DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.02.015

技术与方法

卵巢浆液性囊腺瘤细胞DNA的显微分光光度计镜扫描测定

李才安 张邦斐 傅晓岚 （训练部 中心实验室）

测定细胞DNA用生物化学方法必须把DNA分离提纯，然后才能定量测定。由于分离提纯步骤多，操作复杂，不易掌握。用显微分光光度计，可直接在光学显微镜观察的标本上对单个细胞进行DNA定量测定[1]。标本制作简单，测定迅速，操作方便，用电子计算机进行程序控制，测量精度高，数据可靠。但测量方法大多采用静态测量法，如一波双区法，双波一区法，点测量法等以减少大部分的测量分布误差。这些方法测量的精度不高，准确性较差。用扫描法测量细胞DNA也只局限于机械台扫描。本文报道用镜扫描法定量测定人卵巢浆液性囊腺瘤细胞DNA的相对含量，为从形态学定性染色难于判定的病理诊断和监测提供一个可靠的指标及方法。

材料与方法

标本取自重庆医科大学附属一院病理科1973～1985年收检的人卵巢浆液性囊腺瘤30例，分为良性浆液性囊腺瘤组、浆液性交界瘤组、浆液性囊腺癌组，每组各10例。均系经病理学检查确诊进行分组。标本为石蜡包埋切片，厚度为4μm，用Feulgen染色，制成待测的显微镜观察标本[9]。

Leitz MPV-3型显微分光光度计，配用PDP-11/03型电子计算机，使用FORTRAN语言，选用光谱扫描程序SPCTR2.SAV和吸光率测量程序CELANB.SAV，采用镜扫描法进行样品光谱扫描和吸光率测量，物镜用63倍，扫描光栏为0.05，样品最大吸收波长为560nm，测量灯电流为8A，光电倍增管（型号为9658A）负高压为950V，测量阈值（Threshold）Low=15，Mean=20。测量的结果数据存入电子计算机，经电子计算机数理统计处理，由打印机打印出测定结果。

每张石蜡切片随机测定100个肿瘤细胞，测25个正常纤维细胞作2C标准对照值。定量测定DNA的面积和总吸光率值，都以任意单位（Arbitrary units）表示。以正常纤维细胞DNA含量的均值为2C对照值，然后画出三种肿瘤细胞DNA频数分布图[5]。

测量结果

本实验一共测了46例，计1150个正常纤维细胞，其DNA均值为11.96±3.87，标准差3.87，标准误为0.12，变异系数32.36%。以此值（11.96±3.87）为正常标准2C DNA对照值，再与三种肿瘤细胞所测得的DNA含量进行比较。

浆液性良性瘤、浆液性交界瘤和浆液性囊腺癌各10例，每一例测定100个肿瘤细胞，每个细胞测量DNA的面积和总吸光率值，然后分别取其均值作为每一例患者肿瘤细胞DNA面积和总吸光率值的原始数据。三种肿瘤细胞DNA面积和总吸光率值测定结果列于表1。

结果表明：卵巢浆液性良性瘤与卵巢浆液性交界瘤之间、卵巢浆液性交界瘤与卵巢浆液性囊腺癌之间以及卵巢浆液性囊腺癌与卵巢浆液性良性瘤之间DNA总吸光率值，DNA的面积进行方差齐性检验，均呈非常显著的差异（$P<0.01$）。

三种卵巢肿瘤细胞DNA吸光率值，以正常纤维细胞DNA吸光率值的均值（11.96±3.87）为标准2C对照值进行比较，其结果如附图所示：

附图的结果表明：卵巢浆液性良性瘤细胞DNA绝大部分为4C，而2C和6CDNA只占少数；卵巢浆液性交界瘤细胞DNA大部分为4C～6C，并有少

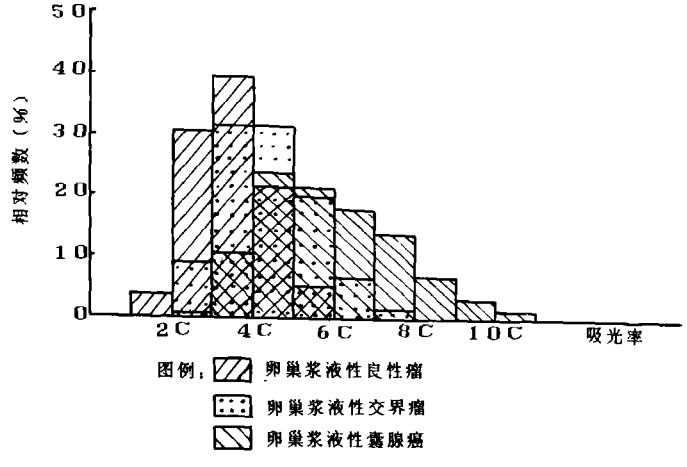
?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　三种肿瘤细胞DNA测定结果

（一组）卵巢浆液性良性瘤			（二组）卵巢浆液性交界瘤			（三组）卵巢浆液性囊腺癌		
标本号	面积均值（100个细胞）	吸光率均值（100个细胞）	标本号	面积均值（100个细胞）	吸光率均值（100个细胞）	标本号	面积均值（100个细胞）	吸光率均值（100个细胞）
1	35.93	16.83	11	59.65	21.77	21	70.98	35.92
2	55.46	20.55	12	57.43	27.41	22	68.14	29.18
3	46.01	17.61	13	47.03	27.66	23	69.71	36.63
4	44.91	21.02	14	62.82	29.10	24	72.51	37.02
5	43.67	18.40	15	58.39	25.81	25	65.50	28.95
6	49.87	25.31	16	62.28	24.20	26	71.40	36.84
7	41.37	19.10	17	61.01	23.83	27	79.05	38.36
8	52.66	22.41	18	58.14	22.43	28	73.39	32.89
9	54.69	24.49	19	65.67	29.63	29	82.53	40.57
10	42.98	19.19	20	62.44	28.85	30	83.88	37.58

注：DNA吸光率
一组与二组比较$P<0.01$
一组与三组比较$P<0.01$
二组与三组比较$P<0.01$

DNA面积
一组与二组比较$P<0.01$
一组与三组比较$P<0.01$
二组与三组比较$P<0.01$



附图　三种肿瘤细胞DNA吸光率频数分布图

显8C DNA出现，卵巢浆液性囊腺癌细胞DNA中6C以上的高倍体DNA显著增加。三种肿瘤细胞DNA含量随着癌变分化程度的增加而增加，多倍体DNA成分也随着明显增加。

讨　论

一、良性肿瘤细胞与恶性肿瘤细胞DNA含量上存在差异已得到公认，因而可作为鉴别良性肿瘤和恶性肿瘤很有价值的客观指标。本实验结果表明，卵巢浆液性良性瘤与交界瘤细胞DNA含量之间有非常显著的差异（$P<0.01$）；而卵巢浆液性交界瘤与浆液性囊腺癌细胞DNA含量之间也有非常显

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

著的差异（$P<0.01$）。这说明细胞从良性到恶性随着癌变程度不断加深，DNA含量也随着显著增加。DNA的面积也随着显著增大。三种肿瘤细胞DNA含量的频数分布图也表明，卵巢浆液性良性瘤细胞DNA含量比正常纤维细胞DNA的含量要高（以正常纤维细胞DNA含量的均值11.96±3.87为标准2C对照值），绝大部分为4C DNA，说明DNA已经增生，是轻度增生；卵巢浆液性交界瘤处于良性瘤与恶性瘤之间，DNA分化增生加快，大部分为4C～5C DNA，6C DNA明显增加，还出现少数8C DNA，说明有一定数量的癌变细胞存在。而在卵巢浆液性囊腺癌细胞中，绝大部分为5C～8C DNA，大于8C DNA的高倍体细胞也占相当的数目，说明癌变与多倍体DNA相关。

二、Leitz MPV-3型显微分光光度计是目前国际上最新型的一种分析测量仪器。运用这种仪器定量测定生物细胞中某种特定物质的相对含量，已成为定量细胞化学重要的分析手段之一[7][10]。近几年来，已有不少文献报导细胞DNA相对含量的测定[2][4][5]。他们大多采用光密度计或机械台扫描法测量细胞核中DNA的含量[3][8]。由于机械台移动一步的距离为0.25μm，因而测量精度不高。

本文应用Leitz MPV-3型显微分光光度计，采用更先进的镜扫描法，扫描步距可达0.11μm，因而测量更精确。镜扫描还有灵敏度高，选择性好，容易操作，结果输出指标多，自动化程度高等优点。是定量测定细胞DNA相对含量较为理想的一种测量方法，适用于临床监测和理论研究[6]，和区分良恶性、交界性肿瘤的参考指标。

参考文献

1. Longmore R. Nuclear Area and Feulgen DNA Content of Normal and Abnormal Oral Squames. Analytical and Quantitative Cytology 1982; 4(1):33
2. Harms H. Characterization of Coronavirus-infected Tissue Cultures by Computer-aided Cytophotometry Analytical and Quantitative Cytology 1981; 3(1):21
3. Wied C. Rapid Hish-Resolution Cytometry. Analytical and Quantitative Cytology 1982;4(4):257
4. Thorslein E. Diagnostic Application of Nuclear DNA Measurements on Bronchial Secretions. Analytical and Quantitative Cytology 1982;4(4):269
5. Wollmer W. Scanning Microfluorometric Measurements of Acriflavine-Feulgen-SITS-Stained Fibroblasts during GO-G1 Transition. Analytical and Quantitative Cytology 1981;3(4):305
6. Pak H Quantitative DNA Determinations by Image Analysis I. Application to Human Pulmanary Cytology Analytical and Quantitative Cytology 1982; 4(2):95
7. Nicolo G. Cytophotometric Analysis o the Nuclear Uptake of Adriamycin in Vivo Normal Mouse Liver and Kidney Cell. Analytical and Quantitative Cytology 1982;4(4): 295
8. Bohm N. Fluorescence Cytophotometry; A valuable method for the Quantiative Determination of Nuclear Feulgen DNA. Histochemie 1968;16:100～118.
9. Seppelt U. Investigation of Automated DNA Diagnosis and Grading of Prostatic Cancer. Analytical and Quantitative Cytology and Histoloog 1986;8(2):152

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net