

胃癌及癌前病变患者DNA倍体与T淋巴细胞检测的意义

张坤, 段金雨, 宋玉国, 刘春雷, 关晓辉

张坤, 段金雨, 宋玉国, 刘春雷, 关晓辉, 北华大学附属医院消化内科 吉林省吉林市 132000

张坤, 医师, 主要从事消化内科胃肠道肿瘤的研究。

作者贡献分布: 此课题由关晓辉设计; 研究过程由张坤、段金雨、宋玉国及刘春雷操作完成; 研究所用试剂及分析工具由宋玉国提供; 数据分析由张坤完成; 本论文写作由张坤、段金雨及刘春雷完成。

通讯作者: 关晓辉, 教授, 132000, 吉林省吉林市船营区解放中路12号, 北华大学附属医院消化内科。739613928@qq.com

收稿日期: 2016-01-15

修回日期: 2016-02-07

接受日期: 2016-02-22

在线出版日期: 2016-03-28

Significance of detection of DNA ploidy and T lymphocytes in patients with gastric cancer or precancerous lesions

Kun Zhang, Jin-Yu Duan, Yu-Guo Song, Chun-Lei Liu, Xiao-Hui Guan

Kun Zhang, Jin-Yu Duan, Yu-Guo Song, Chun-Lei Liu, Xiao-Hui Guan, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132000, Jilin Province, China

Correspondence to: Xiao-Hui Guan, Professor, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Beihua University, 12 Jiefang Middle Road, Chuanying District, Jilin 132000, Jilin Province, China. 739613928@qq.com

Received: 2016-01-15

Revised: 2016-02-07

Accepted: 2016-02-22

Published online: 2016-03-28

Abstract

AIM: To investigate the distribution of DNA

heteroploid in gastric cancer and precancerous lesions and its relationship with cellular immune function.

METHODS: DNA ploidy, T lymphocytes and NK cells were detected by flow cytometry in 20 cases of gastric cancer, 20 cases of precancerous lesions and 20 cases of normal gastric mucosa.

RESULTS: DNA heteroploid rate in the gastric cancer group was higher than that in the normal group (80% vs 0%, $P < 0.05$). DNA heteroploid rate in the gastric cancer group was associated with the degree of tissue differentiation ($P < 0.05$). DNA heteroploid rate in signet ring cell carcinoma was higher than that in the highly and moderately differentiated adenocarcinoma. In the precancerous lesion group, DNA heteroploid rate was significantly higher in high-grade intraepithelial neoplasia than in low-grade intraepithelial neoplasia and intestinal metaplasia ($P < 0.05$). The values of CD3⁺ T cells, CD4⁺ T cells, CD4⁺/CD8⁺, and NK in heteroploid were decreased compared to those in diploid ($P < 0.05$); the value of CD8⁺ T cells was increased in heteroploid compared with diploid.

CONCLUSION: The heteroploid rates of gastric cancer and precancerous lesion are higher than that in normal gastric mucosa. The distribution of heteroploid is associated with clinicopathologic features of gastric cancer and precancerous lesions; the immune status of different DNA ploidy types is significantly different.

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

■背景资料

胃癌在我国是常见的肿瘤, 早期发现和干预是防控胃癌的重要手段, 提高胃癌的早期诊断率是目前面临的难题。DNA异倍体的出现与细胞癌变有关, 肿瘤细胞恶性程度越高, 异倍体阳性率越高, 不同组织的DNA倍体类型细胞免疫状态不同。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科; 卢宁, 副主任医师, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

应用要点

进一步研究癌前病变组织的DNA异倍体情况, 并比较不同倍体分类中细胞免疫功能的变化, 有望提高胃癌准确率, 成为评估机体免疫状态的重要指标之一。

Key Words: Gastric cancer; Precancerous lesions; Ploidy analysis; Cellular immunity

Zhang K, Duan JY, Song YG, Liu CL, Guan XH. Significance of detection of DNA ploidy and T lymphocytes in patients with gastric cancer or precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(9): 1433-1437 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1433.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i9.1433>

摘要

目的: 探讨DNA异倍体在胃癌、癌前病变中的分布差异及其与细胞免疫功能的关系。

方法: 应用流式细胞术检测20例胃癌、癌前病变和正常胃黏膜DNA倍体、T淋巴细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)。

结果: 胃癌组中DNA异倍体率高于正常组(80% vs 0%, $P<0.05$); 胃癌组DNA异倍体与组织分化程度有关($P<0.05$), DNA异倍体在印戒细胞癌中高于高中分化腺癌。癌前病变中高级别上皮内瘤变异倍体高于低级别上皮内瘤变及肠化生($P<0.05$); 异倍体中CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK各值较二倍体降低($P<0.05$), CD8⁺升高($P<0.05$)。

结论: 胃癌、癌前病变异倍体阳性率高于正常胃黏膜。胃癌及癌前病变的异倍体分布和临床病理特征有关, 不同DNA倍体类型组织的免疫状态有明显的不同。

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃癌; 癌前病变; 倍体分析; 细胞免疫

核心提示: 胃癌及癌前病变的异倍体分布和临床病理特征有关, 不同DNA倍体类型组织的免疫状态有明显的不同。细胞核DNA的变化发生在形态改变之前, 因此分析细胞核内DNA含量的变化对早期发现胃癌有一定的价值。

张坤, 段金雨, 宋玉国, 刘春雷, 关晓辉. 胃癌及癌前病变患者DNA倍体与T淋巴细胞检测的意义. *世界华人消化杂志* 2016; 24(9): 1433-1437 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1433.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i9.1433>

0 引言

目前胃癌是世界上第四常见的恶性肿瘤, 致死率在恶性肿瘤中排名第2位^[1], 早期发现和干

预是防控胃癌的重要手段, 胃癌前病变为病理概念, 指胃黏膜及腺上皮的某种病变, 可能转变成胃癌, 包括肠上皮化生、不典型增生或异型增生。肿瘤细胞DNA含量异常是恶性肿瘤的标志之一^[2]。免疫细胞可以介导抗肿瘤特异性免疫^[3]。本研究应用流式细胞术检测胃癌、癌前病变、正常胃黏膜组织中DNA含量和外周血T淋巴细胞亚群、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)细胞, 研究DNA异倍体在胃癌、癌前病变中的意义及对细胞免疫功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 本项目符合北华大学医学伦理委员会制定的伦理学标准, 并得到该委员会的批准, 所有受试对象均取得知情同意。选取2012-12/2013-12北华大学附属医院消化内镜取材, 病理确诊为胃癌20例, 其中男性11例, 女性9例; 年龄50-76岁。中位年龄56.0岁±3.2岁, 所有患者入院前均未接受放、化疗及其他治疗。癌前病变20例, 男10例, 女10例, 年龄47-68岁, 中位年龄53.0岁±5.3岁。对照组选取同期健康体检人群20例, 男12例, 女8例, 年龄43-59岁, 中位年龄51.0岁±4.7岁。测定T淋巴细胞亚群选用美国贝克曼库尔特公司生产的CD3-PC5、CD8-PE、CD4-FITC, 应用流式细胞仪MXP分析软件进行双参数获得数据分析, Multicycle软件进行DNA倍体及细胞周期分析。

1.2 方法

1.2.1 胃镜检查: 对住院患者行常规胃镜前准备, 对镜下病变组织行直视下活检, 取2-3块组织行DNA检测, 同部位取3-4块标本置体积分数40 g/L甲醛固定, 常规送病理检查。对照组选取与病变组相同部位进行取材。

1.2.2 流式细胞术DNA含量分析: 将胃黏膜组织制成单细胞悬液后进行DNA染色, 上机检测, 数据采集后, 进行DNA倍体及细胞周期分析。

1.2.3 细胞DNA倍体分类: 用DNA指数(DNA index, DI)表示^[4], 二倍体: DI为0.9-1.0, 四倍体: DI为1.90-2.10, DI>2.10为多倍体, DI>1.1为超二倍体。其中后3种倍体类型均为异倍体。

1.2.4 流式细胞仪检测T淋巴细胞及NK细胞: 采集所有受试者空腹静脉血后上机检测。应用

表 1 胃癌、癌前病变及正常胃黏膜DNA倍体的比较 ($n = 20$)

分组	二倍体	异倍体 $n(\%)$	SPF(%)	PI(%)	DI值
胃癌组	4	16(80)	33.50 ± 24.89	39.69 ± 24.32	1.37 ± 0.53
癌前病变组	13	7(35) ^{ac}	42.29 ± 27.05^a	28.52 ± 12.65^b	1.06 ± 0.18^a
对照组	20	0(0) ^b	2.26 ± 1.15	3.06 ± 2.88	1.00 ± 0.03^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 胃癌组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组. SPF: S期分数; DI: DNA指数; PI: 细胞增殖活性.

流式细胞仪统计检测样品中各细胞表型的阳性表达率.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行处理, 两样本均数比较采用 t 检验, 阳性率的比较采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$. 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胃癌、癌前病变及正常胃黏膜DNA异倍体的比较 异倍体在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜均有不同水平表达, 表达强度由高到低依次为胃癌、癌前病变及正常胃黏膜($P < 0.05$, 表1).

2.2 胃癌前病变及胃癌中DNA异倍体与病理特征的关系 胃癌前病变DNA异倍体的表达与病变程度有统计学差异, 高级别上皮内瘤变高于低级别上皮内瘤变及肠化生($P < 0.05$, 表2); 胃癌中DNA异倍体的表达与肿瘤分化程度有统计学差异, 印戒细胞癌、低分化腺癌高于高中分化腺癌($P < 0.05$, 表2).

2.3 DNA倍体与细胞免疫的关系 异倍体中 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、NK低于二倍体($P < 0.05$), $CD8^+$ 高于二倍体($P < 0.05$, 表3).

3 讨论

胃癌是一种上皮来源的恶性肿瘤, 全球约50%的胃癌发生在中国, 其发病率排在我国恶性肿瘤的第3位, 严重危害着人民的健康和生命^[5,6]. 早期胃癌的预后较好, 5年生存率可以达到90%以上^[7], 所以提高胃癌的早期诊断是降低胃癌病死率、提高生存率的关键. 要做到肿瘤的早期诊断, 就必须从肿瘤发展的早期阶段的变化入手. 由于细胞核DNA含量变化出现在细胞形态和组织结构改变之前, 因此检测胃黏膜癌前病变细胞核内DNA含量, 对分析癌前病变发展

趋势, 发现早期胃癌有诊断价值. 正常的人体细胞是DNA含量恒定的二倍体细胞, 且处于S期的细胞仅占少数, 肿瘤细胞最根本的属性是增殖旺盛和不受控制, 常发生染色体突变, 导致细胞核DNA含量的改变. 本研究结果显示胃癌、癌前病变细胞增殖活性(PI值)、细胞DNA含量(DI值)、S期分数(SPF值)明显高于正常胃黏膜. DNA异倍体在正常胃黏膜、癌前病变及胃癌的阳性率分别是0%、35%、80%. 异倍体阳性率在正常胃黏膜、癌前病变及胃癌中的差异有统计学意义, 胃癌中异倍体阳性率最高, 与赵婷茹等^[8]报道一致. 因此测定细胞核DNA含量与倍体可以了解细胞增殖状态, 从而判断细胞有无恶变倾向或恶变程度, 对发现早期恶性肿瘤具有一定价值. 胃癌异倍体阳性率与临床病理特征的关系报道不一. 李德昌等^[9]研究显示: 胃高分化腺癌DNA异倍体阳性率分别与中分化及低分化癌有显著性差异. 林继徐等^[10]研究发现胃癌组织细胞DNA异倍体率与肿瘤的分化程度、浸润程度、TNM分期有明显关系, 差别有统计学意义. 陈金明等^[11]研究发现DNA倍性与肿瘤的大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移和远处转移之间无明显差异, 但与患者生存显著相关, 肿瘤细胞为异倍体者预后较二倍体者为差. 本实验结果表明, 胃癌中印戒细胞癌异倍体阳性率高于低分化及高分化腺癌. 异倍体阳性率在印戒细胞、低分化腺癌、高分化腺癌差异有统计学意义. 异倍体在癌前病变中的分布中, 李晓芹等^[12]研究发现在慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→不典型增生→胃癌的发生发展过程中, DNA异倍体出现率逐渐递增. 田智丹等^[13]研究提示在胃黏膜腺体上皮异型增生中, 黏膜上皮细胞核内DNA已发生异常, 此异常改变可能在形态学上尚无法识别. 本研究结果显示胃癌前病变中DNA异倍体分布在高级别、低级别上皮内瘤变和肠化

同行评价

本文初步探讨了胃癌及癌前病变患者DNA倍体与T细胞亚群的相关性, 有一定临床意义.

表 2 DNA倍体与病理特征的关系

DNA倍体	胃癌				胃癌前病变	
	高中分化腺癌	低分化腺癌	印戒细胞癌	肠上皮化生	低级别上皮内瘤变	高级别上皮内瘤变
<i>n</i>	3	9	8	7	8	5
二倍体	3	1	0	7	5	0
异倍体[<i>n</i> (%)]	0(0)	8(88.9) ^a	8(100) ^a	0(0)	3(37) ^c	5(100) ^c

^a*P*<0.05 vs 低分化腺癌组; ^c*P*<0.05 vs 肠上皮化生组.

表 3 DNA倍体与细胞免疫的关系

DNA倍体	胃癌	癌前病变	对照组	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK(%)
异倍体	16	7	0	54.7±8.74 ^a	30.7±5.74 ^a	30.3±2.72 ^a	0.96±0.49 ^a	9.33±4.26 ^a
二倍体	4	13	20	63.5±3.76	39.7±3.06	21.7±3.50	1.21±0.12	16.7±4.27

^a*P*<0.05 vs 二倍体.

生中差异有统计学意义, 高级别上皮内瘤变的DNA异倍体率高于低级别和肠化生.

现已知机体的抗肿瘤免疫主要是NK细胞介导的天然免疫和杀伤性T细胞介导的适应性免疫^[10], 其中CD3⁺ T反映了机体总的细胞免疫状态, CD4⁺ Th是辅助T细胞, CD8⁺ Ts是抑制性T细胞, 机体细胞免疫功能状态是否稳定主要看CD4⁺ T/CD8⁺ T比值, 二者的平衡维持着机体正常的免疫应答. 周振英等^[14]研究显示恶性肿瘤能抑制局部组织的免疫功能, 不同DNA倍体类型组织的免疫状态是不同的. 卜全慧等^[15]研究提示胃腺癌CD4⁺ T细胞增殖、分泌功能受损, CD4⁺PD-I⁺ T淋巴细胞与胃腺癌的发生发展相关. 杜晓辉等^[16]研究发现胃癌患者免疫抑制因素占据优势地位. 本研究提示异倍体中CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK低于二倍体(*P*<0.05), CD8⁺高于二倍体. 机体免疫功能的下降可能和异倍体的出现有关. 李则学等^[17]采用的树突细胞和T细胞多细胞联合免疫治疗, 有效纠正胃癌患者术后免疫损伤及T细胞耗竭状态. 因此通过检测外周血淋巴细胞亚群的变化对患者进行免疫状态监测、免疫功能评估、预后判断都有一定的指导价值.

本研究显示胃癌、癌前病变、正常胃黏膜DNA异倍体率和病理特征有关, 不同DNA倍体类型组织的免疫状态有明显的不同. 由于本研究涉及病例较少, DNA异倍体能否成为胃癌早期诊断及评估免疫状态, 预后判断的指标

尚需商榷, 有待于进一步扩大样本例数进行深入研究.

4 参考文献

- Shen L, Shan YS, Hu HM, Price TJ, Sirohi B, Yeh KH, Yang YH, Sano T, Yang HK, Zhang X, Park SR, Fujii M, Kang YK, Chen LT. Management of gastric cancer in Asia: resource-stratified guidelines. *Lancet Oncol* 2013; 14: e535-e547 [PMID: 24176572 DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70436-4]
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674 [PMID: 21376230 DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013]
- Rahma OE, Khleif SN. Therapeutic vaccines for gastrointestinal cancers. *Gastroenterol Hepatol* (NY) 2011; 7: 517-564 [PMID: 22298988]
- Smith ML, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* 2000; 36: 664-674 [PMID: 10738133]
- 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 邹小农, 张思维, 赫捷. 2011年中国恶性肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤* 2015; 24: 1-10
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917 [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]
- 张澍田, 李鹏. 如何提高上消化道早期癌的内镜诊断率. *中华内科杂志* 2014; 53: 511-512
- 赵婷茹, 马杰, 魏冰, 刘明阁, 于庆凯. 流式细胞术DNA含量分析对胃癌诊断的价值. *肿瘤基础与临床* 2007; 20: 308-310
- 李德昌, 岳颖, 郑吉春, 任力. 组织印片DNA倍体分析在胃癌诊断和预后评估中的应用. *空军医学杂志* 2014; 30: 48-50
- 林继徐, 董剑宏. 胃癌DNA倍体、SPF与肿瘤生物

- 学行为的关系. 中国医疗前沿 2011; 6: 5-6
- 11 陈金明, 李伟华, 周海波. 胃癌的细胞增殖、DNA增殖分数和倍性与患者生存的关系. 中国病理生理杂志 2005; 21: 1562-1565
- 12 李晓芹, 杨力, 杨芝红. 脱氧核糖核酸倍体多参数分析联合胃镜病理学对早期胃癌及癌前病变的诊断意义. 临床荟萃 2010; 25: 2029-2032
- 13 田智丹, 齐琼, 王劲松, 林庆秀, 赵有财. DNA倍体分析在胃黏膜上皮反应性增生与异型增生鉴别中的价值. 临床与实验病理学杂志 2014; 30: 1164-1166
- 14 周振英, 沈宗丽, 吴晓柳, 朱月清, 张军妮, 王亚平. 恶性肿瘤组织DNA倍体分类与CD8/CD28表达的关系. 肿瘤研究与临床 2002; 14: 12-14
- 15 卜全慧, 韦腾飞, 朱美兵. 胃腺癌患者外周血中CD4 T淋巴细胞表面抑制性分子PD-1的表达. 现代肿瘤医学 2015; 23: 1403-1406
- 16 杜晓辉, 刘利利, 宁宁, 梁文涛, 徐迎新, 方国吉. 胃癌患者血清调节性T细胞、细胞毒性T淋巴细胞的检测及意义. 中华实验外科杂志 2013; 30: 2704-2706
- 17 李则学, 张兰, 李沛雨. 免疫细胞治疗对晚期胃癌患者外周血记忆T细胞的影响. 解放军医学院学报 2015; 36: 1169-1171

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有

•消息•

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

