

新鲜肺癌组织的 DNA 含量分析

李英女 杨宁江

(吉林医药学院附属医院病理科 132013)

摘要 目的:研究新鲜肺癌组织的 DNA 含量。方法:采用流式细胞术对 30 例新鲜肺癌组织和 5 例正常对照组组织制成的单细胞悬液进行了 DNA 含量分析。结果:肺癌组 G₀/G₁、S、G₂/M 各时相比率和细胞增殖指数以及 DNA 指数与对照组存在显著性差异($P < 0.01$)。结论:肺病变组织细胞 DNA 的流式细胞术分析是判定肺部肿瘤恶性的敏感指标。

关键词:新鲜组织;肺癌;流式细胞术

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A

Flow cytometric analysis for DNA levels in fresh tissues of lung carcinoma

LI Ying - nu, YANG Ning - jiang

(The Affiliated Hospital, Jilin Medical College, Jilin city 132013, Jilin, China)

ABSTRACT Objective: To Study the DNA levels in fresh tissues of lung carcinoma. **Methods:** We analyzed the single - cell suspensions of 30 fresh lung carcinoma tissues and 5 normal tissues of control group to get their DNA levels by using flow cytometry. **Results:** There were statistical differences in the rates of G₀/G₁, S, and G₂/M, proliferative indices and DNA indices between lung carcinoma group and control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Flow cytometric analysis for cellular DNA levels of lung tumour is a sensitive marker on examining malignant change of lung tumours.

Key words: Fresh tissue; Lung carcinoma; Flow cytometry

流式细胞术(Flow cytometry, FCM)是测定 DNA 含量的一项新技术,目前已经比较广泛地应用于肿瘤的诊断中^[1,2]。为了研究新鲜肺癌组织的 DNA 含量及其相关意义,我们对肺癌手术新鲜标本进行了 FCM 检测。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 30 例肺癌手术标本(肺癌组,术前均经纤维支气管镜活检证实为肺的鳞状细胞癌)和 5 份正常肺支气管粘膜组织标本(对照组),术中取其新鲜组织置于冰浴瓶中送检进行 FCM 分析。

1.2 方法

1.2.1 单细胞悬液的制备:采用 Medimachine 系统(丹麦,DAKO),将新鲜组织去除脂肪、血凝块及坏死组织,冷生理盐水冲洗。取一小块组织(约 30mm³)剪碎,并悬于 1ml 生理盐水中一同加入 Medicon(DAKO)中,开机运行 10s,吸取 Medicon 中的组织细胞悬液,经 Filcon(DAKO)过滤,即得到单细胞悬液。计算细胞总数不低于 1×10^6 ,400g 离心清洗备用^[2]。

1.2.2 DNA 荧光染色:取制备的单细胞悬液,加入 4℃ 的 70% 乙醇 2ml,4℃ 过夜,细胞经 400g 离心清洗备用,加入 2ml 碘化丙啶(Sigma)染液,室温避光染色 30min,其中含 50μg/ml RNase(Sigma)及 50μg/ml 碘化丙啶。离心清洗备用。

1.2.3 FCM 分析:采用 FACSCalibur 型流式细胞仪(Becton - Dickinson,美国),激发光波长 488nm,PI 荧光检测波长 600nm。采用 CellQuest™功能软件中 DDM(Doubt Discrimination Module)

方式进行参数获取,获取细胞总数 10,000 个,在散射光图中对肿瘤细胞群体设门。在 FL2 荧光图上,以正常人外周淋巴细胞为参照,利用 ModFit 2.0 软件进行数据分析,计算各组细胞周期 G₀/G₁、S、G₂/M 各时相比率和细胞增殖指数(Proliferating index, PI)及 DNA 指数(DNA index, DI)。

1.3 统计学方法

所得数据采用 t 检验进行组间差异性检验。 $P < 0.05$ 为组间显著性差异, $P < 0.01$ 为组间非常显著性差异。

2 结果

2.1 所测肺癌组和正常对照组的 G₀/G₁、S、G₂/M 各时相比率和 PI 等各项指标见表

2.2 DNA 指数

对照组 DI 为 1.00 ± 0.01 ,肺癌组 DI 为 1.92 ± 0.10 ,统计学上两组间有非常显著性差异($t = 3.71$; $P < 0.01$)。另外,30 例中 28 例为异倍体肿瘤,占 93.33%,2 例为二倍体肿瘤,占 6.67%。

3 讨论

虽然肿瘤 DNA 的 FCM 分析已经广泛应用于肿瘤的诊断与预后判定,但是尚无统一标准。结合有关学者论述我们认为肿瘤细胞 DNA 的 FCM 结果从以下几个方面反映了肿瘤的有关生物学特性:肿瘤中是否含有异倍体细胞在 DNA 组方图上表现为是否出现异倍体 G₀/G₁ 峰或者其 DI 是否在 0.90 ~ 1.10 之外;DNA 的 FCM 提供了细胞周期的信息,包括 S、G₂/M 期和 PI,可以据此了解肿瘤细胞的增殖能力;通过 DI 的换算可以判定 DNA 含量的相对值,据此也可反映肿瘤细胞的增殖能力。

(下转第 49 页)

(收稿日期:2006 - 02 - 19 接受日期:2006 - 06 - 28)

活动情况的改变,分析屈光不正对儿童视皮层神经元活动的影响。

研究发现,屈光不正眼进行纠正后,视皮层激活范围明显增大,激活强度明显增加。正常眼离焦后,皮层激活范围明显减小,神经元活动水平明显降低。但激活部位仍主要位于枕叶距状裂为中心的视皮层。理论上,视皮层的激活主要是由于视通路传输过来了大量视觉信息,诸如亮度信息,对比度信息,颜色信息,图形信息,运动信息等。这些信息的多寡及性质的不同,将导致视皮层激活部位及强度的不同。视通路的任何一个环节均有可能影响这些信息的传导,导致其量甚至质的改变。近视眼矫正屈光后,晶状体重新获得对焦能力,在视网膜上投射清晰的图像,此时后传的视觉信息在信息量及质上都有明显提高,显然有更多的神经元参与视觉信息的处理,视皮层的激活范围及强度明显增加。正常眼用透镜离焦时,人眼晶状体具有较强的自我调焦能力,但并不是无限的。离焦超过了晶状体的自我调节范围,视网膜无法形成清晰图像,其后传的信息量也大大减少了,参与的神元数量明显减少,活动范围及水平明显减低。

5.3 结论

可见,屈光不正会明显影响儿童视觉皮层神经元的活动。青少年正处于生长发育期,视皮层神经元必须接受到足够的信息,其神经元功能才能活动起来,初级视觉皮层及视联络皮层才能正常发育。长期屈光不正,视皮层长期处于低活动状态,必将导致工能甚至结构的改变。甚至导致无法矫正的视力障碍,形成弱视^[5-8]。因此,屈光不正患儿应尽早进行视力

矫正。另外,受试眼的屈光状态能明显影响皮层的 BOLD 信号,在利用 BOLD 技术进行视觉系统研究时,应考虑到这种影响。

参考文献

- [1] Cabeza R, Nyberg L. Imaging cognition II: An empirical review of 275 PET and fMRI studies[J]. J Cogn Neurosci, 2000,12(1):41-47
- [2] Goodyear B, Nicolle D, Humphrey, et al. BOLD fMRI response of early visual areas to perceived contrast in human amblyopia[J]. J Neurophysiol, 2000,84(4):1907-1913
- [3] Algaze A, Roberts C, Leguire L, et al. Functional magnetic resonance imaging as a tool for investigating amblyopia in the human visual cortex: a pilot study[J]. J AAPOS, 2002,6(5):300-308
- [4] Belliveau J, Kennedy D, McKinstry R, et al. Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging[J]. Science, 1991, 25(4):716-719
- [5] Miki A, Liu G, Goldsmith Z, et al. Decreased activation of the lateral geniculate nucleus in a patient with anisometropic amblyopia demonstrated by functional magnetic resonance imaging[J]. Ophthalmologica, 2003, 217(5):365-369
- [6] Choi, M; Lee K, Hwang J, et al. Comparison between anisometropic and strabismic amblyopia using functional magnetic resonance imaging [J]. Br J Ophthalmol, 2001,85(9):1052-1056
- [7] 张志强.屈光不正型弱视的功能磁共振成像研究[J].医学研究生学报,2004,17(5):469-442
- [8] Anderson S, Holliday I, Harding G, et al. Assessment of cortical dysfunction in human strabismic amblyopia using magneto encephalography (MEG) [J]. Vision Res, 1999,39(9):1723-1738

(上接第 41 页)

有学者报道肺癌石蜡切片中 DNA 含量表明二倍体肿瘤占 11.43%,异倍体肿瘤占 88.57%,而本研究采用的新鲜组织检查结果发现异倍体肿瘤占 93.33%,明显高于石蜡切片的检查结果,其原因可能是石蜡切片组织处理不够及时所致。本结果与其他有关新鲜组织较石蜡包埋组织 FCM 所测 DNA 含量呈现较多异倍体的文献报道相一致^[3,4]。

本研究肺癌组 S、G₂/M 期比率和 PI/DI 均明显高于对照组

的相应指标,提示肿瘤细胞的增殖能力和 DNA 含量明显高于正常组织。另外,肺癌组 S 期比率的 95%和 99%的可信区间分别为 13.58%~18.33%和 13.05%~19.13%,因此,可以推断肺活检组织的 FCM 检查中 S 期比率大于 13%应考虑肺癌的可能性。说明肺病变组织细胞 DNA 的 FCM 分析是判定肺部肿瘤恶性化的敏感指标。特别是在组织切片判断比较困难的情况下,采用 FCM 辅助检查可能更具临床意义。

表 两组 G₀/G₁、S、G₂/M 各时相比率和 PI(%, X ± SE)

Table PI and the rate of G₀/G₁, S and G₂/M of two groups (% , X ± SE)

组别	例数 cases	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
对照组 Control group	5	90.75 ± 1.23	5.85 ± 0.91	3.40 ± 0.71	9.25 ± 0.69
肺癌组 Lung carcin-oma group	30	77.42 ± 2.15	16.09 ± 1.10	6.49 ± 1.11	22.58 ± 1.31
t 值		3.66	3.72	3.85	3.78
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

从表中不难看出,肺癌组 G₀/G₁、S、G₂/M 各时相比率和 PI 与对照组相比在统计学上皆存在非常显著性差异。

参考文献

- [1] 宋平根,李素文主编.流式细胞术的原理和应用[M].北京:北京师范大学出版社,1992:210
- [2] Ottoson GL, Christenson LJ, Larson JK, et al. Tissue disaggregation for flow cytometric analysis: comparison of fine needle aspiration and an au-

tomated mechanical procedure[J]. Cytometry, 1996,26:65-68

- [3] 崔社怀,张蔚东,沈寒放,等.纤支镜活刷检标本 DNA 含量的流式细胞仪分析[J].内镜,1995,12(6):345-347
- [4] Barlogie B, Drewinko B. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man[J]. Am J Med, 1980,69:195