

# PCNA和DNA含量估测腮腺混合瘤增殖活性<sup>①</sup>

陈伟良<sup>②</sup> 孔庆瑜<sup>③</sup> 李海刚<sup>①</sup> 陈光晔 任材年

(中山医科大学孙逸仙纪念医院口腔颌面外科; 广州, 510120)

**摘要** 为了评价增殖细胞核抗原(PCNA)表达和DNA含量在研究腮腺混合瘤细胞增殖活性中的价值,对60例良性无复发、复发和恶性腮腺混合瘤用PCNA免疫组化染色技术和流式细胞测量术作PCNA测定和DNA含量测量。结果显示PCNA表达在各组间和高S期细胞比率(SPF)在无复发和复发组间有显著差异;恶性混合瘤组与良性无复发组或复发组间有显著差异;PCNA表达与高SPF呈显著性正相关关系。提示PCNA表达和DNA含量均能反映良恶性混合瘤细胞增殖活性,对良恶性混合瘤的鉴别有重要价值;PCNA表达对良性混合瘤复发亦有较高估测价值。

**主题词** 腮腺瘤/病理学; 腺瘤,多形性/病理学; 增殖细胞核抗原; DNA,肿瘤/病理学

**中图分类号** R 739.87

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)免疫组化染色技术和流式细胞测量术(flow cytometry, FCM)在肿瘤病理学上应用和对肿瘤生物学特性的研究日趋增多。但两种技术在研究涎腺混合瘤增殖活性方面的比较研究未见报告。作者对腮腺良性和恶性混合瘤用免疫组织化学ABC(avidin-biotin peroxidase complex)法测定其PCNA的表达和用FCM测量DNA含量,探讨腮腺混合瘤细胞的增殖活性以及两技术在本研究中的临床价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

选用经病理确诊的腮腺混合瘤石蜡包埋标本60例,其中良性无复发瘤(下称无复发组)33例,良性复发瘤(下称复发组)11例(经5至14年随访),恶性瘤(恶性组)16例。良性肿瘤原发病灶行肿瘤包膜外切除。恶性肿瘤行腮腺全切除。

### 1.2 PCNA检测

将石蜡包埋标本切取4 $\mu$ m厚组织片,经脱蜡和水化,用免疫组织化学ABC染色。第一抗体为鼠抗PCNA(PC10)单克隆抗体;第二抗体为生物素标记的兔抗鼠IgG(以上试剂盒均为DAKO公司产

品)。采用DAB(3,3'-diaminobenzidine)显色,常规脱水,透明和封片。用已知阳性切片作阳性对照,以PBC液代替第一抗体作为阴性对照。在200倍光镜下,每张切片随机计算1000个肿瘤细胞,其中阳性细胞百分率作为增殖指数(proliferation index; PI)。

### 1.3 DNA含量测定

1.3.1 单细胞悬液样品制备 将石蜡包埋标本切取50 $\mu$ m厚的组织5片,用二甲苯室温下脱蜡,用100%、95%、70%、50%乙醇和蒸馏水梯度水化。然后用胃蛋白酶消化组织。用300目不锈钢网过滤消化液,经漂洗,低速离心(500 r/min $\times$  2 min),除去细胞碎片后,得到单细胞悬液。细胞数 $> 10^8$ 个/L,再用溴化乙啶(EB)染色后上机测量。

1.3.2 DNA的FCM分析 用EPICS ELITE型流式细胞仪(Coulter公司),2 W氩离子激光器,波长488 nm,输出功率300 mW。实验前先用EB染色的鸡红细胞悬液作为核准仪器样品,使变异系数(CV)值小于4%。测量结果用Phoenix Flow Systems的Multycycle软件,在计算机上拟出细胞各时相(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S和G<sub>2</sub>M)分布。

1.3.3 DNA倍体性的判断标准与S期细胞比率 用DNA指数(DNA Index; DI)表示细胞DNA含量。DI计算是样品细胞与对照组细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>峰均值的比值。以正常腮腺细胞DNA含量作为二倍体标

① 本校孙逸仙纪念医院科研基金资助课题; ② 第一作者,1957年出生,男,副主任医师; ③ 本校附属第一医院肾内科流式细胞仪室; ④ 本院病理科

准 ( $DI=1.0$ )。二倍体近二倍体肿瘤细胞  $DI$  范围为  $0.85\sim 1.15$  在此范围以外均为异倍体肿瘤。根据全组 S 期细胞比率 (synthesis phase fraction, SPF) 的平均值, 为高 SPF 和低 SPF

## 2 结果

### 2.1 PCNA 表达

PCNA 阳性反应为棕色, 位于细胞核内。无复发组  $PI$  为  $1.73\pm 0.78$ , 复发组为  $2.95\pm 1.29$ ; 恶性组为  $5.20\pm 1.48$   $t$  检验各组间  $P < 0.05$  各组 PCNA 阳性表达见图 1 2 和 3



图 1 无复发组 PCNA 阳性细胞核 ( $\times 200$ )



图 2 复发组 PCNA 阳性细胞核 ( $\times 200$ )



图 3 恶性组 PCNA 阳性细胞核 ( $\times 200$ )

### 2.2 DNA 含量

无复发组、复发组和恶性组肿瘤异倍体率分别为  $12.1\%$  ( $4/33$ )、 $27.3\%$  ( $3/11$ ) 和  $68.8\%$  ( $11/16$ )。高 SPF (最低为  $4.0\%$ , 最高为  $29.3\%$ , 平均为  $17.8\%$ ) 分别为  $9.1\%$ 、 $27.3\%$  和  $87.5\%$ 。经  $\chi^2$  检验, 异倍体率和高 SPF 在无复发组与复发组之间比较  $P > 0.05$ , 恶性组与无复发组或复发组, 异倍体率比较  $P < 0.05$ , 高 SPF 比较  $P < 0.01$

### 2.3 PCNA 与 DNA 含量关系

将各组 PCNA  $PI$  与相应组别的高 SPF 率作相关系数显著检验,  $r = 0.964$ ,  $P < 0.05$

## 3 讨论

### 3.1 腮腺混合瘤细胞 PCNA 与 SPF 相关性

PCNA 又称周期素 (cyclin), 是 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助蛋白, 与增殖细胞的增殖周期有关。它在核中表达  $G_1$  期逐渐增加, S 期达到高峰。PCNA 在细胞核内阳性表达的高低与细胞增殖活性密切相关<sup>[1]</sup>。近年来, SPF 被推荐为肿瘤增殖的估测指标<sup>[2]</sup>。本研究结果, 腮腺混合瘤无复发组、复发组和恶性组肿瘤细胞 PCNA  $PI$  值、DNA 异倍体发生率和高 SPF 率逐渐增高, 表明其细胞增殖活性高低次序为恶性组  $>$  复发组  $>$  良性组。有报告, 实验性人类细胞株<sup>[3]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[4]</sup> 和腋窝淋巴结阴性的乳腺癌细胞<sup>[5]</sup> PCNA  $PI$  与 DNA FCM 分析的 SPF 显著相关。本研究结果又显示, 良恶性腮腺肿瘤 PCNA 表达与 SPF 有显著正相关关系 ( $P < 0.05$ )。提示增殖细胞核抗原免疫组化染色技术和流式细胞测量术对腮腺混合瘤细胞增殖活性的研究均有较高价值。

### 3.2 PCNA 在估测腮腺混合瘤增殖活性的价值

本结果无复发组、复发组和恶性组 PCNA  $PI$  分别为  $1.73$ 、 $2.95$  和  $5.20$ , 较 Ohmishi<sup>[6]</sup> 报告的良性混合瘤 PCNA  $PI$   $7.8$ , 腺样囊性癌  $16.3$  为低。尽管如此, PCNA 表达一定程度反映了上述 3 组混合瘤细胞的增殖状态。各组间又存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。作者认为 PCNA 表达对良恶性腮腺混合瘤的鉴别以及估测良性混合瘤复发可能性均有临床应用价值。

### 3.3 DNA 含量测定在估测腮腺混合瘤增殖活性的价值

Martin 等报告<sup>[7]</sup>, 良性涎腺混合瘤无复发者异倍体率为  $12.3\%$ , 复发者为  $37.5\%$ 。Chen 报告腮腺

癌异倍体率为 62%<sup>[8]</sup>。本研究结果与之一致,分别为 12. 1%、27. 3% 和 68. 8%。无复发组、复发组和恶性组高 SPF 依次升高,为 9. 1%、27. 3% 和 87. 5%。细胞分裂增殖的实质是 DNA 复制、染色体倍增。可以认为异倍体和 SPF 能客观反映腮腺混合瘤的增殖活性。与 PCNA 表达比较,由于异倍体率和高 SPF 率在无复发组和复发组间无显著差异 ( $P > 0. 05$ ),用 DNA 含量测定作为估测腮腺混合瘤复发可能性的价值不大。恶性组与无复发组或复发组间,异倍体率和高 SPF 率分别有显著性差异 ( $P < 0. 05$ ) 和非常显著性差异 ( $P < 0. 01$ )。作者认为 DNA 含量测定,特别是 SPF 作为鉴别良恶性腮腺混合瘤有重要价值。

### 参 考 文 献

- 1 吴 晓综述. 增殖细胞核抗原及其肿瘤细胞增生活性方面研究进展. 国外医学口腔医学分册, 1994, 21: 136
- 2 李正生综述. 恶性肿瘤流式细胞测量术国际统一新标准. 国外医学肿瘤分册, 1994, 21: 209
- 3 Landberg G, Roos G. Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res*, 1991, 51: 4570
- 4 Fontanini G, Pingitore R, Bigini D, *et al.* Growth fraction in non-small cell lung cancer estimated by proliferating cell nuclear antigen and comparison with Ki-67 labelling and DNA flow cytometry data. *Am J Pathol*, 1992, 141: 1285
- 5 Siitonen SM, Kallioniemi O, Isola JJ. Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry using monoclonal antibody laA2 and a new antigen retrieval technique has prognostic impact in archival paraffin-embedded node-negative breast cancer. *Am J Pathol*, 1993, 142: 1081
- 6 Ohnishi Y. Comparative study of pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of the salivary gland with special reference to cell proliferation and expression of p<sup>21</sup> ras and p<sup>63</sup>. *J Jpn Stomatol Soc*, 1995, 44: 360
- 7 Martin AR, Mantravadi J, Kotylo PK. Proliferative and aneuploidy in pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Arch Pathol Lab Med*, 1994, 118: 252
- 8 Chen RB. Flow cytometric adenomas of benign and malignant tumors of the oral and maxillofacial region. *J Oral Maxillofac Surg*, 1989, 47: 596

(1996-04-08收稿 1996-08-20修回)

## EVALUATION OF PCNA AND DNA CONTENTS IN STUDY OF CELLULAR PROLIFERATIVE ACTIVITY OF PAROTID GLAND MIXED TUMOR

Chen Weiliang Kong Qingyu Li Haigang Chen Guangye Ren Cainian

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

For the purpose of evaluating the value of PCNA and DNA contents in cellular proliferative of parotid gland mixed tumor, the PCNA and DNA contents were analysed by immunohistochemical staining and flow cytometry for sixty cases of benign unrecurrent, recurrent and malignant parotid gland mixed tumor. The result showed that there were significant difference between the groups; and there were no significant difference in incidence of aneuploid and high Sphase-fraction (SPF) between unrecurrent and recurrent tumors and there were significant difference between benign and malignant tumors, and a linear positive correlation was observed between PCNA and high SPF. The results indicated that both PCNA and DNA contents can reflect the cellular proliferative activity and play an important role in distinguishing benign and malignant mixed tumors, that the PCNA is useful for judging the recurrent of benign mixed tumor.

**Subject headings** parotid neoplasms/pathology; adenoma, pleomorphic/pathology; proliferative cellular nuclear antigen; DNA, neoplasm/pathology