

- 2 O'Brien P J. Methods in Enzymology. Orlando: Academic Press, 1984. 370~ 377
- 3 Wymann M P, Deranleau D A, Baggiolini M *et al.* The onset of the respiratory burst in human neutrophils. J Biol Chem, 1987, **262** (25): 12048~ 12053
- 4 Ferrante A, Thong Y H. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the hypaque-ficoll method. J Immunol Methods, 1980, **36** (2): 109~ 117

A Modified Method for Separating Neutrophils From Human Blood. BEI Ling, HU Tianhui, SHEN Xun (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract A modified method for separating neutrophils from whole blood was reported.

Neutrophils was obtained by dextran sedimentation, centrifuged with lymphocytes separating solution, special separating medium washing and erythrocyte depletion. The purity and viability were proved to be both about 95% by Wright's stain and Typan blue respectively. Both the chemiluminescence method and cytochrome c reduction method proved the high activity and the integrity of the membrane receptor of the neutrophils. Compared with other method, this method is more simple and easier to handle, which suggests that it is a efficient and economic method for separating neutrophils.

Key words neutrophil, separation, respiratory burst

流式细胞术检测胃癌前病变 DNA 及 p21, p53 含量*

齐凤英 段惠军 刘庆银

(河北医科大学病理解剖教研室, 石家庄 050017)

左连富 刘江惠 郭建文

(河北省肿瘤研究所, 石家庄 050011)

摘要 应用流式细胞术和免疫荧光技术, 对 80 例胃癌前病变细胞中 DNA 含量, ras p21 和 p53 蛋白进行定量检测, 探讨其在胃癌前病变中, 作为癌变早期标志物的临床意义. 检测结果发现, 胃癌前病变的 DNA 异倍体率随不典型增生病变的分级增高而增加, ras p21 和 p53 蛋白的表达量亦随胃癌前病变不典型增生程度的加重而增高. DNA 异倍体和 ras p21 表达阳性的胃癌前病变出现的癌变率显著增高, 提示可能是癌变早期的分子标志物.

关键词 胃癌前病变, DNA 含量, 流式细胞术

学科分类号 Q2-33

肿瘤的发生、发展是与细胞本身的基因改变密切相关的, 研究证明, 癌基因的激活和抑癌基因的失活、突变以及基因蛋白的过量表达直接参与了细胞的恶性转化^[1]. 本文应用流式细胞术和免疫荧光技术对胃癌前病变细胞 DNA 含量和 ras p21, p53 蛋白表达进行定量检测, 探讨其在癌变过程中的重要作用和病理形态学特征的关系.

1 材料和方法

1.1 标本来源

采用胃镜活检的胃粘膜组织和术后的胃癌旁残端胃粘膜组织, 经病理诊断证实为癌前病

* 河北省卫生厅资助项目 (94001).

收稿日期: 1997-06-10, 修回日期: 1997-10-24

变 (不典型增生) 80 例, 其中不典型增生 I 级 29 例, II 级 30 例, III 级 21 例. 并取正常胃粘膜组织 15 例, 慢性萎缩性胃炎 10 例, 晚期胃癌组织 20 例作为对照组.

1.2 流式细胞检测样品的制备

1.2.1 DNA 含量检测样品的制备和 DNA 荧光染色参照文献 [2].

1.2.2 rasp21、p53 蛋白免疫荧光标记方法的详细步骤见文献 [3, 4], 分别采用间接免疫荧光标记 rasp21 蛋白 (小鼠抗人 rasp21 单抗 ras-F325-171, Oncogene Science Inc. US) 和鼠抗人 p53 蛋白单抗 (PAb1801, Oncogene Science Inc. US)、二抗荧光抗体为羊抗鼠 FITC-IgG (军事医学科学院微生物研究所生产, 批号 9609). 在免疫荧光标记后, 再加入 1.0 ml 碘化丙啶荧光染液对细胞 DNA 染色, 同时进行单参数和双参数检测, 并设有阳性和阴性的同型对照样品. 经染色后的样品涂片在荧光显微镜下观察, rasp21 蛋白发出黄绿色荧光, 主要分布于胞浆内, p53 蛋白发出的荧光主要分布于细胞核内. DNA 发出红色荧光.

1.3 流式细胞检测方法

采用美国 B.D 公司生产的 FACS 420 型流式细胞仪, 光源为 2W 氩离子激光器, 工作功率为 300 mW, 激发波长为 488 nm, 由于 FITC 和 PI 两种荧光染料具有相同的激发光谱, FITC 发出的绿色荧光以 520 nm 的带通滤片, PI 发出的红色荧光以 590 nm 的长通滤片用于荧光信号的探测, 测量的数据输入 HP-300 Consort 30 计算机, 用相应的软件进行数据处理, 测量前以鸡红细胞作为标准样品调整仪器的 CV 值在 5.0% 以内.

1.4 测量资料的分析方法

1.4.1 以 DNA 指数 (DI 值) 表示 DNA 含量, 依据 DI 值判定 DNA 倍体, $DI = 0.9 \sim 1.10$ 为二倍体, $DI < 0.9$ 或 $DI > 1.10$ 为异倍体.

1.4.2 rasp21、p53 蛋白表达的定量分析方法, 参照 Morkve 等^[5]提出的荧光指数 (fluorescence index. FI) 表示 p21、p53 蛋白的相

对含量. $FI = (\text{实验样品 p21 或 p53 平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}) / \text{正常对照样品 p21 或 p53 平均荧光强度}$. 如 FI 值高于正常样品表达荧光强度的上限值, 则判定阳性表达.

1.4.3 为证实胃癌前病变 DNA 异倍体和 rasp21、p53 过量表达与早期癌变的关系, 对所有 80 例胃不典型增生病人进行了为期 3 年的追踪随访.

1.4.4 所有资料的统计处理采用 *t* 检验或 χ^2 检验.

2 结 果

2.1 胃不典型增生细胞 DNA 倍体分析

根据 DNA 倍体判定标准, 15 例正常胃组织 ($DI = 1.0 \pm 0.02$) 和 10 例慢性胃炎 ($DI = 1.0 \pm 0.03$) DNA 量均为二倍体. 在胃癌前病变中, 29 例 I 级不典型增生的 ($DI = 1.01 \pm 0.03$) 出现 1 例异倍体, 30 例 II 级不典型增生 ($DI = 1.02 \pm 0.05$) 有 2 例异倍体, 21 例 III 级不典型增生 ($DI = 1.12 \pm 0.09$) 出现 11 例异倍体, 在 20 例胃癌中 ($DI = 1.19 \pm 0.14$) 出现 15 例异倍体.

2.2 rasp21 蛋白含量与不典型增生分级的关系

正常胃粘膜细胞 p21 蛋白的含量与慢性萎缩性胃炎的含量均为 $FI = 1.0 \pm 0.03$. 20 例胃癌中, p21 含量 $FI = 1.21 \pm 0.16$, 表达阳性 13 例 (65%). 在不典型增生病例中, p21 蛋白量和阳性表达率与组织分级相关 (表 1), 各分级之间的 p21 含量 (FI 值) 随增生程度

表 1 胃不典型增生 p21 与组织分级的关系

组织学 分级	例数	FI 值 ($\bar{x} \pm s$)	P 值	rasp1 阳性率 / % (例数)
I	29	0.99 ± 0.10	$P < 0.01$	20.7 (6)
II	30	1.10 ± 0.16		33.3 (10)
III	21	1.47 ± 0.32	$P < 0.01$	71.4 (15)

加重而增加，各分级之间在统计学上有非常显著性差异 ($P < 0.01$)，且发现Ⅲ级不典型增生 p21 含量明显高于胃癌 ($P < 0.05$)。

2.3 p53 蛋白与不典型增生分级的关系

15 例正常胃粘膜 p53 蛋白含量 $FI = 1.0 \pm 0.04$ ，5 例慢性胃炎 $FI = 1.0 \pm 0.03$ 20 例胃癌含量 $FI = 1.47 \pm 0.31$ ，表达阳性者 15 例 (75%)。80 例不典型增生各分级之间 p53 含量在统计学上没有差异 (表 2)，但胃癌与不典型增生之间的含量相比在统计学上有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 2 胃不典型增生分级与 p53 含量的关系

组织学 分级	例数	FI 值 ($\bar{x} \pm s$)	P 值	p53 阳性率 / % (例数)
I	29	1.02 ± 0.21	$P > 0.05$	17.2 (5)
II	30	1.06 ± 0.28		36.7 (11)
III	21	1.09 ± 0.31	$P > 0.05$	61.9 (13)

2.4 胃不典型增生 DNA 与 p21, p53 蛋白关系

从表 3 显示，DNA 异倍体细胞 rasp21 和 p53 含量和阳性率均高于二倍体细胞，在统计学上均有显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 3 不典型增生 DNA 倍体与 p21 和 p53 表达的关系

DNA 倍体	例数	FI 值(p21) ($\bar{x} \pm s$)	p21 阳性率/ % (例数)	FI 值(p53) ($\bar{x} \pm s$)	p53 阳性率/ % (例数)
二倍体	66	1.09 ± 0.20	28.8 (19)	1.05 ± 0.28	31.8 (21)
异倍体	14	1.46 ± 0.38	85.7 (12)	1.19 ± 0.23	57.1 (8)

2.5 DNA 异倍体和 p21, p53 阳性与癌变关系

在对 80 例胃粘膜不典型增生病例的三年追踪随访期间，其中 24 例 (I 级 16 例，II 级 7 例，III 级 1 例) 失访，无法证实癌变的情况。56 例有随访结果的病例中，17 例 (III 级 14 例，II 级 3 例) 在随访期间已由病理诊断证实为早期癌变，其中 12 例癌变病例为 DNA 异倍体和 rasp21, p53 表达阳性 (FI 值均在 1.30 以上)，5 例癌变病例为 DNA 二倍体，但 p21 表达阳性，含量均为高表达 (FI 值 1.33~ 1.67)，而 p53 含量均为低表达 (FI 值 1.06~ 1.13)。p21, p53 表达阴性的病例中在随访期间未发现癌变。

3 讨 论

对癌前病变的研究是肿瘤防治工作中重要的课题之一，预防癌前病变向恶性转化，并对有癌变潜在的病例作出早期诊断，寻找早期癌变特异性的标志物具有重要的临床价值。已有研究发现^[6]，DNA 异倍体是胃癌前病变发生癌变的重要标志，应用流式细胞术检测胃癌前病变细胞 DNA 异倍体，在病理形态学还不能确诊癌变之前，从 DNA 定量的分子水平进行

超早期癌变诊断成为现实。本研究结果表明，DNA 异倍体的出现率随不典型增生程度加重而增加，从随访结果显示，DNA 异倍体的癌变率显著高于二倍体，且Ⅲ级不典型增生出现的癌变病例明显增高，进一步证实不典型增生程度越重，癌变率越高^[7]，DNA 异倍体可能是癌变早期的标志之一。

从胃癌前病变细胞 rasp21 蛋白表达的结果显示。随不典型增生程度的加重，含量也增高，尤其Ⅲ级不典型增生 p21 含量 (FI 值 1.47 ± 0.32) 明显高于晚期胃癌的表达量 (1.21 ± 0.16)，提示 rasp21 蛋白过量表达对促发癌变起着重要的作用，p21 蛋白的过量表达可能是癌变早期出现基因分子标志物之一，随访的结果表明，17 例发生癌变病例中，p21 蛋白均表达阳性和 FI 值均为高表达，rasp21 蛋白有望成为癌变早期诊断的一个指标，已有发现 p21 在早期肝癌是一个可检测的分子标志物^[8]。

检测胃癌前病变 p53 蛋白含量结果显示，不典型增生各分级之间的 p53 含量 (FI 值) 虽有逐渐增高趋势，但在统计学上没有差异，而晚期胃癌的 p53 含量显著高于胃癌前病变的

含量, p53 蛋白过量表达可能是癌发展晚期的标志物. 大多数的研究结果也发现胃癌中 p53 蛋白呈过量高表达并随病变的进展 p53 含量亦随之增高^[3,9], 但由于所用抗体的类型及实验技术的不同等因素, 所得实验结果存在一定的差异. 对肺癌^[10], 食管癌^[11] 乳腺癌^[12] p53 蛋白的检测也发现, 在晚期肿瘤出现 p53 含量的高表达, 认为 p53 基因突变可能是肿瘤发生中的较晚事件, 检测 p53 蛋白可作为预测癌症病人预后和潜在淋巴结转移的一个指标.

DNA 异倍体的 rasp21 蛋白含量显著高于二倍体, 从而为癌前病变细胞 DNA 含量异常改变提供了癌基因参与启动癌变的分子生物学证据, 癌基因分子的参与使癌前病变细胞 DNA 合成加速, 为最终发生癌变提供了促发因素. 因此, 胃癌前病变细胞出现 DNA 异倍体和 rasp21 蛋白的过量表达对癌变的发生发展过程中的重要作用, 有待进一步深入探索.

参 考 文 献

- Hinds P, Finlay C, Levine A J *et al.* Mutation is required to activate the P53 gene for cooperation with the Ras oncogene and translocation. *J Virol*, 1989, **63** (4): 739~ 742
- 左连富, 刘洪祥, 郭建文等 (Zuo L F, Liu H X, Guo J W *et al.*). 流式细胞术检测石蜡包埋肿瘤细胞 DNA 含量样品制备方法. *中华病理学杂志* (Chinese Journal of Pathology), 1988, **17** (3): 232~ 234
- 左连富, 齐凤英, 郭建文等 (Zuo L F, Qi F Y, Guo J W *et al.*). p21ras 在胃癌前病变和胃癌细胞表达的定量研究. *中华病理学杂志* (Chinese Journal of Pathology), 1994, **23** (3): 138~ 140
- 齐凤英, 左连富, 甄艳军等 (Qi F Y, Zuo L F, Zhen Y J *et al.*). p53 基因蛋白在乳腺良性病变和癌细胞表达的定量研究. *中华病理学杂志* (Chinese Journal of Pathology), 1994, **23** (6): 330~ 332
- Morkve O, Learun O D. Flow cytometry measurement of p53 protein expression and DNA content in paraffin embedded tissue from bronchial carcinoma. *Cytometry*, 1991, **12** (4): 438~ 441
- Macartney J C, Camplejohn R. DNA flow cytometry of histomucosa. *J Pathology*, 1986, **150** (2): 113~ 116
- 林培中, 陆士新, 张金生 (Lin P Z, Lu S X, Zhang J S). 食管癌前病变 (食管上皮增生) 的研究概况. *中华肿瘤杂志* (Chinese Journal of Oncology), 1983, **5** (4): 391 ~ 394
- 郑 杰, 武忠弼, 阮幼冰等 (Zheng J, Wu Z B, Ruan Y B *et al.*). 大鼠实验性肝癌最早可测的分子标志. *癌症* (Chinese Journal of Cancer), 1996, **15** (3): 265~ 257
- 郝 莹, 张锦坤, 易粹琼等 (Hao Y, Zhang J K, Yi C Q *et al.*). 应用流式细胞术对胃癌及癌前病变中 p53 蛋白表达的研究. *中华物理医学杂志* (Chinese Journal of Physical Medical), 1997, **19** (2): 95~ 98
- 周 决, 曹世龙, 张凤坤等 (Zhou J, Cao S L, Zhang F K *et al.*). 流式细胞仪双参数分析肿瘤 DNA 含量和 p53 蛋白表达. *临床与实验病理学杂志* (Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology), 1996, **12** (专辑): 47
- Parenti A R, Rugge M, Frizzera E *et al.* P53 overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*, 1995, **19** (6): 1418~ 1421
- 左连富, 齐凤英, 刘江惠等 (Zuo L F, Qi F Y, Liu J H *et al.*). 乳腺癌 p53 基因蛋白的表达与临床预后的关系. *癌症* (Chinese Journal of Cancer), 1995, **14** (4): 252~ 255

Detection of DNA and Content of p21 and p53 for Gastric Precancer Lesion by Flow Cytometry. QI Feng-ying, DUAN Hui-jun, LIU Qing-yin (Department of Pathology Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China); ZUO Lian-fu, LIU Jiang-hui, GUO Jian-wen (Hebei Provincial tumor Institute, Shijiazhuang 050011, China).

Abstract Content of DNA, rasp21 and p53 in 80 case gastric precancer lesion was quantitative detected by flow cytometry and immunofluorescence techniques. and to investigate its in clinical value as early canceration marker. The detected results showed that raising in DNA heteroploid rate. Rasp21 and p53 protein expression were found with raising of dysplasia grade in gastric precancer lesion. The rate of canceration of gastric precancer lesion in DNA heteroploid and rasp21 expression positive were notable increased. DNA heteroploid and rasp21 protein over expression can be an early canceration molecular marker.

Key words gastric precancer lesion, DNA content, flow cytometry