

·临床研究·

核仁形成区嗜银蛋白形态定量在结肠良恶性病变鉴别诊断中的意义*

周曾芬¹ 袁世珍²

(孙逸仙纪念医院消化疾病研究室)

摘要 应用银染技术对114例结肠癌, 95例结肠腺瘤和10例正常结肠进行核仁形成区嗜银蛋白(Ag-NORs)数量、形态、大小和分布的定量研究。结肠癌的Ag-NORs均数/核(7.04 ± 2.20)明显高于结肠腺瘤(3.43 ± 0.88 , $P=0.0000$)和正常结肠(1.25 ± 0.09 , $P=0.0000$)。结肠癌的异形Ag-NORs均数/100个核(61.39 ± 22.38)明显高于结肠腺瘤(20.74 ± 26.61 , $P=0.0000$)和正常结肠(0 , $P=0.0000$)。结肠癌的小型($<1\mu\text{m}$)和大型($>2\mu\text{m}$)Ag-NORs均数/100个核(483.76 ± 242.89 和 78.08 ± 23.06)明显高于结肠腺瘤(112.00 ± 47.23 和 19.49 ± 17.47 , P 值均= 0.0000)和正常结肠(0 和 0.76 ± 1.16 , P 值均= 0.0000)。结肠癌Ag-NORs颗粒的聚合、分散、核仁内和混合型分布(23.64%、53.20%、9.30%和13.86%)明显不同于结肠腺瘤(77.72%、16.88%、5.46%和0.04%, P 值均 <0.05)和正常结肠(100%、0、0和0, P 值均 <0.05)。本研究结果提示Ag-NORs 4项定量指标有助于结肠良恶性病变的鉴别诊断。

关键词 核仁形成区嗜银蛋白; 结肠肿瘤; 组织病理学; 诊断

中图分类号 R735.35; R361.2

银染核仁形成区嗜银蛋白(Silver-Stained Nucleolar Organizer Regions, Ag-NORs)现已成为肿瘤研究中的一项新指标。以往Crocker^[1]等对Ag-NORs的研究多限于单项计数指标, 本文试图对Ag-NORs数量、形态、大小和分布4项定量指标进行统计分析, 以探讨该技术对结肠良恶性病变的诊断价值。

材料和方法

标本选择 219例结肠标本, 男性130例(59.36%)女性89例(40.64%)。0~29岁18例(8.22%)、30~59岁138例(63.01%)、 ≥ 60 岁63例(28.77%)。分为3组: ①正常结肠(对照组): 10例, 取自本院消化疾病研

究室结肠镜下粘膜活检标本。②结肠腺瘤: 95例, 包括管状腺瘤40例(不典型增生I级17例、II级18例、III级5例)、绒毛状腺瘤30例(不典型增生I级3例、II级13例、III级14例)和管状绒毛状腺瘤25例(不典型增生I级6例、II级14例、III级5例)。取自本院消化疾病研究室1984~1991年结肠镜活检存档蜡块标本。③结肠癌: 114例, 包括管状腺癌86例(高分化29例、中分化36例、低分化21例)、未分化癌6例、印戒细胞癌5例、粘液腺癌12例、乳头状腺癌2例和息肉癌变3例。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。组织学诊断参见常规诊断标准^[2]。

方法

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, 另一张按改良Ploton一步方法^[3]进行Ag-NORs银染染色。

* 本研究由中华医学基金会资助

1 卫生部国内访问学者(现在昆明医学院第一附属医院内科)

2 导师

定量分析 逐次置低倍、高倍至油镜下观察, 每例随机连续观察 100 个无重叠和不能重复的细胞核, 每个细胞核观察如下 4 方面指标。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, 即可得出每个细胞核中 Ag-NORs 颗粒总数, 求出每例均值。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。(i) 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。(ii) 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-C₂ 型 $\sqrt{2}$ 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: (i) 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。(ii) 分散型, 形态及大小不等的颗粒散布于核内, 在核仁外似卫星分布, 数量通常 ≥ 5 个/核。(iii) 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。(iv) 混合型: 具有上述两种分布特征者。见图片 4。

统计学处理 多组资料采用方差分析 (F 检验); 如果方差不齐, 则改用多组秩和检验 (H 检验)。

结 果

标本 Ag-NORs 染色效果 组织切片经 Ag-NORs 银染色后, 每例标本细胞核呈淡黄色, 位于核内或核仁内, 背清晰。

Ag-NORs 形态定量分析结果

正常结肠组 每个细胞核内一般只见一个 Ag-NORs 颗粒, 少数出现 2~3 个, Ag-NORs 均数/核 1.25 ± 0.09 ; 颗粒呈圆形或近圆形, 而且边缘光滑、规则; 大小均匀, 绝大多数为中大型颗粒; 呈聚合型分布。

结肠腺瘤组 每个细胞核内 Ag-NORs 颗粒数目增加, 多为 2~4 个, 少数 5~7 个, Ag-NORs 均数/核为 3.43 ± 0.88 ; 颗粒以规则为主, 出现少数异形颗粒, 其中巨型颗粒偶见; 中型颗粒为主, 部份向大型和小型颗粒两极离散; 以聚合型分布为主, 出现分散型和核仁内型分布, 偶见混合型分布。

结肠癌组 每个细胞核内 Ag-NORs 颗粒数目明显增多, 一般 4~7 个, 少数 7~10 个, 偶见 10 个以上, 甚至 20~30 个, Ag-NORs 均数/核 7.04 ± 2.21 ; 形态明显不规则, 异形型颗粒明显增多, 其中巨型颗粒增多最为明显; 大小不匀, 向大型和小型颗粒两极离散度明显加大, 其中以细小颗粒的增多最为突出; 聚合型分布明显减少, 分散型和混合型分布明显增多, 核仁内型分布也见增加, 其中以分散型分布为主。

上述资料和统计学分析见表 1~3、图 1~5。

表 1 219 例正常、结肠腺瘤和结肠癌 Ag-NORs 计数

系 号	分 组	例 数	Ag-NORs 数/核	范 围
1	正常结肠	10	$1.25 \pm 0.09^*$	1.09~1.39
2	结肠腺瘤	95	3.43 ± 0.88	2.02~5.30
3	结肠癌	114	7.04 ± 2.21	4.17~13.02

* $\bar{X} \pm S$

1~3 多组间比较 (H 检验) $H = 151.23$ $P = 0.0000$; 组间两两比较, P 均 = 0.0000

表 2 219例正常结肠、结肠腺瘤和结肠癌异形和巨型Ag-NORs计数

系号	分组	例数	异形Ag-NORs数/100个核	巨型Ag-NORs数/100个核
1	正常结肠	10	0	0
2	结肠腺瘤	95	20.74 ± 26.61*	3.88 ± 7.44*
3	结肠癌	114	61.39 ± 22.33	27.06 ± 15.00

*: X ± S

异形颗粒1~3多组间比较 (H检验) H = 148.13 P = 0.0000; 组间两两比较, P均 = 0.0000,
巨型颗粒1~3多组间比较 (H检验) H = 132.73 P = 0.0000; 组间两两比较1~2P > 0.05,
1~3和2~3P = 0.0000

表 3 219例正常结肠、结肠腺瘤和结肠癌Ag-NORs大小计数

系号	分组	例数	Ag-NORs数/100个核		
			<1μm*	1~2 μm*	> 2μm*
1	正常结肠	10	0	124.6 ± 9.16**	0.76 ± 1.16
2	结肠腺瘤	95	112.00 ± 47.23	213.01 ± 56.96	19.49 ± 17.47
3	结肠癌	114	483.76 ± 242.89	140.81 ± 65.65	78.08 ± 23.08

*X ± S

<1 μm: 1~3组多组间比较 (H检验) H = 1.61.57 P = 0.0000; 组间两两比较, P均 = 0.0000,
1~2 μm: 1~3组多组间比较 (H检验) H = 70.14 P = 0.0000; 组间两两比较, P均 = 0.0000,
> 2 μm: 1~3组多组间比较 (H检验) H = 151.74 P = 0.0000; 组间两两比较, P均 = 0.0000

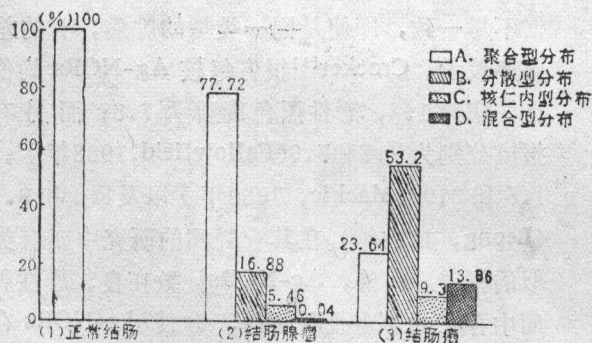


图1 219例正常结肠、结肠腺瘤和结肠癌Ag-NORs分布百分图

- A. 多组间比较, H = 141.71, P = 0.0000; 组间两两比较, P = 0.0000
- B. 多组间比较, H = 30.80, P = 0.0000; 组间两两比较, 1~2.1~3P = 0.0000, 2~3P < 0.01
- C. 多组间比较, H = 22.97, P = 0.0000; 组间两两比较, 1~2.1~3P = 0.0000, 2~3P > 0.05
- D. 多组间比较, H = 92.89, P = 0.0000; 组间两两比较, 1~2P > 0.05 1~3.2~3P = 0.0000

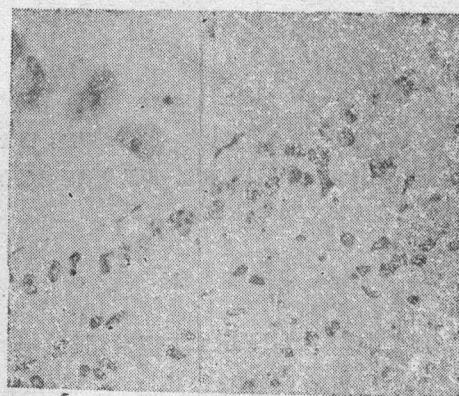


图2 正常结肠

只见1~2个Ag-NORs颗粒, 圆形, 规则, 大小均匀, 直径在1~2μm之间, 聚合型分布(10 × 40, 10 × 100)

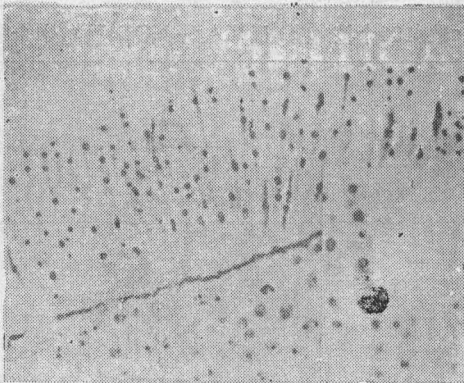


图3 结肠腺瘤

可见 2~4 个 Ag-NORs 颗粒, 形态较规则, 大小较均匀, 以聚合型分布为主, (10×40, 10×100)

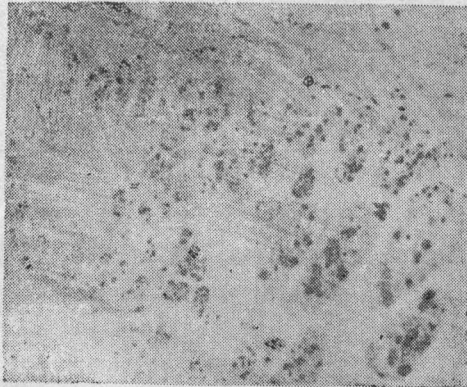


图4 结肠癌

可见 4~7 个或更多 Ag-NORs 颗粒, 形态明显不规则, 大小明显不均, 多呈分散型或混合型分布 (10×40, 10×100)

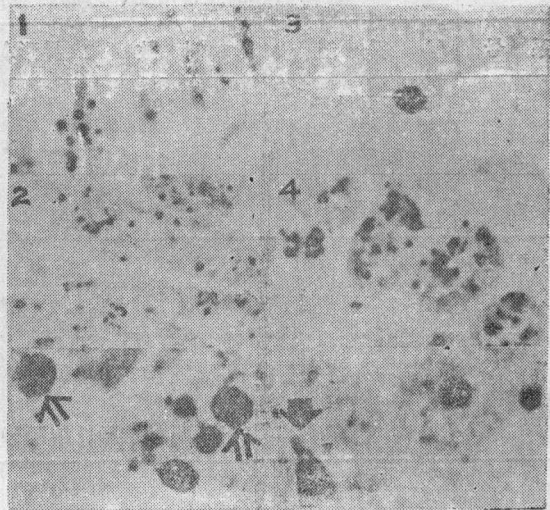


图5 结肠癌组核仁分布情况

(1) 聚合型分布, (2) 分散型分布, (3) 核仁内型分布, (4) 混合型分布

↑ 异型 Ag-NORs 颗粒, ↑↑ 巨型 Ag-NORs 颗粒

均数/核在结肠腺瘤高于正常结肠, 结肠癌明显高于正常结肠和结肠腺瘤。与 Mameav^[4]、Yang^[5]、张亚历^[6]和 Mingazzini^[7]等组对结肠肿瘤的研究结果基本一致, 从而也证实 Ag-NORs 计数有助于对结肠良恶性病变的鉴别。

但 Ag-NORs 计数在文献中, 出现多组数据不尽一致, 即使是同一类型的肿瘤, 有的差异亦较大。Crocker^[1]报告每核 Ag-NORs 均值良性痣为 1.2, 恶性黑色素瘤为 7.8; 而另有报道分别为 1.7 和 7.6 (Fallowfield, 1988 年); 1.5 和 3.9 (Mackic, 1989 年) 以及 1.2 和 9.2 (Leong, 1989 年)。在其它肿瘤的研究中亦有类似的报道。另外, Ag-NORs 计数在良、恶性肿瘤中存在的“重叠”问题, 均使 Ag-NORs 在实际应用中受到一定影响。

Ag-NORs 多项计数指标的研究

多数研究者已注意到 Ag-NORs 形态、大小和分布在良、恶性病变中表达也有明显不同, 也有提出以此作为 Ag-NORs 在肿瘤诊断中的另一重要指标。但这些研究: ① 只从良恶病变表现上大体描述, 缺乏精确定量分析。② 仅有 1~2 指标的简单分析。本文除计数外还在形态、大小和分布多项定量指标上探讨

讨 论

本文应用 Ag-NORs 在正常结肠、结肠腺瘤和癌中的表达, 从数量、形态、大小和分布 4 方面对 Ag-NORs 进行定量研究。

Ag-NORs 单项计数指标的研究

自 1987 年应用 Ag-NORs 银染技术对非何杰金氏淋巴瘤的研究提出对肿瘤的诊断意义以来^[1], 国内外学者通过对不同系统多种肿瘤的研究, 肯定了 Ag-NORs 计数作为鉴别良恶性病变的定量指标。本文结果表明: Ag-NORs

Ag-NORs 对结肠良恶性病变的诊断意义。结果表明:正常结肠,结肠腺瘤和癌 Ag-NORs 的形态、大小和分布明显不同,各项指标3组间差异均有统计学意义。结肠良恶性病变的这些特征性变化,有时不需精确统计,便能通过观察分辨开来。

Underwood^[9]认为 Ag-NORs 数量取决于核仁内 rDNA 转录活性水平,核仁染色体数和细胞在分裂周期所处的阶段。正常细胞分化成熟,细胞生长期相对稳定,蛋白合成不活跃,所以 Ag-NORs 数量少,形态规则,大小均匀,聚合分布;恶性肿瘤细胞分化差,具有高度的生长和分裂潜能,致使 Ag-NORs 数目明显增多,而且恶性细胞 Ag-NORs 颗粒聚合与分散无规则,所以出现形态奇异、大小不均,分散和/或混合分布等特征性变化;而良性肿瘤分化较成熟,细胞生长较稳定,故 Ag-NORs 表现介于正常与恶性细胞之间。本文对 219 例结肠标本进行 Ag-NORs 数量、形态、大小和分布 4 项指标 11 个参数的定量统计分析提示:Ag-NORs 形态、大小和分布 3 项定量指标与 Ag-NORs 计数一样有助于结肠良恶性病变的鉴别,对结肠肿瘤的诊断具有同等价值。4 项定量指标的综合分析,克服了单项计数指标的局限性,可提高该技术对肿瘤的研究水平。本文 4 项定量指标的研究,样本数大,具有客观性,统计学处理精确,增加结果的可靠性。

参 考 文 献

1. Crocker J and Nar P. Nucleolar organ-

izer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987,151(2):111

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; 11~20
3. Ploton D, et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem J* 1986,18(1):5
4. Mamaev NN, et al. Activity of the nucleolar organizers of the cells in epithelial tumours of the human large intestine. *Biull Eksp Biol Med* 1986;102(12):763
5. Yang P, et al. Role of nucleolar organizer regions in differentiation malignant from benign tumours of the colon. *J Clin Pathol* 1990,43(3):235
6. 张亚历, 等. 结肠腺瘤及结肠癌核体组织区的形态学定量研究. *第一军医大学学报* 1990, 10(1):28
7. Mingazzini PL, et al. Expression of interphasic nucleolar organizer regions in normal, dysplastic and neoplastic colorectal mucosa. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991;419(6):487
8. Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988;155:95

(1992-12-11收稿 1993-04-25修回)

SIGNIFICANCE ON THE MORPHOLOGICAL QUANTITATION OF SILVER-STAINED NUCLEOLAR ORGANISER REGIONS IN DIFFERENTIATING DIAGNOSIS OF COLORECTAL MALIGNANT AND BENIGN TUMORS

Zhou Zengfen Yuan Shizhen

(Gastrointestinal Research Laboratory, Sun Yat-Sen Memorial Hospital)

In the present study, silver-stained nucleolar organizer regions (Ag-NORs) were studied with quantitative methods in paraffin sections of 114 colorectal carcinomas, 95 colorectal adenomas and 10 normal colorectal mucosa. The number, shape, size and distribution of Ag-NORs were counted and analysed. The purpose of this study was to probe into the diagnostic significance of quantitative evaluation of Ag-NORs in malignant and benign tumors of the colon. The results showed: The number of Ag-NORs in colorectal carcinomas (7.04 ± 2.20 per nucleus) was significantly greater as compared with colorectal adenomas (3.43 ± 0.88 , $P = 0.0000$) and normal colorectal mucosa (1.25 ± 0.09 , $P = 0.0000$). The number of bizarre Ag-NORs in colorectal carcinomas (61.39 ± 22.38 in one hundred nuclei) was significantly higher than that in colorectal adenomas (20.74 ± 26.61 , $P = 0.0000$) and normal colorectal mucosa (0, $P = 0.0000$). The number of small-sized ($< 1\mu\text{m}$) and large-sized ($> 2\mu\text{m}$) Ag-NORs in colorectal carcinomas (483.76 ± 242.89 and 78.08 ± 23.06 in one hundred nuclei) was significantly higher than that in colorectal adenomas (112.00 ± 47.23 and 19.49 ± 17.47 , $P = 0.0000$ and 0.0000 respectively) and normal colorectal mucosa (0 and 0.76 ± 1.16 , $P = 0.0000$ and 0.0000 respectively). The distribution patterns including concentrated, dispersed, nucleolar and mixed type in carcinomas (23.64%, 53.20%, 9.30%, and 13.86%) differentiated significantly from those in colorectal adenomas (77.72%, 16.88%, 5.46% and 0.04%, all $P < 0.05$) and in normal colorectal mucosa (100%, 0, 0 and 0, all $P < 0.05$). These results suggest that the four quantitative parameters of Ag-NORs might be useful for the differential diagnosis of carcinoma from adenoma of the colon.

Key words silver stained nucleolar organizer regions; colorectal tumour; histopathology; diagnosis