DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.018

雌激素受体和细胞核DNA含量变化与乳腺癌组织学分级的关系

姜 军 詹新思 柳凤轩* 黄朴厚 谷成明 (第三军医大学西南医院普通外科) 630038

提 要 测定45例乳腺癌雌激素受体(ER)与细胞核DNA含量。结果:ER阴性者27例,平均DNA含量45.11;ER阳性18例,DNA含量29.76。组织学分化程度Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级者ER阳性率分别为9/15、5/14和4/16;平均DNA含量分别为25.21、35.64和46.33。按临床分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期ER阳性分别为10/12、8/17和8/16;平均DNA含量分别为35.42、36.07和37.19。不同组织学类型的ER阳性率和DNA含量均无显著差别。提示:乳腺癌组织学分化程度与DNA含量和ER状态明显相关。联合DNA含量和ER测定能更准确了解乳腺癌的生物学特性,对判断预后和设计个体化辅助治疗方案可提供更可靠的依据。

关键词 乳腺肿瘤;受体,雌激素;DNA含量

中图法分类号 R737.9

雌激素受体(ER)和细胞核DNA含量是反映乳腺癌细胞分化程度的二个重要指标,对临床监测乳腺癌的预后和指导术后辅助治疗具有重要意义。本文对45例手术切除的乳腺癌标本同时检测ER和细胞核DNA含量,分析二者与乳腺癌组织学类型,分化程度及临床分期等的相互关系,探讨联合ER和DNA检测对临床治疗和监测预后的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

45例乳腺癌均为女性,年龄30~60岁,平均44.6岁。手术标本均行组织学观察,ER测定及细胞核DNA含量分析。

1.2 组织学观察方法及评分标准

1.2.1 手术切除标本经10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片厚5 μ,HE染色,常规组织学观察。

1.2.2 组织学分化程度评定:按全国统一标准[1]、浸润性非特殊型乳腺癌分级标准:(1)形成腺管程度:有多数明显腺管为1点,中度分化腺管为2点,甚少或不形成腺管为3点;(2)细胞核大小形态及染色质不规则程度:相当一致为1点,中度不规则为2点,明显多形性为3点;(3)染色质增多的核及核分裂相:每高倍视野偶有1个染色质增多的核或核分裂相为1点,多数高倍视野有2~3个染色质增多的核或核分裂相为2点,数量更多为3点。三个指标点数相加达3~5点属Ⅰ级(低度恶性),6~7点属Ⅱ级(中度恶性),8~9点属Ⅲ级(高度恶性)。

1.3 雌激素受体测定方法及评定标准

1.3.1 方法:采用Lee氏荧光组化法[2]。手术标本取肿瘤边缘无坏死区组织立即置入冰壶,于24 h内以恒冷切片机在-20~-30℃温度下切片厚5 μm,置于4℃冰箱干燥1 h,2%BSA处理1~2 s,加雌二醇荧光素结合物(对照片加无雌二醇的荧光素),温盒内孵育2 h,0.01 mol/L PBS浸洗10 min×3次,吹干后磷酸甘油缓冲液封片。以滤光片波长为495 nm的荧光显微镜观察。雌二醇荧光素与受体结合呈果绿色,对照片无荧光染色。

1.3.2 阳性评定标准:以正常乳腺导管上皮细胞所显荧光强度为标准,所测标本细胞荧光强度与之相当或超过为阳性,不及或无荧光显色为阴性。按阳性细胞数占全部上皮细胞30%以下为阴性病例,多于30%为阳性病例。

1.4 细胞核DNA染色及测定方法

1.4.1 DNA染色法(Feulgen法):手术标本以10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片厚5 μm。脱蜡后用1 mol/L盐酸在60℃温度下水解15 min,室温下蒸馏水水解2 min,浸入Schiff试剂染色90 min,亚硫酸水洗3次,每次2 min。经水洗,干燥,透明封片。DNA的脱氧核糖核酸醛基与Schill试剂反应后生成紫红色产物。

1.4.2 DNA测定及计算方法:用Leitz公司MPV-3型显微分光光度计,63倍物镜,扫描光栏0.05 mm,样品最大吸收波长560 nm,测量阈值:低=5,平均=15。选无重叠,典型完整的细胞以单波扫描法定量测定单个细胞核DNA。每例标本测定100个细胞核,同一切片中测定正常小淋巴细胞核20个,以其均值作为DNA二倍体(2C)的对照值。同步连接的电子计算机将每细胞核DNA吸光率自动换算成相对含量,即任意单位(Arbitrary unit,AU),并自动储存。

1.5 统计方法

乳腺癌雌激素受体阳性率的组间比较用秩和检验;DNA含量的组间差异用单因素方差分析;乳腺癌分化程度,雌激素受体及DNA含量的关系用相关性检验。

2 结果

2.1 乳腺癌组织学类型、分化程度及临床分期结果

45例均为浸润性非特殊乳腺癌,其中浸润性导管癌19例、单纯癌12例、髓样癌6例、硬癌4例、腺癌2例、粘液癌1例、腺瘤癌

* 本院病理科

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

变1例。组织学分组Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级分别为15、14、16例。临床分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期分别为12、17、16例。

2.2 ER 测定结果

ER 染色阴性19例，ER 阳性细胞<30% 8例，为阴性病例；>30% 18例，为阳性病例，阳性率为18/40(40%)。

乳腺癌组织分化程度与ER状态的关系见表1。组织学分级为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级者ER阳性率分别为9/15(60%)、5/14(37.5%)和4/16(25%)。统计结果显示，Ⅰ级与Ⅲ级间ER阳性率有非常显著差异($P<0.05$)，即Ⅲ级的ER阳性率明显低于Ⅰ级。

表1 乳腺癌组织分化程度与ER及DNA含量的关系

Tab 1 ER and DNA content in different differentiation grades of breast cancer

Groups	Cases	ER+	DNA content(AU)	average
grade Ⅰ	15	9	18.16～31.23	25.21
grade Ⅱ	14	5	27.88～45.88	35.64
grade Ⅲ	16	4	32.79～86.12	46.33

乳腺癌临床分期与ER状态的关系见表2。临床Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期乳腺癌ER阳性率分别为7/12(58.3%)、5/17(29.4%)和6/16(37.5%)。

表2 乳腺癌临床分期与ER及DNA含量的关系

Tab 2 ER and DNA content in different clinical stages of breast cancer

Groups	Cases	ER+	DNA content (AU)	average
stage Ⅰ	12	7	22.79～45.19	35.42
stage Ⅱ	17	5	28.85～50.97	36.17
stage Ⅲ	16	6	18.16～86.12	37.19

乳腺癌组织学类型与ER状态的关系见表3。不同组织学类型间ER阳性率无明显差别($P>0.05$)。

2.3 DNA 含量测定结果

对45例乳腺癌DNA含量测定，随着组织分化程度降低，2倍体(2c)和4倍体(4c)细胞逐渐减少，以多倍体细胞为主。以DNA相对含量(AU)计算平均值与有关临床资料进行比较。

乳腺癌组织分化程度与DNA含量的关系：Ⅰ级DNA含量为18.16～31.23，平均25.21；Ⅱ级为27.88～45.88，平均35.64；Ⅲ级为32.79～86.12，平均46.33。各组间均有非常显著差异($P<0.01$)。提示组织分化程度越低，DNA含量越高(见表1)。

乳腺癌临床分期与DNA含量的关系：临床Ⅰ期DNA含量22.79～45.19，平均35.42；Ⅱ期为28.85～50.97，平均36.07；Ⅲ级为18.16～86.12，平均37.19(见表2)。

乳腺癌组织学类型与DNA含量关系见表3。不同组织学类型间DNA含量无明显差别。

表3 乳腺癌组织学类型与ER及DNA含量关系

Tab 3 ER and DNA content in different histopathological types of breast cancer

Groups	Cases	ER+	DNA content(AU)	average
Infiltrating ductal carcinoma	19	8	26.05～48.07	33.24
Simple carcinoma	12	2	21.12～45.19	32.34
Medullary carcinoma	6	3	32.20～86.12	45.20
Scirrhous carcinoma	4	1	27.88～50.44	34.99
Mucous carcinoma	1	1	34.40	34.40
Adenocarcinoma	2	2	33.84～38.96	36.40
Adenomatous carcinous degeneration	1	1	22.85	22.85

2.4 ER 阳性与细胞核DNA含量的关系

ER阴性者DNA含量均值为45.11；ER阳性者DNA含量均值为29.76。用ER阳性细胞百分率与DNA含量进行相关性检验，显示呈明显负相关，提示ER含量越低DNA相对含量越高(见表4)。

表4 乳腺癌ER与细胞核DNA含量的关系

Tab 4 Relationship between ER and DNA content in breast cancer

Groups	cases	DNA content (AU)	average
ER+	18	18.16～44.42	29.76
ER−	27	28.85～86.12	45.11

$P<0.01$

3 讨论

传统病理学的癌分化程度是以组织和细胞形态学变化为基础，临床上多把组织学分化程度、肿瘤大小、浸润深度、脉管侵袭和淋巴结转移等临床病理学因素做为评价预后的指标。但已经注意到，某些肿瘤在临床和病理因素相似时其预后不同[3,4]。随着研究的深入，人们对形态学以外的各种因素进行广泛探索，寻找其他能够反映肿瘤预后的指标。很多作者认为雌激素受体状态和细胞核DNA含量高低是影响乳腺癌预后的重要因素[5,6]。但亦有人提出此类指标并非影响预后的独立因素，不能反映肿瘤的全面情况[7,8]。因此探索乳腺癌的形态学分化程度与雌激素受体状态和细胞核DNA含量的相互关系及其对预后的影响具有重要意义。

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

3.1　ER测定与组织分化程度的关系及其意义

近来已认识到评价任何组织的分化状态至少应包括形态学和生物学功能两个方面。乳腺作为性激素的靶器官，其生长，发育和功能均依赖性激素的支持。因此，雌激素受体(ER)的存在和功能状态在一定程度上亦代表乳腺上皮细胞的分化状态。本组所测结果显示，乳腺癌组织学分化Ⅰ级者ER阳性率60%，Ⅱ级者为37.5%，Ⅲ级为25%。ER含量与组织分化程度呈正相关，分化程度越高，受体含量越高，反之亦然。当乳腺癌细胞保留了雌激素受体，对性激素起反应，提示分化相对较好；而细胞中ER含量越低，以至完全丧失ER成为性激素非依赖性肿瘤则分化较差，预后不良[6]。提示乳腺癌ER含量高低可进一步从生物学功能方面反应肿瘤细胞的分化状态。

3.2　细胞核DNA含量测定与组织分化程度的关系

细胞核DNA是细胞遗传物质染色质的基础成份，癌细胞的染色体在数量，结构和遗传特性等方面均可有明显的变化。DNA含量增加提示细胞处于S期DNA合成增多，生长活跃；异型性明显，异常增殖活跃的恶性肿瘤细胞DNA含量异常增加，出现多倍体和非整倍体。对人和动物的研究均证实检测DNA含量做为重要的生物学指标，对于提示预后具有重要意义[9,10]。本组结果显示，在不同组织学分级的乳腺癌中，不同倍体的细胞比例随分级改变而异，其基本规律是：癌细胞分化程度越降低2c和4c细胞相对减少，多倍体细胞增多且以多倍体细胞为主。以DNA相对含量表示，组织学分级Ⅰ级者DNA均值为25.10，Ⅱ级为35.64，Ⅲ级为46.33。各组间相差非常显著($P<0.01$)。提示乳腺癌细胞的分化程度与DNA含量呈负相关。即乳腺癌组织分化越低，DNA含量越高，恶性程度亦较高。

3.3　乳腺癌组织分化程度与ER状态、DNA含量的关系及其临床意义

把乳腺癌的病理组织学分级作为其形态学分化程度，ER状态和DNA含量看作生物学分化程度，将三者相关性检验的结果进行分析，其基本规律为：乳腺癌组织分化程度较高者，其细胞核DNA含量较低，而ER阳性率较高；而组织学分化低者，其DNA含量较高而ER阳性率低，具有一定规律性。同时亦不难看出无论组织学分级高低均有ER阴性者；组织学分级相同的乳腺癌其DNA含量可有较大差别，在相邻的组织学分级中DNA含量有重叠现象，而并不准确对应。因此我们认为，其相互间并不能替代，而是各自反映了乳腺癌分化程度的不同方面。就临床意义而言，ER和细胞核DNA含量测定可作为形态学分析的补充，更全面的了解肿瘤的生物学行为。结合肿瘤的临床分期更能有助于判断病人预后，合理安排手术方式以及辅助治疗程序的设计，提高治疗效果。

参考文献

1 李树玲.乳腺癌.见 中华人民共和国卫生部医政司编.中国常见恶性肿瘤诊治规范，第八分册，北京：北京医科大学中国协和医科大学出版社，1991：25～58

2 Lee SH. Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. Am J Clin Pathol，1980，73：323

3 李志霞，西川真史，信田重光.结肠癌细胞核DNA含量与预后关系的探讨. 中华外科杂志，1993，31(11)：648～649

4 姜　军，詹新恩，傅晓岚，等.乳腺癌术后长期存活及二年内复发者DNA含量分析.普外基础与临床，1994，1(1)：39～42

5 Kakkinoiemi OP，Blanco G，Alavaikko M，et al. Improving the prognostic value of DNA flow cytomtry in breast cancer by combining DNA index and S－phase fraction：a proposed claaification of DNA histograme in breast cancer. Cancer，1988，62(10)：2183

6 Fisher ER. Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. Cancer，1980，45：349

7 Noguchi M，Koyasaki N，Ohta N，et al. Internal mammary nodal statue is a more reliable prognostic factor than DNA ploidy and C－erb B2 expression in patients with breast cancer. Arch Surg，1993，128(2)：242

8 Beerman H，Kluin PM，Hermans J，et al. Prognostic significance of DNA ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. Int J Cancer，1990，45(1)：34

9 Cornelisse CL，Van de Velde CJH，Caspers RJC，et al. DNA ploidy and survival in breast cancer patients. Cytometry，1987，8：225

10 Minke JMHM，Cornelisse CJ，Stolwijk JAM，et al. Flow cytometric CAn ploidy analysis of feline mammary tumors. Cancer Res，1990.50：4003

(收稿：1994-11-10；修回：1995-01-05)

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

The relationship of estrogen receptors and nuclear DNA content with the histological grading of breast cancer

Jiang Jun, Zhan Xinen, Liu Fengxuan, Huang Puhou, Gu Chengming (Department of General Surgery and Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The density of estrogen receptors (ER) and nuclear DNA content were determined in 45 cases of breast cancer. It was found that ER negative was found in 27 cases with an average DNA content of 45.11 and ER positive in 18 cases with an average DNA content of 29.76. In the cases with a histological diffferentiation grade Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ, the ER positive rate and average DNA content were 60% and 25.21, 31.4% and 35.64 and 25% and 46.33 respectively. The increase of ER positive rate and the decrease of DNA content occurred along with the progress of the clinical stages of breast cacner but no similar relationship was found as the histological type of breast cancer was concerned. So, it can be concluded that the density of ER and DNA content were well correlated with the histological differentiation grading of the cancer. The biological features of breast cancer can be accurately assessed with the determination of ER density and DNA content, which ca provide a more reliable basis for the prognosis and the planning of an individualized postoperative management for the patient.

Key words breast neoplasms; receptors, estrogen; DNA content

严重烧伤后胃粘膜损害发生机制的实验研究*

An experimental study on the pathogenesis of gastric mucosal lesions following severe burn injury

张 超 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学西南医院烧伤研究所) 630038

应激性溃疡是烧伤、创伤、严重感染,休克等危重病症的常见并发症和主要致死原因之一。胃粘膜屏障功能损害是应激性溃疡发生的关键因素。有关严重烧伤后胃粘膜屏障功能损害的发病机理尚不十分清楚。本实验对烧伤后胃粘膜屏障功能的改变,以及缺血再灌流损伤、某些细胞因子和炎症介质、胃酸和胃泌素以及糖皮质激素受体变化在烧伤后胃粘膜损害中的作用进行了研究。主要结果如下:

(1)严重烧伤后胃粘膜结合粘液量和粘液内粘蛋白含量明显下降,胃液内溶解性粘脉显著增多,H^+逆弥散量和Na^+净流出量显著增多,胃粘膜组织内pH明显低于对照组,胃粘膜电位差显著下降。伤后胃粘膜出现一系列损伤性病理改变,表明烧伤早期胃粘膜屏障功能及胃粘膜均已受损。

(2)严重烧伤后胃粘膜血流量显著下降,胃粘膜组织中Na^+-K^+-ATP酶活性及ATP、ADP含量明显降低,而胃粘膜组织中AMP含量却显著升高,导致胃粘膜细胞能量负荷显著下降,能量代谢发生严重障碍。伤后血浆及胃粘膜组织MDA含量和组织蛋白D活性显著升高,而SOD活性显著降低。随着胃粘膜血流量的下降,胃酸排出量显著降低($r=0.92$, $P<0.01$),血清胃泌素含量显著升高。

(3)严重烧伤后血浆和胃粘膜组织中ET、TNF含量明显升高,血浆AⅡ和IL-8含量伤后也显著升高,这些细胞因子和炎症介质与胃粘膜结合粘液量改变呈显著负相关,而与H^+逆弥散量则呈显著正相关,表明它们参与了烧伤后胃粘膜损害的发病过程。烧伤后胃粘膜PGE_2含量明显降低,导致胃粘膜自身保护机制削弱。

(4)严重烧伤后血浆皮质醇水平明显升高,胃粘膜细胞胞浆中糖皮质激素受体(GCR)数目明显减少,与糖皮质激素结合的亲和力下降,使糖皮质激素与受体的结合显著减少。

综上所述,烧伤后早期胃粘膜屏障功能严重受损,其发生机理与烧伤后缺血再灌流损伤和失控性炎症反应密切相关。胃粘膜细胞能量代谢障碍可直接引起胃粘膜细胞损伤,氧自由基、ET、AⅡ、TNF、IL-8及组织蛋白酶D在伤后胃粘膜损伤中起重要作用,因粘膜屏障功能受损所致的H^+大量逆流是造成胃粘膜损伤的关键因素,伤后胃酸分泌及胃泌素增高对胃粘膜有加重损伤作用;伤后胃粘膜PGE_2减少和GCR的减少及与GC结合的亲和力降低,促进了胃粘膜损伤的发生。

关键词 溃疡;灼伤;胃粘膜/损伤;能量代谢;细胞因子;受体,糖皮质激素

中图法分类号 R644

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39290700

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