DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.015

肺癌DNA含量及细胞动力学初步研究

崔社怀 张蔚东 沈寒放 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科) 重庆,630038
李才安 陈兆珍 (第三军医大学基础部仪器中心室) 重庆,630038

提 要 采用纤支镜技术,对26例中心型肺癌进行刷检与活检,并用流式细胞仪测定新鲜癌组织的DNA含量,观察细胞的增殖活力。结果提示,新鲜癌组织存在较高的异倍体,异倍体的出现多与恶性肿瘤存在有关;癌细胞的增殖活力亦显著增高,说明细胞的增殖活力直接与组织的恶性程度相关联。经纤支镜检查痛苦小,并发症少,患者易于接受。并且刷检和活检中的任何一项检查,多可获得阳性结果。与活检比纤支镜刷检操作简便、对组织损伤小,出血和并发症少,可弥补管壁浸润型肺癌不易获得活检标本之不足。具有一定的实用价值。

关键词 肺肿瘤;流式细胞测定术,细胞增殖活力
中图法分类号 R734.2

流式细胞技术是近年来国内外应用测定细胞DNA含量的一项新技术。国外已较广泛地应用于肿瘤的诊断、治疗及预后判定,国内亦有为数不多的报道,但多数报道是使用石腊切片,经消化处理后测定细胞核DNA含量[1,2]。使用新鲜癌组织制备单细胞悬液,测定癌细胞的DNA含量国内尚未见报道。本研究旨在使用流式细胞仪测定肺癌患者的纤维支气管镜(纤支镜)活检和刷检标本中的DNA含量,以拓宽纤支镜的诊断范围,提高肺癌诊断的阳性率,并探讨纤支镜所获样品的DNA含量、细胞增殖活力(S%)与肺癌的关系及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例

经病理确诊为肺癌、临床诊断为中心型肺癌者26例,男20例,女6例,平均年龄54.2岁。其中鳞癌15例,小细胞癌5例,腺癌6例。根据纤支镜刷检和活检分别分为刷检组和活检组,正常肺组织和良性病变者为对照组。其中正常肺组织4例,肺结核2例,胸腺瘤1例,作为二倍体对照。

1.2 DNA含量测定

1.2.1 单细胞悬液的制备 用纤支镜活检钳从支气管腔的肿物上活检得到新鲜的癌组织标本。然后用小剪刀剪成1 mm×1 mm×1 mm小碎块,经0.4%胰蛋白酶(DIF进口分装)消化30 min,0.25%胶原酶I (Sigma)消化30 min,终止消化后300目铜网过滤,离心15 min 1500 r/min,去除红细胞制成1×10^5~10^6/ml活细胞液,70%冰乙醇固定,放入4℃冰箱备测。刷检标本经直接过滤,去除红细胞,70%冰乙醇固定,存4℃冰箱备测,正常肺组织和良性病变肺组织制备单细胞悬液步骤同上。

1.2.2 测定DNA含量 应用Facstar Plus(Becton,Dickinson Am),波长488 nm,功率300 mW亚离子激光器为激发光源,每个样品测1×10^5个细胞。经正常人肺组织制备的单细胞悬液作为二倍体对照确定其倍性。以正常组织的G_0/G_1峰均道值作为二倍体标准,计算DNA指数(DI)。细胞激发信号以组方图形式在多道脉冲仪上显示,所得数据经计算机处理,得出DNA合成期细胞占总细胞数的百分比即增殖活力(S%)。DNA倍性均值的统计采用方差分析法。

2 结果

所测26例肺癌细胞DNA倍性为异倍体肿瘤24例,占92%,二倍体肿瘤2例占8%,刷检组DI值为1.67±0.176,活检组DI值为1.605±0.171,对照级的DI值为1.033±0.006,刷检组与活检组比无差异($P>0.05$),刷检组和活检组与对照组比相差显著($P<0.05$)。虽然活检组与刷检组相差不显著但二者高度相关($r=0.92$)。不同肺组织间的细胞增殖活力存在显著差异(见表2)。组方图见图1,2,3。

表1 不同肺组织细胞DI值

Tab 1 DNA Index of lung tissue cells among various groups

Patient groups	Cases	$\bar{x}\pm s$	P
Control groups	7	1.033±0.006	
Brushing groups	26	1.670±0.176	0.03※
Biopsy groups	26	1.605±0.171	0.02※

※: $P<0.05$ *vs* with the control

表2 不同肺组织细胞增殖活力

Tab 2 The cellular Proliferative activity of lung among various groups

Groups	Cases	$\bar{x}\pm s$	P
Control	7	8.929±1.075	
Brushing	26	26.86±2.665	<0.01※
Biopsy	26	27.136±3.725	<0.01※

※: $P<0.01$ *vs* control

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

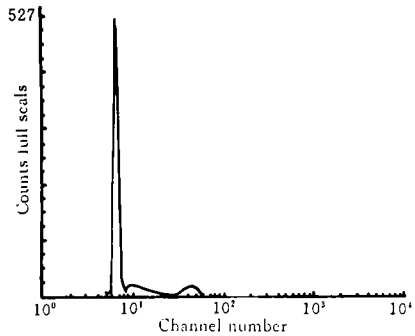


图 1　对照组 DNA 分布组方图(DI＝1)
Fig 1　DNA histogram in control groups

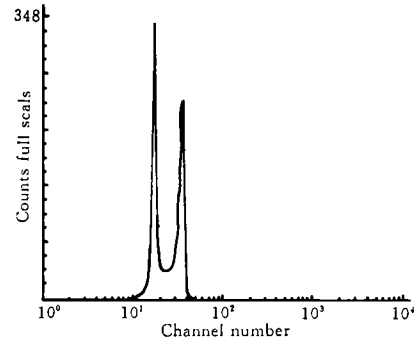


图 2　肺癌活检组 DNA 分布组方图(DI＝1.67)
Fig 2　DNA histogram of lung cancer in biopsy groups

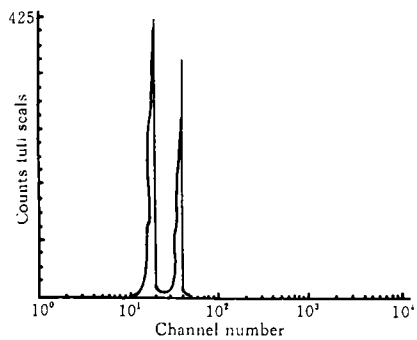


图 3　肺癌刷检组 DNA 分布组方图(DI＝1.605)
Fig 3　DNA histogram of lung cancer in brushing groups

3　讨论

有关异倍体的出现及其百分率，我院已有报道[3]，在35例肺癌石腊切片中 DNA 含量的变化，二倍体肿瘤占11.34%，异倍体肿瘤占88.57%，所有良性病变及正常肺组织皆呈二倍体改变。本研究结果提示，新鲜癌组织制备的单细胞悬液，经流式细胞仪测定其 DNA 含量，异倍体肿瘤占92%，较石蜡切片中检出异倍体高，其原因可能是使用新鲜癌组织制成单细胞悬液，及时处理及时检测 DNA 含量的缘故。这与 Barlogie 报道的恶性肿瘤91%为异倍体的结果大致相符[4]。亦与文献中新鲜癌组织较石蜡包埋组织所测 DNA 含量呈现较多异倍体的报道一致。本文对照组的 DI 值为1.033，与多数良性组织及癌旁组织的 DNA 含量均呈二倍体改变相符[5]。所以我们认为，DNA 定量分析可作为人类实体肿瘤的独特标志，异倍体的出现多提示恶性肿瘤的存在，二倍体的出现不能除外恶性肿瘤，因为本结果提示仍有8%的肺癌组织呈现二倍体改变，可能与临床化疗后，癌细胞发生生物学变化有关，有待进一步研究。由于病理证实的良性病变、正常组织、甚至癌旁组织均呈二倍体改变。由此可以认为 DI 值的异常即表明为恶性肿瘤。

本结果还提示，中心型肺癌经纤支镜刷检和活检所测 DI 值高度相关(r＝0.92)，说明在行纤支镜检查时，只要是中心型肺癌腔内型，管壁浸润型，进行刷检或活检中的任何一项检查，经流式细胞仪测定即可检出异常 DNA 含量的肿瘤细胞。就纤支镜的刷检与活检比，刷检对患者的损伤小，出血和并发症少，操作容易，可弥补管壁浸润型肺癌活检困难之不足，是一项较好的诊断措施，如结合纤支镜肉眼所见，脱落细胞检查，对支气管肺癌的早期诊断和诊断阳性率的提高将提供一条切实可行的途径，值得进一步研究。

本文研究结果还表明，癌细胞的增殖活力显著高于对照组，说明细胞的恶性程度与细胞的增殖活力有关。有证据表明，细胞的增殖活力(S%)越高，该细胞的增殖程度越大，恶性程度就越高。正常组织细胞到癌细胞其 S 期细胞增殖活力明显高于正常组织，并且 S 期细胞增殖活力及其数量的多少与患者的预后有关[7~8]。Volm 等[6]研究认为异倍体肿瘤和 S 期增殖活力高者的存活时间较二倍体肿瘤者显著缩短，肿瘤灶中 S 期细胞越多，患者的存活时间越短。故细胞周期的研究，特别是细胞增殖活力(S%)的研究，将从细胞动力学角度研究癌组织的特点，为临床提供快速有效的参数，为肺癌的诊断提供必要的帮助，甚至有助于肺癌预后的判断，显示出诱人的前景。

参考文献

1 Friedlander M, Hedley DW, Taylor IW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol, 1984; 37: 961

2 Thorud E, Fossa SD, Vaage S et al. Primary breast cancer: flow cytometric DNA Patterns in relation to clinical and histopathologic characteristics. Cancer, 1986; 57: 808

3 刘国祥，沈寒放，吴　善. 肺癌脱氧核糖核酸含量的流式细胞

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

仪分析.中华结核和呼吸杂志,1992;15:290
4 Barlogie BD, Drewinko B, Schumann J et al. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. Am J Med,1980;69:195
5 朱继江,赫明昌.实验性肺鳞癌细胞DNA含量的流式细胞术测定及细胞动力学研究.中华病理学杂志,1991;20:32
6 Volm M, Drings P, Mattern J et al. Prognostic significance of DNA patterns and resistance predictive tests in non-small cell lung carcinoma. Cancer,1985;56:1396
7 Olszewsky W, Darzynkiewicz Z, Claps ML et al. Flow cytometry of lung carcinoma A comparison of DNA stemline and cycle distribution with histology. Anal Quant Cytol,1982;4:90
8 Bunn PA, Carney DN, Gazdar AF et al. Diagnostics and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. Cancer Res,1983;43:5026

(收稿:1994-12-30;修回:1995-09-24)

A preliminary study of cellular DNA content and cytokinetics with bronchoscopic in lung cancers

Cui Shehuai, Li Caian, Zhang Weidong, Chen Zhaozhen, Shen Hanfang (Department of respiratory Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Twenty-six patients with central type of lung cancer were examined with fiberoptic bronchoscopy to obtain bronchial brushing and biopsy specimens with folw cytometric analysis of cellular DNA content and cellular proliferative capacity of lung cancer. It was found that higher level of DNA aneuploidy and significantly higher proliferative capacity were seen in the fresh lung cancer tissue than in the benign disease and normal lung tissues. Bronchial brushing is simple and less invasive technique resulting less tissue damage, bleeding and a few ccomplications and it is the technique of choice to examine the lung carcinoma with wall-infiltration, which is dificult to get the tissue specimens with biopsy.

Key words lung cancer; flow cytometry; cellular proliferative capacity

肝细胞癌抑癌基因失活和癌基因激活及其机理的研究 论文摘要

Studies of tumour suppressor gene inactivation oncogene activation and their mechanism in hepatocellular carcinoma

肖文华 刘为纹 吕有勇* (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆,630038

肿瘤的发生发展是多基因参与的多阶段过程。本实验采用Southern杂交、PCR-PFLP、PCR-SSCP和基因直接测序技术对我国西南地区肝细胞癌(HCC)多种抑癌基因失活和癌基因激活的机理进行了研究。结果表明:15例肝细胞癌中1例肝透明细胞癌Rb基因与5'端CpG岛存在高甲基化状态;41.7%的HCC存在pYNZ 22.1基因位点的高甲基化状态,该位点GpG岛过度的高甲基比与其杂合缺失(LOH)有关。61% HCC c-myc癌基因3'端散在CpG的甲基发生不同程度的丢失;伴有低甲基化的HCC具有更强的转移能力和较低的分化程度。HCC P^{53}基因杂合缺失率为61.5%(8/13),总的突变率为50%(14/28),其特点为突变散在于各外显子,但以第7外显子为主(21.4%),PCR直接测序进一步证实第7外显子突变多发生在第249位密码子G→T的颠换突变。P^{53}基因结构异常多发生在有肝内外转移、分化较差的肝细胞癌。约33.3%(4/12)的肝细胞癌存在Rb基因缺失,具有Rb基因异常的HCC同时也存在P^{53}基因结构异常。

上述资料表明:肝细胞癌的发生发展是多基因参与的过程,癌基因激活和抑癌基因失活是其发生的重要分子机理。癌其因激活和抑癌基因失活的机理是多种的,除缺失和突变外,本实验证实了DNA甲基化异常也是肝癌抑癌基因失活和癌基因激活的重要机理之一。抑癌基因P^{53}和Rb是肝癌的晚期事件,对预测肿瘤患者的预后有帮助;西南地区肝癌P^{53}基因突变特点不同于我国启东地区和日本人肝癌,该突变谱反映了西南地区肝癌病因的复杂性,可能与肝炎病毒和黄曲霉素协同作用有关。

关键词 肝细胞癌;DNA甲基化;癌基因;抑癌基因
中图法分类号 R735.7
(收稿:1995-09-22;修回:1995-10-15)

* 北京市肿瘤防治研究所 北京,100000

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