

· 临床检验研究论著 ·

胃肠道间质瘤石蜡组织 DNA 倍体及 CD117 流式细胞术分析

李琦¹, 易光明¹, 周铭¹, 李军川², 陈廷焯², 袁丹波^{3△}, 杜昆¹

(长江大学附属第一医院: 1. 检验科; 2. 病理科; 3. 防保科, 湖北荆州 434000)

摘要:目的 研究流式细胞术(FCM)检测 DNA 倍体和 CD117 对胃肠道间质瘤(GIST)的诊断价值。方法 对 52 例 GIST 和 10 例食管平滑肌瘤组织的石蜡包埋块切片经过脱蜡水化, 酶消化处理, 制成单细胞悬液。同时, 制备 8 例健康体检者外周血单细胞悬液, 用 FCM 分别检测 DNA 倍体和 CD117 表达。结果 GIST 瘤组织细胞出现异倍体阳性率 23.1%(12/52), 其中极低度/低度危险组未出现异倍体, 中度/高度危险组出现 12 例, 两组异倍体表达阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$)。52 例 GIST 瘤组织 CD117 均高表达, 食管平滑肌瘤 CD117 弱表达, 两组间 CD117 表达荧光强度差异有统计学意义($P < 0.05$)。GIST 极低度/低度危险组 CD117 荧光强度与中度/高度危险组相比, CD117 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 DNA 异倍体可提示 GIST 的中高危险度, FCM 检测组织单细胞 CD117 表达可用于 GIST 的快速筛查。

关键词: GIST; DNA 倍体; CD117; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)19-2348-02

Assessment of DNA ploidy and CD117 expression in paraffin imbedding gastrointestinal stromal tumor tissues by flow cytometry

LI Qi¹, YI Guangming¹, ZHOU Ming¹, LI Junchuan², CHEN Tingxuan², Yuan Danbo^{3△}, Du Kun¹

(1. Department of Clinical laboratory; 2. Department of pathology; 3. Department of preventive Medicine, The First Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prognostic significance of DNA ploidy and CD117 expression in gastrointestinal stromal tumors(GISTs). **Methods** 52 cases of GIST wax tissue blocks were dewaxed in xylene and rehydrated in a sequence of decreasing concentrations of alcohol, digested by pepsin, and made into single cells suspension. Meanwhile the peripheral blood of 8 healthy subjects were made in to single cell suspension, then DNA ploidy and CD117 were determined by flow cytometry. **Results** DNA aneuploidy was seen in 12 cases(23.1%) and it was not seen in very low/low GIST group(14/0), 12 DNA aneuploidy were occurred in intermediate/high GIST group, there was significantly difference between the two groups($P < 0.05$). 52 GIST samples showed high CD117 expression, the parallel group still had weak CD117 expression. There was difference significantly between the two group($P < 0.05$); But there was no statistically difference between very low/low GIST group and intermediate/high GIST group ($P > 0.05$). **Conclusion** our results suggest that DNA aneuploidy represents high risk group of GISTs. To detect the CD117 expression in tissue by using flow cytometry maybe workably for clinical GIST diagnostic screening.

Key words: gastrointestinal stromal tumors; DNA ploidy; CD117; flow cytometry

胃肠道间质瘤(GIST)是消化道常见的间叶源性肿瘤, 病理组织形态学可分为梭形细胞型、上皮样细胞型及混合型, 在形态上很难与平滑肌瘤、神经鞘膜瘤区分, 利用免疫组化的方法检测 CD117 已经成为诊断 GIST 的重要参考指标^[1], 流式细胞术(FCM)是一种自动化细胞分析技术, 逐渐普及于临床应用, 可以进行肿瘤组织的细胞周期、DNA 倍体分析、细胞表面或胞内特异标志的定量分析, 从而获得组织形态学方法难以得到的信息, 为肿瘤的临床诊断提供帮助^[2]。本研究利用流式细胞术对 52 例确诊为 GIST 的石蜡包埋组织切片进行 DNA 倍体及 CD117 表达的检测, 研究 DNA 倍体和 CD117 表达对 GIST 的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 52 例 GIST 患者中男性 31 例, 女性 21 例, 平均 58.69 岁, 按 Fletcher 分级标准极低/低度危险组 14 例, 中度危险组/高度危险组 38 例。52 例 GIST 的 CD117 免疫组化结果由病理科提供, 阳性率 86.5%(45/52)。52 例 GIST 的石蜡包埋组织块、10 例食管平滑肌瘤组织石蜡块均来自 2009 年 3 月至 2011 年 3 月我院病理科。8 例健康人外周血样本来自我院体检科。GIST 诊断标准: 组织学符合典型 GIST、免疫组

化 CD117 阳性; 或者组织学符合典型 GIST、免疫组化 CD117 阴性但可以排除其他肿瘤(如平滑肌瘤、神经源性肿瘤等)^[3]。食管平滑肌瘤诊断依据病理组织学特征, X 线食管钡餐检查和纤维食管镜检查确诊。健康体检者纳入标准: 心肝肾功能正常, 全身无器质性病变, 无糖、脂代谢异常, 无血液方面疾病。

1.2 方法

1.2.1 石蜡组织细胞处理 将石蜡块切成 50 μm 厚薄片, 二甲苯脱蜡 24~48 h, 经乙醇梯度水化, 蒸馏水漂洗, 2 g/L 胃蛋白酶消化处理, 确定消化时间^[3], 以镜下观察到完整、散在、较多的细胞时终止消化, 收集细胞, PBS 洗涤, 300 g 离心 5 min, PBS 重新洗涤 1~2 次, 300 目尼龙网过滤, 收集单细胞悬液。

1.2.2 细胞染色 吸取细胞进行涂片, 加 1 滴健康人血清固定, 自然晾干后, 瑞氏染色, 光学显微镜观察细胞形态。

1.2.3 流式细胞术 使用美国 BD 公司 FACScalibra 流式细胞仪, DNA 倍体试剂盒和 CD117 单抗均购自 BD 公司, 操作主要按照试剂盒说明书进行。DNA 倍体检测时取约 1×10^6 个细胞, 用预冷的 75% 乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃固定液, 加入 400 μL PI(50 ug/mL) 染液和 100 μL

△ 通讯作者, E-mail: 416709692@qq.com.

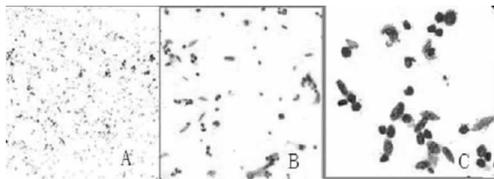
Rnase A 酶(100 μg/mL), 4 ℃ 避光放置 30 min, 上机检测, 结果用细胞周期拟合软件 ModFit 分析。CD117 检测时在 100 μL 细胞悬液加 20 μL 的 CD117-FITC, 同型对照管是在 100 μL 细胞悬液加 20 μL 的未标记 CD117 的 FITC, 室温避光放置 15 min, PBS 洗涤, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL PBS 混匀, 上机测定, 原始采集数据用 CELLGUEST 软件进行分析。

1.2.4 CD117 表达阳性判断标准 采用外周血或骨髓 CD117 的阳性判断标准, 即阳性细胞(荧光强度大于 10^1) 比例大于 10%^[10] 为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GIST 组织细胞形态 GIST 组织制备成的单细胞悬液经瑞氏染色后, 见图 1。光镜下以长短不一的梭形细胞为主, 有少量的上皮样细胞, 胞质丰富, 细胞核呈杆状, 符合 GIST 病理形态学特点。



A: 低倍视野(×10); B: 高倍视野(×40); C: 油镜视野(×100)。

图 1 GIST 组织细胞瑞氏染色

2.2 DNA 倍体分析 52 例 GIST 样本, 有 12 例出现异倍体, 阳性率为 23.1%, 其中极低度/低度危险组未出现异倍体(0/14), 中度/高度危险组阳性率为 31.6%(12/38), 两组间异倍体阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 GIST 不同组间 DNA 异倍体数

组别	n	二倍体	异倍体
GIST 极低/低度危险组	14	14	0
GIST 中度/高度危险组	38	26	12

2.3 CD117 表达 同型对照 GIST 阳性细胞率 0.1%, 荧光强度 8.2; 8 例健康人外周血细胞 CD117 阳性细胞率为 4.0%~8.1%, 荧光强度为 13.22 ± 1.0 ; 10 例食管平滑肌瘤组织细胞 CD117 阳性细胞率 68%~85%, 荧光强度为 226.34 ± 93.61 ; GIST 组细胞 CD117 阳性细胞率均为 100%, 其荧光强度为 $1\,568.40 \pm 630.30$; 其中 GIST 极低度/低度危险组 CD117 荧光强度为 $1\,538.20 \pm 580.50$, 中度/高度危险组 CD117 荧光强度为 $1\,590.30 \pm 566.20$ 。食管平滑肌瘤组与 GIST 组之间比较 CD117 表达有差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 GIST 极低度/低度危险组与中度/高度危险组比较 CD117 表达差异没有统计学意义($P > 0.05$)。各组细胞 CD117 表达荧光强度, 见表 2。

表 2 不同组细胞 CD117 表达荧光强度($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD117 表达荧光强度
健康体检组	8	13.22 ± 1.0
GIST 组	52	$1\,568.40 \pm 630.30$
食管平滑肌瘤组	10	$226.34 \pm 93.61^*$
GIST 极低/低度危险组	14	$1\,538.20 \pm 580.50$
GIST 中度/高度危险组	38	$1\,590.30 \pm 566.20$

*: $P < 0.05$, 与 GIST 组比较。

3 讨 论

随着流式细胞仪的普及, DNA 倍体分析被认为在肿瘤的预测, 治疗及预后判断中有重要的意义^[2]。本研究中 52 例 GIST DNA 异倍体阳性率为 23.1%, GIST 极低度/低度危险组与中度/高低危险组 DNA 异倍体表达差异有统计学意义, 提示 DNA 异倍体的出现与 GIST 高危分级相关, 这一结果与 Lee 等^[3]的研究结论一致。但是 DNA 异倍体在本实验 GIST 中检出率不高, 没有异倍体的出现也不能排除 GIST 的可能, 所以 DNA 异倍体不能作为一项独立的 GIST 诊断指标。

1995 年证实胃肠道卡哈尔间质细胞(ICC)表达 CD117, 并发现它是 GIST 中较特异的细胞分化抗原^[4]。侯英勇和朱雄增^[5]发现原发性 GIST 中 CD117 总阳性率达 96.6%, 采用免疫组化检测 CD117 已成为诊断 GIST 的常规手段。本实验利用 FCM 检测 GIST 组织 CD117 均有强表达, 阳性率高于免疫组化的检测结果。10 例平滑肌瘤组织在流式细胞仪上有不同程度的弱表达, Dirnhofer 等^[6]报道在平滑肌瘤、神经鞘膜瘤、淋巴瘤等其他胃肠道肿瘤中 CD117 呈阴性表达或低表达, 与本研究结果一致。两组间 CD117 表达荧光强度差异有统计学意义, 表明 FCM 分析组织 CD117 表达可以在诊断 GIST 以及鉴别诊断中发挥作用。另外, 在 GIST 极低度/低度危险组与中度/高低危险组之间 CD117 表达强度差异没有统计学意义, 提示 CD117 表达与 GIST 危险分级无相关性。对此问题国内外报道存在着不同的结论, 有报道 CD117 表达与 GIST 的解剖部位、肿瘤细胞类型及良恶性无相关性, 认为 CD117 不能作为判断胃肠道间质瘤肿瘤分级的指标^[7-8], 而张婉媛等^[9]研究表明 CD117 表达在 GIST 极低危险性与高危险性之间差异有统计学意义, 本研究结果支持前者的结论。由于没有查到组织细胞 CD117 流式细胞术表达的阳性判断标准, 所以本研究采用外周血或骨髓 CD117 的阳性判断标准, 即阳性细胞(荧光强度大于 10^1) 大于 10% 为阳性^[10], 对于组织来源的标本, 从本实验结果来看这个标准可能过低了, 鉴于本实验中食管平滑肌瘤组与 GIST 组在 CD117 荧光强度表达差异有统计学意义这一点, 设定一个合适的标记值作为同种来源组织细胞 CD117 的阳性标准, 可能会为临床提供更有意义的阳性数据, 但这需要大量样本的检测和更深入的研究工作。免疫组化的方法虽然已经是病理检查中的金标准, 但是存在着操作步骤繁琐, 人为操作因素影响大等问题。项一宁等^[11]强调了 CD117 免疫组化方法在 GIST 诊断中的判断标准化问题。FCM 具有快速, 可批量操作, 人为影响因素小等优点, 因本实验是回顾性研究, 用到的样本是石蜡包埋组织, 处理成单细胞悬液比较麻烦, 在实际临床中使用新鲜的组织样本, 就可以免去脱蜡, 水化等步骤, 更能节省大量检测时间, 为临床提供快捷的检测结果。综上所述, 本文尝试了用 FCM 检测 GIST 组织 CD117 的表达, 该方法用于 GIST 的快速筛查和鉴别诊断有一定的可行性。

参考文献

[1] 中国胃肠道间质瘤病理专家组. 中国胃肠道间质瘤病理共识意见[J]. 中华病理学杂志, 2007, 36(10): 704-707.
 [2] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 459-477.
 [3] Lee JH, Zhang X, Jung WY, et al. DNA ploidy and c-kit mutation in gastrointestinal stromal tumors[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(23): 3475-3479.
 [4] Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, et al. W/(下转第 2353 页)

用独立样本非参数检验,性别组间各指标比较采用独立样本检验,各指标对 Ins 的影响采用相关分析和偏相关分析;显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不精密度试验 Ins 浓度分别为 102.30、5.23 mU/L 时,批内检测标准差(s)为 1.09、0.22 mU/L, CV 为 1.07%、1.67%; Ins 浓度分别为 105.97、5.49 mU/L 时,天间检测 s 为 1.70、0.35 mU/L, CV 分别为 1.60%、2.60%。

2.2 温度稳定性试验 25℃保存 2、4、8、24 h 后, Ins 水平变化幅度分别为 5%、7%、13%和 24%; 4℃保存 4、8、24、72 h 后, Ins 水平变化幅度分别为 4%、8%、9%和 41%; -20℃保存 3、5、7、9 d 后, Ins 水平变化幅度分别为 3%、6%、8%和 28%。

2.3 参考范围调查 男、女性 Ins 水平分别为 (5.2±2.0)、(6.1±2.5) mU/L, 中位数为 5.0、5.7 mU/L, 女性高于男性 ($z=3.696, P<0.05$), 女性参考范围为 2.6~11.8 mU/L, 男性为 2.3~11.6 mU/L。不同年龄段参考个体 Ins 水平差异无统计学意义 ($\chi^2=1.929, P>0.05$), 见表 1。

2.4 生理和实验室指标对 Ins 的影响 直线相关分析显示, Ins 与年龄、SBP、DBP、FBG、TC、LDL 无相关性, 与 HDL 呈负相关 ($r=-0.179, P=0.000$)。偏相关分析表明:在校正年龄后, Ins 与 BMI 和 TG 呈正相关 (r 值分别为 0.139、0.161, P 值分别为 0.005、0.001), 与 HDL 呈负相关 ($r=-0.171, P=0.000$)。

表 1 各年龄段 Ins 水平比较(mU/L)

年龄(岁)	n	$\bar{x}\pm s$	中位数
20~<31	154	5.8±2.3	5.6
31~<41	126	5.5±1.8	5.2
41~<51	89	6.0±3.1	5.3
≥51	56	5.9±2.3	5.7

3 讨论

RIA 是 Ins 检测传统方法,但特异性差,不能区分胰岛素原(PI)和真胰岛素(TI),反映的是 PI 和 TI 等免疫反应性胰岛素(IRD)总水平,并非 Ins 真实浓度,因而测定值偏高^[3-5],灵敏度则受有限量抗体竞争性原理的限制,只能达到 2~8 mU/L^[4],因而不能确切反映 β 细胞的功能^[6]。ELISA、CLIA 和 ECLIA 则有效提高了 Ins 检测灵敏度和特异性。不同检测方法的方法学性能存在差异,导致 Ins 参考范围有所不同(RIA 检测空腹 Ins 参考范围为 5~20 mU/L, CLIA 检测参考范围为 4.0~15.6 mU/L, 不同品牌试剂检测参考范围也存在差异,因此各实验室应建立自己的参考范围。

不精密度试验表明, Architect i2000 全自动 CLIA 分析系统检测 Ins 高浓度标本批内、天间 CV 分别为 1.07% 和 1.60%, 检测低浓度标本批内、天间 CV 分别为 1.67% 和 2.60%, 与厂商提供数据基本一致,符合临床使用要求。厂商说明书提到 Ins 不很稳定,要求尽可能及时检测,但无更为详细的说明。因此,本研究对 Ins 检测温度稳定性进行了分析。结果表明,随着标本放置时间延长, Ins 检测结果与抽血后即刻检测结果的变化幅度逐渐升高。总体而言,标本 25、4、-20℃保存不超过 4 h、24 h 及 7 d 对 Ins 检测结果无明显影响,说明 Ins 在各种温度条件下并非很稳定,标本采集后应尽快检测,必要时可对血清标本进行冷藏或冷冻保存。

人群 Ins 水平呈偏态分布,为避免极大值和极小值的影响,本研究选择以中位数水平进行统计学分析,并以百分位数建立参考范围。各年龄组间 Ins 水平无统计学差异 ($P>0.05$),故不必建立不同年龄的参考范围。以第 97.5%位数为参考值上限、第 2.5%位数为参考值下限,女性 Ins 参考范围为 2.6~11.8 mU/L, 男性为 2.3~11.6 mU/L。

本研究以相关分析和偏相关分析探讨了生理及实验室指标对 Ins 的影响,结果显示 Ins 水平与年龄、SBP、DBP、FBG、TC、LDL 无相关性,与 BMI 和 TG 呈正相关,与 HDL 呈负相关,可见 BMI、TG 和 HDL 是影响 Ins 水平的重要因素。

由于本研究中参考个体入选标准比较高,40 岁以上人群例数相对有限,对于这部分人群的 Ins 分布情况还需增加例数作进一步研究。

参考文献

[1] Temple R, Clark PM, Hales CN. Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes: problems and pitfalls[J]. Diabet Med, 1992, 9(4):503-512.

[2] 国外医学内分泌学分册编辑部. 糖尿病诊疗标准(一)—美国糖尿病学会(ADA)2005 年公布[J]. 国外医学内分泌学分册, 2005, 25(6):436-437.

[3] Temple R, Clark PM, Nagi DK, et al. Radio immunoassay may overestimate insulin in non-insulin-dependent diabetes[J]. Clin Endocrinol, 1990, 32(7):689-693.

[4] Clark PM, Hales CN. How to measure plasma insulin[J]. Diabetes Metab Rev, 1994, 10(1):79-90.

[5] Haffner SM, Bowsher RR, Mykkanen L, et al. Proinsulin and specific insulin concentration in high and low-risk populations for NIDDM[J]. Diabetes, 1994, 43(12):1490-1493.

[6] 邓尚平, 李双庆, 熊中云. 血中胰岛 β 细胞激素测定的进展[J]. 中国糖尿病杂志, 1995, 3(1):54-56.

(收稿日期:2012-04-23)

(上接第 2349 页)

kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity[J]. Nature, 1995, 373(6512):347-349.

[5] 侯英勇, 朱雄增. CD117 在胃肠道间质瘤和其他肿瘤中的表达[J]. 中华病理学杂志, 2006, 12(35):747-749.

[6] Dirnhofer S, Zimpfer A, Went P, et al. The diagnostic and predictive role of kit(CD117) [J]. Ther Umsch, 2006, 63(4):273-278.

[7] Went P, Dirnhofer S, Bundi M, et al. Prevalance of KIT expression in human tumors[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(22):4514-4522.

[8] 朱甲明, 房学东, 肖钟迪, 等. 胃肠道间质细胞瘤 CD117、Nestin 和 Ki-67 表达及其临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(5):647-

649.

[9] 张婉媛, 吴正升, 吴强, 等. 胃肠道间质瘤组织中 ESM-1 和 CD117 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(3):287-290.

[10] 时昊, 朱锋, 张红, 等. 急性非淋巴细胞白血病中 CD117 表达与化疗疗效的关系[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(3):165-168.

[11] 项一宁, 高冬霞, 王玉萍, 等. 胃肠道间质瘤诊断中 CD117 表达检测的标准化及其免疫组织化学技术[J]. 中华病理学杂志, 2005, 1(34):50-52.

(收稿日期:2012-03-26)