DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.05.007

DNA-RNA 双参数定量分析在早期诊断喉鳞癌中的意义

梁 力 马惟力 (第三军医大学西南医院耳鼻喉科) 630038

提 要 本文采用计算机辅助图象分析,对 33 例喉鳞状上皮轻度增生、声带息肉、不典型增生Ⅰ～Ⅱ级和喉鳞癌进行了核面积、核仁面积、核 DNA 及核仁 RNA 相对含量的测定。结果显示:DNA-RNA 含量,细胞核面积、核仁面积变化与病变程度一致,RNA 参数在不典型增生Ⅰ、Ⅱ级阶段有明显增加,与 DNA 参数结合分析,可作为喉癌癌变阶段的监测指标。

关键词 脱氧核糖核酸/分析;核糖核酸/分析;癌,鳞状细胞;喉肿瘤/诊断

流式细胞计量术(Flow Cytometry, FCM)或图象分析技术(Imagenanalysis)定量检测细胞核 DNA 含量对肿瘤进行早期诊断已有肯定的报道[1]。但对某些低度恶性的 2 倍体或近 2 倍体肿瘤及癌前增生癌变阶段的判定,DNA 参数分析常常受到假阴性的影响,如加用 RNA 作为第二参数可大大提高肿瘤的早期诊断率。本文采用图象分析技术进行 DNA-RNA 双参数及部份形态参数测定,以监测喉鳞状上皮由轻度增生、不典型增生到喉鳞癌期,细胞生物化学特征的动态改变,以期为早期诊断喉癌提供新的参考依据。

1 材料与方法

材料系随机抽取我院 1986 年至 1990 年间均经病理证实的临床病例标本,共 33 例皆为男性;其中慢性炎症伴轻度增生(简称轻度增生)4 例;声带息肉 8 例,不典型增生Ⅰ、Ⅱ级各 3 例,Ⅱ级 2 例,喉鳞癌 13 例。每例涂片 8 张,除 2 张行常规 HE 染色外,余各取 3 张分别行 Feulgen 和 Pyronine 染色。

应用 Olympus BH-2 PM-10AD 型显微相机,在相同条件下(富士 HR-100彩胶、放大倍数400倍),对每张行 Feulgen 或 Pyronine 染色切片,按每视野含鳞状上皮细胞或病变细胞30～40个或间质淋巴细胞60～100个拍彩照一张,共198张,一次拍摄、冲洗完成待测。

采用理光 IS-Ⅱ型图像扫描仪和 TX-3型图像处理系统分别测定彩色样片中细胞核、核仁面积及核 DNA、核仁 RNA 含量(以随意单位 AU 表示);其中每例含病变细胞60～80个,同时测定间质淋巴细胞11例共800个,正常鳞状上皮细胞13例共600个,分别作为正常细胞形态参数、RNA 值和2倍体细胞 DNA 含量标准;并据1980年国际分析细胞学会公布方案[2]计算 DNA 指数(DNA Index, DI)所得诸结果列表进行统计学处理,并绘制有关直方图和线图。

2 结果

2.1 细胞形态参数变化

细胞核面积、核仁面积随病变程度加重而逐渐增大;轻度增生病变细胞核面积、核仁面积与正常鳞状上皮细胞核面积、核仁面积间均无明显差异($P>0.05$);核面积、核仁面积自不典型增生阶段与正常鳞状上皮细胞间比较,均有明显增加($P<0.05$～0.01)(见表1)。

表1 喉粘膜不同病变细胞核及核仁面积比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of nuclear and nucleolar area of various laryngeal mucosal changes

Cell degree	Nuclear area (S_1)		Nucleolar area (S_2)		S_2/S_1 (%)
Normal squamous cells	102.94±20.04	$n=600$	4.96±1.94	$n=600$	4.79±1.24
Hyperplastic	104.47±12.19△	$n=310$	5.14±1.49*	$n=288$	4.96±1.02
Glottic polypus	109.66±47.96	$n=495$	5.49±2.06	$n=485$	5.01±0.94
Dysplastic	163.09±34.54	$n=615$	13.12±5.12	$n=570$	8.06±1.84
Laryngeal squamous carcinoma	210.13±71.09	$n=910$	16.87±5.98	$n=845$	10.14±2.31

n = cell number; △ $P>0.05$ compared with normal squamous cells and glottic polypus; * $P>0.05$ compared with normal squamous cells.

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

2.2 DNA-RNA 相对含量及分布

核 DNA 相对含量从轻度增生、声带息肉、不典型增生到喉鳞癌，随病变级别的增高、细胞异型性的增大而增加；在不同病变的各组 DNA 含量与正常淋巴细胞比较均有非常显著的差异（$P<0.01$），不典型增生Ⅱ级与喉癌细胞比较 DNA 相对含量已无多大差别（$P>0.05$）。与 DNA 含量变化相应，DI 渐增大，波动范围增宽（表2）；DI 分布更为弥散、峰值右移、变低直到消失。而淋巴细胞则有明显正常的 DI 峰值。从不典型增生Ⅰ、Ⅱ级始出现高 DI 值，在喉癌病变组中，DI 值最高达8以上，且无明显的峰值。

表2 喉粘膜不同病变细胞核 DNA 含量分析

Tab 2 Analysis of nuclear DNA contents of various laryngeal mucosal changes

Degree	Number	DNA （$\bar{x}\pm s$）	$DI_{\bullet}$（$\bar{x}\pm s$）
Lymphocytes	800	84.4554± 6.6852	0.92～1.19 (1.01±0.91)
Hyperplastic	310	169.4893±39.1245	1.18～2.81 (2.02～0.81)
Glottic polypus	495	176.2527±24.4126	1.04～3.10 (2.09±1.04)
Dysplastic Ⅰ	235	188.1721±38.3364	1.94～3.20 (2.41±0.46)
Dysplastic Ⅱ	215	211.2146±48.4629	2.50～4.60 (3.55±0.93)
Dysplastic Ⅲ	165	244.0134±59.5612△	2.60～5.60 (3.72±1.20)
Laryngeal squamous carcinoma	910	249.6537±73.2614	2.10～8.29 (4.60±3.24)

△$P>0.05$ compared with laryngeal squamousc carcinoma; There are significant differences each other in the rest.

核仁 RNA 相对含量在轻度增生和声带息肉与正常鳞状上皮细胞间无明显差异（$P>0.05$）；不典型增生及喉鳞癌病变细胞核仁 RNA 含量显著增加，两者间及与正常鳞状上皮细胞、声带息肉、轻度增生病变均有明显的差异（$P<0.01$），超正常细胞 RNA 值上限细胞率（COULN）也随病变程度加重而增加；从不典型增生Ⅰ级开始，RNA 量及 COULN 增加明显，并与正常鳞状上皮细胞，轻度增生、不典型增生Ⅰ级间存有明显的差异（$P<0.01$）（表3）；RNA 量分布线图表明：鳞状上皮细胞、轻度增生，声带息肉、不典型增生Ⅰ级病变细胞均有正常或似正常的对称 RNA 峰值；不典型增生Ⅱ、Ⅲ级及喉癌病变细胞核仁 RNA 值分布呈不对称、双峰、多峰分布。

表3 喉粘膜不同病变细胞核仁 RNA 含量

Tab 3 Nucleolar RNA contents of various laryngeal mucosal changes

Degree	Number	RNA （$\bar{x}\pm s$）	COULN （n）
Lymphocytes	600	9.9214±2.3464	0.83 (5)
Hyperplastic	288	9.9412±3.6214	3.47 (10)
Glottic polypus	485	10.2600±3.2119	5.98 (29)
Dysplastic Ⅰ	215	10.4731±2.9324	9.76 (21)
Dysplastic Ⅱ	200	23.3964±4.8236△	33.50 (67)
Dysplastic Ⅲ	155	25.2156±7.3415△	40.00 (62)
Laryngeal squamous carcinoma	845	27.3146±9.7543△	56.69 (479)

△ No significant difference each other, but $P<0.01$ compared with normal squamous cells, hyperplastic, glottic polypus, and dysplastic Ⅰ; n =cell number.

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

2.3 直线相关分析

DNA-RNA 相对含量与核面积、核仁面积间在轻度增生至喉癌细胞间均有非常显著的正相关性(图1,2)。

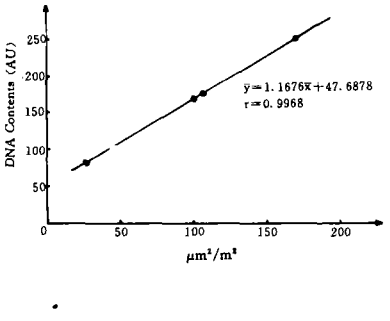


图1 不同病变细胞 DNA 含量与核面积直线相关分析 ($P<0.001$)

Fig 1 Analysis of linear correlation between nuclear DNA contents and nuclear area of various changes ($P<0.001$)

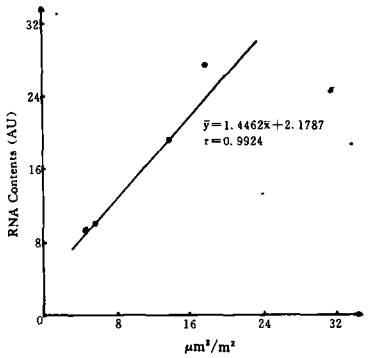


图2 不同病变细胞 RNA 含量与核仁面积直线相关分析 ($P<0.001$)

Fig 2 Analysis of linear correlation between nucleolar RNA contents and nucleolar area of various changes ($P<0.001$)

3 讨论

Loveff[3]认为:①DNA 含量在细胞周期中不同时相各不相同,但可以预知;②DNA 能与某些荧光素或染料特异结合,其结合力或染色深度与 DNA 量成正比;③正常细胞为2倍体或整倍体,而肿瘤细胞倾向于形成非整倍体或多倍体。且 DNA 含量可作为肿瘤级细胞的一种重要标志。这些理论为 DNA 的定量研究奠定了基础。然而,单测 DNA 含量有一定的局限性[4,5]。本文结果表明:加用 RNA 参数,能弥补单参数 DNA 分析的不足,对喉癌早期诊断具有重要的意义。

3.1 DNA-RNA 含量变化

研究显示:喉鳞状上皮细胞从正常、增生到癌,DNA-RNA 量随病变程度加重而增加;DI 波动范围也渐增宽,均值增大,非整倍体指数细胞增多,分布弥散及出现高指数细胞;可见 DNA 含量分布分散、峰值右移、减低或消失;出现非整倍体细胞和高倍体细胞群;而 RNA 量却从正常高斯分布,渐变的峰值不对称或出现双峰、多峰;COULN 也渐增大,而淋巴细胞和正常鳞状上皮细胞均有正常的 DI 和 RNA 峰值。轻度增生和声带息肉病变 DI 均在2.0附近,说明 DNA 量分布皆为近4倍体型,RNA 峰值分布也与正常无多大差别。表明该阶段由于细胞增生活跃,进入细胞周期的细胞增多,但主要为 S 期细胞和部份 G_2M 期细胞,故 DNA 量增加较明显而 RNA 量变化不大。也说明在该阶段虽有异形细胞出现,但总体上仅是染色质量的变化,尚无质的异常。

不典型增生是癌前鳞状上皮内瘤(Squamous Intraepithelial Neoplasia,SIN)形成的重要标记,表现为逐渐增多的非整倍体细胞[6]。实验表明:自不典型增生 I 级阶段出现超4倍体(DI>2.0)的非整倍体指数细胞到不典型增生 II 级 DI 峰右移、减低,至 III 级峰值几近消失,并出现超 DI 5的高指数细胞。不典型增生 I、II 级的这种具有与原位癌

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

DNA 核型非常相似的特征，业已为其它学者发现[7]，并被证明是肿瘤形成最客观的证据[8]。但单参数 DNA 分析并不能真实反映肿瘤的性质和临床分期[9]，超过4倍体范围，形态学上呈重度或更明显异型性的细胞，也仅能作为癌源性细胞变化的一个指征[10]。本文 RNA 量测定显示：RNA 及 COULN 在不典型增生Ⅰ级才有明显的增加，Ⅲ级 COULN 高达40%，并出现不对称 RNA 值峰和双峰；按 Klein[4]和 Barlogie[5]诊断恶性瘤标准，在此阶段 RNA 值不但分布不对称，且有额外峰分布，COULN 也远大于10%的界限。以 DNA-RNA 双参数分析，在不典型增生Ⅰ、Ⅲ级阶段，不但 DNA、RNA 量出现明显量变，而且发生了染色体质的突变，它们在核及核仁面积的增大，核 DNA 量，DI 分布；核仁 RNA 量及分布，COULN 等方面均与喉癌细胞具有一定共性。因此，我们认为不典型增生Ⅰ、Ⅲ级可能是关键的癌变阶段。

3.2 核面积、核仁面积变化

肿瘤细胞与正常细胞最大的差异就是具有明显的异型性。我们发现：喉鳞状上皮细胞从正常、增生到癌，细胞形态、胞核异型性亦随病变程度加重而明显增大；值得注意的是：核面积、核仁面积在声带息肉阶段分别出现了截然不同性质的变化，核仁与核面积比略有增加，说明核仁形态变化出现较核为早而明显，这一现象可能为核仁 RNA 量早期飞跃性变化找到形态学依据。

3.3 核形态参数变化与DNA-RNA含量变化关系

目前诊断喉癌是按细胞形态学改变进行诊断的。直线相关分析显示：在轻度增生至喉癌的各级病变的细胞间，核面积与核 DNA 量，核仁面积与 RNA 量均呈显著的正相关。表明随着增生程度的加重，核异型性的增加，DNA 及 RNA 量亦逐渐增大。从本研究结果来看，目前病理分级尚属合理。能否在此基础上，结合 DNA-RNA 双参数分析，对喉鳞癌的真正癌变阶段做出明确判断，值得商榷。

参考文献

1. Czerniak B, Herz F, Koss LG, et al. DNA distribution patterns in early gastric carcinomas. A feulgen cytometric sutdy of gastric brush smears. Cancer, 1987; Jan59(1): 113
2. 周维安 景尚华 林元珠，等。喉癌细胞 DNA 含量与其临床行为关系。中华耳鼻咽喉科杂志，1991; 26(3): 162
3. Loveff EJ, Schnitzer B, Keren DF, et al. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Lab Inves, 1984; 50: 115
4. Klein FA, Melamed MR, Whitmore WF, et al. Characterization of bladder papilloma by two-parameter DNA-RNA flow cytometry. Cancer Res, 1982; 42(3): 1094
5. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res, 1983; 43(9): 3982
6. Crissman JD, Richard JZ, Zarbo, et al. Quantitation of DNA ploidy in squamous intraepithelial neoplasia of the laryngeal glottis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1991; 117(2): 182
7. Bibbo M, Dytch HE, Alenghat E, et al. DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. Am J Clin Pathol, 1989; 92: 261
8. Naslund I, Rubio CA, Auer GU. Nuclear DNA changes during pathogenesis of squamous carcinoma of the cervix in 3, 4-benzopyrene treated mice. Anal Quant Cytol Histol, 1987; 9: 411
9. Thorud E, Fossa SD, Vaage S, et al. Primary breast cancer. Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. Cancer, 1986; 57(4): 808
10. Konaka C, Auler G, Nasiell M, et al. Pathogenesis of squamous bronchial carcinoma in 20-Methlecholanthrene-treated beagle dogs. Anal Quant Cytol, 1982; 4(1): 61

（收稿：1992-11-26；修回：1993-08-24）

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

The significance of DNA-RNA double parameter quantitative analysis in the early diagnosis of laryngeal squamous cell carcinoma

Liang Li, Ma Weili (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The relative content of DNA-RNA and the nuclear area/nucleolar area ratio of the hyperplastic tissue, glottic polypus, dysplastic tissue of grade Ⅰ to Ⅱ laryngeal squamous cell carcinoma were measured in 33 cases with image analysis technique. It was found that the changes of DNA-RNA content and the ratio of nuclear/nucleolar area were parallel to those of the severity of the carcinoma, and RNA was markedly increased in grade Ⅱ and Ⅱ dysplastic tissue. On the basis of the current grading of laryngeal pathology, the combined determination of DNA-RNA can provide more sensitive indicators to the stages of malignant degeneration of the laryngeal squamous cell carcinoma.

Key words DNA/AN; RNA/AN; carcinoma, squamous cell; laryngeal neoplasms/DI

氟哌酸滴丸治疗急、慢性中耳炎疗效观察

刘碾记 范文汉 赵洪进 (第三军医大学西南医院耳鼻喉科) 630038

急、慢性中耳炎是耳科常见病，我科1991年4月～1992年8月以氟哌酸滴丸治疗急、慢性中耳炎58例，将资料较完整的50例分析如下：

1 临床资料

50例中男性28例，女性22例，年龄最小5岁，最大46岁，平均25岁；病程3 d～15年。检查：单纯鼓膜充血5例，鼓膜紧张部穿孔、溢脓42例，其中慢性中耳炎急性发作33例；乳突根治术后中耳乳突腔积脓3例。脓液培养34例，其中肺炎球菌19例，缘脓杆菌5例，大肠杆菌4例，溶血性链名球菌2例，变形杆菌2例，金黄色葡萄球菌1例，无细菌生长1例。

1.1 处方组成

由我院药局通过筛选载体基质，处方设计及反复试制，确定处方组成为：氟哌酸和基质混匀后制成丸剂，每丸平均重30mg，含氟哌酸7mg。

1.2 治疗方法

将外耳道、中耳腔或乳突腔分泌物揩净，置氟哌酸滴丸1～2粒，3～5 d 复诊，如仍有脓，还可继续放置。

2 治疗效果

2.1 评定疗效标准

2.1.1 痊愈：局部炎症消失，流脓停止。

2.1.2 好转：局部炎症减轻，流脓明显减少。

2.1.3 无效：症状和体征无改善。

2.2 疗效

50例中，放置1次21例，2次23例，3次6例。痊愈41例(82%)，好转8例(16%)，无效1例(2%)，总有效率98%。

3 典型病例

例1 患者女，36岁。因胆脂瘤型中耳乳突炎行乳突根治术，术后中耳乳突腔长期流脓，脓液培养为绿脓杆菌，用3%双氧水揩拭后，中耳乳突术腔放

(下转 425 页)

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