

## ·临床研究·

## FCM-DNA 倍体分析、AgNOR 染色及 hTERT、PCNA 表达在良恶性胸腹水鉴别诊断中的临床意义

吴丽颖<sup>1</sup>, 刘邦荣<sup>2</sup>, 陆军<sup>2</sup>, 凌明德<sup>1</sup>, 陈洁<sup>2</sup>, 李朋<sup>1</sup>, 蒋艳<sup>2</sup>

## Significance of FCM-DNA Ploidy Pattern, AgNOR Counting, hTERT and PCNA Expression in Differentiating Malignant from Benign Serous Effusion

WU Li-Ying<sup>1</sup>, LIU Bang-Rong<sup>2</sup>, LU Jun<sup>2</sup>, LING Ming-De<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>2</sup>, LI Peng<sup>1</sup>, JIANG Yan<sup>2</sup>

1. 淮北市人民医院

消化疾病研究室,

安徽 淮北 235000

2. 淮北市人民医院

病理科,

安徽 淮北 235000

1. Lab of Gastroenterology,

People's Hospital of Huaibei City,

Huaibei, Anhui, 235000,

P. R. China

2. Department of Pathology,

People's Hospital of Huaibei City,

Huaibei, Anhui, 235000,

P. R. China

通讯作者: 吴丽颖

Correspondence to: WU Li-Ying

Tel: 86-561-3055330

E-mail: wu\_ly@sohu.com

基金项目: 淮北市科技计划项目

(No. 040143)

Grant: Sci-Tech Project

Foundation of Huaibei City

(No. 040143)

收稿日期: 2005-12-27

修回日期: 2006-06-19

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** Differentiating malignant from benign serous effusion is still a difficulty in clinic at present. This study was to explore the clinical value of flow cytometry (FCM)-DNA ploidy, argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining, human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in differentiating malignant from benign serous effusion.

**METHODS:** Sixty-seven patients with serous effusion, treated in People's Hospital of Huaibei City from Jun. 2004 to Jun. 2005, were selected. Besides routine exfoliated cytology examination, FCM-DNA ploidy analysis and AgNOR staining was performed, hTERT and PCNA expression were detected by SP immunocytology. **RESULTS:** There were significant differences in FCM-DNA ploidy, AgNOR staining, hTERT and PCNA expression between malignant and benign serous effusion. Compared with exfoliated cytology, the sensitivity of AgNOR staining was the highest (89.1%), the specificity of cytology, hTERT and PCNA expression was the highest (100%), and the accuracy of AgNOR staining and hTERT expression was the highest (89.6%). According to combination examination, the sensitivity was increased to 91.3% through combining cytology with hTERT expression.

**CONCLUSION:** DNA aneuploidy, hTERT and PCNA expression and AgNOR counting increase are correlated to malignant serous effusion, and can be important auxiliary measures for serous cytology.

**KEYWORDS:** Neoplasm; Malignant serous effusion; FCM-DNA ploidy analysis; AgNOR; Human telomerase reverse transcriptase; Proliferating cell nuclear antigen; Diagnosis

【摘要】背景与目的: 良恶性胸腹水的鉴别诊断仍然是临床的一大难题, 本研究应用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)-DNA 倍体分析、核仁组成区嗜银蛋白 (argyrophilic nucleolar organizer region, AgNOR) 染色及端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达来探讨其对良恶性胸腹水的鉴别诊断价值。方法: 选取2004年6月至2005年6月间因胸腹水就诊的患者67例, 每位患者除常规胸腹水脱落细胞学检查外, 还分别进行FCM-DNA倍体分析、AgNOR染色和应用免疫细胞化学SP法检测胸腹水脱落细胞hTERT和PCNA的表达状况。结果: FCM-DNA倍体分析、AgNOR染色及hTERT、PCNA的表达在良恶性胸腹水之间差异显著。上述诸指标与细胞学比较显示, AgNOR染色敏感性最高为89.1%; 细胞学及hTERT和PCNA检测特异性最高, 为100%; 而AgNOR染色及hTERT检测准确率最高, 为89.6%。联合检测发现细胞学联合hTERT检测敏感性提高至91.3% (42/

46)。结论:DNA 异倍体、hTERT 和 PCNA 的表达及 AgNOR 颗粒数增多均是恶性胸腹水的特征,可作为胸腹水脱落细胞学检查的重要辅助手段,而细胞学联合 hTERT 免疫细胞化学检测可提高单纯细胞学的阳性率。

关键词:肿瘤;恶性腹水;FCM-DNA 倍体分析;AgNOR;hTERT;PCNA;诊断

中图分类号:R730.21 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)02-0178-05

流式细胞术(flow cytometry, FCM)和核仁组成区嗜银蛋白(argyrophilic nucleolar organizer region, AgNOR)技术近年来都用于肿瘤研究,前者可测定细胞内 DNA 含量,提供细胞染色体数目异常和细胞增殖活动信息;后者通过显示细胞核内的嗜银蛋白,表明细胞转录活动状态。端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)作为端粒酶的核心组分,也是恶性肿瘤的诊断指标<sup>[1]</sup>。本研究应用 FCM-DNA 倍体分析、AgNOR 染色,免疫细胞化学染色测定胸腹水脱落细胞 hTERT 和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达状况,并将之与胸腹水脱落细胞学比较,以探讨其在良恶性胸腹水鉴别诊断中的临床价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集淮北市人民医院细胞室 2004 年 6 月至 2005 年 6 月间作胸腹水细胞学检查的患者 67 例。其中,男性 38 例,女性 29 例,男女之比为 1:0.76;中位年龄 58 岁。经组织学检查或结合临床证实的恶性胸腹水患者 46 例,分别为肺癌 25 例,卵巢癌 2 例,结肠癌 7 例,肝癌 5 例,胰腺癌 1 例,乳腺癌 2 例,膀胱癌 2 例,胆囊癌 2 例;良性胸腹水 21 例,均经临床、影像学检查和实验室检查确诊,其中结核性 8 例、漏出液 8 例(肝硬化 3 例、尿毒症 2 例、低蛋白血症 2 例、充血性心力衰竭 1 例)、炎症性 4 例、良性胸膜间皮瘤 1 例。所有检查均采用同一次抽出的胸、腹水标本。

### 1.2 方法

1.2.1 试剂 碘化丙啶购自美国 Sigma 公司;硝酸银、明胶及纯甲酸购自上海市实验试剂公司;兔抗人 hTERT 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,PCNA 抗体及 SP 显色试剂盒购自福建迈新生物技术有限公司。

1.2.2 免疫细胞化学方法 采用 SP 二步法,取胸腹水细胞沉渣涂片。采用新鲜细胞涂片固定后 3%  $H_2O_2$  室温孵育 20 min;用适当比例稀释的一抗 4℃ 孵育过夜;依次滴加二抗及 SP 工作液,苏木精复染细胞核 1 min。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性胸水作阳性对照。结果判定:hTERT 和 PCNA 均定位于癌细胞核,呈黄褐色颗粒。采用盲法阅片。阳性标本连续计数 10 个(400 倍)高倍视野,胞核染成黄褐色的阳性细胞所占比例>10% 为阳性。

1.2.3 AgNOR 染色 胸腹水标本离心后,细胞涂片固定,以 2% 明胶与 1% 甲酸配成明胶甲酸染色液,避光染色 30 min,油镜下观察。结果判定:采用 Ploto 改良法每张切片随机计数 100 个细胞核内 AgNOR 数(双核及多核细胞分别计数每个核内 AgNOR 数,再换算成每个核内 AgNOR 平均数)。显微镜下用测微仪测量 AgNOR 的最大直径,计数时未知细胞学或病理结果。

1.2.4 流式细胞仪标本制备及检测方法 胸腹水制备单细胞悬液,离心后 95% 乙醇固定。上机前调整细胞浓度至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,加入荧光染料碘化丙啶溶液 1 ml,置室温避光待测。使用美国 BD 公司的 FACS Calibur 型流式细胞仪进行测定,结果输入 Modifit2.0 计算机和程序软件分析处理。细胞核 DNA 含量以 DNA 指数(DNA Index, DI)表示。 $DI = 1 \pm 0.1$  做为二倍体 DNA 含量的判断标准,此范围之外均为异倍体, $DI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M)$ 。根据细胞周期中处于  $G_0/G_1$  期、S 期、 $G_2/M$  期细胞构成比,计算出细胞增殖指数(proliferating index, PI), $PI = (\text{样品细胞 } G_0/G_1 \text{ 峰均值}) / (\text{正常淋巴细胞 } G_0/G_1 \text{ 峰均值}) \times 100\%$ 。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验和  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FCM-DNA 倍体分析及 DNA 含量测定

21 例良性胸腹水细胞 20 例呈现二倍体,1 例表现为超二倍体; $DI = 1.003 \pm 0.022$ 。46 例恶性胸腹水中 33 例表现为异倍体,主要为超二倍体,少数为超四倍体(图 1)。异倍体发生率为 71.7%(33/46)。DNA 倍体分析检测良恶性胸腹水的敏感性为 71.7%(33/46),特异性为 95.2%(20/21),准确率

为 79.1% (53/67)。两组细胞周期分布及细胞增殖情况见表 1, 恶性胸腹水细胞 DI 明显高于良性胸腹水,在细胞周期分析中,处于 S 期、G<sub>2</sub>/M 期的细

胞及 PI 值也明显高于良性胸腹水, 两组相比差异有显著性(表 1,  $P<0.01$ )。

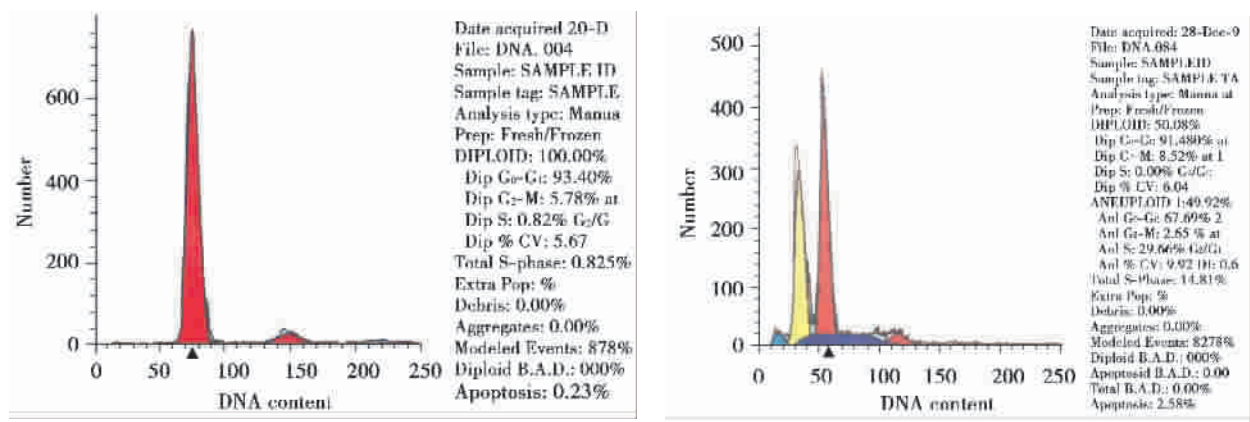


图 1 胸腹水 FCM-DNA 倍体分析结果

Figure 1 Flow cytometry (FCM)-DNA ploidy analysis of serous effusion  
A: diploidy; B: aneuploidy.

表 1 良恶性胸腹水细胞周期各时相分布、DI 及 PI 值 (%)

Table 1 Cell cycle, DNA index (DI) and proliferating index (PI) in serous effusion cells (%)

| Group                     | Cases | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | S                     | G <sub>2</sub> /M     | DI                       | PI                    |
|---------------------------|-------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Benign serous effusion    | 21    | 93.8±8.7                       | 3.1±0.8               | 3.0±0.8               | 1.003±0.022              | 15.4±3.3              |
| Malignant serous effusion | 46    | 68.6±5.3 <sup>a</sup>          | 18.7±3.2 <sup>a</sup> | 12.1±4.1 <sup>a</sup> | 1.482±0.271 <sup>a</sup> | 28.9±4.8 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> $P<0.01$ , vs. benign serous effusion.

2.2 AgNORs 计数

AgNOR 银染颗粒在有核细胞中均能见到。良性胸腹水 AgNOR 数目多为 1~2 个, 偶为 3~4 个, 银染颗粒界限清楚, 边缘光滑, 呈圆形, 颗粒常位于细胞核中央或偏位。21 例良性胸腹水中 AgNOR 计数为  $1.57\pm0.48$ ; 46 例恶性胸腹水中 AgNOR 计数为  $4.33\pm0.68$ , 与良性胸腹水相比, 差异有显著性 ( $P<0.05$ )。恶性胸腹水中 AgNOR 颗粒主要有 3 种形状: ①聚集型: 核内颗粒聚集成 1~2 个团块状, 边缘不光滑, 最大直径  $>5\text{ }\mu\text{m}$ ; ②弥散型: 颗粒弥散分布在核内或核周, 形状及边缘均不规则呈细小点状; ③混合型: 以上两种形状并存。

AgNOR 计数的敏感性与特异性按 AgNOR 计数标准<sup>[2]</sup>, 根据良恶性均数及标准差, 良性范围最高值为 2.05, 恶性范围最低值为 3.65, 统计有细胞学诊断结果的患者, 计算其敏感性为 89.1% (41/46), 特异性为 90.1% (19/21), 准确率为 89.6% (60/67)。

2.3 hTERT 和 PCNA 在浆膜腔积液各细胞成分中的表达情况

hTERT 在 21 例良性胸腹水中, 8 例 (38.1%) 淋巴细胞呈现阳性核着色, 反应性间皮细胞中无阳性着色; 在 46 例恶性胸腹水中, 39 例 (84.8%) 肿瘤细胞呈阳性表达, 间皮细胞中无阳性着色, 而炎性细胞主要是淋巴细胞中出现 19 例 (41.3%) 阳性着色, 良恶性之间差异显著 ( $P<0.01$ )。PCNA 在 46 例恶性胸腹水中 29 例 (63.0%) 肿瘤细胞呈阳性表达, 反应性间皮细胞无表达, 22 例 (47.8%) 淋巴细胞呈阳性着色; 在 21 例良性胸腹水中间皮细胞无阳性表达, 炎性细胞中淋巴细胞 10 例 (47.6%) 呈现阳性着色, 良恶性之间差异显著 ( $P<0.01$ ) (见图 2)。

2.4 5 项检测指标在胸腹水检测中敏感性、特异性及准确率比较

67 例胸腹水脱落细胞学检查发现, 46 例恶性胸腹水检出癌细胞 30 例, 21 例良性胸腹水均未检

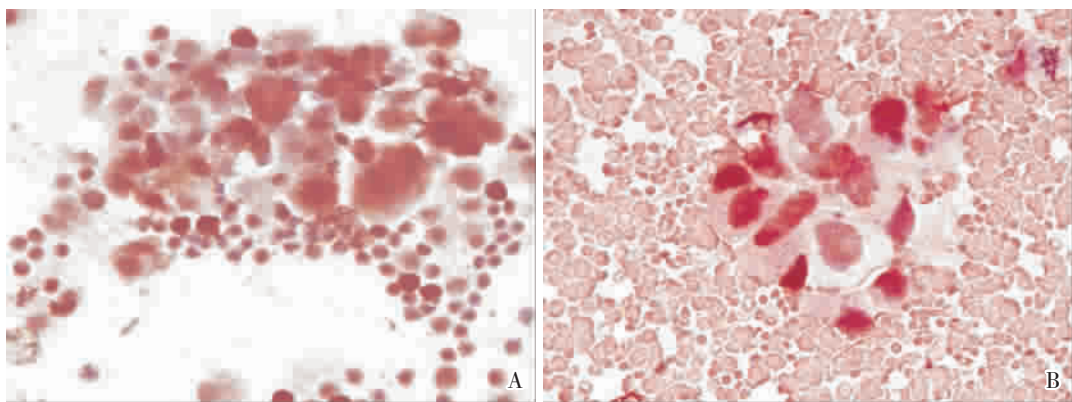


图 2 hTERT 和 PCNA 在浆膜腔积液中的阳性表达情况(SP ×400)

Figure 2 Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) (A) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (B) in serous effusion (SP ×400)

出癌细胞,细胞学检查敏感性 65.2% (30/46),特异性 100% (21/21),准确率 76.1%(51/67)。将上述 4 种指标与脱落细胞学比较,发现 AgNOR 计数敏感性最高为 89.1%,而细胞学、hTERT 及 PCNA 检测的特异性均为 100%,AgNOR 计数及 hTERT 的准确率均为 89.6%,较细胞学升高。继而对 5 项指标进行联合检测判断其敏感性 & 特异性,发现细胞学联合 hTERT 检测敏感性提高至 91.3% (42/46)(见表 2)。

表 2 各指标的敏感性、特异性及准确率比较 (%)

Table 2 Sensitivity, specificity, and accuracy of the examinations (%)

| Examination                  | Sensitivity | Specificity | Accuracy |
|------------------------------|-------------|-------------|----------|
| FCM-DNA ploidy analysis      | 71.7        | 95.2        | 79.1     |
| AgNOR counting               | 89.1        | 90.1        | 89.6     |
| hTERT                        | 84.8        | 100.0       | 89.6     |
| PCNA                         | 63.0        | 100.0       | 74.6     |
| Cytology                     | 65.2        | 100.0       | 76.1     |
| Cytology combined with hTERT | 91.3        | 100.0       | 94.0     |

3 讨 论

细胞病理学诊断中经常遇到一些难以做出恶性结论的病例,如胸腹水中增生活跃的间皮细胞有时很难与分化良好的腺癌细胞加以鉴别。加之存在着敏感性较低的问题,有报道单次检测癌细胞的阳性率仅为 58%<sup>[3]</sup>,因此良恶性胸腹水的鉴别诊断仍然是临床的一大难题。

我们采用 FCM 方法进行 DNA 倍体分析,发现

恶性胸腹水细胞中,处于 S 期、G<sub>2</sub>/M 期的细胞及 PI 值明显高于良性胸腹水,与恶性肿瘤细胞核染色质增多、核增大、核分裂现象增加等形态学表现相符合。在 21 例良性胸腹水中,20 例为二倍体,特异性为 95.2%,1 例假阳性为结核性胸水。46 例恶性胸腹水中 33 例表现为异倍体,敏感性为 71.1%。2 例肺癌患者的胸水,脱落细胞学查到癌细胞,而 FCM 直方图却显示二倍体峰值。另有 2 例腹水患者细胞学检查为可疑,后经临床证实 1 例为肝癌,另 1 例为大肠癌,而 FCM 也显示阴性结果。

研究表明,良性胸腹水与恶性胸腹水细胞核 AgNOR 计数存在显著差异<sup>[4]</sup>,且是鉴别良、恶性腹水一个有价值的指标<sup>[5]</sup>。本研究发现恶性胸腹水中 AgNOR 颗粒计数显著高于良性胸腹水 ( $P < 0.01$ )。作为判断良恶性胸腹水指标其敏感性为 89.1% (41/46),特异性为 90.1% (19/21),准确率为 89.6% (60/67)。

近年来,人们应用端粒酶活性检测来诊断恶性浆膜腔积液,并显示出较好的诊断价值<sup>[6]</sup>。随着研究的深入,人们发现采用端粒酶重复序列扩增技术 (TRAP) 测定端粒酶活性对诊断恶性浆膜腔积液有一定的局限性,在良性积液中也有较高的阳性率,即假阳性问题,使得端粒酶活性检测的应用受到限制。大量的临床研究表明,在端粒酶的复合物中只有 hTERT 的表达具有癌细胞的特异性,并与端粒酶的活性一致<sup>[7]</sup>。日本有学者应用原位杂交方法测定了浆膜腔积液中人端粒酶 mRNA (hTERC) 成分和 hTERT 的 mRNA 表达状况,认为对良恶性胸腹水的鉴别诊断具有重要的辅助作

用<sup>[8]</sup>,国内学者也得出同样结论<sup>[9]</sup>。本研究应用免疫细胞化学方法检测 hTERT 在胸腹水中的表达状况,发现良性胸腹水的主要组成细胞为反应性间皮细胞、淋巴细胞和中性粒细胞,hTERT 在 21 例良性胸腹水中,8 例淋巴细胞呈现阳性核着色,反应性间皮细胞中无阳性着色;在 46 例恶性胸腹水中,39 例肿瘤细胞呈阳性表达,阳性率为 84.8%,间皮细胞中无阳性着色,而炎性细胞主要是淋巴细胞中出现 19 例阳性着色。

PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助蛋白,其成分和表达与细胞增殖状态有关,因此也是评价细胞增殖状态的客观指标。本组资料中 PCNA 在良恶性胸腹水中的表达也存在着显著性差异,PCNA 在 46 例恶性胸腹水中的阳性率为 63.0%,反应性间皮细胞无表达;在 21 例良性胸腹水中间皮细胞无表达,炎性细胞中淋巴细胞 10 例呈现阳性着色。

将上述 4 种检测项目与脱落细胞学加以比较,发现 AgNOR 计数敏感性最高为 89.1%,而细胞学、hTERT 及 PCNA 检测的特异性均为 100%,AgNOR 计数及 hTERT 的准确率均为 89.6%,较细胞学升高。对 5 项指标进行联合检测判断其敏感性 & 特异性,发现细胞学联合 hTERT 检测敏感性提高至 91.3% (42/46)。总之,我们认为 DNA 异倍体、hTERT 和 PCNA 的表达及 AgNOR 颗粒数增多均是恶性胸腹水的特征,可作为胸腹水脱落细胞学检查的重要辅助手段,而细胞学联合 hTERT 免

疫细胞化学检测可提高单纯细胞学的阳性率。

# [参 考 文 献]

- [1] Miura N, Shiota G, Nakagawa T, et al. Sensitive detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the serum of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology*, 2003, 64(4): 430-434.
- [2] 许良中. 关于核仁组成区研究工作的标准化方案 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1996, 18(1): 69.
- [3] Motherby H, Nadjari B, Remmerbach T. Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology [J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 1998, 20(3): 162-168.
- [4] Mohanty S K, Dey P, Rana P. Manual and automated AgNOR count in differentiating reactive mesothelial from metastatic malignant cells in serous effusions [J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 2003, 25(5): 273-276.
- [5] 张智慧, 李中林, 潘秦镜, 等. AgNOR 定量分析在胸腹水及针吸细胞学辅助诊断中的意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2003, 10(1): 27-29.
- [6] Dejmek A, Yahata N, Ohyashike K, et al. *In situ* telomerase activity in pleural effusions: a promising marker for malignancy [J]. *Diagn Cytopathol*, 2001, 24(1): 11-15.
- [7] Saldanha S N, Andrew L G, Tollefsbol T O. Analysis of telomerase activity and detection of its catalytic subunit, hTERT [J]. *Anal Biochem*, 2003, 315(1): 1-21.
- [8] Hiroi S, Nakanishi K, Kawai T. Expressions of human telomerase mRNA component (hTERC) and telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in effusion cytology [J]. *Diagn Cytopathol*, 2003, 29(4): 212-216.
- [9] 张焜和, 付曲波, 操 风, 等. 浆膜腔积液脱落细胞端粒酶逆转录酶 mRNA 检测及其意义 [J]. *中华消化杂志*, 2005, 25(2): 116-118.

[编辑:谢汝华;校对:林志祥]