

核仁形成区嗜银蛋白定量 对结肠癌预后预测的价值^①

周曾芬^② 袁世珍^③

(中山大学孙逸仙纪念医院消化疾病研究室,广州,510120)

提 要 应用银染技术对 114 例结肠癌进行核仁形成区嗜银蛋白(Ag-NORs)定量研究,探讨该技术对结肠癌预后预测的价值。结果显示,Ag-NORs 与临床预后密切相关,其数量、大小和分布在死亡组比存活组差异非常显著,在同一组织类型的死亡病例与存活病例之间不存在交叉重叠。而且与其它影响结肠癌预后的淋巴结转移,以及年龄、组织类型和浸润程度等因素也明显相关。说明 Ag-NORs 定量分析可作为结肠癌预后预测的一项新的、有用的可靠指标。

关键词 核仁形成区嗜银蛋白; 结肠癌; 预后

中图分类号 R735.35; 361.2

核仁形成区嗜银蛋白(silver-stained nucleolar orgnizer regions, Ag-NORs)是 rDNA 及其转录的标志物,可为研究细胞增生和分化的基因调控提供信息^[1],能较好地反映肿瘤的生物行为。目前,该项技术开始用于肿瘤预后预测的研究,但尚处于起步阶段,结论也不尽一致,国内还未见到对结肠癌预后判断方面的研究报道。本文试图从 Ag-NORs 与结肠癌临床预后的关系,与其它影响结肠癌预后多因素的关系,探讨 Ag-NORs 定量分析对结肠癌预后预测的价值。

1 材料和方法

1.1 病例标本选择

114 例结肠癌,男 60 例(52.63%),女 54 例(47.37%)。0~29 岁 11 例(9.65%),30~59 岁 70 例(61.40%),60 岁以上 33 例(28.95%)。癌肿部位以乙状结肠最多,为 44 例(38.60%),其它为升结肠 18 例(15.80%),降结肠与回盲部均为 14 例(12.28%),横结肠 9 例(7.89%),脾曲 8 例(7.02%)及肝曲 7 例(6.14%)。浸润深度以浆膜层最多 57 例(50%),其次为浆膜外 27 例(23.68%)、深肌层 25 例(21.93%)及粘膜、粘膜下和浅肌层 5

例(4.39%)。按常规病理诊断标准^[2]其组织学分类分级为:管状腺癌 86 例(包括高分化 29 例、中分化 36 例、低分化 21 例),未分化腺癌 6 例,印戒细胞癌 5 例,粘液腺癌 12 例,乳头状腺癌 2 例,息肉癌变 3 例;按恶性程度^[3]分为:低恶类 31 例(包括乳头状腺癌,高分化腺癌),中恶类 51 例(包括息肉癌变,中分化腺癌和粘液腺癌),高恶类 32 例(包括低分化腺癌,未分化癌和印戒细胞癌)。根据 114 例手术病理组织的标本证实,淋巴结转移阴性有 56 例(49.12%),淋巴结转移阳性有 47 例(41.23%)和淋巴结转移不详有 11 例(9.65%);其中对 39 例淋巴结转移阳性结肠癌的原发癌与转移癌两处标本置于同片进行 Ag-NORs 银染色。有 5 年以上随访资料 57 例(50%),其中确诊 5 年内死亡 27 例(23.68%),确诊后 5 年内尚生存 30 例(26.32%)。全部标本均取自本院病理科 1984~1991 年结肠癌住院病人手术切除存档病理蜡块标本。

1.2 方法

1.2.1 Ag-NORs 标本制作 每例标本连续切片两张,一张按常规病理切片进行 HE 染色;另一张进行 Ag-NORs 银染色,按改良 Ploton 一步方法^[4]。

① 本研究由中华医学基金会资助

② 卫生部国内访问学者(现在昆明市西昌路 153 号,昆明医学院第一附属医院消化内科,650031)

③ 导师

1.2.2 定量分析 依序置低倍→高倍→油镜下观察,每例随机连续观察100个细胞,每个细胞核观察如下4项指标:(1)数量 记录每个细胞核的核仁数,以一个核仁数定为一个Ag-NORs颗粒,另外数出核仁外Ag-NORs颗粒数,求出均值。(2)形态 每例以100个细胞核Ag-NORs颗粒,按下列形态分型原则计数。①规则型:圆形或近圆形或球状、团块状,边缘光滑或较光滑,均匀一致。②异形型:杆状或多边形、奇异形,其中直径 $\geq 3\mu\text{m}$ 的异形颗粒(巨型)行单独计数和分析。(3)大小 每个细胞核内Ag-NORs颗粒均行测量,范围分为:大($> 2\mu\text{m}$)、中($1\sim 2\mu\text{m}$)、小($< 1\mu\text{m}$)3型,按每例100个细胞核计算求出均值。使用测量仪— C_2 型 $\sqrt{2}^{\circ}$ 网型目标尺,为上海第三光学仪器厂生产。(4)分布 每例100个细胞核内Ag-NORs颗粒分布按下列原则进行分类计数:①聚合型,形态较规则的颗粒聚集于细胞核中央位或偏位,数量通常 ≤ 4 个/核。②分散型,形态及大小不等的颗粒散布于核内,似卫星分布,数量通常 ≥ 5 个/核。③核仁内型,形状、大小、数量不一的颗粒聚集于核仁内,核仁外颗粒少见。④混合型,具有上述两种分布特征者。

1.3 统计学处理

多组资料采用方差分析(F 检验);如果方差不齐,则改为多组秩和检验(H 检验);两样本比较采用 t 检验及Wilcoxon秩和检验;配对资料采用配对 t 检验及配对秩和检验。

2 结果

组织切片经Ag-NORs银染色后,每例标本细胞核呈淡黄色,均可见到Ag-NORs呈黑色或棕黑色颗粒,位于核内或核仁内,背景清晰。

2.1 Ag-NORs和性别

男、女结肠癌组Ag-NORs均数/核各为 7.11 ± 2.29 和 6.93 ± 2.06 ($P>0.05$)。

2.2 Ag-NORs和年龄

0~29岁、30~59岁和60岁以上年龄组Ag-NORs均数/核分别为 8.51 ± 2.32 、 7.08

± 2.21 和 6.42 ± 1.84 。0~29岁与30~59岁和60岁以上组相比 P 均 <0.05 ;30~59岁与60岁以上组比较 $P>0.05$ 。

2.3 Ag-NORs和浸润程度

结肠癌浸润粘膜、粘膜下及浅肌层,深肌层,浆膜层和浆膜外层深度Ag-NORs均数/核分别为 5.55 ± 0.64 、 5.32 ± 0.87 、 7.36 ± 1.80 和 8.24 ± 2.90 。粘膜、粘膜下及浅肌层与浆膜层和浆膜外层组间比较, P 均 <0.05 ;深肌层与浆膜层和浆膜外层组间比较, P 均 $=0.0000$,其余组间比较, P 均 >0.05 。

2.4 Ag-NORs和组织学类型

2.4.1 不同类型结肠癌 Ag-NORs均数/核分别为 6.64 ± 1.88 (管状腺癌)、 6.50 ± 0.86 (粘液腺癌)、 11.94 ± 1.30 (未分化癌)、 10.49 ± 1.05 (印戒细胞癌)、 5.67 ± 0.53 (息肉癌变)、 6.25 ± 0.23 (乳头状腺癌)。管状腺癌组与印戒细胞癌和未分化癌组比较, P 均 <0.01 ;粘液腺癌组与印戒细胞癌和未分化癌组比较, P 均 <0.01 ;其余组间比较, $P>0.05$ (息肉癌变和乳头状腺癌因病例少,未作统计学处理)。

2.4.2 不同恶类结肠癌 低恶类、中恶类和高恶类组Ag-NORs均数/核分别为 5.15 ± 0.87 、 6.52 ± 1.19 和 9.30 ± 2.49 , P 均 <0.01 。

2.5 Ag-NORs和淋巴结转移

淋巴结转移阳性组结肠癌Ag-NORs均数/核(7.59 ± 2.14)明显高于淋巴结转移阴性数(6.37 ± 2.02), $P=0.0000$ 。而且淋巴结转移癌(8.06 ± 2.05)明显高于相应的结肠原发癌(7.27 ± 1.88), $P=0.0000$ 。

2.6 Ag-NORs和临床预后

在数量上,Ag-NORs均值/核死亡组(8.76 ± 2.29)明显高于存活组(6.29 ± 1.83), $P=0.0000$ 。而且同一组织类型的死亡与存活病例,Ag-NORs计数范围不存在交叉重叠。死亡组与存活组相比,Ag-NORs除形态上差异不显著外,其大小和分布均有明显不同, P 均 <0.05 ,见表1~3,图1~6。

表1 不同组织类型结肠癌死亡与存活组 Ag-NORs 计数

组织类型	Ag-NORs 数/核			
	存活组	例数(n)	死亡组	例数(n)
管状状癌	4.64±0.23 ¹⁾ (4.17~4.85) ²⁾	7	6.26±0.72 (5.60~7.38)	8
	5.94±0.92 (4.33~7.10)	11	8.44±0.84 (7.47~9.55)	7
	7.65±0.74 (6.72~8.37)	4	11.23±0.74 (10.89~12.71)	6
粘液腺癌	6.33±0.66 (5.70~7.29)	5	7.75±0.39 (7.42~7.94)	3
其它 ³⁾	9.64±3.51 (6.02~13.02)	3	12.20±0.39 (11.88~12.63)	3
合计 ⁴⁾	6.29±1.83 (4.17~3.02)	30	8.76±2.29 (5.60~12.63)	27

1) $\bar{x}\pm s$; 2)范围; 3)其它包括3例存活病人(未分化癌1例, 息肉癌变1例, 印戒细胞癌1例), 3例死亡病人(未分化癌2例, 印戒细胞癌1例); 4)总死亡组与存活组比较, $t=4.5115 P=0.0000$

表2 死亡组与存活组异形和巨型 Ag-NORs 计数

预后	例数(n)	异形 Ag-NORs 数/100 个核	巨型 Ag-NORs 数/100 个核
存活	30	56.57±19.67 ¹⁾	23.77±14.89 ²⁾
死亡	27	67.00±24.12	31.37±16.15

异形颗粒 1) $\bar{x}\pm s=1.7968, P=0.0779$; 巨型颗粒 2) $\bar{x}\pm s t=1.8494, P=0.0698$

表3 死亡组与存活组 Ag-NORs 大小计数

预后	例数 (n)	Ag-NORs 数/100 个/核		
		<1 μ m	1~2 μ m	>2 μ m
存活	30	398.30±225.36 ¹⁾	158.78±75.74	71.67±27.01
死亡	27	661.70±250.52	128.00±72.65	85.89±20.70

1) $\bar{x}\pm s$; <1 μ m, 两组比较, $t=4.1973 P=0.0001$ 1~2 μ m, 两组比较, $t=1.6347 P=0.1078$ >2 μ m, 两组比较, $t=2.0958 P=0.0407$

3 讨论

近几年来,国内外学者开始探讨 Ag-NORs 与肿瘤预后的关系。几组对消化道肿瘤研究的报道提示 Ag-NORs 计数死亡组比存活组明显增高^[5],发生浸润与转移的癌细胞 Ag-NORs 数量较多^[6]。Griffiths^[7]对 100 例直肠腺癌的研究,认为 Ag-NORs 计数与预后,细胞增生和细胞倍体数无相关性。此外,刘景琴^[8]报道非何杰金氏淋巴瘤(NHL)存活组与死亡组 Ag-NORs 计数

有高度显著性差异外,且发现两组间少数病例有交叉重叠现象。Eusebi^[9]的研究却指出,生存期短(<34 个月)的乳癌病人 Ag-NORs 平均面积比生存期长(>3 年)的高,差异显著,而且两组病例之间无重叠现象。因此,Ag-NORs 对肿瘤预后的研究存在着不同结果。

本文应用 Ag-NORs 定量分析对结肠癌预后预测的研究,结果显示具有较理想的应用价值。第一,Ag-NORs 与临床预后的关系,在死亡组与存活组比较中发现,死亡组 Ag-NORs 计数

明显增多;与此同时,大型和小型颗粒增多,两极离散度增大,以细小颗粒增多最突出;聚合型分布减少,混合型分布增多。表明两者除数量上有显著性差异外,在大小和分布上同样存在着显著性差异。而且同一组织类型的死亡与存活病例之间在数量范围上无交叉重叠现象,与 Eusebi 结果相似,这是本研究对结肠癌预后判断的另一重要结果。第二,Ag-NORs 与淋巴结转移的关系:淋巴结转移是影响结肠癌预后的重要因素。Backmiihi^[10]发现 Ag-NORs 计数在乳癌淋巴结转移阳性组比阴性组高。Kakeji^[11]研究也发现胃癌淋巴结转移时 Ag-NORs 计数增高。本文结果显示:淋巴结转移阳性组 Ag-NORs 计数明显高于淋巴结转移阴性组,发生在浸润和转移的癌细胞核中 Ag-NORs 计数增高,说明这些癌细胞的生物学行为活跃,核内 γ RNA 基因扩增与转录活性很强,易于浸润与转移。因此,Ag-NORs 计数有助于提高细胞癌浸润和转移的危险以及术后复发的预测。本研究也发现,淋巴结转移癌,Ag-NORs 计数明显高于结肠原发癌,这与

Ohno^[12]对软骨肉瘤发生肺转移的研究结果相似,该作者认为此现象与肿瘤的异质性有关。至于在结肠癌存在这一现象的机理有待进一步探讨。此外,本研究还提示,Ag-NORs 与其它影响结肠癌预后的组织学类型、浸润程度和年龄等因素也明显相关。

Ag-NORs 是细胞增生, γ RNA 转录活动的标志。因此,高计数 Ag-NORs 的肿瘤,细胞增生活跃,肿瘤增殖旺盛,生物学行为差,病情进展快,临床预后差;反之,低计数 Ag-NORs 的肿瘤则细胞增生相对稳定,生物学行为好,病情稳定,临床预后好。Moran^[5]在研究 Ag-NORs 对进展期结肠癌预后时指出,传统的临床和病理指标,难以准确预测结肠癌预后,而单项 Ag-NORs 是可靠的预后指标。Ofner^[13]对结肠癌术后病人进行 Ag-NORs 和多种预后指标的比较研究后认为 Ag-NORs 对结肠癌预后预测的价值,甚至比 WHO 分类系统 (UIC 分期, Jass 分类和 Duke's 分类) 更为准确可靠。本研究证实:Ag-NORs 与临床预后密切相关,其数量、大小和分

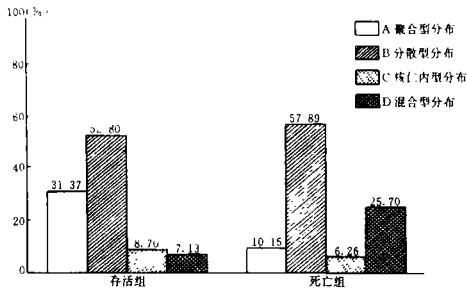


图1 存活组与死亡组 Ag-NORs 分布百分图
A. $P=0.0000$ B. $P=0.299$ C. $P=0.071$ D. $P=0.0000$

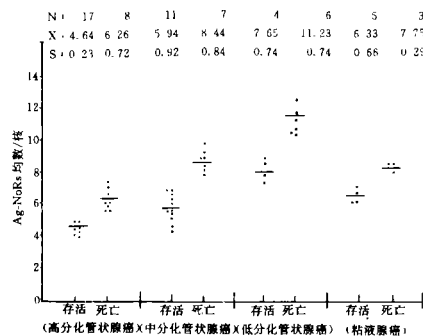


图2 同一组织类型死亡与存活病例 Ag-NORs 均值/核与范围

布在死亡组比存活组差异非常显著,且同一组织类型的死亡与存活病例之间不存在交叉重叠。而且与其它影响结肠癌预后的淋巴结转移以及组织类型、浸润程度和年龄等因素也明显相关。说明 Ag-NORs 定量分析可作为结肠癌预后预测

的一项新的,有用的可靠指标。特别是用于结肠癌术前和术后活检病理诊断,可指导手术治疗,预测转移与复发,这方面的临床应用前景是广阔的。

(本文图3~6见插页2)

参 考 文 献

- 1 庄亚华,王瑞年,胡丹毅. 核仁形成区嗜银蛋白的检测及其在消化道肿瘤研究中的作用. 国外医学(消化分册),1989,9(2): 82
- 2 全国肿瘤防治办公室,中国抗癌协会. 中国常见恶性肿瘤诊治规范. 第3分册,大肠癌. 北京:人民卫生出版社,1990. 11
- 3 何茂棠. 我国大肠癌病理研究的现状与进展. 临床与实验病理学杂志,1985,3: 50
- 4 Ploton D, Menager M, Jeannesson P, et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*,1986,18(1): 5
- 5 Moran K, Cooke T, Forster G, et al. Prognostic value of the nucleolar organizer regions and ploidy values in advanced colorectal cancer. *Br J Surg*,1989,76(11): 1152
- 6 陈 莉,肖玉凤,吴克荣,等. 核仁组成区相关蛋白在胃病变中的意义. 天津医药,1991,8: 478
- 7 Griffiths AP, Butler CW, Roberts P, et al. Silver-stained structure (AG-NORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. *J Pathol*, 1989,159(2): 121
- 8 刘景琴,张顺利,李素英,等. NHL 的 AgNORs 定量研究及其预后的意义. 临床与实验病理学杂志, 1991,7(3): 192
- 9 Eusebi V, Cattani MG, Lamcvec J, et al. Prognostic relevance of silver-stained nucleolar proteins in sarcomatoid carcinomas of the breast. *Ultrastruct Pathol*,1991,15(3): 203
- 10 Bockmüfhl U, Theissing F, Dimmer V, et al. The impact of nucleolar organizer regions for the lymph node spread and prognosis of invasive ductal mammary carcinoma. *Path Res Pract*. 1991,187: 437
- 11 Kakeji Y, korenaga D, Tsujitani S, et al. Predictive value of ki-67 and argyrophilic nucleolar organizer region staining for lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991,51(13): 3503
- 12 Ohno T, Tanaka T, Takeuchi S, et al. Silver-stained nucleolar organizer proteins in chondrosarcoma. *Virchows Archiv B cell Pathol*, 1991,60: 207
- 13 Ofner D, Tötsch M, Sandbichler P, et al. Silver stained nucleolar region proteins (Ag-NORs) as a predictor of prognosis in colonic cancer. *J Pathol*. 1990,162: 43

(1993-05-19 收稿 1994-03-14 修回)

PROGNOSTIC VALUE OF SILVER-BINDING NUCLEOLAR ORGANIZER REGION IN COLORECTEL CARCINOMA

Zhou Zengfen Yuan Shizhen

(Laboratory of Gastroenterology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Using a silver stain technique, nucleolar organizer region associated proteins (Ag-NORs) were studied with quantitative methods in paraffin section of 114 colorectal carcinoma. The results showed: (1) The number of Ag-NORs in death group ($\bar{x} \pm s$: 8.76 ± 2.29 per nucleus, $n = 27$) increased significantly as compared with survive group (6.29 ± 1.83 , $n = 30$, $P = 0.0000$); However, the number of large size ($> 2\mu\text{m}$) and small size ($< 1\mu\text{m}$) Ag-NORs in death group ($\bar{x} \pm s$: 85.89 ± 20.70 ; 661.70 ± 250.52 in every one hundred nuclei) increased significantly as compared with survive group (71.68 ± 27.01 , 398.30 ± 225.36), $P = 0.0407$, 0.0000 respectively. Concentrated type of distribution in death (10.15%) was significantly fewer than in severe (31.37%), $P = 0.0000$, Mix type of distribution in death (25.70%) was significantly more than in survive (7.13%), $P = 0.0000$. However, there was no overlap in the mean numbers of Ag-NORs per nucleus between the both groups. The data showed Ag-NORs related to the clinical prognostic. (2) The number of Ag-NORs related also with other factors that affected prognostic of colorectal carcinoma such as age, histological type, depth of invasion and metastasis of node. These results suggested that Ag-NORs is a novel and useful parameter of prognostic in colorectal carcinoma.

Key words silver staining of nucleolar organizer region associated proteins (Ag-NORs); colorectal carcinoma; prognosis

(上接第 202 页)

tion (7.9%). HCV RNA was positive only in chronic hepatitis C patients who had not been treated with α -interferon. It indicated that detecting the markers of HCV in urine is helpful to judge the curative effect during the treatment of α -interferon.

Key words hepatitis C virus; urine; antibody; RNA; polymerase chain reaction.