

DNA异倍体联合C-12检测在良恶性腹水中的诊断价值

刘利炜, 陈振东, 孙昕, 李俊, 吴秀伟, 何远春, 李嘉嘉

■背景资料

良恶性胸腹水的鉴别诊断一直是困扰临床医生的难题。传统的脱落细胞学诊断阳性率低, 影响诊断准确性的因素多。近年来FCM异倍体的检测及多肿瘤标志物蛋白芯片系统是临床中诊断肿瘤的重要方法, 但两种方法各有其优缺点, 因此进一步明确两种方法的实用价值及两者联合检测鉴别良恶性胸腹水值得探索。

刘利炜, 陈振东, 李俊, 吴秀伟, 何远春, 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科 安徽省合肥市 230022

孙昕, 李嘉嘉, 安徽医科大学第一附属医院中心实验室 安徽省合肥市 230022

作者贡献分布: 此课题由刘利炜和陈振东设计; 研究过程由刘利炜, 陈振东, 孙昕, 李俊, 吴秀伟, 何远春及李嘉嘉操作完成; 研究所用试剂及分析工具由孙昕与李嘉嘉提供; 标本收集由李俊, 吴秀伟及何远春协助完成; 本论文写作由刘利炜和陈振东完成。

通讯作者: 陈振东, 230022, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, chenzhendong@cscsco.org.cn

电话: 0551-2292805

收稿日期: 2008-12-24 修回日期: 2009-01-20

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-02-28

Diagnostic values of DNA-aneuploidy and C-12 analysis for benign and malignant ascites

Li-Wei Liu, Zhen-Dong Chen, Xin Sun, Jun Li, Xiu-Wei Wu, Yuan-Chun He, Jia-Jia Li

Li-Wei Liu, Zhen-Dong Chen, Jun Li, Xiu-Wei Wu, Yuan-Chun He, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China

Xin Sun, Jia-Jia Li, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Center Laboratory, Hefei 230022, Anhui Province, China

Correspondence to: Zhen-Dong Chen, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China. chenzhendong@cscsco.org.cn

Received: 2008-12-24 Revised: 2009-01-20

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-02-28

Abstract

AIM: To evaluate the diagnostic values of DNA-aneuploidy and tumor markers for benign and malignant ascites.

METHODS: Ascites fluid specimens were collected from 68 patients with ascites (benign 31, malignant 37). Besides routine exfoliated cytology examination, FCM-DNA ploidy analysis was performed, and tumor markers were detected by C-12 multiple tumor marker protein chip.

RESULTS: There were significant differences in DNA index and proliferation index between benign and malignant ascites groups. The sensitivity of FCM-DNA and that of C12 for malignant

ascities were 72.97% and 94.59%, respectively while specificities were 93.54% and 54.84%. The accuracy of FCM-DNA and that of C12 were 82.35% and 76.47%, respectively. The combined sensitivity, specificity and accuracy were 94.59%, 96.77% and 82.35%, respectively.

CONCLUSION: Joint detection of DNA-aneuploidy and C-12 multiple tumor marker protein chip could improve the sensitivity and specificity of ascites. They might be of high diagnostic values for benign and malignant ascites and might benefit further clinic procedures.

Key Words: Ascites; Diagnosis; Flow cytometry; C-12; Tumor marker; DNA-aneuploidy

Liu LW, Chen ZD, Sun X, Li J, Wu XW, He YC, Li JJ. Diagnostic values of DNA-aneuploidy and C-12 analysis for benign and malignant ascites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(6): 632-635

摘要

目的: 评价检测腹水细胞的DNA异倍体及肿瘤标志物表达鉴别良恶性腹水的价值。

方法: 68例有明确诊断的腹水患者, 分为良性组31例, 恶性组37例。每位患者除常规腹水脱落细胞学检查外, 还分别进行FCM-DNA倍体分析和使用C-12多肿瘤标志物蛋白芯片检测肿瘤标志物。

结果: 良恶性腹水DI、增值指数有显著差别 ($P < 0.01$)。FCM-DNA倍体检测对恶性腹水的敏感性为72.97%, 特异性为93.54%, 准确性为82.35%。C-12检测恶性腹水的敏感性为94.59%, 特异性为54.84%, 准确性为76.47%。两者联合检测敏感性达94.59%, 特异性达96.77%, 准确性为82.35%。

结论: FCM-DNA倍体检测与C-12多肿瘤标志物联合检测可以提高诊断的敏感性和特异性, 对良恶性腹水的鉴别诊断具有较大的价值, 易于临床应用。

关键词: 腹水; 诊断; 流式细胞术; C-12; 肿瘤标志

■同行评议者

金瑞, 教授, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科; 姚希贤, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

物; DNA异倍体

刘利伟, 陈振东, 孙昕, 李俊, 吴秀伟, 何远春, 李嘉嘉. DNA异倍体联合C-12检测在良恶性腹水中的诊断价值. 世界华人消化杂志 2009; 17(6): 632-635

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/632.asp>

0 引言

腹水是临床中常见的一种症状, 其成因复杂, 常给临床鉴别诊断带来困难. 传统的细胞学诊断恶性浆膜腔积液的敏感度仅为50%-78%^[1]流式细胞术(flow cytometry, FCM)及肿瘤标志物是近年来诊断恶性肿瘤的重要方法, 前者通过测定DNA的含量从而了解细胞染色体的异常及细胞增殖的活性, 后者通过检测特异性的蛋白质来反映肿瘤细胞的存在及增殖状况. 近年来在临床逐步应用的多肿瘤标志物蛋白芯片检测(C-12)对十二种肿瘤标志物一次检测完成, 便于临床综合分析. 因此本研究用流式细胞术联合C-12系统对腹水中恶性肿瘤细胞进行DNA倍体的分析及特异性蛋白质定量分析以探讨二者在良恶性腹水中的诊断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-10/2007-08我院细胞室腹水标本68例. 良性腹水31例, 男16例, 女15例, 平均年龄 47.7 ± 13.2 岁. 其中结核性腹膜炎13例, 肝硬化12例, 其他为系统性红斑狼疮、肾源性疾病、胰腺炎等. 恶性腹水37例, 男16例, 女21例, 平均年龄 53 ± 11.4 岁. 卵巢癌10例, 胃癌8例, 腹水找到癌细胞但未能明确原发灶来源者4例. 其余为胰腺癌、胆囊癌、直肠癌、原发性肝癌等. 患者的诊断均由腹水细胞学检查、腹腔镜检查或手术找到恶性肿瘤细胞或腹膜组织活检证实有恶性肿瘤浸润. 美国Beckmen Coulter公司EPICS XL-MCL型流式细胞仪, HD-2001系列生物芯片检测仪, 低温高速离心机. 已配置好的PI染液(SIGMA公司分装) 4℃避光保存. 湖州数康科技提供的多肿瘤标志物蛋白芯片(C-12)检测试剂盒. DNA分析软件.

1.2 方法

1.2.1 标本采集和细胞学方法: 无菌条件下抽出患者积液200 mL, 其中100 mL送细胞室, 取新鲜底层液体10 mL, 放入大试管, 以2000 r/min, 离心5 min; 弃上清; 取沉渣用推片涂若干张; 晾干; 染色(瑞-姬双染)10-20 min; 冲洗; 镜检. 另100 mL送中心实验室行流式细胞仪行DNA倍体及

表 1 DNA指数和增值活性分析结果 (mean \pm SD)

分组	n	S	G ₂	DI
良性胸腹水	31	4.36 \pm 2.97	5.34 \pm 2.51	1.11 \pm 0.26
恶性胸腹水	37	12.54 \pm 10.53	10.81 \pm 6.33	1.54 \pm 0.81

^b $P < 0.05$ vs 良性胸腹水.

细胞增殖活性分析及C-12检测.

1.2.2 流式细胞检测: (1)单细胞悬液的制备: 腹水200 mL, 加入38 g/L的枸橼酸钠抗凝剂10 mL, 充分混匀, (如为血性腹水可加入氯化铵静置15 min, 以充分溶血)取20 mL, 室温下4000 r/min离心5 min, 去除上清液, PBS洗涤2次, 分别在相同的状态下离心, 700 mL/L乙醇固定, 放入-20℃冰箱. (2)检测前于2000 r/min下离心6 min, 去上清液. PBS 3 mL洗涤3次后在于2000 r/min下离心6 min, 去上清液. 加入PI染液500 μ L/管, 避光静置30 min后用流式细胞仪进行细胞倍体及周期检测.

1.2.3 C12检测: 首先稀释标准品和浓缩洗涤液, 然后加待测样本、标准品复溶液、质控品复溶液, 温育, 振荡, 洗涤, 再加反应液, 温育, 振荡, 洗涤, 将每个芯片表面加入检测液A和B混合液, 静置1.5 min, 最后把蛋白芯片集成块放入HD-2001系列生物芯片检测仪, 软件自动读取图像、作标准曲线、分析测试结果并打印数据.

1.2.4 DNA倍体结果判定: 用正常人淋巴细胞作为正常二倍体标准, 以DNA指数(DNA index, DI)进行判定: DI = 0.9-1.10为二倍体, DI > 1.20或 < 0.85为异倍体, DI = 1.10-1.20为近二倍体.

1.2.5 C12诊断标准: CEA < 5 μ g/L, HGH < 7.5 μ g/L, f-PSA < 1 μ g/L, PSA < 5 μ g/L, AFP < 20 μ g/L, CA242 < 20 U/mL, CA125 < 35 U/mL, CA153 < 35 U/mL, CA199 < 35 U/mL, β -HCG < 3 mIU/mL, NSE < 13 μ g/L, Ferritin < 322 μ g/L(男)219 μ g/L(女).

统计学处理 采用SPSS 16.0统计分析软件, 两组间数据的比较采用 t 检验, 两组间率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 有统计学意义. 方法学评价指标的具体公式为: 敏感性 = 真阳性病例数 / (真阳性 + 假阴性) 病例数、特异性 = 真阴性病例数 / (真阴性 + 假阳性) 病例数、准确性 = 待测标本正确数 / 总标本数.

2 结果

2.1 FCM-DNA倍体分析 恶性腹水组DI值、S期、G₂期比例明显高于良性腹水组, 两组比较差异性显著($P = 0.00012 < 0.01$). 31例良性腹水中

■ 研发前沿

引起恶性腹水的病因很多, 单一肿瘤标志物检测作为诊断手段其灵敏度和特异性均有限, C12系统对12种肿瘤标志物同时检测能提高诊断的敏感性. 恶性肿瘤中DNA异倍体出现率较高, FCM检测DNA异倍体具有较高的特异性.

■ 相关报道

Krishan *et al* 在2006年用FCM检测体腔积液中的恶性肿瘤细胞, 发现其检测恶性腹水的敏感性仅为38%, 特异性为82%.

■创新盘点

本研究同时进行腹水的标志物及细胞DNA异倍体检查,避免了同一检测方法造成的检测误差。通过FCM-DNA倍体检测联合C-12多肿瘤标志物检测,敏感性可达94.59%,特异性达96.77%,与传统脱落细胞学相比敏感性显著提高。

表 2 腹水C12测定结果比较分析 (mean ± SD)

分组	CEA	Fer	HGH	f-PSA	PSA	AFP	CA242	CA125	CA153	CA199	HCG	NSE
良性腹水	4.1 ± 1.4	165.2 ± 55.3	2.1 ± 0.8	0.3 ± 0.1	2.2 ± 0.7	14.3 ± 5.2	27.8 ± 7.1	67.2 ± 24.5	11.6 ± 3.7	32.2 ± 12.8	1.3 ± 0.5	3.8 ± 1.2
	37.1 ± 29.7	324.8 ± 164.7	3.6 ± 1.7	0.5 ± 0.3	2.5 ± 0.9	44.2 ± 23.9	78.4 ± 52.2	408.4 ± 284.6	51.4 ± 35.8	271.8 ± 234.4	2.9 ± 1.6	12.8 ± 4.9

表 3 FCM-DNA倍体联合C12检测在腹水中的诊断价值

检测项目	敏感性	特异性	准确性
细胞学	45.95	100.00	70.58
DNA倍体+C12(并联)	94.59	48.38	73.52
DNA倍体+C12(串联)	70.27	96.77	82.35

29例表现为二倍体, 2例表现为超二倍体; 37例恶性腹水中27例表现为异倍体, 其中14例可见到明显的异倍体峰。DNA倍体检测良恶性腹水的敏感性为72.97%, 特异性为93.54%, 准确性为82.35%(表1)。

2.2 十二种肿瘤标志物定量分析 对良恶性组腹水进行分析发现恶性腹水中CEA、铁蛋白、CA199、CA242、NSE和CA125水平较良性腹水组有明显升高($P = 0.002 < 0.01$), HGH、PSA、AFP、HCG水平两组无明显变化($P > 0.05$)其结果见表2。多肿瘤标志物检测良恶性腹水的敏感性为94.59%, 特异性为54.84%, 准确性为76.47%(表3)。

2.3 FCM-DNA倍体分析联合C12检测与细胞学的比较 68例标本细胞学检查发现37例恶性腹水有17例检出癌细胞, 31例良性腹水均未检出癌细胞, 其敏感性为45.95%, 特异性为100%。DNA倍体与C12联合检测的敏感性、特异性见表3。

3 讨论

肿瘤的发生是从DNA的损伤开始的, 肿瘤无限制迅速生长的基础是DNA增多, S+G₂M期比率增高又决定了肿瘤的生物学恶性行为, DNA异常、出现异倍体是恶性肿瘤的标志, 所以恶性肿瘤中DNA异倍体出现率较高^[2]。一般认为异倍体细胞检出率与肿瘤发生的组织及采集标本的部位有关, 并且转移灶的阳性检出率明显比原发灶高, 由于恶性胸腹水产生的主要原因是由于恶性细胞侵袭、转移至腹膜引起, 因此分析DNA异倍体在恶性积液中的检出率更高。本研究发现恶性腹水DI及增值指数明显高于良性腹水, 也证实了此观点, 认为DI在腹水中是一种广

谱肿瘤指标可以反映恶性肿瘤细胞的存在。早在20世纪90年代国外大量文献已经证明FCM检测DI可以提高恶性胸腹水的检出率。随着近年来国内流式细胞仪的普及, FCM已经作为一种临床常规的检验技术。有文献报道FCM-DNA倍体分析在恶性胸腔积液的敏感性在62%-82%, 特异性在71%-95%^[3-5]。但国外同期报道其检测恶性腹水的敏感性仅为38%, 特异性为82%^[6]。本研究证实利用FCM-DNA倍体检测良恶性腹水的敏感性为72.97%, 特异性为93.54%, 准确性为82.35%。其结论与国内的研究相似, 但与国外研究差距较大, 具体原因尚不明确, 可能与检测标本的组成、标本数量、制备标本技术有关。

肿瘤标志物是肿瘤细胞分泌、脱落到体液、组织中的或是宿主对体内寄生物反应而产生并进入到体液、组织中的物质。肿瘤细胞生物学特性的复杂性及多态性, 肿瘤的多步骤及多基因的癌变过程, 肿瘤细胞的异质性和肿瘤细胞基因型及细胞表型的差异等导致肿瘤标志物的不同, 单一肿瘤标志物检测作为诊断手段其灵敏度和特异度均有限^[7], 因此, 目前多数学者提出联合、动态监测多种标志物, 可以提高检测恶性腹水的敏感性和特异性^[8-10]。C-12检测系统将最常见的12种肿瘤标志物集成在一张芯片上, 一次检测提供12种肿瘤标志物的信息, 临床上可以从相对全方位的信息角度做出准确判断。本研究发现C-12系统对恶性腹水的敏感性为94.59%, 特异性仅为54.84%。但发现随着肿瘤标志物检测项目的增多, 出现较多的假阳性, 对腹水中12种肿瘤标志物定量研究发现HGH、PSA、AFP、HCG在良恶性腹水中无差别。可能是, 正常人和良性疾病患者肿瘤标志物也有不同程度的表达; 肿瘤标志物的产生和体内理化因素有关^[11]。

通过FCM-DNA倍体检测联合C-12多肿瘤标志物检测, 敏感性可达94.59%, 特异性达96.77%, 与传统脱落细胞学相比敏感性显著提高。因此, FCM-DNA倍体分析和C-12多肿瘤标志物蛋白芯片系统是一种操作简单、快速、可

■应用要点

FCM-DNA倍体分析和C-12多肿瘤标志物蛋白芯片系统是一种操作简单、快速、可靠的方法且利于在临床应用, 可成为腹水诊断和鉴别诊断的重要指标, 也可作为与细胞学检查互补的诊断手段。

靠的方法用于良恶性腹水的鉴别诊断且便于在临床应用, 可成为腹水诊断和鉴别诊断的重要指标, 也可作为与细胞学检查互补的诊断手段.

4 参考文献

1 Queiroz C, Barral-Netto M, Bacchi CE. Characterizing subpopulations of neoplastic cells in serous effusions. The role of immunocytochemistry. *Acta Cytol* 2001; 45: 18-22

2 朱长林, 杨宗伟, 张文彬, 薛承岩, 刘怀深. DNA异倍体和端粒酶检测对恶性腹水的诊断价值. *山东医药* 2006; 46: 55-56

3 陈霄峰, 陈文芬, 林明增, 杨清宇. DNA倍体分析在胸腹水诊断中的价值. *实用肿瘤学杂志* 2006; 20: 86-87

4 黎萍. DNA倍体分析在良恶性胸腹水鉴别诊断中的价值. *中国现代医学杂志* 2007; 17: 349-350, 353

5 吴丽颖, 刘邦荣, 陆军, 凌明德, 陈洁, 李朋, 蒋艳. FCM-DNA倍体分析、AgNOR染色及hTERT、PCNA表达在良恶性胸腹水鉴别诊断中的临床意义. *癌症* 2007; 26: 178-182

6 Krishan A, Ganjei-Azar P, Jorda M, Hamelik RM, Reis IM, Nadji M. Detection of tumor cells

in body cavity fluids by flow cytometric and immunocytochemical analysis. *Diagn Cytopathol* 2006; 34: 528-541

7 汤钊猷. *现代肿瘤学*. 第2版. 上海: 复旦大学出版社, 2005: 364

8 黄家森, 杨剑, 周仁荣, 胡健. 腹水/血清肿瘤标志物对良恶性腹水的鉴别价值. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1533-1536

9 Porcel JM, Vives M, Esquerda A, Salud A, Pérez B, Rodríguez-Panadero F. Use of a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, cancer antigen 125, carbohydrate antigen 15-3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions. *Chest* 2004; 126: 1757-1763

10 Shitrit D, Zingerman B, Shitrit AB, Shlomi D, Kramer MR. Diagnostic value of CYFRA 21-1, CEA, CA 19-9, CA 15-3, and CA 125 assays in pleural effusions: analysis of 116 cases and review of the literature. *Oncologist* 2005; 10: 501-507

11 仲召阳, 王东, 李增鹏, 李梦侠, 戴楠, 曹晓静, 王佳, 关伟. 多肿瘤标志物蛋白质芯片检测对肿瘤诊断的临床意义. *第三军医大学学报* 2008; 30: 1658-1660

■同行评价
本文选题实用, 条理分明, 结论明确, 分析论证合乎逻辑, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写P, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2009-02-28)