

前列腺上皮内瘤 DNA 倍体、细胞周期的分析

李清¹, 李解方¹, 杨金瑞²

Analysis of DNA Ploidy and Cell Cycle on Prostate Intraepithelial Neoplasia

LI Qing¹, LI Jie-fang¹, YANG Jin-rui²

1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China; 2. Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Xiangya Medical School, Central South University

Abstract Objective To explore the significance of DNA ploidy and cell proliferous ratio of prostate intraepithelial neoplasia in diagnose and differential diagnose. Methods The image cytometry was used to measure the average DNA content, the DNA average ploidy value and cell proliferous ratio of prostate intraepithelial neoplasia, benign prostate hyperplasia and prostate cancer. Results The heteroploidy rate of PIN group was 70 %. The DNA average ploidy value, G₀/G₁-phase fraction and S-phase fraction of PIN group were between BPH group and PC group. Conclusion DNA heteroploidy, higher S-phase fraction as the biological features of PIN can be used as an reference index for PIN differential diagnose.

Key words DNA ploidy; S-phase fraction (SPF); Prostate intraepithelial neoplasia (PIN)

摘要 目的 探索 DNA 倍体类型、细胞周期在前列腺上皮内瘤中诊断和鉴别诊断的价值。方法 应用细胞图像分析技术检测前列腺上皮内瘤(PIN)细胞的平均 DNA 含量、DNA 平均倍体值及细胞周期的各个时相的变化。同时与良性前列腺增生症(BPH)、前列腺癌(PCa)比较。结果 PIN 组异倍体率为 70 %, 前列腺上皮内瘤 DNA 平均倍体值、G₀/G₁ 期细胞比率、S 期细胞比率介于良性前列腺增生症和前列腺癌之间。结论 DNA 异倍体、较高 S 期细胞比率是前列腺上皮内瘤重要生物学特性。对于前列腺上皮内瘤的鉴别诊断具有一定参考价值。

关键词 DNA 倍体; S 期细胞比率 (SPF); 前列腺上皮内瘤 (PIN)

中图分类号: R737.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)11-0858-02

0 引言

脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) 主要存在于细胞核的染色体中, 细胞的成熟度与 DNA 含量关系密切。DNA 含量的异常变化, 常提示某种病态的发生, 特别是肿瘤的出现。我们采用细胞图像分析技术 (Image cytometry, ICM) 测定前列腺上皮内瘤的 DNA 倍体值、细胞周期, 同时以良性前列腺增生症、前列腺癌为对照, 以求进一步探讨 DNA 倍体值、细胞周期的各个时相的变化在前列腺上皮内瘤中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

均来自南华大学附属第一医院、附属第二医院、湘西自治州人民医院存档石蜡标本。前列腺上皮内瘤(PIN) 20 例, 年龄 55~85 岁, 平均年龄 70.5 岁。

收稿日期: 2006-08-25; 修回日期: 2007-04-11

作者单位: 1. 421001 衡阳, 南华大学附属第一医院泌尿外科; 2. 中南大学湘雅二医院泌尿外科

通讯作者: 李解方, E-mail: lig73@163.com

作者简介: 李清(1973-), 男, 主治医师, 医学博士, 主要从事泌尿系肿瘤的研究

良性前列腺增生症(BPH) 30 例, 年龄 48~76 岁, 平均 65.1 岁。前列腺癌(PCa) 50 例, 年龄 45~78 岁, 平均 66.2 岁。所有标本均经中南大学湘雅二医院病理科证实。

1.2 主要仪器和试剂

细胞图像分析系统 (PIPS-2020) 包括 Olympus BX-50 显微镜, polaroid 数码相机, 分析软件 (重庆天海医疗设备有限公司提供)。

无色 schiff 试剂和偏重亚硫酸钠溶液依照文献^[1]由中南大学湘雅二医院病理科配制。

1.3 方法

1.3.1 Feulgen 染色^[2] 标本经 7 μm 厚连续切片, 脱蜡, HE 染色复查。切片经梯度酒精入水, 蒸馏水洗, 冷 N-HCl 漂洗 3 min, 60 °C 的 N-HCl 5~12 min(将盐酸预先置染缸内, 将染缸放入恒温水浴缸中), 再回冷 N-HCl 内略洗, 入蒸馏水略洗, Schiff 试剂内 1~2 h, 入偏重亚硫酸钠溶液三次, 每次 2 min。流水冲洗 5~10 min。蒸馏水稍洗, 常规脱水、透明、封固。

1.3.2 图像的采集、测量和分析 采用 550 nm 的单色光为光源, 随机选择一个高倍视野 (×

400), 由数码相机以 8bit 黑白模式将图像摄入并存入计算机内, 图像测量定标为 40 倍, 每个像素点为 $0.2073 \mu\text{m}^2$, 对每个视野进行设定测量范围、减背底、分割细胞、滤波、删除聚焦不清和重叠的细胞、自动测量等操作, 用各个单独探测的像素密度分布的总和即积分光密度 (Integrated optical density, IOD) 表示细胞的平均 DNA 含量。先测定至少 50 个间质淋巴细胞 (参照细胞) 的 DNA 相对含量, 作为 DNA 正常二倍体 (2C) 含量对照, 再测定同切片内全部前列腺上皮内瘤细胞 (分析细胞), 也至少 50 个。根据参照细胞 (2C) DNA 上限值, 采用细胞图像分析系统 (PIPS-2020) 对染色后的切片进行分析得出不同的 DNA 平均倍体值及细胞增殖各期细胞比率。

1.4 结果判定标准^[3-4]

1.4.1 DNA 倍体类型 (1) 二倍体 2C 及近 2C: $1.8 \sim 2.5\text{C}$, (2) 增殖倍体: $2.5 \sim 5.0\text{C}$, (3) 异多倍体: $> 5.0\text{C}$ 。后两者为 DNA 异倍体。

1.4.2 细胞增殖各期细胞比率

G_0/G_1 期细胞百分比 (%) = $[G_0/G_1 / (G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$

S 期细胞比率 (S-phase fraction, SPF), SPF (%) = $[S / (G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$

G_2/M 期细胞百分比 (%) = $[G_2/M / (G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$

1.5 统计学分析 采用 SPSS 11.0 统计软件, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Feulgen 染色结果 细胞核内 DNA 呈紫红色。

2.2 前列腺上皮内瘤异倍体数、DNA 平均倍体值的比较

在 20 例前列腺上皮内瘤组中, 异倍体占 14 例, 均为增殖倍体, 未出现 DNA 含量较高的异多倍体; 50 例 PCa 组异倍体占 92%, 其中 33 例增殖倍体, 13 例异多倍体, 经 χ^2 检验两组间差别有统计学意义 ($\chi^2 = 3.99$, $P < 0.05$)。BPH 组细胞核 DNA 倍体在二倍体范围。PIN 组 DNA 平均倍体值介于 BPH 组和 PCa 组之间, 见表 1。

2.3 前列腺上皮内瘤组细胞增殖各期细胞比率的比较

PIN 组 G_0/G_1 期细胞比率、SPF 介于 BPH 组和 PCa 组之间, 与 BPH 组、PCa 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 前列腺上皮内瘤异倍体数、DNA 平均倍体值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	异倍体数 (%)	平均 DNA 含量 (IOD)	平均倍体值 (C)
PIN	20	14	9.84 \pm 0.68	2.74 \pm 0.18 *
BPH	30	0	7.99 \pm 0.57	2.23 \pm 0.16
PCa	50	46	15.02 \pm 4.19	4.18 \pm 1.17

注: Post Hoc Tests, *: 与 BPH 组比较 $P < 0.05$, 与 PCa 组比较 $P < 0.01$

表 2 前列腺上皮内瘤组细胞增殖各期细胞比率的比较 (%)

组别	例数	G_0/G_1 期	SPF	G_2/M 期
PIN	20	55.14 \pm 10.44 *	42.73 \pm 9.88 **	2.13 \pm 3.02 ***
BPH	30	71.60 \pm 8.53	27.72 \pm 7.91	0.38 \pm 1.16
PCa	50	28.90 \pm 18.70	54.32 \pm 14.05	16.78 \pm 15.93

注: Post Hoc Tests, *、**: 与 BPH 组、PCa 组比较 P 均 < 0.01 ; ***: 与 PCa 组比较 $P < 0.01$, 与 BPH 组比较, $P = 0.60$

3 讨论

前列腺上皮内瘤 (Prostate intraepithelial neoplasia, PIN) 是指前列腺导管和腺泡上皮的异常增生。但仍然保存原有的腺体结构或基底层, 没有间质浸润^[5]。由于 PIN 的病理学形态介于 BPH 和 PCa 两者之间, 临床工作者往往将其归为 BPH。然而, PIN 不论从遗传学上还是形态学上都与前列腺癌更有相似性^[6]。前列腺的外周带既是前列腺癌的高发区, 也是 PIN 的高发区。PIN 是现在公认的前列腺癌的癌前病变^[7]。许多前列腺癌可找到 PIN 的存在^[8]。由于临幊上治疗 PIN 与前列腺癌的方式有很大不同, 如何正确区分 PIN 有极其重要的临幊意义。本实验结果显示 PIN 的 DNA 含量介于 BPH 与 PCa 之间, 异倍体率高达 70%, 高于文献报道。PIN 中异倍体类型全部是 DNA 含量相对较低的增殖倍体, 没有出现异多倍体, PIN 组 DNA 平均倍体值与 BPH 组、PCa 组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示 DNA 含量在 PIN 细胞核已经出现异常增多, 但与前列腺癌比较还有一定差距, 因此, 通过测量病变细胞的 DNA 含量、DNA 倍体值, 对 PIN 与 BPH、PCa 的鉴别诊断, 有重要参考价值。

细胞周期 (Cell cycle) 是指从亲代细胞分裂结束到子代细胞分裂结束所经历的过程。它分为 G_1 期、S 期、 G_2 期和 M 期 4 个时期。一些细胞离开细胞周期, 处于静止期, 又称 G_0 期。在正常情况下人体大部分细胞处于非增殖状态的 G_0 期, 肿瘤细胞中 G_0 期细胞较少, 有更多的细胞进入了细胞周期, 发生分裂增殖。有研究资料表明在 S 期和 G_2/M 期细胞比率明显增高, 是肿瘤细胞增殖活跃的表现, 因此

(下转第 863 页)

的亲和常数测定实验发现,¹³¹I-FGD10 的亲和常数最大,¹³¹I-F56 的亲和常数最小。标记多肽与细胞上受体的亲和性可能与多肽序列的本身空间结构有关,也可能是在¹³¹I-F56 中富含 Trp、Leu、Met、Tyr 等疏水基团,疏水性较强,与 HUVEC 的非特异性结合较多,影响其对 HUVEC 的亲和性。¹³¹I 标记多肽在肿瘤部位的浓聚与肿瘤新生血管内皮细胞表达的受体数目、受体的亲和力、肿瘤组织的血液循环状况、标记多肽在体内的代谢情况等因素有关。而标记多肽与细胞上受体的亲和力可能成为关键因素之一。本研究显示,三个标记多肽中¹³¹I-FGD10 与 HUVEC 的亲和性最强,其在肿瘤部位的显像效果也最为明显。

¹³¹I-FGD10 从荷瘤裸鼠尾静脉注射后 8 h 左右,在肿瘤部位出现明显浓聚,体内脏器也有少量分布,随后体内各脏器的¹³¹I-FGD10 主要随肾脏代谢而显著下降。¹³¹I-FGD10 可望成为肿瘤早期核素显像诊断和肿瘤血管靶向治疗的靶向分子,其在体内的分布情况和肿瘤抑制情况尚须进一步研究。

(本文图 3 见第 894 页)

参考文献:

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and

- other disease[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.
 [2] Folkman J. Addressing tumor blood vessels[J]. Nature Biotechnol, 1997, 15(6): 510.
 [3] Luttun A, Autiero M, Tjwa M, et al. Genetic dissection of tumor angiogenesis: Are PIGF and VEGFR-1 novel anti-cancer targets? [J]. Biochem Biophys Acta, 2004, 1654(1): 79-74.
 [4] Boyer SJ. Small molecule inhibitors of KDR (VEGFR-2) kinase: an overview of structure activity relationships[J]. Curr Top Med Chem, 2002, 2(9): 973-1000.
 [5] Holig P, Bach M, Volkel T, et al. Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells[J]. Protein Engineering, Design & Selection, 2004, 17(5): 433-441.
 [6] An P, Lei H, Zhang J, et al. Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library[J]. Int J Cancer, 2004, 111(2): 165-173.
 [7] Hetian L, Ping A, Shumei S, et al. A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor[J]. J Biol Chem, 2002, 277(45): 43137-43142.
 [8] Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics[J]. Nat Med, 1998, 4(6): 655-657.
 [9] Dutour A, Rigaud M. Tumor endothelial cells are targets for selective therapies: in vitro and in vivo models to evaluate anti-angiogenic strategies[J]. Anticancer Res, 2005, 25(6B): 3799-3807.

[编辑:贺文] [校对:安凤]

(上接第 859 页)

高增殖比率的细胞群体中即使为整倍体细胞,也常被拟诊为恶性肿瘤^[9]。本研究显示 PIN 组 SPF、G₀/G₁ 期细胞比率介于 BPH 组和 PCa 组之间。提示 PIN 有较高的增殖活性,在前列腺癌前病变期就已出现了 SPF 的增高和 G₀/G₁ 期细胞比率的降低。由于 PIN 的 DNA 含量、SPF 等均介于 BPH 组和 PCa 之间,提示 PIN 可能是正常前列腺或 BPH 发生前列腺癌变的渐变过程,通过对细胞周期各时相及 DNA 倍体的测定,能更好的理解前列腺上皮内瘤和前列腺癌的发生机制,为分子水平的研究提供了一个很好的方向。

参考文献:

- [1] 王伯云,李玉松,黄高升,等. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000. 211-212.
 [2] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.

282-285.

- [3] 候惠莲,张学斌,南勋义,等. 前列腺癌组织 MVD、DNA 倍体与其临床生物学行为的研究[J]. 肿瘤防治研究,2003,30(2): 133-134.
 [4] 李金庆,项锋钢,董绍翠,等. 前列腺癌 DNA 倍体、PCNA、iM-VD 免疫组化研究[J]. 中华泌尿外科杂志,1999,20(1): 36-38.
 [5] Mostofi FK. Prostatic carcinoma problems in the interpretation of prostatic biopsies[J]. Hum Pathol, 1992, 23(3): 223-241.
 [6] 夏同礼. 前列腺癌的基础与临床[M]. 北京:科学出版社,2000. 95-98.
 [7] 张玉静,欧阳红生,阮承迈,等. 分子遗传学[M]. 北京:科学出版社,2000. 82.
 [8] So MJ, Cheville JC, Katzmann JA, et al. Factors that influence the measurement of prostate cancer DNA ploidy and proliferation in paraffin embedded tissue evaluated by flow cytometry [J]. Mod Pathol, 2001, 14(9): 906-912.
 [9] 彭黎明. 细胞凋亡检测的研究进展[J]. 中华医学检验杂志,1996,19(6): 336-338.

[编辑校对:安凤]