

口腔颌面部非何杰金氏淋巴瘤流式细胞DNA分析及意义探讨

马莉 何志秀 吴兰雁 蔡益新 黄河长 雷松

摘要 目的:探讨流式细胞学各项指标与非何杰金氏淋巴瘤(NHL)发病部位、临床分期、病理分级、细胞类型及预后的关系和流式细胞学对NHL的诊断价值。方法:采用流式细胞仪测定50例口腔颌面部NHL及10例反应性增生淋巴结(RLN)石蜡包埋组织的DNA倍体、细胞周期各参数,并分析各参数及其与预后的关系。结果:10例RLN皆为二倍体,而NHL二倍体率为54%,异倍体率为46%,二者有显著性差异。SPF值、S+G₂/M值与非何杰金氏淋巴瘤恶性程度密切相关,SPF值、S+G₂/M值随肿瘤的恶性程度增大而增大。结论:口腔颌面部淋巴瘤流式细胞学检测具有一定诊断学价值,但其运用一定要与形态学相结合。同时SPF、S+G₂/M等指标可以反映其细胞增殖状况及病理学恶性程度。

关键词 流式细胞学 非何杰金氏淋巴瘤 反应性增生淋巴结

Flowcytometry DNA Analysis of Oral and Maxillofacial Non-Hodgkin's Lymphoma

Ma Li

The College of Stomatology, Zhongshan University

He Zhixiu, Wu Lanyan, Cai Yixin

West China College of Stomatology, Sichuan University

Huang Hechang

The Third Affiliated Hospital of Zhongshan University

Lei Song

West China Hospital, Sichuan University

Abstract

Objective: The purpose of this study was to investigate the relationship between the results of flowcytometry analyses of different clinical stage, location, pathologic grade and cell origin of oral and maxillofacial non-Hodgkin's lymphoma (NHL), and the diagnostic value of flowcytometry analysis in lymphoma. **Method:** This study analyzed 50 oral and maxillofacial NHL cases and 10 reactive lymph nodes (formalin fixed and paraffin embedded) by flowcytometry (FCM). **Results:** Reactive lymph nodes were all diploid. The diploid rate of NHL was 54%, and aneuploidy rate was 46%. There was statistically significant difference between reactive lymph nodes and NHL in the DNA ploidy status and cell cycle data (SPF, CV, S+G₂/M, DI). The S phase fraction (SPF) and S+G₂/M had close relationship with the grade of NHL. SPF value and DNA ploidy status had no obvious relationship with the prognosis. **Conclusion:** The results suggested that the FCM had diagnostic value in NHL, especially when the morphological diagnosis was difficult. Although the cell cycle data had no prognostic value, SPF and SPF+G₂/M can show the proliferative status of NHL, which can help clinical doctor select therapeutic method.

Key words: flowcytometry non-Hodgkin's lymphoma reactive lymph nodes

恶性肿瘤的倍体及细胞周期分析对于估计肿

瘤的恶性程度、预测预后和判定疗效有着重要的价值。在淋巴瘤的流式细胞学(flow cytometry, FCM)研究中以非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)为最多,而口腔颌面部NHL的FCM研究国内外报道较少。本研究采用流式细胞仪分析

作者单位:510060 中山大学附属光华口腔医学院病理教研室(马莉),四川大学华西口腔医院病理科(何志秀,吴兰雁,蔡益新),中山大学附属第三医院口腔科(黄河长),四川大学华西医院肿瘤生物治疗中心(雷松)

50例口腔颌面部 NHL 石蜡包埋组织的 DNA 倍体、细胞周期各参数,探讨其与发病部位、临床分期、病理分级、细胞类型及预后的关系,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择 1988 ~ 1999 年华西医科大学口腔医院病理确诊的 50 例 NHL 标本为实验组,其石蜡包埋组织在取材进行 FCM 检测前行切片复审,经 2 个病理医生读片再次确诊并作免疫组化染色,按 1992 年 Kiel 分类标准重新分类。另用 10 例反应性增生淋巴结(reactive lymph nodes,RLN)的石蜡包埋组织作为对照组。

1.2 单细胞悬液制备及 DNA 荧光染色

将石蜡包埋组织块切成 40 μm 厚切片 3 ~ 5 张,二甲苯脱蜡 48 h 后,依次用 100%、95%、70%、50% 的乙醇水化各 10 min。再经蒸馏水漂洗 2 次后,加入 pH 1.5 的 0.5% 胃蛋白酶 5 ml 消化,置 37℃ 水浴 30 min,边消化边震荡,后加入生理盐水 5 ml 终止消化,过 200 目网筛后收集悬液。将收集的悬液离心 4 min(1500 r/min),弃上清,再加入生理盐水 5 ml 混匀,再次离心 4 min(1000 r/min),弃上清。以碘化丙啶(PI)染液 1 ml 插入 DNA 荧光染色。

1.3 测定方法

使用美国 Coulter 公司的 Elite 型流式细胞仪,以波长 488 nm,功率 15 mW 的氩离子激光器作光源,以直方图及数据分析形式显示。调节变异系数使 CV 值在 2% 以内。每份样品测定 5000 ~ 10000 个细胞。

1.4 DNA 倍体分析

正常体细胞 DNA 为二倍体,出现异倍体则是恶性肿瘤的特征。以 NHL 组织中残留的正常淋巴细胞为正二倍体细胞,其在直方图上表现为 DNA 含量较低的 G₀/G₁ 峰,对含两个以上的 G₀/G₁ 峰者计算 DNA 指数(DI)。

$$DI = \frac{\text{样本中肿瘤细胞 G}_0/\text{G}_1 \text{ 峰道值}}{\text{样本中正常淋巴细胞 G}_0/\text{G}_1 \text{ 峰道值}}$$

以 DI 为 1 ± 0.05 为二倍体肿瘤细胞,以 DI 为 1 ± 0.15 为近二倍体肿瘤细胞,余者为异倍体肿瘤细胞¹。

1.5 细胞周期分析

DNA 倍体分析,细胞周期分为 DNA 合成前期(G₁期),DNA 合成期(S期),DNA 合成后期或分裂前期(G₂期),分裂期(M期),静止期(G₀期)。

1.5.1 S 期比率(s phase fraction,SPF)及 S + G₂/M 期 SPF 指处于 S 期的细胞占整个细胞的百分比,由于 S 期是增殖细胞的 DNA 合成期,故 SPF 可以反映一定的细胞增殖情况。G₂/M 指处于分裂前期和分裂期的细胞占整个细胞的百分比,常和 S 期一起(S + G₂/M)用来反映细胞增殖情况。

1.5.2 变异系数(CV)值 正常淋巴对照 DNA 直方图图形

清楚显示 G₁ 峰有降支垂直下行,而肿瘤病例 G₁ 峰的降支有额外峰出现,但在实际工作中有一些病例尽管在最好的分析条件下,也无明显的额外峰。因此 Wain 等²⁻⁴ 建议将 G₁ 峰图 CV 值的增加作为恶性淋巴瘤的标志。在笔者的测试中也发现淋巴瘤的 G₁ 峰的 CV 值明显大于反应性增生淋巴瘤组织,因此本研究将 G₁ 峰的 CV 值也作为分析指标之一。

2 结果

本研究 50 例 NHL 流式细胞学检测 41 例成功,9 例失败。10 例 RLN 均成功。反应性增生淋巴结、二倍体肿瘤和异倍体肿瘤直方图见图 1。

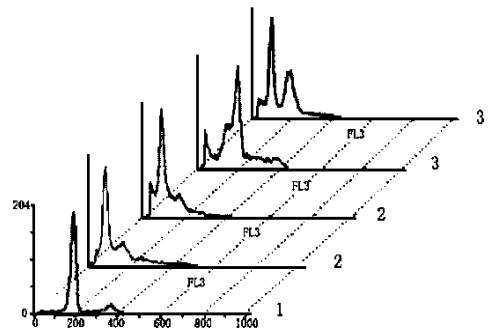


图 1 反应性增生淋巴结、二倍体淋巴瘤以及异倍体淋巴瘤直方图

Fig 1 The histogram of reactive lymph node ,diploid NHL and aneuploid NHL

曲线 1 反应性增生淋巴结直方图,G₀/G₁ 峰为单峰,S 段低平
Curve 1 The histogram of reactive lymph node , G₀/G₁ peak is single , S segment is low and plane

曲线 2 二倍体淋巴瘤直方图,G₀/G₁ 峰为单峰,峰宽加大(CV 值加大),S 段抬高
Curve 2 The histogram of diploid NHL , G₀/G₁ peak is single , the width of the peak increases , S segment rises

曲线 3 异倍体淋巴瘤直方图,G₀/G₁ 峰为双峰
Curve 3 The histogram of aneuploid NHL , G₀/G₁ peak is double

10 例 RLN 组和 41 例 NHL 组的倍体数、SPF、CV 值、S + G₂/M、DI 值的测定结果见表 1。从表 1 可见,两组间的异倍体数、SPF 值、CV 值、S + G₂/M 及 DI 值,经过²及 t 检验,均有显著性差异(P < 0.05)。

41 例 NHL 组的不同恶性程度、临床分期、发病部位及细胞类型的倍体数、SPF、CV 值、S + G₂/M、DI 值的测定结果见表 2。从表 2 可见,NHL 不同病理分级(1992 年 Kiel 分类)高恶性和低恶性间的 SPF 值及 S + G₂/M 值经 t 检验有显著性差异(P < 0.05),但 DI 值、CV 值及异倍体数经 t 及²检验均无显著性差异(P > 0.05)。41 例不同的部位(涎

腺、颌骨、口内、其它)、不同临床分期(、 、 、 期)和细胞类型(T、B)的 NHL 间倍体数、SPF 值、CV、S + G2/M 值、DI 值经过 χ^2 、*t* 检验及方差分析, 均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

NHL 中二倍体瘤与异倍体瘤的生存情况经 Kaplan-Meier 生存曲线及 Logrank 检验作生存分析, 二者间无显著性差异。NHL 中以 SPF 为 18(淋巴瘤的 SPF 均值)作为分界, SPF 大于 18 的淋巴瘤与 SPF 小于和等于 18 的淋巴瘤的生存情况经 Kaplan-Meier 生存曲线及 Logrank 检验作生存分析, 二者间

无显著性差异。

表 1 41 例 NHL 及 10 例 RLN 的流式细胞分析结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The result of flowcytometry analyses of 41 NHL and 10 RLN

组别	二倍体例数(%)	异倍体例数(%)	SPF	CV	S + G2/M	DI
RLN	10(100)	0(0)	8.53 ± 3.02	7.66 ± 1.53	16.23 ± 1.64	1.00 ± 0.00
NHL	22(54)	19(46)	18.12 ± 8.62	13.79 ± 3.99	27.31 ± 9.44	1.29 ± 0.38

表 2 不同临床分期、发病部位、病理分级和细胞源性的 41 例 NHL 的流式细胞分析结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The result of flowcytometry analyses of different clinical stage, location, pathologic grade and cell origin of 41 NHL($\bar{x} \pm s$)

类别	二倍体例数	异倍体例数	例数	SPF	CV	S + G2/M	DI
Clinical stage	7	8	15	19.43 ±9.85	13.65 ±4.50	27.92 ±9.68	1.36 ±0.44
Clinical stage	7	6	13	19.10 ±7.55	14.26 ±4.15	30.15 ±10.27	1.31 ±0.39
Clinical stage	8	3	11	14.07 ±7.27	13.06 ±3.61	22.17 ±6.61	1.12 ±0.23
Clinical stage	0	2	2	24.20 ±10.33	15.80 ±0.71	32.50 ±9.91	1.62 ±0.13
Salivary gland	5	5	10	14.59 ±6.59	13.49 ±4.35	24.26 ±7.57	1.32 ±0.41
Maxilla and mandible	3	1	4	26.45 ±10.77	14.68 ±3.65	35.73 ±13.56	1.10 ±0.20
Oral cavity	9	7	16	17.62 ±7.00	13.65 ±4.02	25.74 ±7.69	1.29 ±0.39
Other location	5	6	11	19.04 ±10.39	13.89 ±4.26	29.29 ±10.74	1.33 ±0.41
Low grade	15	9	24	*12.86 ±4.90	12.88 ±3.44	*21.28 ±5.11	1.22 ±0.31
High grade	7	10	17	*25.55 ±7.14	15.08 ±4.46	*35.81 ±7.36	1.39 ±0.45
T cell origin	7	3	10	21.43 ±5.47	13.54 ±4.55	29.08 ±6.61	1.10 ±0.17
B cell origin	15	16	31	17.05 ±9.23	13.87 ±3.88	26.74 ±10.22	1.35 ±0.41

注: * $P < 0.05$

3 讨 论

3.1 口腔颌面部恶性淋巴瘤流式细胞学检测的诊断价值

本研究结果显示 RLN 皆为二倍体,而 NHL 二倍体率为 54%,异倍体率为 46%,经统计学分析二者有显著性差异。在形态学改变不典型的情况下对病变进行流式细胞分析,如有异倍体的检出对淋巴瘤的诊断有很大帮助,高的 SPF、CV、S + G2/M 及 DI 值对淋巴瘤的诊断同样也具有价值,这与 Waitzin 等^{5~7}采用 FCM 对皮肤淋巴瘤的研究结果一致。本研究还显示 SPF 和 S + G2/M 值与 NHL 恶性程度(1992 年 Kiel 分类分为高恶与低恶)密切相关,SPF 和 S + G2/M 值随肿瘤的恶性程度增大而增大,这与 Vackovic 等⁸的研究结果类似。笔者认为 SPF、S + G2/M 等指标能反映肿瘤增殖情况及病理学恶性程度,可为临床医生提供治疗的参考。但口腔颌面部不同发病部位、临床分期和细胞类型的 NHL 的 DNA 增殖程度及倍体数相近,说明 DNA 增

殖程度仅与病理学意义上的恶性程度有密切关系。

本研究还通过对恶性淋巴瘤中二倍体瘤与异倍体瘤及 SPF 大于 18 和 SPF 小于和等于 18 的淋巴瘤的生存情况经 Kaplan-Meier 生存曲线及 Logrank 检验作生存分析说明 SPF 值的大小及倍体状况与预后无关。笔者认为其原因可能是 SPF 值大者的淋巴瘤肿瘤细胞增殖较快,处于 DNA 合成期及分裂期的细胞量多,对放、化疗尤其敏感,治疗效果好;而 SPF 值小者的肿瘤细胞增殖相对较慢,处于 DNA 合成期及分裂期的细胞量少,对放、化疗反应不敏感,故治疗效果不如前者好。因此不同恶性程度及 SPF 值的淋巴瘤预后无显著性差别。这与 Morgan 等⁹对 178 例 NHL 的研究结果相似。但 Lackovska 等¹⁰经过对 117 例 NHL 的研究表明:SPF 及 DNA 倍体状况均可作为独立的预后因素。Holte 等¹¹对 63 例 B 细胞 NHL 研究结果表明 SPF 具有独立的预测预后的价值。由此可见淋巴瘤细胞增殖活性是否可作为预测其预后的指标还有待进一步研究。

3.2 流式细胞学组织选材

笔者从本研究发现流式细胞学的选材最好选细胞密集、出血坏死少的组织,否则失败率高。笔者还认为石蜡包埋组织 G0/G1 峰漂移较大,不宜用鸡红细胞或正常淋巴细胞作为内外对照。本研究用自身对照法进行检测。因所有 NHL 组织中均残存一定量正常淋巴细胞,当出现两个以上 G0/G1 峰时,首峰以后诸峰均可视为异倍体峰,以 DI 值大于 1.15 者作为异倍体肿瘤,此种方法会遗漏部分亚二倍体肿瘤,但后者发生率小于 2%,故不影响结果分析^{12,13}。

总之口腔颌面部淋巴瘤流式细胞学检测具有一定诊断学价值,但其运用一定要与形态学相结合,尤其是在形态学检查比较困难的时候 FCM 的运用更有意义。虽然本研究病例中 FCM 各项指标没有预测预后的价值,但 SPF、SPF + G2/M 等指标可以反映其细胞增殖状况及病理学恶性程度,为临床医生选择治疗方案提供依据。

参考文献

- Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer*, 1990, 65(5): 1194 ~ 1205
- Wain SL, Braylan RC, Bornwittz MJ. Correlation of monoclonal antibody phenotyping and cellular DNA content in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*, 1987, 60(10): 2403 ~ 2411
- Christensson B, Tribukait B, Linder IC. Cell proliferation and DNA content in non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer*, 1986, 58(6): 1295 ~ 1304
- 张文智,陈秀鉴. 二倍体恶性淋巴瘤流式细胞术诊断问题的探讨. *数理医药学杂志*, 1996, 9(3): 227 ~ 230
- Waitzin CL, Larsen JK, Christensen JJ. Early diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma by DNA flow cytometry on skin biopsies. *Cancer*, 1984, 54(7): 1348 ~ 1352
- Qiu BS, Ni HZ. DNA flow cytometry from paraffin embedded tissue in diagnosis of cutaneous malignant lymphomas and pseudolymphomas. *Chin Med J*, 1993, 106(8): 611 ~ 614
- Levy PC, Flotte JJ, Preffer F. Application of DNA flow cytometry from paraffin-embedded tissue to the diagnosis of mycosis fungoides. *J Cutan Pathol*, 1991, 18(4): 279 ~ 283
- Vackovic J, Forenpoher G, Marusic M, et al. Prognostic relevance of non-Hodgkin's lymphomas cell cycle data. *Neoplasma*, 1998, 45(5): 332 ~ 335
- Morgan DR, Williamson P, Quirke AD. DNA Content and prognosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*, 1986, 54(4): 643 ~ 649
- Lackovska B, Gruchala A, Niezabitowski A, et al. Prognostic and predictive evaluation of DNA content, S-phase fraction and immunophenotyping in non-Hodgkin's lymphomas in adults. *Pol J Pathol*, 1999, 50(1): 23 ~ 29
- Holte H, Sao Z, Smeland EB. Prognostic value of lymphoma specific s-phase fraction compared with that of other cell proliferation markers. *Acta Oncol*, 1999, 38(4): 495 ~ 503
- Srigley J, Barlogie B, Butler JJ, et al. Heterogeneity of non-Hodgkin's lymphoma probed by nucleic acid cytometry. *Blood*, 1985, 65(5): 1090 ~ 1096
- 王伟光,纪树荃,孟如松,等. 非何杰金氏淋巴瘤流式细胞术分析及其临床意义探讨. *中国肿瘤临床*, 1994, 21(6): 412 ~ 415

(2001-09-06 收稿)

(本文编辑 邓本姿)

《中国口腔医学年鉴》第十卷审定稿会议在蓉召开

《中国口腔医学年鉴》第十卷审定稿会议于 2002 年 4 月 21 ~ 27 日在成都四川大学华西口腔医学院召开。来自北京大学、上海第二医科大学、第四军医大学、武汉大学、吉林大学、四川大学等全国 15 所口腔医学院系、口腔医院以及香港大学牙医学院、香港口腔医学学会的编委及联络员等共 70 人出席了会议。

大会由《中国口腔医学年鉴》编委会主任委员、四川大学华西口腔医学院王翰章教授主持。大会上,《中国口腔医学年鉴》主编、四川大学华西口腔医学院院长周学东教授对《中国口腔医学年鉴》第九卷的编辑、出版、发行工作作了全面总结,并汇报了《中国口腔医学年鉴》第十卷编委会组成情况及编辑出版工作,宣读了第十卷《中国口腔医学年鉴》编委会人员名单。

大会后,即分组进行审稿、定稿。全体编委在紧张而有序的数天工作后,圆满完成了第十卷《中国口腔医学年鉴》审定稿任务。

会议期间,四川大学华西口腔医学院邀请了与会编委中华口腔医学会会长张震康教授、上海第二医科大学邱蔚六院士、香港大学牙学院张念光教授等为华西口腔医学院全体青年教师、研究生等作了专题讲座。

《中国口腔医学年鉴》编辑部