

一<sup>[8]</sup>。陶红<sup>[6]</sup>的研究显示,血清 TG>2 mmol/L 时,去游离法和不去游离法检测结果有差异, TG>5 mmol/L 时差异更为显著;靳剑芸<sup>[5]</sup>的研究显示, TG<5.6 mmol/L 时,两种方法检测结果无差异。本研究以体检健康者作为研究对象,检测结果均小于 3.0 mmol/L,且两种方法检测结果比较差异无统计学意义(P=0.356),但各年龄段检测结果比较差异有统计学意义(P<0.05),随年龄增长血清 TG 水平逐渐升高。

参考文献

[1] Fossati P. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide[J]. Clin Chem, 1982, 28(13):2077-2078.  
 [2] 杨昌国,李清华,许叶,等. 中华医学会检验学会血脂测定推荐方法[J]. 中华医学检验杂志, 1995, 18(4):249-250.

[3] 李健斋. 血浆(清)甘油三酯测定方法综述[J]. 中华医学检验杂志, 1987, 10(2):119-120.  
 [4] 鄢盛恺,夏良裕. 血清甘油三酯的测定方法与标准化研究最新进展[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4):454-456.  
 [5] 靳剑芸. 去游离法和不去游离法测定儿童血清三酰甘油的差异研究[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(1):92-93.  
 [6] 陶红. 游离甘油对血清三酰甘油测定结果影响的实验观察[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2):149-150.  
 [7] 沈广虎,于娜,王丽娜,等. 两种三酰甘油测定法的对比研究及偏倚评估[J]. 检验医学, 2007, 22(2):221-222.  
 [8] Cole TG. Glycerol blanking in triglyceride assays: Is it necessary [J]. Clin Chem, 1990, 36(7):1267-1268.

(收稿日期:2012-09-02)

• 检验技术与方法 •

## 细胞 DNA 定量检测在宫颈癌筛查中的应用

曾一芹<sup>1</sup>, 左江成<sup>1△</sup>, 曾玉荣<sup>2</sup>, 孙小蓉<sup>3</sup>, 李祖铭<sup>4</sup>

(1. 三峡大学第一临床医学院/宜昌市中心人民医院检验科, 湖北宜昌 443003; 2. 湖北武当山医院, 湖北十堰 442700; 3. 华中科技大学同济医学院中加肿瘤早期诊断中心, 湖北武汉 430000; 4. 湖北省宜昌市夷陵区妇幼保健院, 湖北宜昌 443100)

**摘要:**目的 探讨 Feulgen 染色在宫颈细胞 DNA 定量分析中的应用意义。方法 随机选择 3 162 例妇女, 每例妇女制备 2 张宫颈细胞液基薄层片, 1 张进行巴氏染色及 TBS 诊断, 另 1 张进行 Feulgen 染色, 以细胞 DNA 倍体分析仪进行 DNA 定量检测。结果 3 162 例患者 TBS 诊断低级别鳞状上皮内病变(LSIL)32 例、高级别鳞状上皮内病变(HSIL)22 例; DNA 定量检测检出 3 个五倍体及其以上多倍体细胞者 64 例。32 例进行宫颈组织活检, 15 例诊断为宫颈上皮内瘤变(CIN2)、CIN3/原位癌、浸润癌, 其中 10 例为 LSIL、HSIL, DNA 定量检测检出 3 个或 3 个以上五倍体及其以上多倍体细胞者 13 例。缩短 Feulgen 染色步骤中的酸化或染色时间可影响细胞形态、细胞检出数量及平均光密度。结论 Feulgen 染色在 DNA 倍体分析中具有重要作用, DNA 倍体分析可用于宫颈细胞学检测。

**关键词:** 宫颈细胞学; DNA; 倍体分析; Feulgen 染色; 图像分析仪

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.034

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)02-0199-02

Feulgen 染色是由 Feulgen 和 Rossenbeck<sup>[1]</sup> 在 1924 年提出的细胞核内 DNA 染色技术, 广泛应用于 DNA 结构研究。目前 Feulgen 染色主要用于细胞核内 DNA 定量分析<sup>[2-3]</sup>。Feulgen 染色操作步骤简单, 主要由酸化和染色过程组成, 但二者对染色效果的影响尚不明确。全自动 DNA 倍体分析仪已广泛用于细胞 DNA 定量检测, 具有敏感性高、结果客观的优点。本文探讨了 Feulgen 染色在宫颈细胞 DNA 定量检测中的作用及相关影响因素。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 在本院进行宫颈癌筛查的妇女 3 162 例, 年龄 30~50 岁。

**1.2 仪器与试剂** 宫颈癌普查试剂盒及细胞 DNA 倍体分析仪(武汉兰丁)。

### 1.3 方法

**1.3.1 标本制备及检测** 以试剂盒说明书的要求采集受试对象宫颈刷片标本, 每例标本制成 2 张薄层细胞学片, 1 张采用巴氏染色进行常规细胞学诊断(TBS 诊断), 诊断意见包括: 正

常或良性、不明意义的非典型鳞状上皮(ASCUS)、低级别鳞状上皮内病变(LSIL)、高级别鳞状上皮内病变(HSIL)或原位癌(CIS)、鳞状上皮浸润癌。另 1 张采用 Feulgen 染色, 常规染色(5 mol/L HCl 处理 1 h, 硫堇染色 1 h, 水洗、脱水及封片)后以 DNA 倍体分析仪扫描染色片, 每张染色片扫描细胞核超过 5 000 个, 分析 99 个特征值, 包括形态特征、吸光特征、具体结构特征、Markovian 和非 Markovian 结构特征、长度特征等, 并根据不同细胞成分所具有的不同特征参数进行自动细胞分类和计数, 如正常上皮细胞、增生或癌变细胞、淋巴细胞及未参与诊断的垃圾细胞(重叠细胞核、聚焦不良细胞核和核碎片等)<sup>[5]</sup>。对照细胞为同一染色片中的 100 个正常上皮细胞, 以其平均光密度(IOD)为双倍体参考值。以下 3 种情况判为异常: 出现非整倍体细胞(如五倍体)、四倍体细胞数超过被测细胞总数的 10%、出现非整倍体细胞峰。对五倍体细胞进行显微镜观察, 并逐一进行核实, 以排除分析仪将垃圾和重叠细胞核误认为癌细胞或异常细胞。结合 TBS 诊断意见及 DNA 定量检测结果给出综合诊断及建议。

△ 通讯作者, E-mail: zuoyaa@126.com.

**1.3.2 阴道镜及病理学检查** 凡建议组织活检的妇女,均进行阴道镜检查并对可疑部位进行 4 点以上的组织活检。每例活检标本均进行病理学检查,给出病理诊断,包括正常、宫颈炎(CC)、宫颈上皮内瘤变(CIN1)、CIN2、CIN3 或原位癌、浸润癌。

**1.3.3 不同检测方法诊断结果比较** 选择病理诊断为 CIN2、CIN3/原位癌、浸润癌的 12 例患者,每例患者制备 6 张薄层细胞学片,用 3 种 Feulgen 染色法进行检测,比较 3 种方法以下指标检测结果的差异,包括二倍体细胞 IOD、平均上皮细胞数量(扫描 10 min)、五倍体细胞数量、出现五倍体及其以上多倍体细胞的患者例数、细胞核膜边缘和细胞核内纹理染色情况。

**2 结 果**

3 162 例宫颈细胞标本常规细胞学及 DNA 倍体检测结果见表 1。32 例患者进行宫颈病理活检,不同病理诊断患者常规细胞学及 DNA 倍体检测结果见表 2。12 例 CIN2、CIN3/原位癌、浸润癌患者宫颈细胞标本进行 3 种 Feulgen 染色方法(见表 3)检测,检测结果见表 4。常规染色组二倍体细胞 IOD 高于其他两种方法处理组;水解时间缩短组平均上皮细胞数量(扫描 10 min)少于其他两种方法处理组,而常规染色组和染色时间缩短组间无明显差异;常规染色组和染色时间缩短组平均异倍体细胞数无明显差异,但均多于水解时间缩短组;常规染色组细胞核边缘清楚、核内纹理清楚,染色时间缩短组核边缘和核内纹理减弱,水解时间缩短组细胞核膜边缘不清、核内纹理不清。

**表 1 宫颈细胞常规细胞学与 DNA 倍体检测结果(n)**

检测结果	常规细胞学检测	DNA 倍体检测		
		正常	1~2 个*	>3 个*
正常	2 964	2 833	120	11
ASCUS	144	96	29	19
LSIL	32	8	8	16
HSIL	22	1	3	18
合计	3 162	2 938	160	64

\*:指五倍体及其以上多倍体细胞数量,下同。

**表 2 不同宫颈组织病理诊断患者常规细胞学就 DNA 倍体检测结果(n)**

病理诊断	n	常规细胞学检测				DNA 倍体检测	
		正常	ASCUS	LSIL	HSIL	1~2 个	>3 个
CC	8	2	3	2	1	3	5
CIN1	9	1	3	3	2	2	7
CIN2	8	1	3	2	2	2	6
CIN3	5	0	1	1	3	0	5
宫颈癌	2	0	0	0	2	0	2
合计	32	4	10	8	10	7	25

**表 3 3 种 Feulgen 染色方法**

染色方法	n	5 mol/L HCl 处理(h)	硫堇染色(h)
常规方法	2	1	1
水解时间缩短	2	0.5	1
染色时间缩短	2	1	0.5

**表 4 12 例 CIN2 或 CIN2 以上级别宫颈病变**

指标	正常染色	水解时间缩短	染色时间缩短
二倍体细胞 IOD	230	170	202
平均上皮细胞数	6 731±1 207	3 393±1 032	5 432±1 423
多倍体细胞数	58±32	12±6	32±11
出现多倍体细胞的例数△	12	5	10
细胞核膜边缘	清楚	模糊	一般
细胞核内纹理	清楚	不清	一般

△:多倍体细胞包括五倍体及其以上多倍体细胞。

**3 讨 论**

Feulgen 染色可证实细胞核内 DNA 含量与染色质数量密切相关,相同组织细胞具有相同的核内 DNA 含量,且细胞在有丝分裂前 DNA 含量增大 1 倍<sup>[6-8]</sup>。通过 Feulgen 染色可对细胞核内 DNA 含量或倍体进行检测,从而判断细胞生理状态和病理改变,已广泛应用于科研和临床。本研究利用细胞 DNA 倍体分析仪对 3 162 例宫颈细胞 Feulgen 染色标本进行了检测,结果显示多数 LSIL、HSIL 患者标本均可检出五倍体及其以上多倍体细胞,在 15 例 CIN2、CIN3、宫颈癌患者中,13 例可检出 3 个或 3 个以上五倍体及其以上多倍体细胞,而常规细胞学检测仅检出 10 例 LSIL、HSIL。国内外学者均报道 DNA 定量检测对宫颈癌的诊断灵敏度高于常规细胞学检测<sup>[9-10]</sup>。宫颈癌前病变或宫颈癌可导致宫颈细胞 DNA 含量异常,Feulgen 染色加深,通过与标本中正常二倍体细胞比较,即可计算获得 DNA 含量。因此,以 Feulgen 染色进行定量细胞学检测可用于肿瘤诊断。

Feulgen 染色主要包括水解和染色过程,主要是在酸性条件下使 DNA 上的脱氧核苷酸与碱基分解,形成含有醛基结构的核苷酸,然后再与 Schiff 试剂反应而显色。然而 DNA 分子在酸性水解过程中可被裂解成极易从细胞核中脱落的小片段。因此水解过程可出现两个相反的结果,如果水解引起醛基结构增多,可使染色强度增高而提高 IOD,细胞核膜边缘和核内纹理清晰;如果水解引起较多 DNA 片段脱落,则 IOD 下降。本研究结果显示,缩短水解时间(0.5 h)、保持正常染色时间可使 IOD 下降,细胞核膜边缘及核纹理均不清晰,说明水解 30 min 可导致水解不充分,DNA 醛基形成量减少,染色后引起细胞核形态改变而导致出现异倍体细胞,进而引起误诊。染色时间也是影响 Feulgen 染色效果的关键因素。将染色时间缩短至 0.5 h 后,细胞核内 IOD、细胞数量等均下降,但与常规染色法相比并无显著改变。本研究中,12 例高级别宫颈病变中,10 例标本可检出五倍体及其以上多倍体细胞,而常规染色法在 12 例标本中均可检出,可能与染色时间缩短导致 Schiff's 试剂与醛基结合不充分有关。

总之,Feulgen 染色在细胞核内 DNA 定量检测中具有重要作用,可用于肿瘤的诊断;Feulgen 染色水解及染色步骤是决定染色效果的关键步骤,DNA 倍体分析可用于宫颈细胞学检测。

**参考文献**

[1] Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure von Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende selective färbung von Zellkernen(下转第 219 页)

别为 SD (99.4%)、万泰 (95.1%)、奥普 (88.9%)、艾康 (80.2%)、中炬 (71.0%)。假阳性率分别为 SD (0.6%)、万泰 (4.9%)、奥普 (11.1%)、艾康 (19.8%)、中炬 (29.0%)。SD 对肺结核的诊断特异度最高 ( $P < 0.05$ )。不同试剂盒的抗原纯度以及对结核分枝杆菌的特异度不同是出现这些假阳性的可能原因之一。另外不同分枝杆菌间抗原的交叉反应也是造成假阳性的重要原因。奥普、中炬、艾康、SD 和万泰的阳性预测值分别为 80.9%、61.8%、73.3%、98.5% 和 89.0%，阴性预测值分别为 87.3%、84.6%、93.5%、84.3% 和 82.8%，临床诊断符合率分别为 84.9%、73.7%、84.2%、88.0% 和 84.6%。另外，上述 5 种试剂的 ROC 曲线下面积分别为 0.833、0.731、0.844、0.851 和 0.821。由此可知，除中炬外，奥普、艾康、SD 和万泰对肺结核的诊断符合率以及诊断准确性无明显差异 ( $P > 0.05$ )，其中 SD 的诊断效能最高。另外，SD 的阳性预测值最高，即其检出结核抗体阳性时，98.5% 可诊断为肺结核病，而阴性预测值最高的是艾康，当其检出结核抗体为阴性时，93.5% 的可能性诊断为非结核病。

综上所述，5 种试剂盒中，奥普、艾康、SD 和万泰对肺结核的诊断效能近似，均优于中炬。而艾康的诊断灵敏度最高，在结核病流行调查和筛选可疑患者时，可以选用此灵敏度较高的试剂盒。在用于临床诊断时应更加注重检测系统的诊断特异度。本研究中的疾病对照组是由肺部真菌感染、上呼吸道感染、结核病史、肺肿块、肺转移癌等确诊排除活动性结核的疾病组成，这些疾病都较容易被误诊为肺结核病<sup>[12]</sup>。因此在重要的鉴别诊断或结核患者的确定诊断时，应选用特异性强、阳性预示值高的检测系统。

参考文献

[1] 金关甫, 李伟霞, 刘金伟, 等. ICT-TB 卡快速检测肺结核患者血清中五种抗结核抗体的效果[J]. 中国防痨杂志, 1998, 20(3): 148-149.

[2] 陈奎霖. 结核抗体在诊断结核病中的意义[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1608.

[3] 张国庆, 付玉军, 田巧, 等. 斑点金免疫渗滤法检测结核分枝杆菌抗体在肺结核诊断中的应用[J]. 中国医药导报, 2008, 5(8): 89-90.

[4] 胡忠义, 靳安佳, 宋月珍, 等. 四种结核抗体试剂盒临床应用评价[J]. 中国防痨杂志, 1998, 20(1): 32-34.

[5] Singh M, Andersen AB, McCarthy JEG, et al. The Mycobacterium tuberculosis 38-kDa antigen: overproduction in Escherichia coli, purification and characterization[J]. Gene, 1992, 117(1): 53-60.

[6] Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV, et al. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(11): 2313-2318.

[7] 陈红兵, 张小刚, 何秀云, 等. 结核分枝杆菌重组 38KDa 蛋白质抗原免疫学特性的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(6): 837-839.

[8] Said Tohir AH, Richard V, Raharimanga V, et al. Evaluation of an immunochromatographic test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Madagascar[J]. BMC Res Notes, 2011, 4: 403.

[9] Li X, Xu H, Jiang S, et al. TB-SA antibody test for diagnosis and monitoring treatment outcome of sputum smear negative pulmonary tuberculosis patients[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2011, 42(5): 1147-1153.

[10] 高孟秋, 初乃惠, 王海英, 等. 结核分枝杆菌特异性蛋白抗体检测在结核病诊断中的价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(12): 918-920.

[11] 毕爱笑, 徐德兴, 胡忠义, 等. TB-SA 结核抗体检测的临床应用评价[J]. 同济大学学报: 医学版, 2008, 29(2): 77-84.

[12] 孙伟民, 任永变. 肺结核误诊 54 例原因分析[J]. 职业与健康, 2001, 17(11): 146-147.

(收稿日期: 2012-09-18)

(上接第 200 页)

in mikroskopischen Präparaten [J]. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem, 1924, 135(2): 204-248.

[2] Hall TL, Fu YS. Applications of quantitative microscope in tumor pathology[J]. Lab Invest, 1985, 53(1): 5-21.

[3] Mellin W. Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis [J]. Pathol Res Pract, 1990, 186(1): 37-62.

[4] 孙小蓉, 汪键. DNA 定量细胞学[M]. 武汉: 湖北科技出版社, 2006.

[5] Bocking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry [J]. Anal Cell Path, 1995, 8(1): 67-74.

[6] Vendrely R, Vendrely C. La teneur du noyan cellulaire en acid desoxyribonucléique atraverse le organs, les individus et les especes animals[J]. Experientia, 1948, 4(3): 434-436.

[7] Swift H. The constancy of desoxyribose nuclei acid in plant nuclei [J]. Proc Natl Acad Sci, 1950, 36(4): 643-654.

[8] Patau K, Swift H. The DNA-content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion [J]. Chromisoma, 1953, 6(2): 149-169.

[9] Guillaud M, Benedit JL, Cantor SB, et al. DNA ploidy compared with human papilloma virus testing (Hybrid Capture II) and conventional cervical cytology as a primary screening test for cervical high-grade lesions and cancer in 1555 patients with biopsy confirmation [J]. Cancer, 2006, 107(3): 309-318.

[10] Tong H, Shen R, Wang ZM, et al. DNA ploidy cytometry testing for cervical cancer screening in China (DNACIC Trial); a prospective randomized, controlled trial [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(23): 6438-6445.

(收稿日期: 2012-09-18)