DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.045
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1345-03

论著

肾细胞癌DNA倍性测定的意义

汤群辉,杨力军,秦荣良,王鹏飞,武国军 (第四军医大学西京医院泌尿外科,西安 710033)

提 要:目的 探讨DNA倍性在肾细胞癌预后中的作用。方法 运用流式细胞仪和图像分析技术对56例肾细胞癌标本进行DNA含量测定,按照肾癌的病理分级、临床分期及细胞类型进行DNA倍性的统计学分析。并对近二倍体和非整倍体肾癌患者的生存率进行统计学分析。结果 肾癌的DNA非整倍体率与癌细胞的病理分级、临床分期呈递增关系,各病理分级、临床分期间的非整倍体率有显著性差异($P<0.05$);而各病理细胞类型间的DNA非整倍体率无显著性差异。近二倍体肾癌患者生存率明显高于非整倍体肾癌患者($P<0.01$)。结论 DNA倍性与肾癌预后相关,综合病理分级、临床分期和DNA倍性可对肾癌的恶性程度及预后作出更准确的判断。

关键词:肾细胞癌;DNA;流式细胞术
中图法分类号:R394.2;R737.11 文献标识码:A

Significance of DNA ploidy determination in renal cell carcinoma

TANG Qun-hui, YANG Li-jun, QIN Rong-liang, WANG Peng-fei, WU Guo-jun (Department of Urology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University Xi'an 710033, China)

Abstract: Objective To explore the prognostic significance of DNA ploidy in renal cell carcinoma. Methods Flow cytometry and quantitative fluorescence image analysis were used to determinate the DNA ploidy in 56 cases of renal cell carcinoma. The survival rate between the diploid and aneuploid cases and DNA ploidy in different pathological grading and clinical stage of the renal cell carcinoma were analyzed. Results DNA aneuploidy rate was the significantly different in different pathological gradings and clinical stage($P<0.05$), but had no significant difference in different cell types of renal cell carcinoma. The survival rate of the diploid cases was significant high than the aneuploid ones($P<0.01$). Conclusion DNA ploidy is correlated with the prognosis of renal cell carcinoma. The synthesis of DNA ploidy, pathological grading and clinical stage can more accurately estimate the level of malignancy and prognosis of renal cell carcinoma.

Key words: renal cell carcinoma; DNA; flow cytometry

肾癌的生物学行为较难预测,对肾癌患者的预后主要根据肿瘤的分级、分期。对肿瘤细胞的DNA倍性进行测定,可以客观地了解肿瘤细胞的增殖能力和恶性程度,有可能明显提高肾癌患者预后估计的准确性。

1 材料和方法

1.1 标本

56(男41,女15)例标本均是1990—1999年行肾癌手术切除的石蜡标本。年龄38~79(平均59)岁。分期采用Robson分期标准,Ⅰ期25例,Ⅱ期13例,Ⅲ期14例,Ⅳ期4例;分级采用Fuhman核分级标准,Ⅰ级25例,Ⅱ级15例,Ⅲ级12例,Ⅳ级4例;细胞类型为透明细胞32例,颗粒细胞16例,混合细胞8例。56例中有52例患者获得随访。

1.2 流式细胞术(FCM)测定

采用改良的Hedley法进行脱石蜡核悬液制备[1],溴化乙啶一步染色法染色。采用美国Becton Dickinson公司的FACS-420型流式细胞仪对标本进行测定[2]。正常肾皮质组织DNA含量作为二倍体标准,DNA指数(DI)为1.0。

$$\text{肿瘤 DI}=\frac{\text{肿瘤细胞 } G_0/G_1 \text{ 峰值}}{\text{对照细胞 } G_0/G_1 \text{ 峰值}}\pm 10\%$$

以此值作为区分二倍体和非二倍体的标准。

1.3 图像分析术

每份标本切取5μ切片6张进行HE常规染色和用Schiff试剂进行Feulgen染色。首先对HE染色片进一步证实病理诊断,并以WHO标准进行病理分级;再采用西德Leitz TAS图像分析仪对每片测定100个肿瘤细胞,以同片100个正常淋巴细胞的DNA含量作二倍体对照[3]。经计算机处理得出各类细胞的积分A值和肿瘤细胞的DNA相对指数(u值)。

$$u\text{值}=\frac{\text{肿瘤细胞 DNA 平均积分 A 值}}{\text{淋巴细胞 DNA 平均积分 A 值}}$$

参照Hofstaeter等的方法,以对照细胞的积分A值±20%作为区分二倍体和非二倍体的标准。

1.4 统计学分析

χ^2检验。

2 结果

综合FCM和图像分析结果得出56例肾癌的DNA倍性,56例肾癌中近二倍体为22例,占39.3%,非整倍体34例,占60.7%;其中有5例标本的大部分组织块为近二倍体,而另外1~2个组织块为非整倍体,最后将其归入非整倍体组。DI范围:1.01~1.87。根据统计学处理,发现肾癌的DNA非整倍体率与癌细胞的病理分级、临床分期呈递增关系,各病理分级、临床分期间的非整倍体率有显著性差异($P<0.05$);而各病理细胞类型间的DNA非整倍体率相近,透明细胞59.4%(19/32),颗粒细胞62.5%(10/16),混合细胞62.5%(5/8),差异不显著。52例获得随访的肾癌患者,经单因素统计分析,近二倍体与非整倍体间生存率差异非常显著($P<0.01$),近二倍体肾癌患者生

作者简介:汤群辉(1961—),男,浙江省杭州市人,博士,主治医师,讲师,主要从事泌尿系肿瘤的防治研究,发表论文10余篇。电话:(029)33753521

收稿日期:2001-04-09;修回日期:2001-08-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

存率明显高于非整倍体肾癌患者。结果见表 1~3。

表 1 56 例肾细胞癌病理分级与 DNA 倍性的关系

Tab 1 Relationship between pathological grading and DNA ploidy in 56 cases of renal cell carcinoma

Grading	Case	Diploid	Aneuploid	Aneuploid rate(%)
Ⅰ	25	15	10	40.0[a]
Ⅱ	15	6	9	60.0[c]
Ⅲ	12	1	11	91.7
Ⅳ	4	0	4	100.0

a: $P<0.05$ *vs* Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ; c: $P<0.05$ *vs* Ⅲ, Ⅳ

表 2 56 例肾细胞癌临床分期与 DNA 倍性的关系

Tab 2 Relationship between clinical stage and DNA ploidy in 56 cases of renal cell carcinoma

Phase	Case	Diploid	Aneuploid	Aneuploid rate (%)
Ⅰ	25	16	9	36.0[a]
Ⅱ	13	5	8	61.5[c]
Ⅲ	14	1	13	92.9
Ⅳ	4	0	4	100.0

a: $P<0.05$ *vs* Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ; c: $P<0.05$ *vs* Ⅲ, Ⅳ

表 3 52 例肾细胞癌生存率与 DNA 倍性的关系

Tab 3 Relationship between survival rate and DNA ploidy in 52 cases of renal cell carcinoma

DNA content	1 year survival(%)	3 year survival(%)	5 year survival(%)
Diploid	100(19/19)[b]	84.2(16/19)[d]	63.2(12/19)[f]
Aneuploid	78.8(26/33)	42.4(14/33)	18.2(6/33)

b: $P<0.01$ *vs* AN, d: $P<0.01$ *vs* AN, f: $P<0.01$ *vs* AN

3 讨论

3.1 肾癌 DNA 倍性与肿瘤异质性

每一个肿瘤都是一个复杂的细胞群体，该群体中各细胞的遗传特征、恶性程度不完全一致，这就是肿瘤的异质性，它导致了相同分期的肿瘤患者在治疗方法相似的情况下出现不同的临床结果。Currin 等[4]报告取材少于 3 个组织块，则不能发现肿瘤 DNA 倍体异质性，对肾癌不同区域取材进行 DNA 含量测定，结果表明肾癌的 DNA 含量存在异质性。Ljungberg 等[5]则认为肿瘤组织内只要有一个组织块为非整倍体，该肿瘤就应视为非整倍体性质。本组 56 例标本中即有 5 例出现了异质现象。因此，综合运用组织病理学和 DNA 倍性测定可以对肾癌作出更为精确的描述。FCM 能高速度、高精度连续定量分析样品，结果分析较客观，可同时进行多参数分析，但其样品制备较复杂，测定结果易受取材部位和数量的影响；而图像分析样品制备容易，可以重复测定，不易受取材部位和数量的影响；两种方法具有良好的相关性，如能同时运用可进一步提高分析的准确性。

3.2 肾癌 DNA 倍性与病理分级及临床分期的关系

本研究结果显示肾癌细胞的分化程度与 DNA 倍性密切相关，病理分级愈高，DNA 非整倍体率亦愈高，Ⅰ级为 40.0%，Ⅱ级为 60.0%，Ⅲ级为 91.7%，Ⅳ级为 100%，各病理分级间 DNA 非整倍体率有显著性差异（$P<0.05$），两者呈递增关系。肾癌的临床分期与 DNA 倍性亦密切相关，两者亦呈递增关系，Ⅰ期为 36.0%，Ⅱ期为 61.50%，Ⅲ期为 92.9%，Ⅳ期为 100%，各临床分期间 DNA 非整倍体率有显著性差异（$P<0.05$）。表明非整倍体肾癌细胞更具有无限增殖和侵袭转移能力。肾癌细胞类型与恶性程度是否有关尚有分歧，有作者报告透明细胞癌非整倍体率低，颗粒细胞癌和未分化癌非整倍体率高[6]。本组透明细胞癌、颗粒细胞癌和混合细胞癌之间非整倍体率统计无显著性差异，颗粒细胞癌和混合细胞癌的非整倍体率略高于透明细胞癌，尚不能肯定肾癌细胞类型与恶性程度有关。

3.3 肾癌 DNA 倍性与生存率的关系

本组 52 例获得随访的肾癌患者，19 例为二倍体，其 1，3 和 5a 的生存率分别是 100%（19/19）、84.2%（16/19）和 63.2%（12/19）。33 例为非整倍体，其 1，3 和 5a 的生存率分别是 78.8%（26/33）、42.4%（14/33）和 18.2%（6/33）。二倍体肾癌患者的生存率高于非整倍体肾癌患者，有显著性差异（$P<0.01$）。说明非整倍体肾癌的恶性程度要明显高于二倍体肾癌。

3.4 肾癌 DNA 倍性测定在预后及治疗决策选择中的作用

肿瘤细胞的 DNA 倍性反映了细胞的增殖状态，代表肿瘤的活跃程度，测定肿瘤细胞的 DNA 倍性就可以在分子水平上反映肿瘤的恶性潜能，这一点常规的病理学检查或临床分期是无法办到的[7,8]。而测定一些癌基因、抑癌基因或其产物虽然也有一定的预后作用[9,10]，但一些作者在对前列腺癌和肾癌标本进行 DNA 测定后发现，相对于其它预后指标 DNA 倍性测定对肿瘤的预后有明显的重要性[11~13]。本组单因素生存率分析结果显示，近二倍体肾癌患者术后 1~5a 的生存率高，而非整倍体肾癌患者的术后生存率低，两者有显著性差异（$P<0.01$），表明 DNA 倍体形式与肾癌预后相关。也有作者通过多因素预后分析认为 DNA 含量与肾癌预后存在相关关系，但不是影响预后的独立因素[4,14]。因此，我们认为综合病理分级、临床分期和 DNA 倍性可对肾癌的恶性程度及预后作出更准确的判断。通过 DNA 含量测定可以为肾癌的量化诊断、预后及治疗个体化提供可靠的依据。

参考文献：

[1] Nakamura K, Simon A L, Kasabian N G, *et al*. Flow cytometric analysis of relative mean DNA content of urogenital cancer cells in fresh and paraffin-embedded materials[J]. Urology, 1987, 30(4): 333—336.

[2] Ensley J F, Maciorowski Z, Pietraszkiewicz H, *et al*. Solid tumor preparation for clinical application of flow cytometry[J]. Cytometry, 1987, 8(5): 488—493.

[3] Fossa S D, Kaalhus O. The prognostic relevance of nuclear feulgen DNA in transitional cell carcinoma of the urinary bladder[J]. Eur Urol, 1985, 11(6): 418—421.

[4] Currin S M, Lee S E, Walther P J. Flow cytometric assessment of deoxyribonucleic acid content in renal adenocarcinoma: does ploidy status enhance prognostic stratification over stage alone[J]? J Urol, 1990, 143(3): 458—463.

[5] Ljungberg B, Forsslund G, Stenling R, *et al*. Prognostic significance of the DNA content in renal cell carcinoma[J]. J Urol, 1986, 135(2): 422—426.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[6] Lu G H, Hei L S, Huo H X, *et al*. Flow cytometric analysis of renal cell carcinoma[J]. Zhonghua Zhongliu Zazhi(Chin J Oncology), 1990, 12(1): 27—29.
[7] Tian Y W, Ding H Y, Wu X, *et al*. DNA quantitative fluorescence image analysis of tumor cell[J]. Zhonghua Binlixue Zazhi(Chin J Pathol), 1995, 24(4): 264—265.
[8] Zheng W, Li Y W. Investigation of DNA quantitative fluorescence image analysis of tumor cell[J]. Chin J Clin Experi Pathol, 1997, 13(2): 180—181.
[9] Tang Q H, Wang H, Chen B Q, *et al*. Expression and significance of anti-apoptotic gene bcl-2 in renal cell carcinoma[J]. J Fourth Mil Med Univ, 1999, 20(2): 141—142.
[10] Meng Y L, Zhang G C, Xu D L, *et al*. The expression and significance of pgp in Wilms' tumor and medulloblastoma in children[J]. J Fourth Mil Med Univ, 1999, 20(4): 344—347.
[11] Gao X, Porter A T, Grignon D J, *et al*. Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer[J]. Prostate, 1997, 31(4): 264—281.
[12] Amling C L, Lerner S E, Martin S K, *et al*. Deoxyribonucleic acid ploidy and serum protate specific antigen predict outcome following salvage prostatectomy for radiation refractory prostate cancer[J]. J Urol, 1999, 161(3): 857—863.
[13] Ruiz-Cerda J L, Hernandez M, Sempere A, *et al*. Intratumoral heterogeneity of DNA content in renal cell carcinoma and its prognostic significance[J]. Cancer, 1999, 86(4): 664—671.
[14] Dekernion J B, Mukamel E, Ritchie A W S, *et al*. Prognostic significance of the DNA content of renal carcinoma[J]. Cancer, 1989, 64(8): 1 669—1 673.

（编辑　潘式文）

（上接 1344 页）

例 2, 男, 21 岁, 44 kg, 主动脉瓣置换、三尖瓣成形术。转流 172 min, 主动脉阻断 102 min, 开放主动脉后, 气道压 25～39 cm H_2O, 疑气管导管扭曲, 更换新的气管导管仍无改善, 将 Erica 呼吸机换成纽帮呼吸机, 双肺通气和气道阻力无改善, 立即按灌注肺处理加气管内滴入异丙肾 0.1 mg 2 次 10 min 后病情改善。血气: pH 7.139, $PaCO_2$ 9.73 kPa, PO 28.02 kPa, BE —0.6 TCO_2 29.4 SB 21.9, HCO_3 27.2, SpO_2 93%, 术毕呼吸支持 26 h, 痊愈出院。

例 3, 女, 5 岁, 12 kg, 法四根治加肺动脉瓣切开术。转流 144 min, 主动脉阻断 85 min, 灌注压 4～5.8 kPa。开放主动脉前发现气道内较多量的血性泡沫痰溢出, 立即予以吸引, 并按灌注肺处理, 除泡剂, 吸入 5%酒精, 静脉滴注硝普钠 0.02 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$, 开放主动脉, 恢复通气后, 气道阻力增高, 压力 25～43 cm H_2O, SpO_2 68%～83%有创血压 5.33～8 kPa, 除以上治疗外, 给与多巴胺, 多巴酚丁胺各 40 mg 稀释于 50 ml 液体内静滴等处理后改善不明显。

血气: pH 7.485, $PaCO_2$ 6.11 kPa, PaO_2 7.16 kPa, BE —5.7 TCO_2 23 SB 24.1, HCO_3 22。因呼吸衰竭于术后 5 d 死亡。

例 4, 男, 11 岁, 22 kg, 法四根治术加肺动脉切开流出道加宽术。转流时间 64 min, 主动脉阻断 46 min。开放主动脉, 恢复通气即出现气道压力增高, 48 cmH_2O, 双肺听诊布满湿性罗音, 继之气道内涌出较多泡沫痰, 立即按灌注肺处理, 输入白蛋白 50 ml, 西地兰 0.2 mg 加 10 ml 林格氏液缓慢静推, 速尿 10 mg. iv, 硝普钠 0.01～0.1 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$, 气管内滴入异丙肾上腺素 0.1 mg。血气: pH 7.278, $PaCO_2$ 4.67 kPa, PaO_2 3.87 kPa, BE —3.2 TCO_2 24.2 SB 21.6, HCO_3 22.7。术后呼吸支持 48 h。

例 5, 女, 7 岁, 室缺加重度肺高压。室缺修补术, 体外循环时间 48 min, 主动脉阻断 28 min, 灌注压 4.2～9.0 kPa。开放主动脉, 即发现气道阻力增加, 呼吸囊阻力大, 压力(Erica)上显示 37 cmH_2O 以上, $ETCO_2$ 6.7%, 气道内有少量血性泡沫痰, 立即静注氨茶碱 125 mg, 地米 5 mg, 西地兰 0.2 mg 静推, 气管导管内滴入稀释异丙肾上腺素 2 滴(1 ml≈0.1 mg), 控制入量, 适当输入人体白蛋白、硝普钠 0.01～0.1 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$。术后 4 h 逐渐好转, 次日 8 时平安回病房。停机时血气: pH 7.282, $PaCO_2$ 7.23 kPa, PaO_2 4.44 kPa, Beb —1.3 TCO_2 26.6 SB 21.4, HCO_3 24.9。术毕肺动脉压 9.1～9.33 kPa。

例 6, 女, 2 岁 8 月, 8 kg, 房缺动脉导管未闭加严重肺高压, 肾切除术后。体外循环时间 116 min, 主动脉阻断 26 min。停机后, 患儿双肺布满水泡音, 气道压力升高(52 cmH_2O)即出现粉红色泡沫痰, 术中已静滴硝普钠 10 $ml \cdot h^{-1}$(25 mg＋500 ml 液体)及硝酸甘油 1 mg, 西地兰 0.1 mg 稀释 10 ml 静推。转流前输液 120 ml, 转流后 80 ml, 输血 200 ml, 机器内全血 300 ml, 液体 300 ml。血气: pH 7.394, $PaCO_2$ 6.89 kPa, PaO_2 30.7, BEb 6.2, HCO_3 30.7。K^+ 4.8, Na^+ 142。经静注速尿 5 mg, 地米 2.5 mg, 术毕尿量 280 ml, 送 ICU, 呼吸支持 48 h, 痊愈出院。

2　讨论

灌注肺是体外循环心脏直视手术早期的严重并发症。有关灌注肺发生的机制尚未完全阐明, 但可能与体外循环期间白细胞、血小板激活、氧自由基产生、肠道内毒素释放等因素导致的肺微血管通透性增加, 肺血管内微栓形成以及肺泡表面活性物质质与量的改变有关[1～3]。近年来由于灌注技术不断提高和膜肺的应用, 灌注肺的发生率大为下降。

本研究报道 6 例灌注肺均为早期发现, 及时治疗。其中 5 例康复出院, 1 例死亡。治疗体会主要有以下几点: ①体外循体环要适当控制流量、压力、尽量使用进口膜肺, 力求转流平稳, 适度血液稀释(HCT 25%以上), 保持一定的渗透压; ②保护红细胞, 减少血球破坏, 尽量减少肺的微血栓形成; ③严密观察各项监测指标, 严格控制出入量, 尤其是婴幼儿; ④术中应警惕动脉导管未闭漏诊, 注意探查。其中 1 例主动脉瓣置换术加动脉导管结扎术, 手术先换瓣, 后探查发现未闭动脉导管, 导致左肺血流剧增而发生严重灌注肺; ⑤药物治疗, 包括: a. 吗啡(0.2～0.5 $mg \cdot kg^{-1}$), 加深麻醉, 扩张肺血管, 降低外周血管阻力, 减轻心脏负荷; b. 使用缓解支气管痉挛的药物, 如氨茶碱; c. 直接从气管导管内滴人稀释的异丙肾上腺素, 0.01～0.05 mg(0.5～1 ml)使支气管扩张, 降低气道阻力, 此剂量不增加心率, 也不增加心肌耗氧。同时扩张冠状动脉血管, 有利于增加心肌供血、供氧; ⑥间断吸引气道内分泌物, 以保持呼吸道通畅。

关键词: 体外循环; 灌注肺
中图法分类号: R654.106　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Picone A L, Lutz C J, Finck C, *et al*. Multiple sequential insults cause post-pump syndrome[J]. Ann Thorac Surg, 1999, 67(4): 978—985.
[2] Chai P J, Williamson J A, Lodge A J, *et al*. Effects of ischemia on pulmonary dysfunction after cardiopulmonary bypass[J]. Ann Thorac Surg, 1999, 67(3): 731—735.
[3] Griese M. Cardiopulmonayy bypass reduces pulmonary surfactant activity in infants[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 118(2): 237—244.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net