

# 非霍奇金淋巴瘤细胞增殖活性和组织学恶性程度及预后的关系<sup>①</sup>

方少珍<sup>②</sup> 叶玉玲 周慕珩

(中山医科大学病理教研室,广州,510089)

**提 要** 131例非霍奇金淋巴瘤(NHL)按国际工作分类分低、中、高度恶性(LG、MG、HG)3组。对NHL和14例反应性增生淋巴组织(RLH)作核分裂计数(MF),银染核仁组成区(AgNORs)计数,并用ABC法检测部分病例的增殖细胞核抗原(PCNA)和Ki<sub>67</sub>抗原。MF、AgNORs、PCNA及Ki<sub>67</sub>检测结果有较好相关性( $r$ 值0.612, $P<0.01$ ),均和NHL恶性度呈正相关,LG、MG、HG及RLH组间有显著性差异( $P<0.01$ ,但LG和RLH组 $P>0.05$ ),表明细胞增殖活性的检测有助于了解NHL恶性度,但不能区分LG和RLH。MG中弥漫小裂细胞型(DSC)细胞增殖活性低于同组其它类型( $P<0.05$ ),但与LG无显著性差异( $P>0.05$ ),预后相对较好,拟属LG。MF、AgNORs和PCNA值越高,生存期越短,表明细胞增殖活性有助于预测NHL预后。MF和AgNORs经济易行;Ki<sub>67</sub>全面反映增殖细胞的数量,仅用于冰冻切片;PCNA可用于石蜡切片,便于回顾性研究。

**主题词** 淋巴瘤,非何杰金氏/病理学;有丝分裂;核仁组成区;抗原,鉴别;预后

**中图分类号** R263

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphomas, NHL)是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一。恶性肿瘤最基本的生物学特性是细胞生长分化的失控,常致细胞增殖活性等方面的异常改变。核分裂计数(mitotic frequency, MF)和银染核仁组成区(AgNORs)计数是较为普遍检测细胞增殖活性的方法。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是DNA聚合酶 $\delta$ 的辅助蛋白,具有促进该酶延伸DNA链的作用<sup>[1]</sup>;Ki<sub>67</sub>抗原则是一种345~395kD的非组蛋白<sup>[2]</sup>,两者均与DNA复制和细胞增殖活性密切相关。本文通过联合采用MF、AgNORs、PCNA和Ki<sub>67</sub>4种方法检测NHL细胞增殖活性,试图探讨与组织学恶性程度及预后的关系,以及分析4种方法间的可能关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及染色方法

选用中山医科大学附属一院及肿瘤医院1982~1993年NHL外检石蜡组织,组织学切片按美国国家肿瘤研究所1982年制定的NHL工作分类方案分为低度(lower grade, LG)、中度(intermediate grade, MG)和高度(high grade, HG)恶性3组,对131例NHL和14例反应性增生淋巴组织(reactive lymphoid hyperplasia, RLH)分别进行HE下的MF和胶质银染色下的AgNORs计数。选取52例NHL及14例RLH用ABC法进行PCNA(PC<sub>10</sub>,Dako公司产品,工作浓度1:100)检测,并对其中9例NHL-MG和8例RLH的新鲜外检组织进行Ki<sub>67</sub>(Dako公司

① 广东省卫生厅科研基金资助课题;

② 第一作者,1962年出生,女,硕士研究生,现在河北医学院邯郸分院病理教研室工作;邯郸市,056002

产品,工作浓度 1:50)检测。对本文 NHL 患者进行随访,得到 40 例随访资料(对生存者

随访的时间最长 125 个月,最短 24 个月)。各方法检测病例的组织学类型详见表 1。

表 1 NHL 细胞增殖活性检测病例组织学类型分布(n/例)

组织学类型	MF 与 AgNORs <sup>2)</sup>	PCNA	Ki <sub>67</sub>	随访
反应性增生淋巴组织 (RLH)	14	14	8	
非霍奇金淋巴瘤 (NHL) <sup>1)</sup>	131	52	9	40
低度恶性 (LG)	11	6		4
小淋巴细胞型 (SL)	5	3		1
滤泡性小裂细胞型 (FSC)	4	2		1
滤泡性混合细胞型 (FM)	2	1		2
中度恶性 (MG)	85	33	9	28
滤泡性大细胞型 (FL)	5	3		
弥漫性小裂细胞型 (DSC)	15	10	1	3
弥漫性混合细胞型 (DM)	34	13	7	17
弥漫性大细胞型 (DL)	31	7	1	8
高度恶性 (HG)	35	13		8
小无裂细胞型 (SNC)	17	5		5
淋巴母细胞型 (LBL)	10	5		2
免疫母细胞型 (IBL)	8	3		1
	(145)	(66)	(17)	(40)

1)按美国国家癌症研究所 1982 年制定的 NHL 工作分类方案 (Working Formulation WF)分类; 2)MF 与 AgNORs 两种方法检测的病例相同

## 1.2 计数方法

在( $\times 10$ )网格目镜下,对随机选取 20 个高倍视野中大网格(0.25mm $\times$ 0.25mm)范围内的核分裂像进行计数,求得每个大网格内 MF 的平均值。对油镜下多个视野中 10 个中方格(10 $\mu$ m $\times$ 10 $\mu$ m)内的肿瘤细胞进行计数,求出 100 个细胞核中平均每个细胞核内 AgNORs 颗粒数。PCNA 和 Ki<sub>67</sub>是在高倍镜下随意计算 800 个肿瘤细胞中阳性细胞的百分数。对滤泡性淋巴瘤只计数滤泡内的肿瘤细胞,反应性增生淋巴细胞只计数生发中心以外的细胞。

## 2 结 果

### 2.1 NHL 细胞增殖活性和组织学恶性程度的关系

各项检测结果分述如下:

2.1.1 MF, AgNORs, PCNA, Ki<sub>67</sub> 检测结果和 NHL 组织学恶性程度的关系 由表 2 可见各项指标均随 NHL 组织学恶性程度的增高而呈递增趋势。

2.1.2 NHL-MG 组细胞增殖活性检测结果 从表 3 中可见 DSC 各项指标均高于同组的其它类型。

表2 MF、AgNORs、PCNA、Ki<sub>67</sub>和 NHL 组织学恶性度的关系<sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )

组织学类型 <sup>1)</sup>	MF	AgNORs	PCNA	Ki <sub>67</sub>
	个/0.25 <sup>2</sup> mm <sup>2</sup> (n)	个/核(n)	%(n)	%(n)
RLH	0.96±0.61(4)	1.45±0.39(14)	3.18±1.72(14)	5.41±4.24(8)
NHL LG	1.16±0.51(11)	1.82±0.80(11)	7.63±6.57(6)	
MG	4.35±2.58(85)	4.45±1.76(85)	24.75±14.32(33)	20.23±11.22(9)
HG	9.33±3.57(35)	6.72±1.71(35)	50.38±13.59(13)	
	(145)	(145)	(66)	(17)

1)RLH 反应性增生淋巴组织;LG 低度恶性;MG 中度恶性;HG 高度恶性。2)各组间比较, $P < 0.001$ ( $F$ 值分别为:MF80.75,AgNORs 32.77,PCNA 37.15);3)各组间两两比较, $P < 0.01$ 。采用 POMS-05 程序  $q$  检验, $q$  值分别为:RLH-MG, MF6.58, AgNOR, 8.10, PCNA 7.92, Ki<sub>67</sub>( $t$ 值)3.26;RLH-HG, MF16.28, AgNORs 14.58, PCNA 14.36; LG-MG, MF6.30, AgNOR 6.50, PCNA 4.52; LG-HG, MF15.17, AgNORs 12.41, PCNA 10.15; MG-HG, MF 12.70, AgNORs 8.46, PCNA 9.17; 但 RLH-LG 组  $P > 0.05$ ,  $q$  值分别为, MF0.24, AgNORs 0.80, PCNA 1.07

表3 NHL-MG 各亚型 MF、AgNORs、PCNA、Ki<sub>67</sub>检测结果

MG 组 <sup>1)</sup>	MF	AgNORs	PCNA	Ki <sub>67</sub>
	个/0.25 <sup>2</sup> mm <sup>2</sup> (n)	个/核(n)	%(n)	%(n)
DSC <sup>2),3)</sup>	2.05(15)	2.75(15)	11.33(10)	6.82(1)
FL	4.86(5)	3.33(5)	27.83(3)	
DM	4.39(34)	4.39(34)	26.70(13)	21.60(7)
DL	6.14(31)	5.51(31)	39.00(7)	18.21(1)
	4.35(85)	4.45(85)	24.75(33)	20.23(9)

1)DSC 弥漫性小裂细胞型,FL 滤泡性大细胞型,DM 弥漫性混合细胞型,DL 弥漫性大细胞型;2)DSC 和各组间比较, $P < 0.01$ ( $*$   $P < 0.05$ ,  $**$   $P > 0.05$ )POMS-05 程序, $q$  检验, $q$  值为: DSC-DM MF 4.59, AgNOR 4.65, PCNA 5.11; DSC-DL, MF 7.90, AgNOR 7.74, PCNA 7.85; DSC-FL, MF 3.30\*, AgNOR 1.00\*\*, PCNA 3.5;3)DSC 和 LG 组比较, $P > 0.05$ ,POMS-05 程序, $q$  检验, $q$  值为: MF 1.92, AgNOR 2.04, PCNA 1.0

镜下观察, MF 在 RLH 中多为双极,赤道板或星芒状生理性核分裂像,在 NHL 中常见不对称双极,多极或奇异型病理性核分裂。AgNORs 在淡黄色细胞核内呈黑色多为圆形颗粒(图1)。PCNA 及 Ki<sub>67</sub> 阳性细胞核着棕褐色,前者呈细小颗粒状或弥漫团块状(图2),后者多以核仁着色较为强烈(图3)。MF, AgNORs, PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 在滤泡性 NHL 多集中于滤泡内,而在弥漫性 NHL 中则呈弥漫性分布。

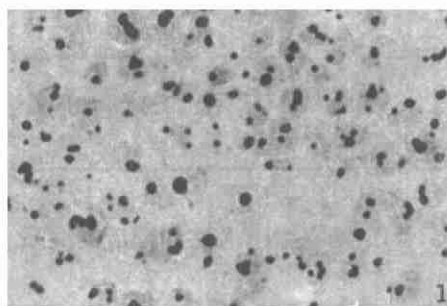


图1 非霍奇金淋巴瘤胶质银染色示 NHL-LG 瘤细胞核内 1~4 个 AgNORs 圆形颗粒 ( $\times 200$ )

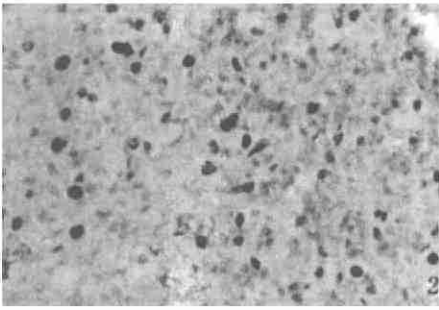


图2 非霍奇金淋巴瘤ABC法  
示 NHL-MG 中等量 PCNA 阳性细胞核着棕褐色 ( $\times 100$ )

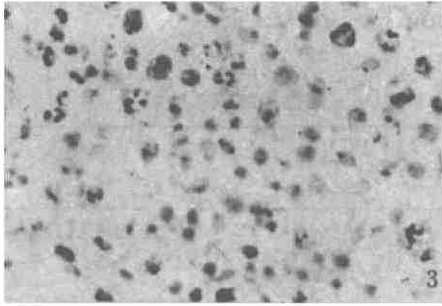


图3 非霍奇金淋巴瘤ABC法  
示 NHL-MG 中等量 Ki67 阳性细胞核  
仁着色较深 ( $\times 100$ )

2.1.3 NHL-MG 组各亚型患者预后的比较 从表4中可见,DSC组两年内病死率低于同组其它类型。

表4 28例 NHL-MG 组各亚型病死率的比较

MG 组	例 数(%)		合 计
	$\leq 2$ 年	$> 2$ 年	
DSC	0(0) 11(64)	3(100)	3
DM	7)	6(33.3)	17
DL	6(75)	2(25)	8

## 2.2 NHL 细胞增殖活性和预后的关系

表5 6例 NHL PCNA 检测结果和生存期的关系

组织类型	例 1	例 2	例 3	例 4	例 5	例 6
	SL	DSC	DSC	DM	DM	DL
生存期(月)	$> 125$	$> 29$	$> 52$	$> 30$	2	9
PCNA(%)	2.326	12.57	38.55	24.55	34.05	40.46

注:例1~4 随访时尚存活

2.2.1 MF 和 AgNORs 与 NHL 预后的关系 分别以 MF, AgNORs 均数的整数(4个/ $0.25^2\text{mm}^2$ , 4.5个/核)为界将获得随访资料的40例 NHL 分成两组绘制生存曲线(图4, 5)。

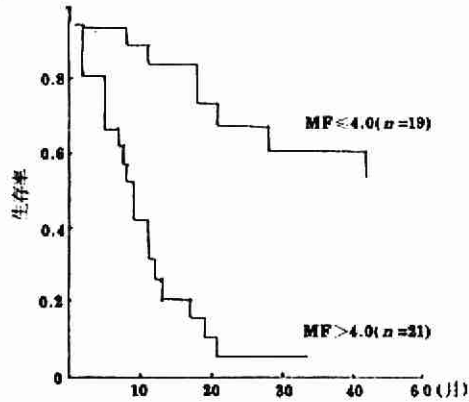


图4 NHL MF 和生存率的曲线

$P < 0.01$

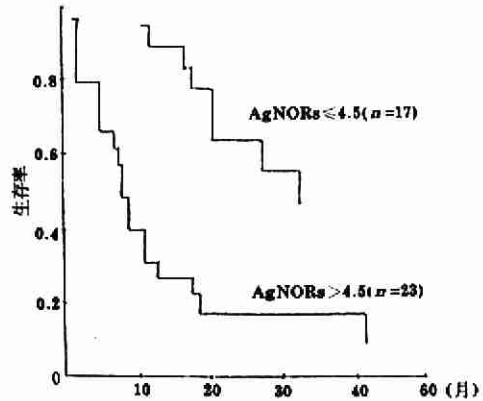


图5 NHL, AgNORs 和生存率的曲线

$P < 0.01$

2.2.2 PCNA 和 NHL 预后关系 表5显示 PCNA 越高,患者的生存期越短。

2.3 检测结果相关分析 表6显示各相关系数  $r$  值均有统计学意义。

表6 NHL 细胞增殖活性各方法检测结果的相关分析

方 法	例 数	相关系数 $r$		
		MF	AgNORs	PCNA
AgNORs	131	0.743		
PCNA	52	0.768	0.830	
Ki <sub>67</sub>	9	0.612	0.857	0.910

注:各  $r$  值  $P < 0.01$

### 3 讨 论

#### 3.1 NHL 细胞增殖活性和组织学恶性程度的关系

在 NHL 细胞增殖活性的研究中, Egan 等<sup>[3]</sup>发现按 Kiel 分类属 NHL-LG 组的 AgNORs 计数明显低于 HG 组。黄高升等<sup>[4]</sup>报道 NHL 的 MF 和 Ki<sub>67</sub> 计数和组织学恶性程度密切相关。Wood 等<sup>[1]</sup>对 31 例胃肠道淋巴瘤进行 PCNA 检测亦得出类似结果。本研究联合采用 MF, AgNORs, PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 4 种方法检测 NHL 细胞增殖活性, 结果显示 NHL 细胞增殖活性与组织学恶性程度呈正相关(表 2), RLH 和 NHL、RLH 和 NHL-MG、HG 组以及 NHL-LG、MG 和 HG 3 组之间均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 表明 NHL 细胞增殖活性的检测有助于了解 NHL 恶性程度。

在 4 种检测细胞增殖活性的结果中, 我们发现 MG 组中 DSC 的结果总是偏低(表 3), 统计学检验显示 DSC 的细胞增殖活性低于同组其它类型, 而与 LG 组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 这和 Schwartz<sup>[5]</sup>用 Ki<sub>67</sub> 检测 NHL 的结果相一致。刘复生等<sup>[6]</sup>对 433 例 NHL 随访, 其中 79 例 DSC 的 5 年生存率为 33.3%, 而 DL 仅为 12.4%。本文表 4 中 DSC 两年内病死率(0/3)低于 DM(64.7%)和 DL(75%), 表明在预后方面 DSC 可能亦有别于同组其它类型。因此我们认为 DSC 具有和同组其它类型不同的生物学行为, 拟属低度恶性, 有必要通过更多的病例研究, 对之加以区分。

#### 3.2 细胞增殖活性在 NHL-LG 与 RLH 鉴别诊断中的意义

细胞增殖活性的检测能否有助于区分良恶交界性病变, 目前尚有争议。Schwartz 等<sup>[5]</sup>用 Ki<sub>67</sub> 检测 NHL 细胞增殖活性, 结果显示 NHL-LG 和 RLH 并无明显差异。Giri<sup>[7]</sup>亦报道 AgNORs 在乳腺良恶交界性病变中有交叉重叠现象。本文结果显示在均值上 NHL-LG 高于 RLH(表 2), 但两者的差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 表明细胞增殖活性的检测对 NHL-LG 和 RLH 无鉴别诊断意义。

在检测细胞增殖活性的方法中, AgNORs 是和 rDNA 转录活性密切相关的 NOR 酸性非组蛋白 (C<sub>23</sub>、B<sub>23</sub>)<sup>[3]</sup>, PCNA 是 DNA 复制必不可少的 DNA 聚合酶  $\delta$  辅助蛋白<sup>[1]</sup>, 而 Ki<sub>67</sub> 可能是为 DNA 复制提供场所的核基质及染色体支架的一个构成部分<sup>[2]</sup>。由此看来, AgNORs、PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 均和 DNA 的功能状态密切相关, 可以反映细胞增殖活性的高低, 但却不能反映细胞所发生的基因和外基因改变(即由良性向恶性发展的癌变)。核分裂像是染色体在光镜下的表现, 故核分裂的异常(即病理性核分裂像)可提示细胞发生质的改变(癌变), 它在 NHL-LG 和 RLH 以及良恶交界性肿瘤鉴别诊断中的意义尚有待于研究。

#### 3.3 NHL 细胞增殖活性和预后的关系

MF 和预后的关系早已被人们所关注。本文结果(图 4)显示 MF 高于 4 个/0.25<sup>2</sup>mm<sup>2</sup> 组的 NHL 生存率明显低于 MF 小于 4 个/0.25<sup>2</sup>mm<sup>2</sup> 组 ( $P < 0.01$ ), 这与文献报道 MF 越高 NHL 患者预后越差相符。AgNORs 与肿瘤的预后多数人认为有关。De-

lahunt 等<sup>[8]</sup>对 182 例肾细胞癌的研究表明, AgNORs 可作为肾癌患者判断预后的指标。本文图 5 显示 AgNORs 大于 4.5 个/核组的 NHL 生存率低于 AgNORs 小于 4.5 个/核组 ( $P < 0.01$ ), 其中 6 例 NHL 患者的生存期随 PCNA 值升高似有下降趋势(表 5), 表明 AgNORs 与 PCNA 和 NHL 的预后有关。细胞增殖活性的检测有助于 NHL 预后的预测。

### 3.4 NHL 细胞增殖活性各检测方法间的相关分析及优缺点

MF, AgNORs, PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 4 种方法检测 NHL 细胞增殖活性的结果均显示有较好的相关性(表 6), 这与 Hall<sup>[9]</sup>检测 NHL AgNORs 和 Ki<sub>67</sub> 的结果 ( $r = 0.89$ ) 及 Kamel<sup>[10]</sup>检测 NHL PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 的结果 ( $r = 0.90$ ) 相一致。表明 4 种方法检测细胞增殖活性的机理各有不同, 但它们都能从不同的角度反映细胞增殖活性。那么选用哪种为好呢?

在 4 种方法中, MF 只需常规 HE 切片, 经济易行适用于基层单位; 但 MF 仅表现处于 M 期的增殖细胞, 而 M 期在整个细胞增殖周期中时间最短(多为 1~2 h), 此期停留的细胞数目较少, 故 MF 对增殖细胞的检出率较低, 具有一定的局限性。AgNORs 主要合成于 G<sub>1</sub> 期, 可在 G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M 前及 M 末期表达, 所用试剂的价格较 PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 低廉, 但计数常需在油镜下进行较为繁琐。PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 阳性细胞的核呈棕褐色, 易于辨认, 镜下不仅可以直观反映增殖细胞的数量, 而且增殖细胞在组织中的分布情况亦一目了然。PCNA 主要在 G<sub>1</sub> 后期和 S 期高度表达, 它不仅用于冰冻切片, 更重要的是可用于石蜡切片, 便于日常病理外检及回顾性研究。Ki<sub>67</sub> 可在除 G<sub>0</sub> 外的整个增殖周期(G<sub>1</sub>, S 和 G<sub>2</sub>/M) 中表达, 它能较全面地反映增殖细胞的数量, 并可间接测出 G<sub>0</sub> 期细胞的比率, 故被认为是较理想的检测细胞增殖活性的抗体<sup>[10]</sup>; 但由于 Ki<sub>67</sub> 反应时所辨认的 DNA 封

闭核蛋白可在甲醛固定石蜡包埋过程中被破坏, 故仅能用于冰冻组织切片。国外近期有文献报道用重组的 Ki<sub>67</sub> 基因产物来免疫鼠, 得到一种可用于石蜡切片的抗 Ki<sub>67</sub> 的 MIB<sub>1</sub> 和 MIB<sub>2</sub> 单克隆抗体, 可望成为检测细胞增殖活性的理想抗体。

MF, AgNORs, PCNA 和 Ki<sub>67</sub> 的联合应用有助于对增殖细胞所处的增殖周期进一步加以分析, 并可排除单一方法在制片中某些客观因素及计数中某些主观因素的可能影响, 得到一个反映细胞增殖活性的真实结果。

(本文承蒙中山医科大学病理教研室全体老师及杜新华、储兵等同学的大力协助, 特致谢意)

### 参 考 文 献

- 1 Wood AI, Handy PA. The prognostic value of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) immunostaining in gastro-intestinal lymphomas. *J Pathol*, 1990, 161 : 342a
- 2 Gerdes J, Li Lo, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of cell proliferation-associated nuclear antigen: That is defined by monoclonal antibody Ki<sub>67</sub>. *Am J Pathol*, 1991, 138 : 867
- 3 Egan MJ, Roafat MJ, Crocker J, et al. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol*, 1987, 153 : 275
- 4 黄高升, Feller AC, Lennert K. 非何杰金氏淋巴瘤增殖活性的研究-Ki<sub>67</sub> 阳性率与核分裂相间的关系. *淋巴瘤学刊*, 1991, 10 : 18
- 5 Schwartz BR, Pinkus G, Bacus S, et al. Cell proliferation in Non-Hodgkin's lymphomas: Digital image analysis of Ki<sub>67</sub> antibody staining. *Am J Pathol*, 1989, 134 : 327
- 6 刘复生, 杨谷城, 刘艳晖, 等. 非何杰金氏淋巴瘤的组织学类型与预后的关系(443 例临床病理分析). *中国放射肿瘤学*, 1988, 2(2) : 11
- 7 Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, et al. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J Pathol*, 1989, 157 :

- 307
- 8 Delahunt B, Ribas JL, Nancy JN, et al. Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma. *J Pathol*, 1991, 163(1) : 31
- 9 Hall Pa, Crocker J, Watts A, et al. A comparison of nucleolar organizer regions and Ki<sub>67</sub> immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*, 1988, 12 : 373
- 10 Kamel OW, Lebrun DP, Eric DR, et al. Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2-correlation with Ki<sub>67</sub> labeling. *Am J Pathol*, 1991, 138 : 147i

## THE RELATIONSHIP BETWEEN THE CELL PROLIFERATING ACTIVITY OF NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS AND HISTOLOGICAL MALIGNANT GRADE AND THE PROGNOSIS

Fang Shaozhen      Ye Yuling      Zhou Muheng

(Department of Pathology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

131 cases of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) were divided into low grade, intermediate grade and high grade groups (LG, MG, HG) according to the National Working Formulation. Methods of mitotic frequency (MF) and silver-stained nucleolar organizer regions associated proteins (AgNORs) were carried out in 131 cases of NHL and 14 cases of reactive lymphoid hyperplasia (RLH). ABC method was adopted to detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki<sub>67</sub> antigen. The results detected by MF, AgNORs PCNA and Ki<sub>67</sub> were well correlated with each other ( $r=0.612, P<0.01$ ), and were all positively related with the malignant grade of NHL. There were significant differences between LG, MG, HG and RLH groups ( $P<0.01$ , except that between LG and RLH was  $P>0.05$ ), indicating that the detection of the cell proliferative activity helped to judge the malignant grade of NHL, but could not differentiate LG from RLH. In the MG group, the cell proliferative activity of the diffuse small cleaved cell type (DSC) was lower than other types in the same group ( $P<0.05$ ), but showed no significant difference with that of LG ( $P>0.05$ ), and the prognosis was relatively better, suggesting the DSC type might belong to LG group. The higher the results of MF, AgNORs and PCNA, the shorter the survival time, indicating that the detection of cell proliferative activity was helpful for the prediction of the prognosis. MF and AgNORs are cheaper and easy to be apply; Ki<sub>67</sub> can better show the quantity of the proliferating cells, but is only used in frozen sections; PCNA can be applied in paraffin-embedded sections for reviewing research.

**Subject headings** lymphoma, non-Hodgkin's/pathology; mitosis; nucleolus organizer region; antigens, differentiation; prognosis