

- [6] 谢百发,刘明华,张雷.急性白血病患者采用血小板参数检测的意义[J].北京医学,2016,38(7):741-742.
- [7] 刘聪,葛繁梅.血液系统常见病T淋巴细胞亚群检测及临床价值的分析[J].延安大学学报(医学科学版),2016,14(1):29-31.
- [8] 刘靓珏,骆丰,孙明洪,等.288例初诊恶性血液病患者血液分析仪散点图及报警信息分析[J].中国实验血液学杂志,2014,22(2):329-332.
- [9] 姜波.血小板参数联合骨髓涂片对血液疾病检验的效果分析[J].世界最新医学信息文摘,2015,5(87):19-21.

• 短篇论著 •

## 全自动DNA定量分析系统在结直肠肿瘤诊断中的应用<sup>\*</sup>

吴崑嵒<sup>1</sup>,丁康<sup>1#</sup>,张辉<sup>2</sup>,方媛<sup>3</sup>,林慧萍<sup>1</sup>,章秀<sup>1</sup>,马云<sup>1</sup>,耿建祥<sup>4△</sup>

(1.南京市中医院全国肛肠疾病治疗中心,南京210001;2.南京市中医院检验科,南京210001;  
3.南京中医药大学,南京210046;4.南京市中医院病理科,南京210001)

**摘要:**目的 探讨DNA定量分析技术在结直肠癌诊断中的应用价值。方法 采用DNA定量分析技术对176例正常及结直肠肿瘤患者肠道组织进行异倍体的检测,并以病理学诊断结果作为“金标准”,分析该检测用于诊断的准确性。通过ROC曲线评估该方法的诊断价值。结果 结直肠组织中异倍体的数量和结直肠癌密切相关,癌组织中异倍体的数量明显高于息肉及正常组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。发现结直肠癌的灵敏度为91.8%,特异度为92.0%,以出现9个以上异倍体为诊断阈值的灵敏度为69.9%,特异度为100.0%,此项技术用于结直肠癌的早期诊断有较高准确性。对异倍体预测发生息肉及结直肠癌风险的准确性进行分析,结果显示预测模型有一定的意义,总体来看, $\geq 9$ 个异倍体发生结直肠癌的预测正确的可能性为94%。结论 异倍体定量分析方法对结直肠癌组织的诊断价值极高,可以临床推广,其诊断阈值需扩大样本量进一步验证。

**关键词:**异倍体; 定量分析; 结直肠癌; 病理学诊断

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.024

**文章编号:**1673-4130(2018)03-0338-04

- [10] 侯发林.骨髓涂片配合血小板参数对血液疾病检验的效果研究[J].吉林医学,2014,35(24):5331-5332.
- [11] 王天震.血小板参数联合骨髓涂片对血液疾病检验的效果分析[J].中国实用医刊,2015,19(22):118-119.
- [12] 李松琦,董彩霞,谷宇辉.血小板参数联合骨髓涂片对血液疾病检验的效果分析[J].基层医学论坛,2015,19(17):2376-2377.

(收稿日期:2017-07-27 修回日期:2017-10-04)

**中图法分类号:**R446.9;R735.3

**文献标识码:**B

结直肠癌是来源于结肠或直肠黏膜上皮的恶性肿瘤,该病早期一般无明显的临床症状,中晚期会出现便血、腹痛等症状,其发病率、病死率均较高,大多数由结直肠息肉转化而来。GLOBOCAN 2012<sup>[1]</sup>数据显示,全球结直肠癌发病1 360 602例,居恶性肿瘤第3位。中国结直肠癌发病率和病死率在亚洲国家中排名靠前。2016年中国恶性肿瘤发病和死亡分析显示,结直肠癌的发病率已位居癌症谱的第4位(女性第3位、男性第5位)<sup>[2]</sup>,病死率则位居第5位(女性第4位、男性第5位),年新增病死患者高达15.9万人,结直肠癌的发病率明显上升,城市地区远高于农村地区。多数患者发现时已属于中晚期,因此需要对结直肠癌早期筛查、早期诊断标准进行研究。本课题组近年来一直在寻找无创、快捷、准确的早期诊断方

法,并取得了一定突破,发现全自动DNA定量分析系统具有一定的可靠性,应用于临床诊断的价值较高,可以开发出一种可直接用于分析诊断的无创异倍体分析技术。而在这之前,需要收集一些临床标本并进行相关性分析,进行前期的评估,本研究得出了有一定意义的结果。

### 1 材料与方法

**1.1 一般资料** 收集2013年1月至2015年1月南京市中医院全国肛肠疾病治疗中心共176例就诊者的肠道组织标本,包括正常肠道组织黏膜63份,结直肠癌113份(其中息肉40份,恶性肿瘤73份),其中男性117例,女性59例,最大年龄84岁,最小年龄28岁。

**1.2 仪器** 印片由全自动细胞DNA检测分析系统

\* 基金项目:南京市卫计委课题项目(ZKX14046)。

# 共同第一作者。 △ 通信作者,E-mail:WXC83838@163.com。

本文引用格式:吴崑嵒,丁康,张辉,等.全自动DNA定量分析系统在结直肠肿瘤诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2018,39(3):338-341.

(武汉兰丁医学高科技有限公司)进行扫描处理。系统硬件构成包括全自动显微镜扫描平台、数码 CCD、自动控制系统等。

**1.3 方法** (1)活检取材:对肠镜下的正常肠道组织、疑似肿瘤的组织或手术取下的肿块(未用甲醛固定前)进行活检取材。将活检组织印在玻片上,自然干燥后用 95%乙醇固定 10 min,送往病理科做异倍体分析。(2)制片:印片不需进一步制片;如无法活检取材则进行灌洗,灌洗液中如细胞多可做液基薄层制片,如细胞少,可用吸管吸取细胞涂在玻片上,自然干燥,用 95%乙醇固定 10 min。(3)染色:快速切片或印片,用苏木素染色(不染细胞质),其他玻片均用 Feulgen 染色,用于异倍体的检测。(4)原理:在肠道上皮重度不典型增生或浸润癌时,可发现上皮细胞异倍体增多;异倍体细胞多少与肠道肿瘤的严重程度密切相关,异倍体细胞和异倍体细胞峰越多,病变越严重,预后也越不好。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS23.0 软件对数据进行统计分析。计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料组间比较则采用 t 检测,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。运用 Logistic 回归分析疾病与异倍体数量的相关性,运用 ROC 曲线对诊断价值进行判断,计算曲线下面积(AUC),面积越大,判断价值越高。

## 2 结 果

**2.1 异倍体在不同组织中的分布情况** 对所收集的结直肠正常、息肉及癌组织标本进行异倍体分析,异倍体为 0 个的标本在正常组织、息肉组织、癌组织中的分布为 68.24%、24.71%、7.06%。1~8 个异倍体的标本在三种组织中的分布为 11.11%、44.44%、44.44%。大于 9 个异倍体的标本,未出现在正常肠道组织中,息肉及癌组织标本中分别占 23.88%,76.12%。癌组织中异倍体明显高于息肉及正常组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 异倍体检测与病理活检结果的比较** 若以病理活检结果作为“金标准”,出现 1 个以上 DNA 异倍体为阳性,发现结直肠癌的灵敏度为 91.8%,特异度为 92.0%;以出现 9 个以上异倍体为阳性,发现结直肠癌的灵敏度为 69.9%,特异度为 100.0%;以出现 1 个以上异倍体为阳性标准,发现肠息肉的灵敏度为 47.5%,特异度为 92.0%。通过 ROC 曲线分析评估异倍体检测的诊断价值,结果显示息肉相关的 ROC AUC 为 0.701( $P = 0.001 < 0.05$ ),AUC 的范围为 0.700~<0.900,表明此项技术有一定准确性,见图 1。而与癌组织相关的 AUC 为 0.947( $P = 0.000 < 0.05$ ), $AUC > 0.900$ ,表明此项技术用于结直肠癌的早期诊断有较高准确性,见图 2。

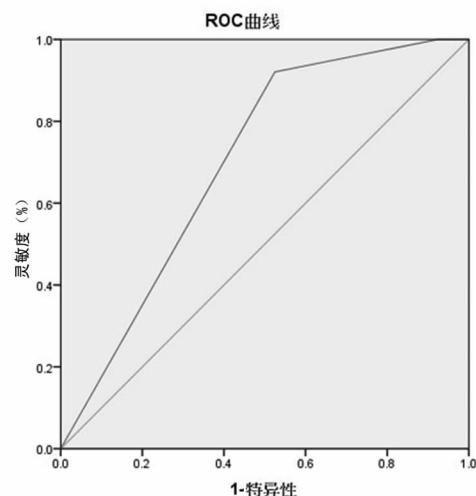


图 1 结直肠息肉相关 ROC 曲线图

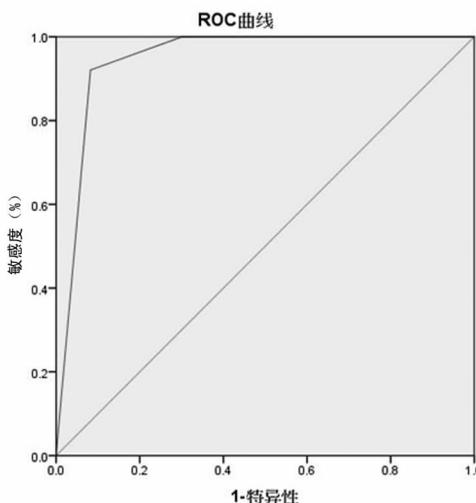


图 2 结直肠癌相关 ROC 曲线图

**2.3 异倍体分析用于预测发生息肉及结直肠癌的风险** 模型的似然比卡方检验( $\chi^2 = 144.749, P < 0.01$ )说明预测模型有意义,1~8 个异倍体相对于 0 个异倍体患者,发生息肉的风险  $OR = 8.838, 95\% CI$  为 2.880~27.125。1~8 个异倍体对于 0 个异倍体患者,发生结直肠癌的风险  $OR = 30.933, 95\% CI$  为 8.350~114.590。总体来看,0 个异倍体作为预测正常组织正确的可能性为 68.0%,1~8 个异倍体预测发生息肉的可能性为 43.0%, $\geq 9$  个异倍体发生结直肠癌的预测正确的可能性 94.0%。风险估算见表 1。

表 1 风险估算表

组织类型	异倍体(n)	$\beta$	标准误差	P
结直肠息肉	0	1.016	0.255	0.000
	$\geq 9$	19.747	0.753	0.000
	1~8	2.179	0.572	0.000
结直肠癌	0	-2.269	0.429	0.000
	$\geq 9$	23.833	0.813	0.000
	1~8	3.432	0.668	0.000

### 3 讨 论

结直肠癌的早期诊断非常重要,早期行根治手术可使得患者获得较好的预后,术后的5年生存率可高达90%,而有转移的结直肠癌患者,其5年生存率低于10%。结直肠癌最常见的远处转移器官是肝脏,发生肝转移的患者可高达60%。结直肠是息肉的高发部位,95%的结直肠癌是从大肠息肉转化过来的<sup>[8]</sup>。这个过程可能需5~10年,且存在着个体差异,由于早期很少引起不适症状,往往不易被发现,多数患者是在体检或检查其他疾病时才被发现的。大部分患者就诊时已发展到中晚期,失去行根治手术治疗的机会,往往预后较差。所以,寻找早期诊断该病的方法尤为重要。细胞学诊断具有方法简单、无创等优点,在临床肿瘤诊断中发挥着重要作用,例如宫颈癌的普查,而能否用于结直肠癌的早期筛查仍需要进一步探究。显微镜下,人工通过细胞形态进行细胞学诊断已有近70年历史,但因人为操作存在着误差和局限性,至今不能解决细胞学诊断质量控制及标准化的难题。面对我国日益增加的癌症防治及肿瘤早期筛查需求,用自动化的技术解决细胞学诊断中人为误差大,病理医生缺乏的困境成为当务之急。

有研究表明,异倍体可用于监测细胞增殖和肿瘤转化,肿瘤细胞异倍体增多,异倍体的异型性与肿瘤的发生、发展及临床病理特点密切相关<sup>[4-5]</sup>。正常肠道组织细胞的DNA含量相对恒定,在正常肠道细胞发生瘤变甚至癌变的过程中,有大量的核酸类物质合成,同时伴随细胞内染色体片段的增加或丢失,DNA量的变化,肿瘤细胞基因重组,碱基对变化或者染色体丢失或增多,产生非整倍体肿瘤细胞株,肿瘤细胞即为>5c细胞,而大肠癌细胞中DNA异倍体形式与肿瘤大小、分期、淋巴结转移及病死率有关,分化程度差、有淋巴结转移的远端大肠癌异倍体更加常见<sup>[6-7]</sup>。染色体研究表明,一般实体性恶性肿瘤染色体数目在二倍体至四倍体之间,并有集中在二倍体附近及在三倍体与四倍体之间的两种倾向<sup>[8]</sup>,因此,在肿瘤发展阶段,DNA含量不均匀的细胞可被直接观测到,可认为是癌变的重要标记物,测定和分析细胞DNA含量的变化对良、恶性肿瘤的诊断、鉴别诊断、疗效判断及预后测定等有重要价值<sup>[9]</sup>,异倍体分析在国内外已经成为一种常规的筛查技术<sup>[10]</sup>,已经广泛用于宫颈癌的诊断及人乳头瘤病毒(HPV)感染的基因分布情况检查<sup>[11-13]</sup>,而用于肠道病变检查鲜有报道。本课题组使用全自动细胞DNA定量分析系统,通过测定肠道细胞核内DNA含量变化,将细胞DNA异倍体发生改变的细胞挑出来,实现全自动扫描、自动诊断及完善的质量控制。该系统根据不同细胞成分所具有的不同特征参数来完成自动细胞分类和计数过程,如正常上皮细胞、增生或异倍体细胞、淋巴细胞、中性白细胞等凡出现多于3个>5c异倍体细胞或异倍体细胞峰

者为阳性。记忆细胞位置,便于医生通过控制软件,对每个细胞重新定位进行镜下人工复核,增加诊断的准确性。该系统实现了从标本登记、制片、染色、扫描、诊断到发放报告的全流程管理,便于开展质量跟踪和远程技术支持。

通过上述研究,本课题组后期将开发一种无创的细胞DNA异倍体分析技术,可直接刷取肠道脱落细胞用于分析。脱落细胞学检查是临床病理形态学检查的常用方法,异倍体检测比形态学检查能更早发现病变。细胞学检查结合异倍体检测能更好地判断其良恶性,能为临床早期发现、治疗恶性肿瘤提供可靠的诊断依据。另一方面,此项技术能满足自动化、智能化、经济性的要求。异倍体分析在宫颈癌筛查中的第一份经济学研究显示,在宫颈病变筛查中异倍体分析比液基细胞巴氏涂片费用更便宜<sup>[14]</sup>,并具有一致的诊断效率,与国内研究结果一致<sup>[15]</sup>。异倍体分析运用仪器进行检测,自动化程度高、结果可靠,可重复性好、操作简便、速度快,操作者无需细胞学诊断经验,报告结果经图形化处理,便于解读。一般情况下,细胞DNA检测分析系统对每张玻片上6 000个以上的细胞核进行扫描测定,每个细胞核均得到500余个特征值,其中包括形态特征、吸光特征、具体结构特征、Markovian和非Markovian结构特征及长度特征等。

综上所述,异倍体定量检测对于诊断结直肠肿瘤有较高的准确性,作为结直肠肿瘤早期诊断的重要指标具有可行性,但仍需要进一步扩大样本进行研究。后期,本课题组将把该系统运用于肠道脱落细胞学的结直肠癌及癌前病变检测,早于形态变化检测出细胞核DNA含量的变化,具有方便、快捷、无创、精准的特点。

### 参考文献

- [1] WHO. Colorectal cancer: estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [EB/OL]. [2017-06-13]. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets.aspx).
- [2] 陈万青,郑荣寿,张思维,等.2012年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2016,25(1):1-8.
- [3] 中华医学会消化病学分会.中国结直肠肿瘤筛查、早诊早治和综合预防共识意见(一)[J].中华消化杂志,2012,32(1):1-10.
- [4] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [5] 范华骏,郑勇斌,童仕伦,等.大肠癌转移和复发与KRAS及磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位α基因突变的关系[J].中华实验外科杂志,2014,31(8):1819-1821.
- [6] 姬宏莉,姬宏娟,宋卫兵,等.大肠癌线粒体DNA诱导NIH3T3细胞D环突变[J].广东医学,2011,32(10):1230-1232.
- [7] 姬宏莉,姬宏娟,杜芳,等.大肠癌线粒体DNA高突变I区及II区突变及其功能意义[J].实用医药杂志,2012,29

- (7):630-633.
- [8] 杜传书. 医学遗传学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [9] CHEN L M, LAZCANO O, KATZMANN J A, et al. The role of conventional cytology, immunocytochemistry, and flow cytometric DNA ploidy in the evaluation of body cavity fluids: a prospective study of 52 patients[J]. Am J Clin Pathol, 1998, 109(6):712-721.
- [10] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [11] COLDITZ G A, CROWLEY J. DNA cytometry testing for cervical cancer screening: approaches and reporting standards for new technologies[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(22):6971-6972.
- 短篇论著 •

- [12] 董云灿, 耿建祥, 张劲松, 等. 1 722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头瘤病毒基因的分型[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(7):817-820.
- [13] 王春兰, 仲玉英, 耿建祥, 等. 967 例女性宫颈细胞 DNA 定量检测的临床研究[J]. 中国妇幼保健 2015, 30(29): 4959-4962.
- [14] FOLLEN M, SCHOTTENFELD D. Surrogate endpoint biomarkers and their modulation in cervical chemoprevention trials[J]. Cancer, 2001, 91(9):1758-1776.
- [15] 范雪梅, 徐薇, 耿建祥, 等. 879 例女性宫颈液基细胞学检查与 DNA 定量分析法的对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23):3165-3170.

(收稿日期:2017-07-22 修回日期:2017-09-27)

## 非霍奇金淋巴瘤 DNA 倍体的流式细胞术检测分析<sup>\*</sup>

蔡植华, 郑乃莹, 林永华

(广州医科大学附属肿瘤医院内二科, 广州 510095)

**摘要:**目的 分析流式细胞术检测非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者 DNA 倍体情况, 以期提高对 NHL 患者病变程度及预后预测水平。方法 选择 2014 年 11 月至 2015 年 10 月该院收治的 NHL 患者 84 例, 所有患者均经手术病理确诊为 NHL, 并根据术中所见分期, 84 例患者按照病理分期为 4 组(I 期 16 例, II 期 23 例, III 期 31 例, IV 期 14 例)。选取该院同期收治的 20 例淋巴结增生患者作为对照组, 所有淋巴瘤患者均于术中取淋巴瘤组织, 淋巴结增生患者采用穿刺获取淋巴组织, 进行 DNA 倍体流式细胞检测相关指标(包括 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数)。分析不同临床分期 NHL 患者与淋巴结增生患者的 DNA 倍体变异相关指标的差异, 分析患者的国际预后指数(IPI)与 DNA 倍体流式细胞检测指标(DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数)的相关性。结果 84 例患者 DNA 倍体参数 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数均明显高于对照组, 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); NHL III 期与 IV 期患者的 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数均明显高于 NHL I 期、II 期患者, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。NHL 患者 IPI 指数与 DNA 异倍体率、S 期细胞率、DNA 指数均呈正相关。结论 流式细胞术检测 NHL 患者的 DNA 倍体参数, 有助于临床医生对患者的病情程度进行判断并预测患者的预后情况, 对患者的诊治方案选择具有重要临床意义。

**关键词:**非霍奇金淋巴瘤; 流式细胞术; DNA 倍体; 临床价值

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.025

**文章编号:**1673-4130(2018)03-0341-03

**中图法分类号:**R733.4

**文献标识码:**B

非霍奇金淋巴瘤(NHL)是淋巴结和其他淋巴组织发生的肿瘤<sup>[1]</sup>, 流式细胞术是一种可以对细胞或亚细胞结构进行快速分析和分选的技术<sup>[2-3]</sup>。本文对 NHL 患者与淋巴结增生患者采用流式细胞术进行 DNA 倍体相关参数的检测, 分析这些参数与 NHL 形态学分型间的相关性, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 将 2014 年 11 月至 2015 年 10 月本院收治的 NHL 患者共 84 例纳入研究, 所有患者均经

手术病理检查确诊为 NHL, 并根据术中所见进行分期, 分为 4 组(I 期 16 例、II 期 23 例、III 期 31 例、IV 期 14 例)。选取本院同期收治的 20 例淋巴结增生患者作为对照组。5 组患者的性别、年龄比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 纳入排除标准<sup>[3]</sup>** 纳入标准:(1)经手术病理确诊为 NHL;(2)患者了解参加此次研究的利弊, 并愿意配合此次研究的各项工作, 签署知情同意书。排除标准:(1)其他恶性肿瘤的患者;(2)未签署知情同意

\* 基金项目: 吴阶平医学基金科研项目(320675014198)。

本文引用格式: 蔡植华, 郑乃莹, 林永华. 非霍奇金淋巴瘤 DNA 倍体的流式细胞术检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(3):341-343.