复性和可靠性最好的测定参数是核面积，甚至有几宗报道认为，核面积可以作为一个区别患者生存 5 年以上或 5 年以下的判别参数[2,5]。本组结果也显示细胞核面积参数在健存组与死亡、复发组间差异具有高度显著性差异($P<0.01$)。不过本组结果显示从统计学角度来评价核面积参数在肿瘤预后判断中的价值与核周长与形状因子等参数是等同的。

细胞核大小的判断在普通光镜下凭经验估计往往偏差较大，不同观察者的经验和体会有较大差别，因而会影响到分级的准确性。对于 Fuhrman 分级的几个重要分级要素，肿瘤细胞核大小的确定，图像分析仪测定是准确可靠的。对细胞核异形性的判断，用细胞核面积、周长和形状因子等参数通过图像分析仪测定也比凭经验判断异型性更为客观准确，检测得出的定量参数更能够如实地反映细胞核的异型程度，不同观察者间可重复性较好。因此用图像分析仪对肾细胞癌按细胞核形态进行分级有重要价值

3.2 肾细胞癌细胞核 DNA 倍体和形态参数与预后的关系

DNA 倍体及含量的测定对肾细胞癌的生物学行为的预测作用一直存在争议，部分研究者认为其有重要作用[1,5,6]，Shalev 等[7]的研究结果显示，根据 DNA 倍体来预测肾细胞癌生物学行为是不准确的。对于 DNA 倍体与肾细胞癌 Fuhrman 病理分级的关系研究较少有报道。本组结果显示肾细胞癌从Ⅰ～Ⅳ级随病理分级的增高，DNA 二倍体细胞数量逐渐减少，非二倍体细胞所占比例逐渐增加，各组之间 DNA 倍体参数比较差异有显著性($P<0.01$)，结果与文献报道相近，支持肾细胞癌 Fuhrman 病理分级与瘤细胞 DNA 倍体分布状况有着密切联系的观点[8]。从 DNA 倍体与患者预后联系方面，健存者组平均非二倍体细胞所占比例为 34.1%，复发转移及死亡者组为 55.2%，两相比较，后者异倍体细胞比例显著高于前者($P<0.01$)，强烈地提示 DNA 倍体状况与患者预后有密切的联系，非整倍体细胞数超过总数 60% 者临床预后较差。由于 Fuhrman 病理分级与瘤细胞 DNA 倍体分布状况和预后密切相

维普资讯 http://www.cqvip.com

关($P<0.01$)，因此 Fuhrman 病理分级结合 DNA 倍体测定对肾细胞癌预后判断有着较好的应用价值。

细胞核形态参数如核大小、面积、周长和形状因子等，都可以反映细胞的异型性，核的大小是 Fuhrman 病理分级的基础要素，与临床预后关系密切。面积、周长和形状因子能较好地反映细胞核的异型性，相同面积情况下，周长和形状因子值较大时，说明胞核形状偏离圆形的偏离度增加，因而异型性也较大。

与流式细胞术(flow cytometry，FCM)相比，图像细胞术(image cytometry，ICM)在肿瘤诊断上的应用显得更为简单实用，成本低，对材料要求低，由于能定量测定癌细胞的多个参数，已广泛用于肿瘤的癌前病变与癌的鉴别的研究。采用 Feulgen 染色技术，能够通过光密度的测定，了解肿瘤细胞核 DNA 的倍体情况，又可在测定 DNA 含量的同时获得其核的多个形态参数(大小、面积、周长、形状因子等)。肾细胞癌由于临床分级系统以及传统的病理组织分型对预后的预示作用不理想，而基于细胞核形态的病理分级和 DNA 倍体分布是独立于其他指标的与预后密切相关的因素，因此我们认为，对于肾细胞癌的病例，在有条件的情况下，可应用图像分析仪进行检测，根据细胞核形态而进行较准确的病理分级并同时做 DNA 倍体分析，协助临床判断肿瘤的发展及预后和制定合理的治疗方案。

参 考 文 献

[1] Paraskevakou E, Kavantzas N, Pavlopoulos, et al. Computerized nuclear morphometry of renal cell carcinomas[J]. Gen Diagn Pathol, 1996; 142(2): 101 - 104.

[2] Nativ O, Sabo E, Madeb R, et al. Prognostic score for patients with localized renal cell carcinoma treated by nephrectomy [J]. Isr Med Assoc J, 2001; 3(1): 24 - 27.

[3] Lee JS, Jung JJ, Lee MC, et al. Value of morphometric nuclear image analysis using the Feulgen reaction in renal cell carcinoma[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000; 22(1): 31 - 36.

[4] Rey D, Pfister C, Gobet F, et al. Study of the prognostic value of DNA ploidy and proliferation index (Ki - 67) in renal cell carcinoma with venous thrombus[J]. Prog Urol, 2003; 13(6): 1300 - 1306.

[5] Jose LR, Miguel H, Federico G, et al. Value of deoxyribonucleic acid ploidy and nuclear morphometry for disease progression in renal cell carcinoma[J]. The J Urological, 1996; 155: 459 - 465.

[6] Abou - Rebyeh H, Borgmann V, Nagel R, et al. DNA ploidy is a valuable predictor for prognosis of patients with resected renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2001; 92(9): 2280 - 2285.

[7] Shalev M, Gdor Y, Leventis A, et al. The prognostic value of DNA ploidy in small renal cell carcinoma [J]. Pathol Res Pract, 2001; 197(1): 7 - 12.

[8] Francois C, Decaestecker C, Lathouwer OD, et al. Improving the progrostic value of histopathological grading and clinical staging in renal cell carcinomas by means of commputer - assisted microscopy[J]. J. Pathol, 1999; 187: 313 - 320.

(上接第 717 页)

参 考 文 献

[1] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchyaml progenitor cells in human undilical cord blood[J]. Br J Haematol, 2000; 109: 235 - 242.

[2] Ferrari G, Angelis GC, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors [J]. Sciences, 1998; 279: 1528 - 1530.

[3] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotential of Mesenchymal stem cells derived form adult marrow[J]. Nature, 2002; 418: 41 - 49.

[4] Sanchez - Ramos J, Song S, Cardozo - Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vivo[J]. Exp Neurol, 2000; 164: 247 - 256.

[5] Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry [J]. Blood, 1997; 90(9): 3471 - 3481.

[6] Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, et al. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow - derived mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 1998; 59(9): 1182 - 1187.

[7] 艾国平，粟永萍，闫新泽，等. 骨髓间充质干细胞的分离和培养[J]. 第三军医大学学报，2001; 23(5): 553 - 555.

[8] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow Mesenchymal progenitor cells [J]. J Cell Physiol, 1999; 181(1): 67 - 73.