

FCM 在横纹肌肉瘤细胞周期和 DNA 倍体分析研究中的应用

魏熙胤 高松源 牛瑞芳 孙保存

(天津医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所 天津 300060)

摘要 目的:以 20 年来的病理资料存档完整的 90 例横纹肌肉瘤石蜡标本为研究对象,研究横纹肌肉瘤细胞的细胞周期和 DNA 倍体变化与临床病理分型之间的相关性。方法:荧光染料使用碘化丙啶 (PI), PI 可以和 DNA 双链结合,细胞中 PI 染料的含量与 DNA 的含量成正比,因此 PI 的含量就间接反映出细胞中 DNA 的含量和周期分布情况。结果:二倍体 8 例 (8/90 8.89%),次二倍体 4 例 (4/90 4.44%),超二倍体 38 例 (38/90 42.22%),近四倍体 13 例 (13/90 14.44%),出现多周期细胞群 27 例 (27/90 30%)。结论:DNA 倍体改变在横纹肌肉瘤有一定规律,除多周期细胞现象外,整体的 DNA 倍体改变以超二倍体形式最多,其次为近四倍体 DNA,而二倍体 DNA 病例较少。这与横纹肌肉瘤具有明显的异质性完全符合。

关键词 横纹肌肉瘤 流式细胞术 DNA 倍体

FCM (flow cytometry) 即流式细胞术,是用流式细胞仪 (flow cytometer FCM) 测量液相中悬浮细胞或微粒的一种现代分析技术。流式细胞仪主要由四部分组成:液流系统、光学系统、电子系统、分析系统。一般是将待测细胞或微粒进行荧光染色后制成悬液标本,在一定气体压力下将待测样品压入流动室,用不含细胞或微粒的缓冲液 (又称鞘液) 在高压下从鞘液管喷出,鞘液管入口方向与待测细胞或微粒流成一定角度,使鞘液包裹着细胞或微粒高速流动,形成一个圆形的流束 (即鞘流),待测细胞在鞘液的包裹下单行排列,依次通过流式细胞仪的检测区域,经激发光激发后产生荧光信号并由微机进行分析。

现代流式细胞术更是由于它结合单克隆抗体技术、定量细胞化学和定量荧光细胞化学技术,使其在生物学、临床医学、药理学、材料学等众多研究领域中的应用有更加突飞猛进的发展。在生物学中应用流式细胞术可进行细胞核型分析、染色体分析、分选指定的染色体或细胞,有时也用来检测或定量测量细胞表面或内部特异基因所编码的细胞分子。在医学中利用 FCM 可进行细胞周期分析、DNA 倍体分析、定量分析检测细胞增殖标志物、细胞表面标志、癌基因蛋白产物、耐药蛋白、细胞凋亡等,为疾病的诊断与治疗提供可靠信息。

横纹肌肉瘤是儿童和青年最常见的软组织肉瘤,在儿童发病率最高,青春期后期发病率最低,5% 的横纹肌肉瘤发生于儿童,2% 为先天性。在成人,尤其是大于 40 岁的人群中,横纹肌肉瘤很少见。

本研究以 20 年来的病理资料存档完整的 90 例横纹肌肉瘤石蜡标本为研究对象,研究横纹肌肉瘤细胞的细胞周期和 DNA 倍体变化与临床病理分型之间的关系。荧光染料使用碘化丙啶 (PI), PI 可以和 DNA 双链结合,细胞中 PI 染料的含量与 DNA 的含量成正比,因此 PI 的含量就间接反映出细胞中 DNA 的含量和周期分布情况。

1 材料与方法

1.1 标本

本研究所用 90 例病例均为本院存档的病理蜡块标本,相关病理资料详实。其中男性 55 例,女性 35 例,男女比例为 1.57 : 1。年龄 2~76 岁,平均年龄 33.9 岁。病理类型:胚胎型 30 例、腺泡型 38 例、多形性 22 例。组织学分级:I 级 23 例、II 级 44 例、III 级 23 例。转移情况:原位复发 42 例、淋巴结转移 6 例、远处转移 18 例、死亡 42 例。另选正常淋巴结组织蜡块 3 例作为标准对照。

1.2 仪器与试剂

流式细胞仪为美国 BECKMAN COULTER 公司生产,型号 EPICS-XL。数据采集软件为 SYSTEM II,数据分析软件采用 MULTICYCLE。组织切片机为德国莱卡公司产品 2502 型。其他设备为常用的冰箱、离心机、恒温箱、电子天平等。

1.3 主要试剂

二甲苯、无水乙醇、生理盐水、1N 盐酸、0.5% 胃蛋白酶、含 RNA 酶的碘化丙啶染料。

1.4 方法步骤

制备样本单细胞悬液。

复合 HE 切片, 按切片选出相应存档蜡块, 石蜡包埋组织不得小于 $10 \times 10 \times 2\text{mm}$, 在组织切片机上连续切取 3~5 片 $50 \mu\text{m}$ 厚切片, 置于试管内。

将盛有组织切片的试管置于 60°C 恒温箱中预热 30min, 取出后趁热加入足量二甲苯, 30min 后更换二甲苯, 重复 3 次。

彻底脱蜡后, 分别用无水乙醇 $\times 2$ 、95%、80%、70% 的梯度酒精漂洗组织切片, 直至返水。

生理盐水冲洗组织切片 2~3 次, 将组织切片置于平皿中, 加入 1mL 生理盐水, 用弯头眼科剪剪碎组织。

用 1N 盐酸溶液配制 0.5% pH1.5 的胃蛋白酶消化液。

将剪碎的组织悬液从平皿中移入离心管中, 1200rpm 离心 5min, 弃上清。

向离心管中加入 2mL 胃蛋白酶消化液, 在 37°C 恒温孵箱孵育 1h。

将消化好的组织 1200rpm 离心 5min, 弃上清, 加入 1mL 生理盐水重悬终止消化。

用 200 目尼龙网过滤样本, 滤液移入流式细胞仪专用上样管中, 800rpm 离心 5min, 弃上清, 加入 PI 染料 1mL, 室温避光孵育 30min, 上机检测。

1.5 检测分析方法

1.5.1 标本检测 在 SYSTEM II 操作系统下, 首先检测正常淋巴细胞, 调整电压将 $G_{0/1}$ 期细胞峰定位于直方图横坐标荧光强度为 200 的位置, 液流速度设为低速, 然后再检测肿瘤标本。

1.5.2 分析方法 DNA 倍体, 通过计算 DNA 指数 (DI) 进行分析:

$$DI = \frac{\text{肿瘤标本 } G_{0/1} \text{ 峰平均荧光强度}}{\text{正常标本 } G_{0/1} \text{ 峰平均荧光强度}}$$

二倍体: $DI=1.0$ ($0.9 \sim 1.1$)

四倍体: $DI=1.9 \sim 2.1$

非整倍体: $DI < 0.9$ 或 $DI > 1.1$

偏移正常二倍体 5% 的峰应考虑为异倍体 S 期比率

利用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 不同 DNA 倍体的分布

本组研究将 DNA 倍体分为次二倍体组 ($DI < 0.9$)、超二倍体组 ($DI > 1.1$) 和近四倍体组 (DI 在 $1.8 \sim 2.5$ 之间) 三组, 同时出现多周期细胞群。

其中二倍体 8 例 (8/90 8.89%), 次二倍体 4 例 (4/90 4.44%), 超二倍体 38 例 (38/90 42.22%), 近四倍体 13 例 (13/90 14.44%), 出现多周期细胞群 27 例 (27/90 30%) (见图 1)。根据检测的情况, 本组研究将 S 期细胞百分率 (SPF) 不同的病例分为 4 组, 第一组: SPF 为 0 (6 例 6.67%), 第二组: $0 < \text{SPF} \leq 4.0$ (15 例, 16.67%), 第三组: $4.0 < \text{SPF} \leq 8.0$ (27 例, 30.0%), 第四组: $\text{SPF} \geq 8.0$ 。

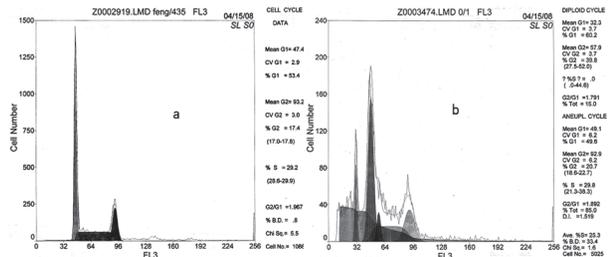


图 1 DNA 倍体图谱

a. 正常二倍体; b. 多倍体

2.2 DNA 倍体在不同病理类型中的分布

本组 90 例横纹肌肉瘤中胚胎型 (ERMS) 30 例, 其中二倍体 3 例、超二倍体 11 例、近四倍体 2 例、多周期病例 14 例; 腺泡型 (ARMS) 38 例, 其中二倍体 4 例、次二倍体 3 例、超二倍体 16 例、近四倍体 10 例、多周期病例 5 例; 多形性横纹肌肉瘤 (PRMS) 22 例, 其中二倍体 1 例、次二倍体 1 例、超二倍体 11 例、近四倍体 2 例、多周期病例 7 例。经统计学分析 $P=0.034$, 即不同组织学类型的横纹肌肉瘤中 DNA 倍体的分布有明显差异, 多周期性横纹肌肉瘤和超二倍体在各组织学类型中均普遍存在, 而近四倍体主要分布于腺泡型横纹肌肉瘤 (见表 1)。

表 1 DNA 倍体在不同组横纹肌肉瘤病理类型中的分布

RMS 亚型	例数	DNA 倍体									
		一倍体		次二倍体		超二倍体		近四倍体		多周期	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ERMS	30	3	10.0	-	-	11	36.7	2	6.7	14	46.7
ARMS	38	4	10.5	3	7.9	16	42.1	10	26.3	5	13.2
PRMS	22	1	4.5	1	4.5	11	50.0	1	4.5	8	36.4
合计	90	8	8.9	4	4.5	38	42.2	13	14.4	27	30.0

2.3 D3. DNA 倍体在不同组织学分级中的分布

23 例 I 级病例中二倍体 2 例、超二倍体 9 例、近四倍体 7 例、多周期性 5 例; 44 例 II 级病例中二倍体 5 例、次二倍体 3 例、超二倍体 18 例、近四倍体 5 例、多周期病例 13 例; 23 例 III 级病例, 其中二倍体 11 例、近四倍体 1 例、多周期病例 9 例 (见表 2)。经统计学分析, $P=0.279$, 说明不同组织学分级的横纹肌肉瘤中 DNA 倍体无明显差异。

表2 DNA 倍体在不同组织学分级横纹肌肉瘤中的分布

RMS 亚型	例 数	DNA 倍体									
		一倍体		次二倍体		超二倍体		近四倍体		多周期	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
I	23	2	8.7	-	-	9	39.1	7	30.4	5	21.7
II	44	5	11.4	3	6.8	18	40.9	5	11.4	13	29.5
III	23	1	4.4	1	4.4	11	47.8	1	4.4	9	39.1
合计	90	8	8.9	4	4.4	38	42.2	13	14.4	27	30.0

3 讨论

本组研究发现, DNA 倍体改变在横纹肌肉瘤有一定规律, 除多周期细胞现象外, 整体的 DNA 倍体改变以超二倍体形式最多, 其次为近四倍体 DNA, 而二倍体 DNA 病例较少, 尚不足本组病例的 10%(8/90)。这与横纹肌肉瘤具有明显的异质性完全符合。然而 20 世纪 90 年代初, DNA 异倍体对预后影响的评价有明显的矛盾性结论, 结论不明确往往是因为检测病例过少, 不能代表实际情况造成。在本组研究中, 由于一些存档的组织不适用于流式细胞技术的检测, 原本收集到的 128 例横纹肌肉瘤只检测 90 例。因为这组病例中以超二倍体和多周期细胞居多, 虽然检测到总的 DNA 变化较多, 并且似有明显的倾向性, 但统计学检测结果往往没有显著的差异。本组研究中, 经统计学分析 DNA 倍体在不同组织学分型病例中分布差异存在统计学意义, 根据表 1 可知, 多周期现象在胚胎型和多形性横纹肌肉瘤中多见, 而近四倍体 DNA 几乎都为腺泡型横纹肌肉瘤, 因为超二倍体 DNA 是本组研究对象 DNA 倍体改变的最多见类型, 所以在各型横

纹肌肉瘤中均有分布。这与国外文献报道大致相同, 有研究发现胚胎型横纹肌肉瘤中 DNA 倍体改变以超二倍体为主, 而腺泡型横纹肌肉瘤中 DNA 倍体的改变则以近四倍体为主, 但本组研究发现, 腺泡型横纹肌肉瘤中除包括超过 80% 的近四倍体病例外, 还同时存在超二倍体形式。这就提示腺泡型横纹肌肉瘤比胚胎型横纹肌肉瘤有更复杂的细胞遗传学的改变, 尽管光镜诊断中, 腺泡型横纹肌肉瘤具有相对比较一致的细胞学表型, 胞核相对较小。但细胞遗传学的改变却比胚胎型横纹肌肉瘤复杂, 甚至与细胞学表型远较腺泡型横纹肌肉瘤复杂许多的多形性横纹肌肉瘤相比, 腺泡型横纹肌肉瘤中细胞遗传学改变可造成更加不好的预后趋势。因此要揭示 DNA 倍体改变与横纹肌肉瘤病理类型之间的相关性, 还需利用 FISH、CGH 等现代分子生物学技术进一步深化横纹肌肉瘤细胞遗传学的研究。

参考文献

- 1 Rijken A, Dekker A, Taylor S, et al. Diagnostic value of LINA analysis in effusions by flow cytometry and image analysis: A prospective study on 102 patients as compared with cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 2001, 95 : 6~12
- 2 Unger KM, Raber M, Bedrossian CW, et al. Analysis of pleural effusions using automated flow cytometry. *Cancer* 2000, 52 : 873~7
- 3 Evans DA, Thornthwaite JT, Ng AB, et al. DNA flow cytometry of pleural effusions. Comparison with pathology for the diagnosis of malignancy. *Anal Quant Cytol Histol* 2002, 5 : 19~27
- 4 Ceyhan BB, Demiralp E, Celikel T. Analysis of pleural effusions using flow cytometry. *Respiration* 2001, 63 : 17~24

The application of FCM in detecting cell cycle and DNA ploidy of rhabdomyosarcomas

Wei Xiyin Gao Songyuan Niu Ruifang Sun Baocun

(Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060)

Abstract Objective: To investigate application of DNA ploidy in differential clinical pathotyping of Rhabdomyosarcomas. Methods: Paraffin wax embedded rhabdomyosarcomas tissues of 90 cases were conserved by Tianjin Cancer Hospital during 1983~2003. The method is Flow cytometry. We used the fluorescein-PI as a probe to detect the cell cycle and DNA ploidy. Result: A statistically significant correlation was found between ploidy histologic subtype of RMS, A hyperdiploid DNA pattern predominated among patients with embryonal RMS, and a tetraploid pattern dominated among patients with alveolar RMS. The highest 5-year survival rate was seen among patients with hyperdiploid RMS, followed by those with diploid, tetraploid and hypertetraploid RMS. Conclusion: The precise prognostic value of DNA ploidy in RMS and the relationship between DNA ploidy and myogenic transcriptional regulatory proteins remains equivocal. Larger, cooperative studies could give statistically more reliable results.

Key words Rhabdomyosarcomas Flow cytometry DNA Ploidy