

DNA含量及细胞动力学在不同胃黏膜病变中的变化

党小红, 郭俊芝, 黄会芳, 李建红, 刘近春, 霍丽娟

党小红, 郭俊芝, 黄会芳, 李建红, 刘近春, 霍丽娟, 山西医科大学第一医院消化内科 山西省太原市 030001

作者贡献分布: 此课题由党小红设计; 研究过程由党小红、郭俊芝、黄会芳、李建红、刘近春及霍丽娟操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由党小红提供; 数据分析由党小红与郭俊芝完成; 本论文写作由党小红、郭俊芝、黄会芳及李建红完成。

通讯作者: 党小红, 副主任医师, 030001, 山西省太原市, 山西医科大学第一医院消化内科. xh.dang@163.com

收稿日期: 2010-06-02 修回日期: 2010-08-10

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-10-18

Alterations in DNA content and cell kinetics in different gastric mucosal lesions

Xiao-Hong Dang, Jun-Zhi Guo, Hui-Fang Huang, Jian-Hong Li, Jin-Chun Liu, Li-Juan Huo

Xiao-Hong Dang, Jun-Zhi Guo, Hui-Fang Huang, Jian-Hong Li, Jin-Chun Liu, Li-Juan Huo, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Li-Juan Huo, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. xh.dang@163.com

Received: 2010-06-02 Revised: 2010-08-10

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-10-18

Abstract

AIM: To investigate the changes in DNA content and cell kinetics in different gastric mucosal lesions.

METHODS: The DNA content and cell kinetics were investigated by flow cytometry in 25 superficial gastritis specimens and equal number of specimens of type N-IIb intestinal metaplasia, foveolar hyperplasia, type IIb intestinal metaplasia, and dysplasia taken from patients with chronic atrophic gastritis or gastric cancer.

RESULTS: DNA histogram analysis revealed that proliferative index (PI), S phase fraction (SPF) and G₂M fraction were highest in dysplasia, followed by type IIb intestinal metaplasia, foveolar hyperplasia, type N-IIb intestinal metaplasia and superficial gastritis.

CONCLUSION: Quantitative cytokinetic analysis can be used to evaluate the risk of malignant transformation of gastric lesions.

Key Words: Gastric mucosal lesion; Cell kinetics; DNA content; Flow cytometry

Dang XH, Guo JZ, Huang HF, Li JH, Liu JC, Huo LJ. Alterations in DNA content and cell kinetics in different gastric mucosal lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(29): 3147-3150

摘要

目的: 观察慢性浅表性胃炎、N-IIb型肠化、小凹上皮增生、IIb型肠化及异型增生胃黏膜细胞核内DNA含量以及细胞动力学的变化。

方法: 用FCM研究25例浅表性胃炎DNA含量及细胞动力学变化, 并与萎缩性胃炎及癌旁组织中出现的N-IIb型肠化、小凹上皮增生、IIb型肠化及异型增生相比较。

结果: 有关细胞动力学参数提示由浅表性胃炎-萎缩性胃炎-癌旁组织, SPF, PI, G₂M期分数逐渐增高($P<0.05$)。由浅表性胃炎-N-IIb型肠化-小凹上皮增生-IIb型肠化-异型增生, PI, SPF, G₂M期分数逐渐增高($P<0.05$)。

结论: 潜在的癌变危险性可以用量化的细胞动力学分析, 从观察细胞增殖运动状态可以推断其病变危险性。

关键词: 胃黏膜病变; 细胞动力学; DNA含量; 流式细胞仪

党小红, 郭俊芝, 黄会芳, 李建红, 刘近春, 霍丽娟. DNA含量及细胞动力学在不同胃黏膜病变中的变化. *世界华人消化杂志* 2010; 18(29): 3147-3150

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3147.asp>

0 引言

目前对早期胃癌^[1,2]的诊断主要是通过胃镜活检确诊, 然而早期胃癌的诊断率低, 多数胃癌一经确诊已到了不可逆的形态学变化阶段。如能在癌前病变^[3,4]可逆阶段评估其癌变危险性, 不但可提高早癌检出率, 而且能实现早期预防, 逆转癌前病变, 减低癌变率。本研究着重探讨各类胃黏膜病变中细胞增殖, 分化状态并以此评价细

■背景资料

目前对早期胃癌的诊断主要靠胃镜活检诊断, 放大内镜与NBI的使用提高了早期胃癌的检出率。但是这些发现都已是组织学上的癌变, 如果能发现更早阶段的癌前病变, 不但能提高早期胃癌检出率, 而且能实现早预防, 逆转癌前病变, 减少癌变率。

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

■创新盘点

本研究用黏液组织化学的方法区分肠上皮化生类型,并对不同类型的胃黏膜病变进行DNA含量测定和细胞动力学分析,得到了有意义的结果,目前还未见相关报道。

胞动力学在癌前病变早诊中的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 预试验中在20例患者胃窦同一部位取活检6块分2组行病理检查,组织学吻合度95%。所有研究对象均为2005-02/2008-11出现上消化道症状或萎缩性胃炎复查,就诊于山西医科大学第一医院门诊的患者。组织学经胃镜观察和组织病理学确诊分为5组:1组,单纯浅表性胃炎标本25例;萎缩性胃炎197例按组织学检查及黏液组织化学分析继续分组:2组,主要含N-Ⅱb型肠化病变的标本25例;3组,主要含小凹上皮增生标本25例;4组,主要含Ⅱb型肠化标本25例;5组,主要含异型增生标本25例。

1.2 方法

1.2.1 内镜及病理检查:所有患者均行胃镜检查(Olympus GIF-XQ240型)。浅表性胃炎组患者均在胃窦部大弯侧取材,每处取6块。萎缩性胃炎在病变明显处及黏膜形态异常处取材,每处取6块。胃癌组织旁取材6块,镜下剔除有癌组织的标本,保留含有上述病理改变的标本。其中3块行FCM检测,其余送病检。

1.2.2 黏液组织化学染色:组织化学试剂AB(pH2.5)、PAS及AF染液由福建三强生化所提供, PB-KOH-PAS染色液参照colling法配制。AB(pH2.5)-PAS及AF-PAS套染严格按说明书进行, PB-KOH-PAS据colling法。

1.2.3 DNA含量及细胞动力学:使用流式细胞仪(FCM美国B.D公司产)检测DNA含量。将新鲜活检标本置于PBS液中,经0.25%胰蛋白酶,0.25%胶原酶消化20 min,300目尼龙网过滤制成单细胞悬液,加入RNA酶水解RNA后用溴化乙啶荧光染料插入DNA中使之定量染色,单细胞顺序通过检测仪,分析每个细胞内DNA含量与细胞周期。染色前调整细胞浓度加入荧光微球做内参标准校对仪器使CV值稳定在5%以内。每份样品检测10 000个以上细胞。

1.2.4 细胞动力学参数的计算:以DNA指数(DNA index, DI)表示细胞核相对DNA含量: $DI = \text{样品细胞 } G_{01} \text{ 峰均值} / \text{正常对照 } G_{01} \text{ 峰均值}$ 。据实验灵敏度及CV值规定: $DI = 1 \pm 0.1$ 时为二倍体,其余均为异倍体。细胞动力学参数: $PI = (S + G_2/M) / (S + G_0/G_1 + G_2/M) \times 100\%$, S期分数 = $S / (S + G_0/G_1 + G_2/M) \times 100\%$, G_2/M 期分数 = $G_2/M / (S + G_0/G_1 + G_2/M) \times 100\%$ 。

统计学处理 多组间均数比较经方差分析

表 1 各组细胞动力学变化 ($n = 25$)

分组	PI	SPF	G_2M
癌旁组织	26.767	26.923	16.859
萎缩性胃炎	17.062 ^a	11.440 ^a	5.680 ^a
浅表性胃炎	10.635 ^a	6.838 ^a	3.226 ^a

^a $P < 0.05$ vs 癌旁组织组。

表 2 不同病变的细胞动力学变化 ($n = 25$)

分组	PI	SPF	G_2M
浅表性胃炎	10.425 ^{ac}	6.985 ^{ac}	3.503 ^{ac}
N-Ⅱb型肠化	23.609 ^c	17.646	6.035 ^c
小凹上皮增生	23.899	17.895	6.038
Ⅱb型肠化	26.889 ^a	19.925	6.953 ^a
异型增生	27.514 ^{ab}	20.326 ^a	7.175 ^{ab}

^a $P < 0.05$ vs 小凹上皮增生组; ^c $P < 0.05$ vs 异型增生组; ^a $P < 0.05$ vs N-Ⅱb型肠化组。

后用Duncan's mutiple Range检验法行均数间两两比较。多组间率的比较经 $R \times 2$ 表的 χ^2 检验或Fishe's确切概率法后用 χ^2 分割进行多组间率的两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

浅表性胃炎组中仅发现2例N-Ⅱb型肠化生(7.69%),未检出Ⅱb型肠化生,检出率显著低于萎缩性胃炎及癌旁组织(图1)。

FCM获得的DNA组方图CV值控制在5%以内。异倍体的检出率在癌旁组织、萎缩性胃炎、浅表性胃炎分别为26.1%、8.3%、3.9%。经Fisher确切概率法以及 $R \times 2$ 表 χ^2 检验, DNA异倍体在癌旁组织发生率显著增高。有关细胞动力学参数提示由浅表性胃炎-萎缩性胃炎-癌旁组织SPF, PI逐渐增高($P < 0.05$)。由浅表性胃炎-萎缩性胃炎-癌旁组织 G_2M 期分数逐渐增高($P < 0.05$, 表1)。

进一步探讨浅表性胃炎, N-Ⅱb型化生, 胃小凹上皮增生, Ⅱb型肠上皮化生及异型增生5种病变间细胞动力学变化特点发现, 由浅表性胃炎-N-Ⅱb型肠化(图1A)-小凹上皮增生-Ⅱb型肠化(图1B, C)-异型增生, SPF、PI、 G_2M 期分数逐渐增高($P < 0.05$)。由浅表性胃炎-N-Ⅱb型肠化-小凹上皮增生-Ⅱb型肠化-异型增生, SPF逐渐增高($P < 0.05$, 表2)。

3 讨论

将癌细胞与相应的正常细胞的生物学特性进行

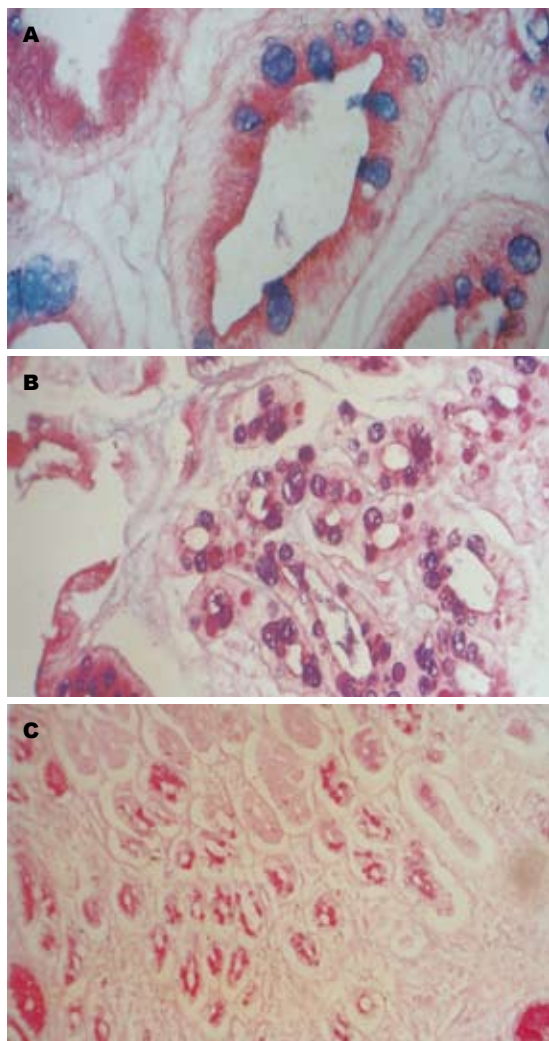


图1 组织化学示Ⅱb型肠化组织. A: AB(+)/PAS(-)($\times 400$); B: AF(+)/PAS(+)($\times 200$); C: KOH/PB/PAS(+)($\times 100$).

比较发现, 癌细胞在增殖和分化两个生物学过程中的协调和控制机制发生了异常, 使癌细胞能不断地生长分裂而不发生功能分化^[5-7]. 组织化学染色可以从黏液分泌功能方面观察细胞的分化程度^[8]. 癌前细胞(precancerous cell)DNA已突变但表型正常. 在一种或多种促癌物质的不断作用下表型发生了改变, 细胞的各种恶性性状得以表达^[9]. 由于增殖细胞在开始有丝分裂之前都必须倍增其DNA, 随着细胞周期的运动细胞核中DNA含量有所不同, 因此检测DNA的合成及其含量的变化就能明确这一细胞群的增殖特点和DNA分子的异型性.

细胞增殖加速是细胞癌变的普遍机制, 有丝分裂细胞较静止期细胞更易于受致癌物的损伤而发生癌变. S期细胞增加可能意味着癌变过程已经开始^[10]. 细胞动力学研究表明由浅表性胃炎-N-Ⅱb肠化, 小凹上皮增生-Ⅱb型肠化-异

型增生PI, SPF G₂M期分数逐渐增高. 这提示随着细胞分化程度的降低, 细胞分裂能力逐渐增高, 高度分化的细胞往往不再发生分裂, 而低分化的细胞则存在分裂, 分化能力, 细胞有丝分裂指数(G₂M期分数)往往与细胞分化成反比. 随着分化程度的提高, 细胞对环境因子的反应能力也逐渐下降. 目前多数学者认为Ⅱb型肠化属癌前病变, 是不完全肠化发生中的不成熟期, 细胞功能不稳定^[8,9]. Falck认为Ⅱb型肠化与不典型增生之间有内在联系, 应作为癌前病变对待予以重视^[7,8]. 该研究中Ⅱb型肠化组织在细胞动力学上的G₂M期分数及PI增高相一致. 揭示由正常胃黏膜-癌, 决不是一蹴而就的一次性突变, 而是有逐渐量变的演变过程. 细胞动力学的变化先于组织学变化. 研究发现由浅表性胃炎-N-Ⅱb型肠化, 小凹上皮增生-Ⅱb型肠化-非典型增生细胞动力学指标逐渐增高, 这意味着潜在的癌变危险性可以用量化的细胞动力学分析, 从观察细胞增殖运动状态可以推断其病变危险性^[10,11]. 倘若能进一步找到增生程度或Ⅱb型肠化程度与细胞动力学量变的依赖关系, 可能会使癌前病变的诊断从依据组织形态学变化提早到细胞水平, 甚至DNA分子水平功能结构的变化.

以往多用体内氚标记的胸腺嘧啶核苷检测胃上皮细胞标记指数(labeling index, LI)来判定增殖状态^[11]. 但费时长; 使用放射性同位素, 限制了临床应用. 近来多用体外溴脱氧尿嘧啶核苷标记的免疫组织化学技术检测LI^[12], 也因存在需组织培养; 切片要求高, 必须满足纵切到完整长度的胃小凹及附属腺体; 细胞计数量多, 临床不易推广. 本研究利用FCM可以灵敏地分析经定量染色的单个细胞DNA含量及细胞周期, 得到细胞群的动力学特点, 并检测有无异倍体. 以此推断分化程度, 增殖能力. 研究认为用FCM检测DNA倍性和细胞动力学参数早期, 敏感, 定量反映细胞增殖状态. 不但可以在细胞水平了解胃黏膜病变的演化趋向, 而且可以辅助鉴别交界性病变^[13,14]. 在临床上可能提高胃癌早诊效率. 尤其当病变尚处于可逆性改变时, 检测DNA含量和细胞动力学变化与组织病理学检查综合分析, 可作为筛选随访者的指标之一, 并改善预后.

4 参考文献

- Espejo Romero H, Navarrete Siancas J. [Gastric Cancer in Early Stage: study of 371 lesions in 340 patients in the E. Rebagliati National, Lima-Peru] *Rev Gastroenterol Peru* 2005; 25: 48-75
- Ho SB. Premalignant lesions of the stomach. *Semin*

■应用要点

用FCM检测胃黏膜上皮细胞DNA倍性和细胞动力学参数, 可以早期、敏感、定量反映细胞的增殖、分化状态, 早期预测胃黏膜病变的演化趋向, 辅助鉴别交界性病变.

■同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 对于治疗各类胃黏膜病变患者有一定的临床应用价值。

- Gastrointest Dis* 1996; 7: 61-73
- 3 Kapadia CR. Gastric atrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: S29-S36; discussion S61-S62
- 4 Malhotra V, Tatke M, Gondal R, Kumar N, Broor SL. Intestinal metaplasia--its association with gastric cancer. *Trop Gastroenterol* 1995; 16: 22-26
- 5 林晓钢, 潘英俊, 郭永彩. 癌细胞周期自荧光光谱特征. *光学学报* 2009; 29: 1328-1331
- 6 钟芷芬, 曾西池, 余水成, 刘林勇. 胃肠道腺癌细胞DNA定量分析的临床意义. *临床肿瘤杂志* 2002; 7: 5411-5412
- 7 张文范, 张荫昌. 胃癌. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 24-26
- 8 金行藻. 胃粘膜肠上皮化生的类型与早期胃癌的关系. *临床与实验病理学杂志* 1985; 1: 19
- 9 张弘, 迟景宏, 王瑛, 张志琴, 刘淑仙, 徐艳春. 胃癌前状态906例随访观察. *中华消化内镜杂志* 1997; 14: 246-247
- 10 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 89-103
- 11 Wright PA, Williams GT. Molecular biology and gastric carcinoma. *Gut* 1993; 34: 145-147
- 12 Fukuzawa K, Noguchi Y, Matsumoto A. Alterations in DNA proliferation in gastric stump mucosa with special reference to topography. *Surgery* 1996; 119: 191-197
- 13 杜祥, 沈铭昌. 流式细胞技术在胃镜活检组织诊断中的应用价值. *肿瘤* 1994; 14: 145-147
- 14 党小红, 闫柱. 残胃黏膜DNA增生及细胞动力学变化. *中华消化杂志* 2003; 23: 186-187

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)编辑委员会共计400人, 全部为副教授及副主任医师以上. *WCJD*编委会审稿费结算工作于次年01-05开始. 本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费费用, 共计40 850元, 数据以稿件审回日期为准. *WCJD*共计审稿1 418篇, 其中送审专家377位, 共计送审次数2 094次, 成功审回次数1 634, 成功率78.03%. 其中审稿次数排前三位的为: 西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位, 各17篇; 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位, 16篇; 中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位, 各15篇.

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持, 同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作. 审稿费已经通过邮局汇款, 如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差, 请各位编委与编辑部联系, 联系电话: 010-85381892, 联系人: 李军亮. (编辑部主任: 李军亮 2010-04-20)