

• 论 著 •

DNA 倍体分析在浆膜腔积液诊断中的应用

刘 娑

(湖北省荆州市第三人民医院检验科 434001)

摘要:目的 探讨全自动细胞 DNA 倍体分析系统在良、恶性浆膜腔积液诊断中的应用价值。方法 262 例浆膜腔积液标本(胸腔积液 169 例、腹水 78 例、心包积液 15 例)经离心处理后,制片 2 张,其中 1 张用于 Feulgen 染色后,给予全自动细胞 DNA 倍体分析,另 1 张用于巴氏染色,同样给予常规的细胞学检查,比较 2 种不同的检测方法对恶性浆膜腔积液的阳性检出率。结果 262 例浆膜腔积液常规细胞学检测出 119 例(45.4%)异常,而同样标本中 DNA 倍体分析检测出 113 例(43.1%)异常,常规细胞学找到肿瘤细胞及可疑肿瘤细胞 73 例标本,均发现异倍体细胞的存在,而在常规细胞中找到核异质细胞的 46 例中,仅有 34 例出现异倍体细胞。结论 全自动细胞 DNA 倍体分析系统有助于提高浆膜腔积液的阳性检出率,可作为细胞学检查的重要辅助手段。

关键词:浆膜腔积液; DNA 倍体分析; 细胞学检查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0051-03

Application of DNA ploidy analysis in diagnosis of serous cavity effusion

LIU Suo

(Department of Clinical Laboratory, Jingzhou Third People's Hospital, Jingzhou, Hubei 434001, China)

Abstract; Objective To explore the application value of automated cell DNA ploidy analysis system in the diagnosis of benign and malignant serous cavity effusion. **Methods** 262 cases of serous cavity effusion(169 cases of pleural effusion, 78 cases of ascites, 15 cases of pericardial effusion) were treated by centrifugation, 2 slices of each sample were made. One of them used for dyeing Feulgen, which given automatic cell DNA ploidy analysis, another one for Papanicolaou staining, with a conventional cytology. The positive detection rate of these 2 kinds of different detection methods for malignant serous cavity effusion were compared. **Results** 119 cases(45.4%) of 262 cases abnormal were detected by conventional cytology of serous cavity effusion. Meanwhile, 113 cases(43.1%) were detected abnormal by DNA ploidy analysis in the same samples. 73 cases of tumor cells and suspicious tumor cells were found by conventional cytology, and different ploidy cells were found in all of these samples. In conventional cells, 46 cases of nuclear heterogeneous cells were found, while only 34 cases exist different ploidy cells. **Conclusion** Automated cell DNA ploidy analysis system is helpful to improve the positive diagnosis rate of serous cavity effusion, which can be used as an important auxiliary means of cytology.

Key words: serous cavity effusion; DNA ploidy analysis; cytological examination

临幊上通过浆膜腔积液诊断良恶性肿瘤是常用方法,准确判断其良恶性对临幊相关疾病的诊疗有重要意义。传统的方法主要靠脱落细胞学检查及其生化指标检测,但易受人为因素影响,检出率较低。目前有很多的辅助手段,然而仍然有 6% 的患者初次检查时依然得不到明确的诊断^[1],DNA 倍体分析技术却不同,它能在形态学改变的基础上提供更客观的、准确的、重复性好的增添信息^[2]。国内外许多研究指出,测定并分析细胞 DNA 含量及倍体分析能够对良恶性肿瘤的诊断以及鉴别诊断、疗效判断、预后及增生性疾病的诊断都有重要的临幊价值和意义^[3-6]。因此,应用常规细胞学检查结合 DNA 倍体分析检测能够更加完善地、准确地为临幊提供诊断依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在本院接收住院治疗患者所送的浆膜腔积液标本 262 例(其中胸腔积液标本 169 例,腹水标本 78 例,心包积液 15 例)。

1.2 方法 每例送检标本充分振荡混匀,经细胞离心(2 500 r/min)10 min 后, Sed-Fix 固定液固定 20 min, 再次离心, 清洗后用涂片离心机制成 2 张薄层细胞片。其中 1 张细胞片经

Feulgen-Thionin 染色,另 1 张细胞片用巴氏染色进行常规细胞学检查,用 SPICM-DNA 型全自动细胞图像分析系统(武汉呵爾医疗科技发展有限公司)来进行测定细胞核的 DNA 含量。

1.2.1 常规细胞学检查 常规的细胞学检查浆膜腔积液标本,其检查结果分为四类:(1)炎性(包括急性炎症、结核和慢性炎症)积水,未找到肿瘤细胞;(2)找到核异质细胞;(3)找到可疑肿瘤细胞;(4)找到肿瘤细胞(包括恶性间皮瘤和转移性癌)。

1.2.2 细胞 DNA 倍体分析 所有经 Feulgen 染色的细胞片用全自动细胞图像分析系统进行扫描处理,仪器对每张细胞片进行自动聚焦测定 4 000 个以上的细胞核,得出细胞 DNA 倍体分析系统所做的 3 种分析结果:(1)未见 DNA 倍体异常细胞(以正常 2C 细胞为主);(2)可见少量 DNA 倍体异常细胞, DNA 指数(DI)>2.5 细胞;(3)可见异倍体细胞峰及大量 DI≥2.5 细胞(即大于或等于 5C 细胞)。

2 结 果

2.1 细胞学检查 在 262 例浆膜腔积液标本中常规细胞学发现胸腔积液 96 例、腹水 39 例、心包积液 8 例共 143 例

(54.6%)正常,胸腔积液73例、腹水39例、心包积液7例共119例(45.4%)异常,异常包括46例(胸腔积液30例、腹水12例、心包积液4例)找到核异质细胞(17.6%),13例(胸腔积液6例、腹水5例、心包积液2例)找到可疑肿瘤细胞(5.0%),60例(胸腔积液37例、腹水39例、心包积液7例)找到肿瘤细胞(22.9%)。见表1。

2.2 DNA倍体分析 标本中DNA倍体分析胸腔积液98例、腹水42例、心包积液9例共149例(56.8%)正常,113例(胸腔积液71例、腹水36例、心包积液6例)异常(43.1%),其中DNA含量大于5C的异倍体细胞数较少的有34例(胸腔积液

22例、腹水9例、心包积液3例,12.9%),79例(胸腔积液49例、腹水27例、心包积液3例,30.0%)可见较多的DI ≥ 2.5 细胞及异倍体细胞峰。见表1。

2.3 细胞学检查与DNA倍体分析的比较 49例浆膜腔积液的标本中有大量DI $>5C$ 的异倍体细胞中,常规细胞学发现可疑肿瘤6例,核异质细胞3例,另外3例为炎性标本,最终找到肿瘤37例。而DNA倍体分析的特异性、准确性和敏感性分别为100.0%、92.1%和85.7%,常规细胞学诊断的特异性、准确性和敏感性分别为90.3%、80.2%和72.1%,两种方法比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

表1 262例浆膜腔积液DNA倍体分析与常规细胞学结果比较(n)

标本类型	n	常规细胞学				DI $>5C$ 的细胞数		
		炎性积水	核异质细胞	可疑肿瘤细胞	肿瘤细胞	0	1~2	≥ 2.5
胸腔积液	169	96	30	6	37	98	22	49
腹水	78	39	12	5	22	42	9	27
心包积液	15	8	4	2	1	9	3	3

表2 262例浆膜腔积液DNA倍体分析与常规细胞学诊断实验评价(%)

项目	特异度	准确度	敏感度
倍体分析	100.0	92.1	85.7
常规细胞学	90.3	80.2	72.1

3 讨 论

目前我国的恶性肿瘤出现井喷现象,肿瘤的发病率也在不断上升,针对临床的浆膜腔积液,临幊上常常会难以明确其性质,所以对其性质的鉴别至关重要。细胞学检查特异性高,但敏感性不高,其阳性检出率仅40%~50%^[7],而且由于非典型增生的胸腹膜间皮细胞往往较难区别于恶性肿瘤细胞,故也可导致误诊。肿瘤细胞的重要特征就是基因突变和DNA受损,它的表现为DNA的结构异常和DNA的数量异常增多,从而形成多倍体和非整数倍体,DNA倍体和结构的异常就能够非常准确地反映细胞的异形性^[8]。近年来,越来越多的临幊医师开始重视用细胞DNA定量分析检测基因组大规模变化,以染色体倍数改变作为检测肿瘤细胞的一个指标,并且在宫颈癌^[9]、口腔癌^[10]等多种肿瘤的临幊早期检测^[11]中获得了非常不错的应用价值。因此,采用DNA倍体分析检测辅助细胞涂片,是一个能够提高临幊的诊断率,同时能为临幊给患者制定适合的治疗方案,提供非常有价值的辅助信息,这就是本院开展的新技术。

细胞核内染色体数量在细胞生长不同时期是变化的,即G1期(23对染色体) \rightarrow S期(23对 \rightarrow 46对染色体) \rightarrow G2期(46对染色体) \rightarrow M期(46对 \rightarrow 23对染色体)。不同细胞生长周期的长短是不一致的,如青蛙的胚胎细胞可在不到1 h内发生一个周期,而人的某些肝细胞有时可长达1年以上。细胞生长周期中的长短是不一致的,一般说来,M期在整个细胞生长周期内所占时间最短,占整个细胞生长周期的5%~10%。S、G2期时间较稳定,G1期的长短就有很大的不同,有些细胞在G1期不再向前发展,处于相对停止状态,这种细胞所处的时期为G0

期。机体的正常情况下,细胞大部分是G0期,仅有极少数(10%以下)的细胞是进入生长周期。然而大多数细胞在G0、G1期,即染色体对数为23对,又称DNA二倍体(2C细胞)。少数细胞在S期、G2期(4倍体细胞即4C细胞)和M期。在正常人体细胞中,DNA含量是一致的,即为整倍体。只有在生殖细胞(精子,卵细胞为单倍体),S期细胞(DNA含量在2倍体和4倍体之间),某些丢失了DNA片断的退变细胞才出现非整倍体细胞。

一个正常细胞核内有23对染色体,其中DNA含量是固定数量不变的(7 pg)^[12]。但是在定量细胞学上细胞核的DNA含量,不是一个绝对的数量,更不能直接测定出来的。DNA-ICM是通过测定染色细胞核的IOD来判断细胞核含量的多少,用二维结构测定的DNA含量,不能够完全反映染色体的倍数,为了避免差别,在测定细胞DNA含量的时候,用DNA指数(DI)来表示DNA含量。DNA指数=被测细胞IOD值/正常细胞DNA(G0/G1期)IOD平均值。当被测细胞处于G0/G1期时,其IOD量与正常细胞IOD平均值很接近,故DNA指数为1,即为2C细胞,少数细胞进入DNA合成期及有丝分裂期(G2/M期),这时其IOD量正好约为正常细胞IOD平均值的2倍,DNA指数为2,即为4C细胞。处于S期的细胞,DI指数在1~2,即2C~4C,当细胞为8倍体时,DI值约为4。由于淋巴细胞内DNA含量及形态较为稳定,很多DNA定量细胞学测定淋巴细胞IOD,把淋巴细胞的DNA当作正常细胞DNA,这样的参照来比较被测细胞的DNA。

当异倍体细胞DNA含量在2C~4C形成峰时,或者是当有3个DNA含量为大于5C的细胞时,那么就可以诊断为恶性胸腹水^[13]。DNA合成期的正常增殖细胞包含在二倍体与四倍体之间(S期)的少数异倍体细胞,细胞增殖就是细胞分裂与细胞核DNA复制,细胞无限的增殖和转移即细胞恶变的本质,诊断恶性肿瘤的客观指标就是测量细胞核DNA含量^[14]。DNA-ICM检测炎性浆膜腔积液时,大多未见异倍体细胞,即使可见异倍体细胞,也只是1~2个,而恶性积液绝大多数可见异倍体细胞和异倍体细胞峰。由此可见,恶性积液的肿瘤细胞染

色体倍数已发生了改变,当异倍体细胞峰越多,那么染色体就越不稳定,这样就提示肿瘤的恶性程度就会越高,患者的预后就会越差。因此恶性浆膜腔积液的 DNA-ICM 直方图也可用于肿瘤的恶性程度和预后的评估。

恶性浆膜腔积液中非整倍体细胞峰可有不同 DNA 含量,其原理尚未确定。非整倍体细胞峰出现的位置主要取决于肿瘤细胞内染色体的倍数。如果肿瘤细胞的染色体倍数为正常细胞的 1.5 倍,那么就可能在 DI 为 1.5 时出现 1 个峰;如果肿瘤细胞的染色体倍数为正常细胞的 3 倍,非整倍体细胞的峰就可出现在 DI 为 3 的位置,浆膜腔积液非整倍体细胞峰出现的不同部位,那么它就可能与原发肿瘤的类型、肿瘤的性质和发展的程度有关系。

DNA 倍体分析在鉴别浆膜腔积液性质方面与病理细胞形态学的诊断不同,它代表的只是 DNA 含量的异常,因此就出现了与病理细胞学诊断不相符的情况,如在恶性肿瘤组中,49 例浆膜腔积液细胞表现为大量异倍体。病理细胞学检查仅 37 例检出癌细胞,这可能与 DNA-ICM 的高灵敏度有关。

DNA-ICM 在诊断浆膜腔积液中尚存的问题:少数炎性积液细胞可出现细胞退变或核固缩,这些细胞在 Feulgen 染色时,可出现大于 5C 细胞,但这些细胞的数量比例非常小。另外,DNA-ICM 对成团的肿瘤细胞不能识别,不能将成团的细胞分割开,而胸腔积液中转移的肿瘤细胞多为腺癌细胞,常聚集成团出现,从而导致误诊。

总之,DNA 倍体分析是鉴别浆膜腔积液良恶性的一种非常有效的临床辅助方法。它不仅比常规细胞学更敏感、更客观,而且诊断率更高,如果将 DNA 倍体分析和常规的细胞学检查相结合,那么就能更加有效地进行鉴别诊断,能够更好地为临床治疗带来便利,同时对患者的预后给予依据。

参考文献

- [1] Osterheld MC, Liette C, Anca M. Image cytometry: an aid for cytological diagnosis of pleural effusions [J]. Diagn Cytopathol, 2005, 32(3): 173-176.
- [2] 舒仪经, 阚秀. 细针吸取细胞病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [3] 贾永蕊. 药学实验室技术系列: 流式细胞术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [4] Saha I, Dey P, Vhora H, et al. Role of DNA flow cytometry and Image cytometry on effusion fluid [J]. Diagn Cytopathol, 2000, 22(2): 81-85.
- [5] Lazcano O, Chen LM, Taai C, et al. Image analysis and flow cytometric DNA Studies of the role of benign and malignant body cavity fluids: Reappraisal of the role of current methods in the differential diagnosis of reactive versus malignant conditions [J]. Mod Pathol, 2000, 13(7): 788-813.
- [6] Unger K, Raber M, Bedrossian C, et al. Analysis of pleural effusions Using Automaticated flow cytometry [J]. Cancer, 1983, 52(5): 873-877.
- [7] 时国朝, 邓伟吾. 胸液细胞 DNA 含量分析对恶性胸腔积液的诊断价值 [J]. 中华内科杂志, 1995, 34(4): 268-269.
- [8] 马正中, 阚秀. 鉴别细胞病理学 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [9] Guillaud M, Benedet J, Scott C, 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 1 555 patients with biopsy confirmation [J]. Cancer, 2006, 107: 309-318.
- [10] Maraki D, Yalcinkaya S, Pomjanski N, et al. Cytologic and DNA-cytometric examination of oral lesions in lichen planus [J]. J Oral Pathol Med, 2006, 35(4): 227-232.
- [11] Dunn JM, Mackenzie GD, Oukrif D. Image cytometry accurately detects DNA ploidy abnormalities and predicts late relapse to high-grade dysplasia and adenocarcinoma in Barrett's oesophagus following photodynamic therapy [J]. Br J Cancer, 2010, 102(11): 1608-1617.
- [12] 王永才. 最新脱落细胞病理诊断学多媒体图谱 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2006.
- [13] Auer GU, Caspersson TD, Wallgren AS. DNA content and survival in Mammary carcinoma [J]. Anat Quant Cytol, 1980, 2(3): 161-165.
- [14] Haroske G, Baak JP, Danielsen H, et al. Fourth updated ESACP consensus Report on diagnostic DNA image cytometry [J]. Anal Cell Pathol, 2001, 23(2): 89-95.

(收稿日期:2016-08-09 修回日期:2016-10-28)

(上接第 50 页)

- [1] [J]. Am J Clin Pathol, 2001, 116(3): 311-315.
- [3] 陈倩云, 石兵, 韩江, 等. PDCA 循环法在 ISO15189 医学实验室质量管理体系建立中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 249-250.
- [4] 张新平. 临床实验室分析前质量管理的体会 [J]. 山西医药杂志, 2001, 40(1): 84-86.
- [5] 姚瑶, 李妙, 车晓燕, 等. 基于 6Sigma 过程改进的缩短住院病人急诊生化检验报告时间研究 [J]. 中国医院, 2008, 14(8): 15-18.
- [6] 国秀芝, 邱玲. 临床生化检验流程调查与优化管理 [J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(4): 100-101.

- [7] 曹明善. 利用实验室信息管理系统对急诊生化检验 TAT 影响因素的分析 [J]. 山西医药杂志 (下半月版), 2013, 42(2): 88-89.
- [8] 宋昊岚, 张水香, 彭志英. 生化检验的报告时间分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(5): 72-75.
- [9] 周庆利, 何剑虎, 刘军. LIS 与 HIS 集成研究 [J]. 生物医学工程杂志, 2008, 25(6): 1294-1298.
- [10] 姚晴虹, 柏志安, 朱立峰, 等. 基于 ISO15189 认证的 LIS 系统改造探索 [J]. 中国医疗器械杂志, 2012, 36(1): 59-60.

(收稿日期:2016-08-01 修回日期:2016-10-20)