

# 腹水良恶性细胞核仁组成区定量研究

张世能<sup>①</sup> 袁世珍

(中山医科大学孙逸仙纪念医院消化内科,广州,510120)

**提 要** 使用胶质银染色技术,对 28 例良性腹水和 26 例恶性腹水进行核仁组成区(AgNORs)形态定量研究。结果表明:良性腹水间皮细胞与恶性腹水癌细胞二者在 AgNORs 数目、形态、大小及核内分布方面均存在显著差异。另外,对 5 例临床上疑诊恶性腹水而常规脱落细胞学(HE)染色阴性或未肯定者进行上述定量分析,确定腹水良恶性,结果与组织病理学诊断相一致。提示该技术在一定程度上可弥补常规脱落细胞形态学之不足。

**主题词** 核仁组成区/病理学;腹水/诊断

**中图分类号** R442.5

近年来,银染核仁组成区(Silver-stained nucleolar organizer regions, AgNORs)形态定量研究用于鉴别良性肿瘤与恶性肿瘤的重要性日益受到重视,国外已有报道<sup>[1,2]</sup>。国内尚无应用于鉴别良恶性腹水的文献报道,本文试图通过对良性腹水间皮细胞与恶性腹水癌细胞进行 AgNORs 定量观察,以探讨两者间鉴别诊断的客观标准,为腹水细胞学检查提供一项新依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

良性腹水组 28 例,其中肝炎后肝硬化 24 例,缩窄性心包炎 1 例,肾病综合征 2 例,结核性腹膜炎 1 例。均经典型的临床病征、实验室检查包括消化道内窥镜、超声影像学及电子计算机断层扫描等确定良性病因,且无癌病史,随访 5~11 月未发现恶性肿瘤,腹水涂片经苏木素-伊红(HE)染色 3 次以上,检查未发现癌细胞。恶性腹水组 26 例,其中胃癌 6 例,结肠癌 7 例,卵巢癌 8 例,宫颈癌 1 例,原发性肝癌 4 例。均经临床病征及实验室

检查确诊,腹水涂片 HE 检查见癌细胞,其中 14 例尚经组织病理学证实。临床上疑诊恶性腹水组 5 例,腹水涂片 3 次以上,仍未见癌细胞。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞涂片的制备 取腹水标本约 10 毫升,常规离心,沉渣制成涂片数张,经 95% 酒精(部分为 1:1=乙醚:乙醇)固定 15min 后,分别作 HE 和 AgNORs 染色。

1.2.2 AgNORs 染色方法 按改良 Ploton 一步法进行<sup>[3]</sup>。(1)涂片经蒸馏水洗约 10s;(2)用新鲜胶质银工作液(A液:0.1g 明胶加入 5ml 1%甲酸配成 2%明胶甲酸液;B液:5g 硝酸银加入 10ml 去离子水配成 50%硝酸银溶液,A、B2 液按 1:2 容积比临时配用)室温下避光染色 10~60min;(3)去离子水洗;(4)梯度酒精脱水、二甲苯透明、树胶封片。

1.2.3 定量方法 依序置低倍→高倍→油镜下观察,选用×100 油镜,根据细胞形态及核的特征,辨别出炎性细胞(淋巴细胞、多形核白细胞)不计。良性组,每例随机选择 100 个间皮细胞核。恶性组,则排除炎性细胞与间皮细胞外,每例随机选择 100 个余下

<sup>①</sup> 第一作者,1966 年出生,男,主治医师

的细胞核,分别进行定量检测,指标如下:(1)数目:分别计数每个细胞核内 AgNORs 颗粒数,求出平均值。(2)形态:颗粒分为规则型(圆形和近圆形,边缘光滑)和异形型(杆状或多边、奇异形等),记录每例异形型颗粒比例,求出均值。(3)大小:每个细胞核内 AgNORs 颗粒均行测量,范围分:巨型(直径  $\geq 2.3\mu\text{m}$ )、中型( $1.6\mu\text{m} \sim 2.3\mu\text{m}$ )、小型( $< 1.6\mu\text{m}$ )3类,记录每例各类比例,求出均值,选用  $C_2$  型  $\sqrt{2^n}$  网型测微尺,使用前进行校正。(4)分布:根据 AgNORs 颗粒在核内所处的位置,分为中央位(细胞长、短径连线中点),周边位(紧贴或位于核膜上)及偏中位(中央位与周边位之间)。记录每例各类比例,求出均值。

1.2.4 统计学处理 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本资料采用  $t$  检验,显著性界值  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

涂片经 AgNORs 银染色后,胞浆呈淡黄色,核呈深黄色,AgNORs 呈棕黑色颗粒。

表2 腹水良恶性细胞 AgNORs 大小及分布比例( $\bar{x} \pm s$ )<sup>1)</sup>

组别	n	大小(直径, $\mu\text{m}$ )			分布		
		$< 1.6$	$1.6 \sim 2.3$	$> 2.3$	中央位	偏中位	周边位
良性组	28	$80.6 \pm 5.1$	$19.2 \pm 6.3$	$0.2 \pm 3.1$	$59.9 \pm 8.3$	$32.0 \pm 7.6$	$8.1 \pm 1.9$
恶性组	26	$50.7 \pm 10.3$	$38.4 \pm 5.8$	$10.9 \pm 1.9$	$20.5 \pm 7.5$	$35.3 \pm 4.7$	$44.2 \pm 8.2$

1)  $P < 0.01$

取以  $\bar{x} + 2s$  为判断良性腹水间皮细胞上限值,则4项指标为:(1)平均每个核 AgNORs  $\geq 3.35$  个;(2)异形型颗粒  $\geq 18.7\%$ ;

### 2.1 间皮细胞染色结果

核内 AgNORs 颗粒多为 2~3 个,且多呈规则型,大小较一致,多位于细胞中央或稍偏于一侧,见图 1。

### 2.2 癌细胞染色结果

核内 AgNORs 颗粒明显增多,异形型者亦增多,大小不一,且多呈周边位分布。见图 2~3。

### 2.3 AgNORs 定量指标计数结果

良性腹水间皮细胞与恶性腹水癌细胞核内 AgNORs 颗粒数目、形态、大小及分布定量结果见表 1~2。

表1 腹水良恶性细胞 AgNORs 数目及异形型颗粒比例( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AgNORs(个/核)	异形型颗粒比例
良性组	28	$2.47 \pm 0.44$	$10.9 \pm 3.9$
恶性组	26	$6.19 \pm 1.47^{1)}$	$38.1 \pm 11.9^{1)}$

1)  $P < 0.01$

(3)巨型颗粒  $\geq 6.4\%$ ;(4)周边位分布  $\geq 11.9\%$ 。符合上述任一项即判断为恶性腹水,各项指标判断准确性等见表 3。

表3 各项指标敏感性、特异性和准确性 例数(%)

指标	敏感性	特异性	准确性
AgNORs	25/26(96.2)	28/28(100.0)	53/54(98.1)
巨型颗粒	24/26(92.3)	28/28(100.0)	52/54(96.3)
异形型颗粒	21/26(80.8)	28/28(100.0)	49/54(90.7)
周边位分布	22/26(84.6)	28/28(100.0)	50/54(92.6)

### 2.4 5例疑诊者 AgNORs 定量结果

在前述两组对比定量结果基础上,5例临床上疑诊恶性腹水者,采用相同的 AgNORs 定量方法,并与随后的腹腔镜下活检腹膜组织病理学比较,结果4例 AgNORs 者

达到恶性标准,腹膜组织病理学证实为腹膜转移癌;另1例未达到恶性标准,且腹膜活检组织病理学仅见上皮样增生,随防8个月无肿瘤病因发现,抗结核治疗腹水好转。见表4。

表4 5例疑诊者 AgNORs 定量结果及随访病理组织学资料<sup>1)</sup>

例号	临床初诊	A(个/核)	B(%)	C(%)	D(%)	病理组织学
1	结核性腹膜炎	4.13	8.3	32.7	34.6	腹膜转移性腺癌
2	肝炎后肝硬化	4.20	10.7	43.1	43.4	腹膜转移性腺癌
3	结核性腹膜炎	4.54	17.2	32.6	34.4	腹膜乳头状腺癌浸润
4	腹水待查	2.50	0.1	17.3	8.5	腹膜上皮样增生
5	腹水待查	5.17	10.1	38.5	41.3	腹膜转移性腺癌

1):A为平均每核 AgNORs 数目、B为巨型颗粒比例、C为异型颗粒比例、D为周边位分布比例

## 3 讨论

由于腹水脱落细胞丧失了原发器官和周围背景结构,加之观察者的经验影响,导致腹水常规脱落细胞学检查诊断癌性腹水敏感性仅为40%~60%<sup>[4]</sup>。

核仁组成区是一种具有核糖体 RNA 基因的酸性蛋白,可通过胶质银工作液在光镜下显示出来。Crocker<sup>[5]</sup>等首先对高度恶性和低度恶性非霍奇金氏淋巴瘤进行了 AgNORs 形态定量分析,结果显示二者间 AgNORs 数目具有明显差异。

本文结果亦显示腹水癌细胞 AgNORs 数目(6.19±1.47)明显多于间皮细胞者(2.47±0.44,  $P < 0.01$ )。恶性肿瘤细胞中 AgNORs 颗粒之所以增多,Underwood<sup>[6]</sup>等认为可能与下列因素有关:(1)细胞增殖活跃,以致细胞中有的核仁分解,使 AgNORs 颗粒分散于细胞核;(2)核仁的融合有缺陷;(3)细胞的倍体数增加,AgNORs 染色体数目增多;(4)r-DNA 转录活动的增加会导致原来不明显的 AgNORs 变得明显可见。

另外,作者的结果又发现癌细胞 AgNORs 异形型颗粒、巨型颗粒及周边位分布

数均高于间皮细胞者。这表明腹水间皮细胞与癌细胞二者同样在 AgNORs 空间构型方面存在客观差异。

综上,若采用前述癌细胞初步判断标准,则本文54例回顾性研究资料诊断敏感性为80.8%~96.2%,特异性均为100%,准确性为90.7%~98.1%。

本文进一步观察了5例腹水 HE 检查呈阴性而临床疑诊恶性腹水者细胞 AgNORs 定量结果,除1例外,其它4例合乎上述恶性标准,且与随访的腹膜组织学结论一致。这表明本文初步确定的判断癌细胞的定量标准具有较高的可靠性,AgNORs 形态定量方法有助于腹水间皮细胞与癌细胞的鉴别。

(本文图见插页1)

(本文曾得到本院病理科陈镁镛教授热诚帮助,特此致谢)

## 参 考 文 献

- 1 Lim SM, Duggan MA, Ruff M, et al. Morphometric analysis of nucleolar organizer regions in benign and malignant peritoneal effusions using backscattered electron microscopy. J Pathol, 1992, 166: 53

- 2 Derenzini M, Nardi F, Farabozoli F, et al. Distribution of silver stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from non-neoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytologica*. 1989, 33 : 491
  - 3 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
  - 4 Colli A, Succino G, Cocciolo M, et al. Diagnostic accuracy of fibronetic in the differential diagnosis of ascites. *Cancer*, 1986, 58 : 2489
  - 5 Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphoma. *J Pathol*, 1987, 151 : 111
  - 6 Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discrimination for malignancy. *J Pathol*, 1988, 155 : 95
- (1994-05-06 收稿 1995-03-22 修回)

## MORPHOMETRIC ANALYSIS OF SILVER-STAINED NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS IN BENIGN AND MALIGNANT ASCITES

Zhang Shineng      Yuan Shizhen

(Division of Gastroenterology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital,  
Sun Yat-sen university of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

The purpose of this study was to investigate the diagnostic value of silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant ascites. AgNORs were studied with quantitative methods in 54 cases, including benign ascites (28) and malignant ascites (26). The number, shape, size and distribution of AgNORs were counted and analysed. Use of the similar staining method was attempted in five additional patients. The results showed: the number of AgNORs was significantly higher in carcinoma cells ( $6.19 \pm 1.47$ ) than that in mesothelial cells ( $2.47 \pm 0.44$ ,  $P < 0.01$ ). There are also significant differences in morphology, size and distribution of AgNORs between them. All the results of AgNORs of additional patients were compatible with the histologic and clinical follow up. These results suggest that the four quantitative parameters of AgNORs might be useful for the differential diagnosis of malignant ascites and benign ascites.

**Subject headings** nucleolus organizer region/pathology; ascites/diagnosis