

单位代码: 10025
学 号: 0502010

分类号: R781
密 级: 非密级



硕 士 学 位 论 文

口腔黏膜脱落细胞在口腔癌早期诊断中的应用研究

Application of exfoliated cell in early detection of oral cancer

研 究 生:	刘瑶
学科专业:	口腔临床医学
指导教师:	孙正 教授
导师单位:	首都医科大学附属北京口腔医院
完成日期:	二〇一二年五月

首都医科大学

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权首都医科大学可以将本学位论文的全部内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于（请在以下相应方框内打“√”）：

- 1、保密□，在____年解密后适用本授权书。
- 2、不保密□。

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

口腔黏膜脱落细胞在口腔癌早期诊断中的应用研究

Application of exfoliated cell in early detection of oral cancer

硕士研究生： 刘 瑶

导 师： 孙 正 教授

本课题由：北京医药产品和技术重大项目培育研究北京市科技计划项目
(2101107050210012) 资助、首都医学发展科研基金项目 (2007-3095) 资助。

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
前言.....	5
正文.....	7
材料与方法	7
结果	15
讨论	37
全文小结	41
综述.....	46
参考文献.....	52
附录.....	60
致谢.....	65
个人简历.....	67

口腔黏膜脱落细胞在口腔癌早期诊断中的应用研究

中文摘要

首都医科大学口腔医学院

研究生：刘瑶

导师：孙正 教授

我国是全球六大口腔癌高发和高死亡率的国家之一，尽管外科手术、放化疗技术飞速进展，但口腔癌的五年存活率仅约 50%，主要原因在于患者确诊及接受治疗时已经处于疾病的晚期。若出现血行转移其五年生存率仅为 19%，若就诊时处于疾病的早期阶段其五年生存率可以提高到 80%。可见口腔癌若能早期诊断及早期治疗，可以大大提高五年生存率及生活质量。因此口腔癌的早期诊断至关重要。

研究目的：本研究通过对口腔癌、口腔白斑及正常人群口腔黏膜脱落细胞 DNA 定量分析及 P16、P15 基因甲基化的检测，观察该方法对口腔癌早期诊断的可行性，寻找一种无创性、高特异性和高敏感性、操作简单、容易被患者接受的检测方法，为口腔癌的早期诊断及癌前病变治疗方案的选择、预后评价提供依据。

研究方法：选择 2011 年 4 月至 2012 年 4 月就诊于首都医科大学附属北京口腔医院经临床诊断为口腔癌的患者 43 例，口腔白斑 59 例，共 102 例。该 102 例患者经组织病理学诊断共包括：43 例口腔癌及白斑重度异常增生，21 例白斑伴中度异常增生，25 例白斑轻度异常增生、13 例白斑不伴异常增生，同时有 108 例正常对照。用特制毛刷刷取病变部位脱落细胞，采用薄层液基制片，Feulgen 染色，全自动细胞图像分析系统进行 DNA 定量分析，同时用巴氏染色进行细胞学分析。进一步提取脱落细胞中 DNA，进行特异性甲基化处理，定量 PCR，检测 P16 基因和 P15 基因甲基化情况。

结果：43 例口腔癌及白斑重度异常增生患者中有 41 例 DNA 定量分析检测

结果为阳性；46 例白斑轻、中度异常增生中有 3 例为阳性结果；13 例白斑不伴异常增生和 108 例正常对照组 DNA 定量分析结果均为阴性。

口腔黏膜脱落细胞 DNA 定量分析在口腔癌诊断的敏感性是 95.35%，特异性是 98.20%，阳性预测值是 93.18%，阴性预测值是 98.80%，其诊断的准确度用受试者工作特征曲线下面积表示，为 0.996。将 P16 基因和 P15 基因甲基化检测和 DNA 定量分析相结合，其诊断的敏感性可以提高到 100%。

结论：用口腔黏膜脱落细胞 DNA 定量分析检测 43 例口腔癌/重度异常增生患者中，出现 2 例假阴性病例，其诊断的敏感性为 95.35%，可见 DNA 定量分析可以用于口腔癌的早期诊断；同时对 59 例口腔白斑患者，108 例正常对照组样本进行分析，出现 3 例假阳性病例，其特异性是 98.20%，表明 DNA 定量分析可以用于口腔白斑病的定期筛查，及早期发现口腔白斑恶变病例。可见口腔黏膜脱落细胞 DNA 定量分析是一种无创的、可靠的、高特异性和高敏感性的早期诊断口腔癌的方法。

关键词：口腔黏膜脱落细胞；口腔癌；口腔白斑；DNA 定量分析；甲基化。

Application of exfoliated cell in early detection of oral cancer

Abstract

School of Stomatology, Capital Medical University

Master degree candidate : Liu Yao

Supervisor: Prof. Sun Zheng

Oral cancer is common worldwide. The high mortality and morbidity of oral cancer making it the sixth most common malignancy in the world. Despite of advanced in radiotherapy and chemotreatment, the 5-year survival rate has remained approximately 50% for last 30 years. Late diagnosis resulting in late treatment is the main cause of death and low quality of life.

Objective The aim of this study was to access the feasibility of DNA quantitative analysis in the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma(OSCC) and to evaluate genes methylation status of P16、P15 in the exfoliated cells from oral leukoplakia (OLK)、OSCC patients. This study tried to find a noninvasive、high sensitivity and specificity、easily accepted by patients、repeatable approach for OSCC early detection. The study lay a foundation for early diagnosis of OSCC and selection of treatment plans for oral premalignant disease.

Methods 102 patients diagnosed with OLK and OSCC clinically and histologically were recruited in this study from April 2011 to April 2012 in Beijing Stomatological Hospital, including 43 OSCC and severe dysplasia of oral leukoplakia、21 moderate dysplasia、25 mild dysplasia、13 without dysplasia、108 health people as control. The patients' exfoliated cells were collected by using cervibrush, and then Feulgen staining and DNA quantitative analysis was performed. Meanwhile, the DNA was extracted from exfoliated cells for evaluation methylation

of P16、P15 by using Methylamp DNA modification kit and real time PCR.

Results 41 of 43 OSCC and severe dysplasia samples, and 3 of 59 OLK samples were detected positive by DNA quantitative analysis. None in the control group by DNA quantitative analysis.

The sensitivity of the DNA quantitative analysis was 95.35%, the specificity was 98.20%, positive predictive value was 93.18%, negative predictive value was 98.80%, the area under receiver operating characteristic (ROC) curve was 0.996. Combined with P 16、P15 methylation analysis and quantitative analysis, the sensitivity could be reached to 100%.

Conclusion Our study indicated that the DNA quantitative analysis by oral exfoliated cells could be used as an noninvasive、high sensitivity and specificity approach in early detection of OSCC.

Key words: oral exfoliated cell, oral cancer, oral leukoplakia, DNA quantitative analysis, methylation

前言

全球每年有将近 405,000 例口腔癌新发病例。我国是全球六大口腔癌高发和高死亡率的国家之一，且近年来出现上升趋势。尽管外科手术、放射治疗、化学治疗有了很大进展，但平均五年生存率仍不及 50%，主要原因是很多口腔癌患者就诊时已处于疾病晚期^[1-2]，若出现血行转移其五年生存率仅为 19%，若就诊时处于疾病的早期阶段其五年生存率可以提高到 80%^[3]。口腔癌中 90% 为鳞状细胞癌，很多口腔黏膜鳞状细胞癌都具有明确的癌前损害阶段，口腔中常见的为口腔白斑，它是国际公认的癌前病变。从癌前病变到真正的变为癌可以经历几年到十几年，口腔黏膜癌变位置表浅，反复取材方便，易于观察，具有早期诊断和干预的可行性。

组织病理学仍然是诊断口腔癌的金标准，但是反复取材创伤大、患者难以接受，因此就需要寻找一种创伤小、高敏感性和高特异性、可靠、患者易于接受的标志物作为观察指标。近年来，脱落细胞学备受关注，广泛用于宫颈癌的早期诊断、癌前病变的检测、健康查体和防癌普查。同时，因为其取材方便、创伤小、操作简单，脱落细胞学已逐渐被用于口腔癌的早期诊断。

正常人体各种组织的细胞 DNA 含量应当是恒定的，成熟分化的细胞有 23 对染色体，DNA 含量为二倍体；然而异倍体的出现，是恶性肿瘤的早期指征之一。DNA 图像定量分析技术，利用 Feulgen 染色保证了细胞核的着色深浅度与 DNA 含量正相关这一原理，可以检测每个细胞核中 DNA 含量，计算 DNA 指数 (DI, DNA index)，当 $DI=1\pm0.1$ 时为二倍体 (2C)，当 DI 超过 2C 范围时则定义为异倍体，异倍体的出现可以提示口腔癌的早期发生。研究表明用 DNA 图像定量分析技术分析口腔癌患者黏膜脱落细胞中异倍体情况，可以提高口腔癌早期诊断的敏感性和特异性，其敏感性从 94.6%-100.0% 不等，特异性从 92.9%-99.5% 不等，与传统细胞学研究相比有显著提高，从而认为在临床上疑似癌变的组织，可以用这种简单、创伤小的脱落细胞学技术结合 DNA 图像定量分析早期

诊断口腔癌^[3-6]。与此同时口腔黏膜脱落细胞 DNA 含量的变化要早于病理学的异常，提前时间从 1-32 个月不等，为肿瘤的早期诊断提供了可靠的定量细胞学依据^[7]。

DNA 甲基化是表观遗传学的重要组成部分，在维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育以及人类肿瘤发生中起重要作用，是目前新的研究热点之一。尤其是抑癌基因启动子高甲基化，已经被确认为是目前各种临床肿瘤早期基因改变事件。DNA 的甲基化常会使基因的表达降低或使基因沉默，最终导致生物体改变，在肿瘤的发生中起重要作用。DNA 甲基化能关闭某些基因的活性，去甲基化则诱导基因的重新活化和表达^[8-11]，DNA 甲基化在口腔癌的发生发展中起着关键的作用。P16 基因是细胞周期有效调控者，其编码的蛋白可以阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期，从而抑制细胞增殖，是直接抑制肿瘤发生的抑癌基因，其甲基化使该基因失活，不能抑制细胞增殖^[12]。P15 基因所编码的蛋白通过抑制细胞周期素依赖激酶 4/6（CDK4/6）阻止细胞由 G₁ 期进入 S 期，减少细胞的异常增长及变异，其表达受转化生长因子- β （TGF- β ）诱导，也属于抑癌基因^[10]。

本研究将通过对 2011 年 4 月至 2012 年 4 月就诊于首都医科大学附属北京口腔医院的口腔癌和口腔白斑患者进行刷拭活检，并立即或一月内对相同的部位进行切除或切取组织病理学检查，收集的标本进行 DNA 定量、细胞学分析和 P16、P15 基因甲基化分析，以探索脱落细胞学结合 DNA 定量分析和 P16、P15 基因甲基化分析对口腔癌早期诊断的可行性。

材料与方法

1. 研究对象

1.1 实验组

收集从2011年4月至2012年4月就诊于首都医科大学附属北京口腔医院临床诊断为口腔癌的患者43例，口腔白斑59例，共102例。

该102例患者经组织病理学诊断共包括：43例口腔癌/白斑重度异常增生，21例白斑伴上皮中度异常增生，25例白斑伴上皮轻度异常增生，13例白斑不伴异常增生，患者年龄21-85岁不等，平均年龄 60.65 ± 12.11 岁，其中男性54例，占52.94%，女性48例，占47.06%。所有受试者病历资料完整，其中口腔癌样本均为初发肿瘤，未经过放射治疗和化学治疗，患者所签署的知情同意书通过伦理委员会审查（见附录）。

口腔白斑、口腔癌患者纳入标准：

- （1）临床诊断为口腔白斑、口腔癌；
- （2）年龄18-85岁的男性或女性；
- （3）口腔病损组织病理学诊断符合白斑不伴异常增生；白斑伴上皮轻、中、重度异常增生；鳞状细胞癌的诊断标准；
- （4）局部区域内无残根、残冠、锐利牙尖、不良修复体、咬颊唇等刺激；
- （5）未经激光，放射线或化学药物治疗；
- （6）能签署知情同意书。

口腔白斑、口腔癌患者排除标准：

- （1）年龄18岁以下或85岁以上者；
- （2）妊娠或哺乳期妇女；
- （3）有严重心、肺、肝、肾等系统性疾病者；
- （4）其他肿瘤、精神病患者；
- （5）局部区域内有残根、残冠、锐利牙尖、不良修复体、咬颊唇等刺激；

(6) 已经激光, 放射线或化学药物治疗。

1.2 正常对照组

正常对照组 108 例, 年龄 40-60 岁不等, 平均年龄 52.50 ± 6.44 岁, 其中男性 50 例, 占 46.30%, 女性 58 例, 占 53.70%。

正常对照组受试者纳入标准:

- (1) 年龄 18-85 岁的男性或女性;
- (2) 口腔内无口腔白斑、口腔扁平苔藓、口腔红斑等口腔黏膜疾病及口腔鳞状细胞癌;
- (3) 能签署知情同意书者。

正常对照组受试者排除标准:

- (1) 年龄 18 岁以下或 85 岁以上;
- (2) 口腔内有口腔白斑、口腔扁平苔藓、口腔红斑等口腔黏膜疾病;
- (3) 有严重的心、肝、肾、肺、糖尿病等全身系统疾病;
- (4) 其他肿瘤、精神病患者;
- (5) 妊娠和哺乳期妇女。

2. 研究内容、方法

2.1 主要仪器及试剂配制

2.1.1 主要仪器和试剂

BA600 Mot 细胞 DNA 定量分析系统 (麦克奥迪实业集团有限公司, 中国)

Moticam Pro 205c 显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司, 中国)

显微镜 DM2000 (Leica, 德国)

定量 PCR 仪 Mx3005P (STRATAGENE, 美国)

Veriti 梯度 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国)

2000 紫外可见分光光度计 (NanoDrop, 美国)

Eppendorf5430 高速离心机 (Eppendorf, 德国)

TD25-WS 多管架自动平衡离心机（湘仪离心机，中国）
BSA124S 电子天平（Sartorius，德国）
涡旋混匀器 HYQ-3310（Silent Shake，中国）
干式恒温器（北京百晶生物技术有限公司，中国）
电热恒温培养箱 303-1（上海浦东荣丰科学仪器有限公司，中国）
水浴锅 XMTD-6000（长风，中国）
CJJ78-1 磁力加热搅拌器（上海梅香仪器有限公司，中国）
口腔/咽拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒 1 博迈德生物，中国）
Epitect Bisulfite Kit（Qiagen，美国）
Methylamp DNA modification Kit（Epigentek，美国）
P16 探针、引物（TaKaRa Biotechnology，中国）
P15 探针、引物（TaKaRa Biotechnology，中国）
Universal Master Mix（Applied Biosystems，美国）
灭菌去离子水 RNase-Free ddH₂O（TIANGEN，中国）
5N 盐酸（北京益利精细化学品有限公司，中国）
橘黄 G6 染色液（北京益利精细化学品有限公司，中国）
EA36 染色液（北京益利精细化学品有限公司，中国）
苏木素染色液（北京益利精细化学品有限公司，中国）
甲醇（分析纯）（北京益利精细化学品有限公司，中国）
甲醛（分析纯）（北京益利精细化学品有限公司，中国）
乙酸（分析纯）（北京益利精细化学品有限公司，中国）
硫堇（麦克奥迪实业集团有限公司，中国）
偏重亚硫酸钠（麦克奥迪实业集团有限公司，中国）

2.1.2 试剂配制

（1）**Bohm-Sprenger 固定液**（B.S 固定液）（100 ml）：80 ml 甲醇（分析纯），15 ml 甲醛（分析纯），5 ml 乙酸（分析纯），混匀。

(2) **Feulgen 染液** (100 ml): 在棕色广口瓶中加入 0.1 g 硫堇及 0.1 g 偏重亚硫酸钠, 加入 98 ml 蒸馏水及 2 ml 5N 盐酸, 搅拌均匀, 放入 25 ± 2 °C 恒温箱中用磁力搅拌器搅拌 1 h-1.5 h, 过滤, 备用。

2.2 细胞的收集

让患者用清水漱口 30 s 漱掉口内食物残渣, 然后用低温消毒过的特殊定制的 Cervibrush (Cervibrush, 麦克奥迪实业集团有限公司, 中国) 在适当病变部位, 以中等力度, 沿同一方向旋转刷拭 10-15 下。共刷取两份, 一份放入保存液中 (麦克奥迪实业集团有限公司, 中国), 另一份放入 -20 °C 冰箱保存。并制定刷取口腔黏膜脱落细胞的操作步骤 (见附件), 拍摄操作视频。

2.3 制片

处理载玻片, 将 2 ml 粘片剂 (麦克奥迪实业集团有限公司, 中国) 加入到 220 ml 蒸馏水中, 将载玻片浸泡其中 15 min, 取出晾干备用。

将装有保存液和刷头的标本收集管, 在涡旋振荡器上振荡 10 s, 让刷头上的细胞充分震荡到保存液中, 然后将消化后的细胞悬液全部倒入 15 ml 尖底离心管中, 2000 rpm 离心 5 min, 弃上清液后, 用塑料滴管加入适量蒸馏水或细胞分散剂 (麦克奥迪实业集团有限公司, 中国), 然后在涡旋振荡器上震荡约 10 s 混匀, 用塑料滴管滴两滴在载玻片中央, 制片后自然干燥。一共制两张, 一张做 DNA 定量分析, 一张做巴氏染色。

2.4 DNA 定量分析

2.4.1 Feulgen 染色

(1) 将标本放入 B.S 固定液中固定 50 min (温度控制在 25 ± 2 °C), 用蒸馏水漂洗干净;

(2) 放入 5N HCL 中 60 min (温度控制在 25 ± 2 °C), 蒸馏水漂洗;

(3) 放入 Feulgen 染液中 75 min (温度控制在 25 ± 2 °C), 蒸馏水漂洗后, 蒸馏水中放置 10 min;

(4) 75%-95%-100%-100%酒精各 1 min, 无水乙醇-二甲苯 (1:1) 3 min,

二甲苯 I -二甲苯 II 各 3 min, 中性树脂封片。

2.4.2 全自动细胞 DNA 定量分析系统检测

细胞 DNA 的定量检测是通过逐一检测每一个细胞核的积分光密度值实现。显微镜获取每个细胞的光学信号后, 被数码相机转化为模拟电信号, 进而再转换成数字信号, 经计算机处理, 将运算产生的各种参数、储存的图像和数据进一步分析诊断。

阳性判定标准:

(1) 采用 **DI 值即 DNA 指数判定**。DNA 指数 (DNA Index, DI) 系指被测标本细胞的 DNA 积分观密度值 (IOD, integrated optical density) 与该样本正常细胞的 DNA IOD 平均值之比, 当 $DI = (1 \pm 0.1)$ 时为二倍体 (2C), 当 DI 超过 2C 范围时, 定为倍体异常细胞, 即异倍体细胞。按照宫颈癌 DNA 定量分析诊断标准^[13]: 样本中 DI 值大于 2.5 (5C) 的细胞为异倍体细胞, 若出现 3 个及以上异倍体细胞则为阳性。按照加拿大 BC 省肿瘤中心 (BCCA, BC Cancer Agency) 标准: 样本中 DI 值大于 2.3 (4.6C) 的细胞为异倍体细胞, 若出现 5 个及以上异倍体细胞则为阳性。

(2) **10% 的异常增生细胞**。异常增生细胞比例是指倍体异常细胞数和正常增殖、疑似癌变细胞数总和与全部细胞数的比值, 大于 10% 为阳性。

(3) **异倍体峰**。诊断标准为: ①异倍体 G_1/G_0 峰应当在 $1.05 < DI < 1.9$ 或 $2.1 < DI < 3.8$ 范围内; ②异倍体 G_1/G_0 峰必须在 DI 直方图中可见, 也就是要有 50 个以上的细胞; ③异倍体 G_1/G_0 峰相对比较窄 (通常 $CV \leq 10\%$); ④异倍体 G_1/G_0 峰顶和谷底的比值最少应是 3; ⑤散点图上, 通常异倍体 G_1/G_0 峰处是一些密集点形成的一群细胞, 和正常细胞分开。

2.5 巴氏染色

将另一张玻片进行巴氏染色。

步骤:

(1) 玻片入蒸馏水;

- (2) 苏木素染色 4-6 min, 水洗;
- (3) 1%盐酸酒精适当分化, 水洗;
- (4) 1%氢氧化铵反蓝, 水洗;
- (5) 95%乙醇处理 1 min;
- (6) 橘黄 G6 染色 5 min;
- (7) 95%乙醇 I、II 各处理 20 s;
- (8) EA50 染液 8 min;
- (9) 95%乙醇 I、II 各处理 20 s;
- (10) 100%乙醇 I、II 各处理 20 s;
- (11) 二甲苯透明;
- (12) 中性树脂封片。

巴氏染色玻片由首都医科大学附属北京口腔医院病理科专家读片, 对巴氏染色玻片进行分析。从细胞核的大小、异型性、染色深浅, 核浆比例, 炎症程度对每例样本进行分析。

2.6 P15、P16 基因甲基化分析

将刷取的口腔黏膜脱落细胞的另一份样本用口腔/咽拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒 (博迈德生物, 中国) 提取脱落细胞 DNA, 所提取的 DNA 浓度从 0.0028 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -0.3408 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 不等, 平均 0.0647 $\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0.0562 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; DNA 含量从 0.076 μg -6.816 μg 不等, 平均 1.303 $\mu\text{g} \pm 1.118 \mu\text{g}$ 。然后将部分所提取的 DNA 经 Epitect Bisulfite Kit (Qiagen, 美国) 和 Methylamp DNA modification Kit (Epigentek, 美国) 试剂盒重亚硫酸盐处理修饰后, 用定量 PCR 仪 Mx3005P (STRATAGENE, 德国) 进行 P16 和 P15 基因荧光定量特异性甲基化聚合酶链式反应 (MSP, Methylation Specific Polymerase Chain Reaction) 检测 P16、P15 基因甲基化情况。荧光探针和寡核苷酸引物由 TaKaRa Biotechnology 公司合成。

重亚硫酸盐处理: (Methylamp DNA modification kit, 美国)

- (1) 在 1.5 ml 离心管中加入 DNA 样本 (含 500 ngDNA) 和去离子水共 24 μl ,

加入 1 μ lR1 (DNA 变性剂), 混匀后 37 $^{\circ}$ C 放置 10 min;

(2) 取 1.1 mlR3 (DNA 修饰液) 加入一瓶 R2 (DNA 修饰粉末) 中, 混匀至无沉淀, 再加入 40 μ lR1 (DNA 变性剂), 混匀;

(3) 将 125 μ l 步骤 (2) 中液体加入样本中, 65 $^{\circ}$ C 放置 180 min;

(4) 取 300 μ lR4 (修饰后 DNA 沉淀剂) 加入样本中, 混匀, 将样本转移至离心管柱中, 12000 rpm 离心 3 min, 弃去离心后液体;

(5) 加入 200 μ lR5 (修饰后 DNA 冲洗剂), 12000 rpm 离心 3 min;

(6) 取 10 μ lR1 (DNA 变性剂) 加入到 1.1 ml90%乙醇中, 混匀, 去 50 μ l 此液体加入离心管柱中, 室温放置 10 min 后, 12000 rpm 离心 3 min;

(7) 取 200 μ l 90%乙醇加入到离心管柱中 12000rpm 离心 5 min, 弃去离心后液体, 重复此步骤 1 次;

(8) 将离心管柱放入新的 1.5ml 离心管中, 在离心管柱的过滤膜上加入 18 μ lR6 (修饰后 DNA 洗脱剂), 室温放置 5 min, 12000rpm 离心 5 min。

P16 基因:

上游引物序列: 5' -TCTAACAATTATAAACTCCAACCACCAA-3';

下游引物序列: 5' -GGGAAGATGGGATAGAAGGGAATAT-3';

探针: 5' - (FAM) CCTTCATTCTAACCCAATACCTATCCCACC TCTA AA
(TAMRA) -3'

P15 基因:

上游引物序列: 5' -GAGGGTAATGAAGTTGAGTTTAGGTTTT-3';

下游引物序列: 5' -CGAATAATCCACCGTTAACCGTAA-3';

探针为: 5' - (FAM) AGCGTGGGAAAGAAGGGAAGAGTGTCG (TAMRA) -3'。

PCR 反应体系包括:

2 \times Master Mix	10 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	4 μ l
DNA 模板	3 μ l

目的基因上游引物	1 μ l
目的基因下游引物	1 μ l
目的基因探针	1 μ l
共计	20 μ l

反应条件: 95℃ 15 min

95 °C 15 s	}	45 个循环
60 °C 60 s		

2.6 组织病理学检查

对受试者刷取口腔黏膜脱落细胞的同一病变部位,刷取后立即或一个月内进行组织病理学检查,由北京口腔医院病理科经验丰富的病理专家双盲法对组织切片进行病理诊断。

口腔白斑病理诊断^[14]: ①白斑主要病理表现为上皮增生,伴有过度正角化或过度不全角化;粒层明显,棘层增厚;上皮钉突伸长变粗,固有层和黏膜下层中有炎症细胞浸润。②上皮异常增生参照 2008 年 WHO (world health organization, 世界卫生组织) 对上皮的 12 项异常改变判定标准进行诊断,12 条判定标准为:基底细胞极性改变;基底细胞复层样改变;核浆比例增加;水滴状钉突;上皮分层紊乱;核分裂相增加及出现异常核分裂相,有丝分裂水平增加(上皮 1/2 出现有丝分裂);细胞多形性;核浓染;核仁增大;细胞间附着减弱或消失;错角化。③轻度异常增生的组织紊乱一般局限于上皮 1/3,细胞的非典型性轻微。④中度异常增生的组织结构紊乱延伸至上皮中 1/3,然而,细胞的非典型性的程度高时可考虑升高异常增生级别。⑤重度异常增生的组织紊乱超过上皮的 2/3,合并细胞非典型性变化,然而结构紊乱到中 1/3 处,合并有足够的细胞非典型性时,可将中度异常增生提高到重度异常增生。

鳞状细胞癌(WHO, 2005) 根据肿瘤的恶性程度、细胞和细胞核的多形性以及细胞分裂活性分为高、中、低分化。

鳞状细胞癌(WHO, 2005) 根据原发病灶 (T, Primary Tumour)、局部淋

巴结转移(N, Regional lymph nodes)、远处转移(M, Distant metasis)将其进行TNM分期^[15]。

3. 统计学分析

数据用 SPSS 18.0 进行统计分析, 分析 ROC 曲线。

组织病理诊断为金标准, 将细胞学结果与其比较, 得出^[16]:

(1) **敏感性**: 组织病理学和细胞学诊断均为阳性例数占有组织学诊断阳性例数的百分比。

(2) **特异性**: 组织病理学和细胞学诊断均为阴性例数占有组织学诊断阴性例数的百分比。

(3) **假阳性**: 组织病理学诊断为阴性但细胞学诊断为阳性的病例。

(4) **假阴性**: 组织病理学诊断为阳性但细胞学诊断为阴性的病例。

(5) **阳性预测值**: 真阳性人数占细胞学诊断呈阳性的人数的百分比。

(6) **阴性预测值**: 真阴性人数占 DNA 定量分析结果呈阴性人数的百分比。

(7) **约登指数**: 灵敏度与特异度之和减去 1。表示筛检方法发现真正患者与非患者的总能力, 指数越大说明筛查实验的效果越好, 真实性越大。

结 果

1. 正常对照组 DNA 定量分析结果

本实验共收集 108 例正常对照组受试者, 其中男性 50 例, 女性 58 例。刷取部位包括: 唇部 24 例, 颊部 30 例, 腭部 10 例, 舌部 24 例, 牙龈 20 例。样本经过制片, Feulgen 染色, 最后 DNA 定量分析。108 例样本均检测正常, 检测参数未见异常, 均未见倍体异常细胞。各组细胞百分比为: 正常细胞 $85.23 \pm 11.41\%$, 粒细胞 $13.92 \pm 10.76\%$, 淋巴细胞 $0.66 \pm 1.05\%$, 增殖细胞 $0.20 \pm 0.37\%$, 倍体异常细胞 $0.00 \pm 0.00\%$ 。各组细胞 DI 值为: 正常细胞 0.957 ± 0.026 , 粒细胞 0.928 ± 0.033 , 淋巴细胞 0.843 ± 0.063 , 增殖细胞 1.554 ± 0.286 , 倍体异常细胞

0.000±0.000。(见表 1)

表 1. 正常对照组 DNA 定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

分组	百分比 (%)	DI 值
正常细胞	85.23±11.41	0.957±0.026
粒细胞	13.92±10.76	0.928±0.033
淋巴细胞	0.66±1.05	0.843±0.063
增殖细胞	0.20±0.37	1.554±0.286
倍体异常细胞	0.00±0.00	0.000±0.000

2. 实验组临床数据

本研究共收集 102 位受试者, 其中男性 54 例, 女性 48 例。平均年龄为 60.65±12.11 岁。102 位受试者临床诊断包括口腔癌 43 例、口腔白斑 59 例。经病理诊断包括: 口腔癌/重度异常增生 43 例、口腔白斑伴上皮中度异常增生 21 例、口腔白斑伴上皮轻度异常增生 25 例、口腔白斑不伴异常增生 13 例。

43 例口腔癌/重度异常增生患者中, 包括男性 23 例, 占 53.49%, 女性 20 例, 占 46.51%, 平均年龄 61.35±12.12 岁; 根据病损部位分为: 颊部 5 例 (11.63%), 舌部 23 例 (53.49%), 牙龈 14 例 (32.56%), 口底 1 例 (2.33%); 根据是否伴有淋巴结转移分为: 伴淋巴结转移 5 例 (11.63%), 不伴有淋巴结转移 38 例 (88.37%); 根据 TNM 分期分为: 0 期 6 例 (13.95%), I 期 11 例 (25.58%), II 期 16 例 (37.21%), III 期 6 例 (13.95%), IV 期 4 例 (9.31%)。

59 例口腔白斑患者中, 包括男性 31 例, 占 52.54%, 女性 28 例, 占 47.46%, 平均年龄 60.13±12.17 岁; 根据病损部位分为: 颊部 18 例 (30.51%), 舌部 12 例 (20.34%), 牙龈 27 例 (45.76%), 腭部 2 例 (3.39%); 根据病理分型分为: 白斑不伴异常增生 13 例 (22.03%), 轻度异常增生 25 例 (42.37%), 中度异常增生 21 例 (33.59%); 根据临床分型分为: 均质型 48 例 (81.36%), 非均质型 11 例 (18.64%)。

3. DNA 定量分析阳性标准选择

国际宫颈癌 DNA 定量分析阳性判定标准:①DI 值大于 2.5 为倍体异常细胞, 该细胞数大于或等于 3 个为阳性; ②出现异倍体峰为阳性; ③异常增生细胞数百分比大于或等于 10%为阳性。三者只要满足一条即为阳性。按照此标准对 102 例口腔癌、口腔白斑受试者, 及 108 例正常对照组人群进行统计学分析, SPSS 18.0 统计软件分析 ROC 曲线 (见图 1), 其曲线下面积为 0.994, $p=0.000<0.01$ 。

加拿大 BC 省肿瘤中心 (BCCA, BC Cancer Agency) DNA 定量分析阳性诊断标准:①DI 值大于 2.3 为倍体异常细胞, 该细胞数大于或等于 5 个为阳性; ②出现异倍体峰为阳性; ③异常增生细胞数百分比大于或等于 10%为阳性。三者只要满足一条即为阳性。按照此标准同样分析 102 例口腔癌、口腔白斑受试者, 及 108 例正常对照组人群进行统计学分析, SPSS 18.0 统计软件分析 ROC 曲线 (见图 1), 其曲线下面积为 0.996, $p=0.000<0.01$ 。

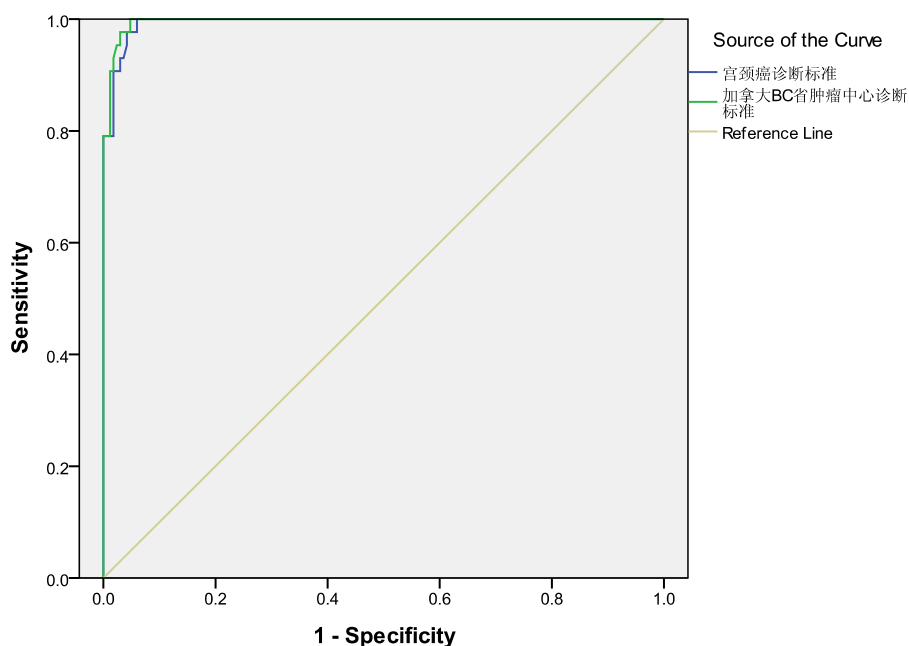


图 1. ROC 曲线

将上述两种诊断标准 ROC 曲线下面积 A 相比较得出: $A_{2.5}=0.994$, $A_{2.3}=0.996$, 两者比较 $P=0.56>0.05$, 两种诊断标准没有显著差异。

将两种诊断标准的约登指数比较得出, 宫颈癌诊断标准约登指数为 0.9066,

而加拿大 BC 省肿瘤中心的诊断标准约登指数为 0.9385, 可见后者的真实性、发现真正患者与非患者的总能力好于前者。

综上所述, 本实验选用加拿大 BC 省肿瘤中心的诊断标准, 即①DI 值大于 2.3 为倍体异常细胞, 该细胞数大于或等于 5 个为阳性; ②出现异倍体峰为阳性; ③异常增生细胞数百分比大于或等于 10%为阳性。三者满足其一即为阳性。

4. 各组细胞百分比比较

对口腔癌/口腔白斑重度异常增生 43 例、口腔白斑 59 例、正常对照组 108 例的各组细胞(正常细胞、粒细胞、淋巴细胞、增殖细胞、倍体异常细胞)所占细胞总数百分比进行统计学分析。三组平均细胞总数分别为 53184.91 ± 37752.73 、 25094.59 ± 28788.61 、 73638.25 ± 42307.28 , 细胞总数均大于 8000 (满意标本标准: 传统制片细胞数量为 8000~12000 个, 液基制片细胞数量为 5000~20000 个^[17]), 该细胞数量足以满足本实验获得有诊断意义的细胞, 且口腔白斑组较其余两组明显降低, 具有统计学差异(秩和检验, $\alpha=0.017$, $P=0.000<0.017$), 但口腔癌组与正常对照组之间无显著性差异。

对正常细胞、粒细胞、淋巴细胞、增殖细胞、倍体异常细胞占细胞总数百分比进行统计学分析(见表 2; 图 2)。统计表明: ①正常细胞百分比: 从口腔癌/重度异常增生组到口腔白斑组, 到正常对照组, 其正常细胞百分比逐渐降低, 具有显著统计学差异; ②粒细胞、淋巴细胞、增殖细胞、倍体异常细胞百分比: 从口腔癌/重度异常增生组到口腔白斑组, 到正常对照组, 其粒细胞、淋巴细胞、增殖细胞、倍体异常细胞百分比逐渐降低, 且各组之间具有显著统计学差异。可见, 随着病理分级严重程度的降低, 其正常细胞百分比逐渐增高, 而炎症程度、增殖程度、倍体异常细胞百分比则逐渐降低。

表 2. 各组细胞百分数比较(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	例数	正常细胞	粒细胞	淋巴细胞	增殖细胞	倍体异常细胞
口腔癌	43	45.34±25.50 ^a	45.72±26.17 ^a	4.23±3.49 ^a	4.67±3.85 ^a	0.20±0.39 ^a
口腔白斑	59	67.94±18.75 ^a	29.76±18.46 ^a	1.94±1.88 ^a	0.63±2.34 ^a	0.00±0.99 ^a
正常对照组	108	84.40±11.42 ^a	14.30±10.81 ^a	0.66±1.01 ^a	0.20±0.36 ^a	0.00±0.00 ^a

a 组间比较, 秩和检验, $\alpha = 0.017$, $P = 0.000 < 0.017$

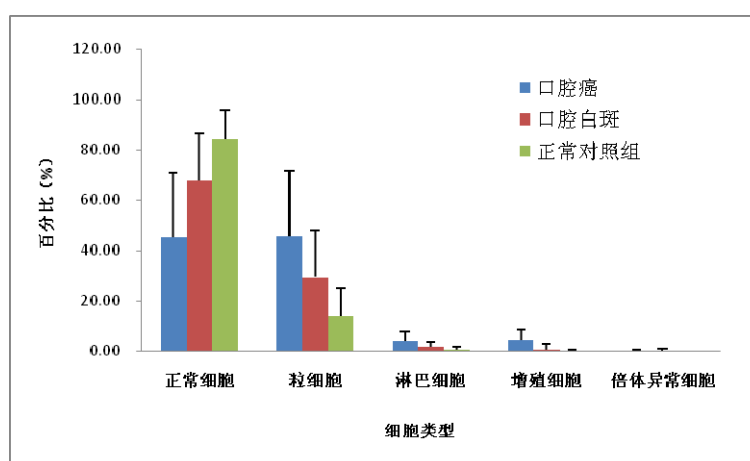


图 2. 各组细胞百分数比较

5. 各组增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值比较

DI 值即 DNA 指数 (DNA Index, DI), 系指被测标本细胞的 DNA 积分观密度值 (IOD, integrated optical density) 与该样本正常细胞的 DNA IOD 平均值之比。将口腔癌/重度异常增生、口腔白斑、正常对照组增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值进行比较 (见表 3; 图 3), 统计表明: ①增殖细胞: 口腔癌/重度异常增生组增殖细胞 DI 值显著高于其余两组, 且具有显著统计学差异; 但是口腔白斑组与正常对照组之间无统计学差异; ②倍体异常细胞: 从口腔癌/重度异常增生组到口腔白斑组, 到正常对照组其倍体异常细胞 DI 值逐渐增高, 且各组之间具有显著统计学差异。

表 3. 各组细胞 DI 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	增殖细胞 DI 值	倍体异常细胞 DI 值
口腔癌	43	1.733±0.318 ^{ab}	3.162±0.407 ^c
口腔白斑	59	1.569±0.408 ^a	0.770±1.488 ^c
正常对照	108	1.568±0.282 ^b	0.000±0.000 ^c

单因素方差分析, aP=0.032<0.05; bP=0.007<0.05; cP=0.000<0.05

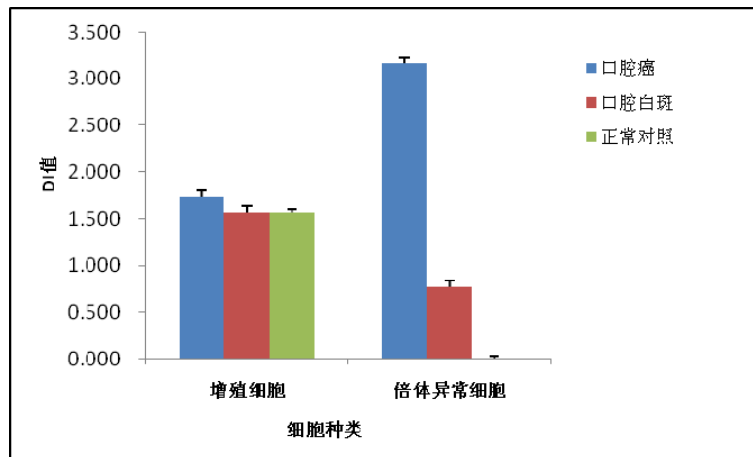


图 3. 各组细胞 DI 值比较

6. 白斑病理分型各组细胞百分数比较

共收集 59 例口腔白斑受试者, 其中白斑伴上皮中度异常增生 21 例, 白斑不伴异常增生和伴上皮轻度异常增生 38 例。对其正常细胞、粒细胞、淋巴细胞、增殖细胞、倍体异常细胞占细胞总数百分比进行统计学分析 (见表 4; 图 4)。统计表明: ①正常细胞百分比: 白斑伴中度异常增生组、白斑/轻度异常增生组其正常细胞占细胞总数百分比均显著高于口腔癌/重度异常增生组, 但此两组之间无统计学差异; ②增殖细胞、淋巴细胞、增殖细胞、倍体异常细胞百分比: 从正常对照组至白斑/轻度异常增生, 再到白斑伴上皮中度异常增生, 最后到口腔癌/重度异常增生, 其上述四组细胞百分比逐渐升高, 各组均与口腔癌/重度异常增生之间有显著统计学意义 (秩和检验, $\alpha=0.008$, $P=0.000<\alpha$), 但是各组之间无显著统计学意义。

表 4. 白斑病理分型各组细胞百分数比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	例数	正常细胞	粒细胞	淋巴细胞	增殖细胞	倍体异常细胞
口腔癌/重度	43	45.34±25.50 ^{ab}	45.72±26.17	4.23±3.49	4.67±3.85	0.11±0.23
中度	21	69.52±15.33 ^a	27.61±14.90	1.65±1.32	1.23±3.85	0.00±0.01
白斑/轻度	38	69.17±17.33 ^b	28.90±17.00	2.05±2.14	0.30±0.56	0.00±0.00
正常对照组	108	84.84±11.41	14.30±10.81	0.66±1.01	0.20±0.36	0.00±0.00

a 秩和检验, $\alpha=0.008$, $P<\alpha$

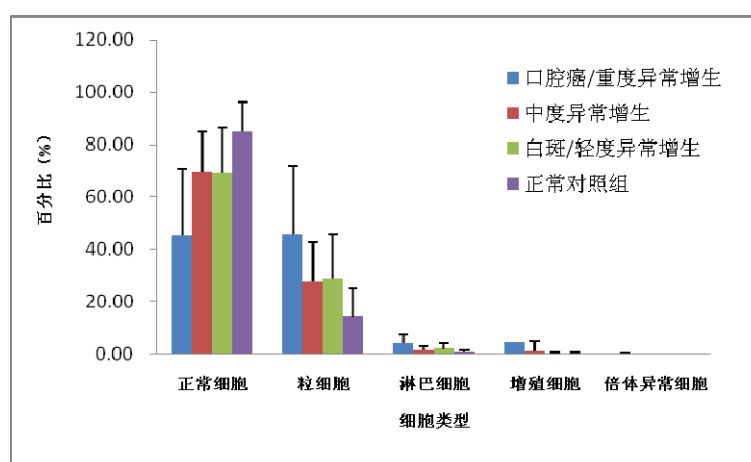


图 4. 白斑病理分型各组细胞百分数比较

7. 白斑病理分型增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值比较

对 21 例白斑伴上皮中度异常增生、38 例白斑/轻度异常增生, 共计 59 例受试者脱落细胞样本中的增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值进行统计学分析 (见表 5; 图 5)。统计表明: ①增殖细胞: 中度异常增生组增殖细胞 DI 值较正常对照组升高, 具有统计学意义, 但与口腔癌/重度异常增生组之间无统计学差异; 白斑/轻度异常增生组增殖细胞 DI 值较口腔癌/重度异常增生组显著降低, 但无明显统计学意义。②倍体异常细胞: 从口腔癌/重度异常增生到白斑伴上皮中度异常增生, 再到白斑/轻度异常增生, 最后到正常对照组, 其倍体异常细胞 DI 值逐渐降低, 且各组之间具有显著统计学差异。

表 5. 白斑各病理分型增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	增殖细胞 DI 值	倍体异常细胞 DI 值
口腔癌/重度异常增生	43	1.733±0.318	3.163±0.407 ^a
白斑中度异常增生	21	1.701±0.179 ^b	1.087±1.794 ^a
白斑/轻度异常增生	38	1.497±0.478	0.595±1.282 ^a
正常对照组	108	1.568±0.282 ^b	0.000±0.000 ^a

a 秩和检验, $\alpha=0.008$, $P=0.000<0.008$; b 秩和检验, $\alpha=0.008$, $P=0.009<0.008$

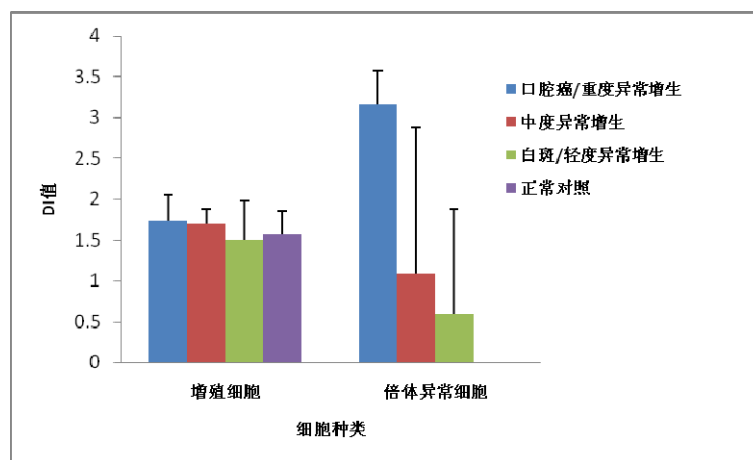


图 5. 白斑各病理分型增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值比较

8. 白斑临床分型 DNA 定量分析结果

临床上将口腔白斑分为均质型和非均质型, 均质型包括斑块型和皱纹纸型, 非均质型包括溃疡型、疣状型和颗粒性。本实验共收集 68 例口腔白斑受试者(包括恶变病例), 其中 48 例临床分型为均质型, 占 70.59%, 20 例为非均质型, 占 29.41%。48 例非均质型口腔白斑受试者无一人恶变, 20 例非均质型口腔白斑受试者有 9 人恶变, 占 45.00%。将均质型和非均质型口腔白斑 DNA 定量分析结果相比较(见表 6-表 8; 图 6-图 8), 并进行统计学分析。

由表 6 可见非均质型白斑其组织病理学恶变例数显著高于均质型, 同时 DNA 定量分析阳性例数也显著高于均质型。

由表 7、表 8 可见增殖细胞百分比、DI 值, 倍体异常细胞千分比、DI 值均

为均质型白斑低于非均质型，除增生细胞 DI 值以外，其余两者之间均有显著统计学差异。

表 6. 均质型、非均质型白斑恶变例数、DNA 定量分析阳性例数比较

分组	例数	病理学恶变例数	DNA 定量分析阳性例数
均质型	48 (70.59%)	0 (0.00%)	2 (4.17%)
非均质型	20 (29.41%)	9 (45.00%)	10 (50.00%)

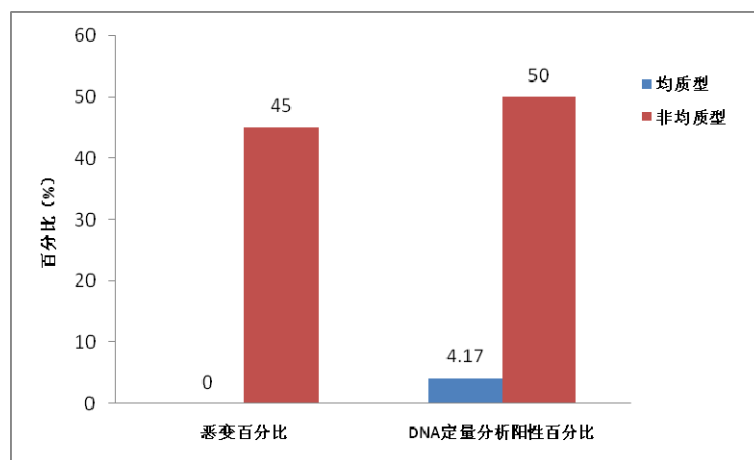


图 6. 均质型、非均质型白斑恶变例数、DNA 定量分析阳性例数比较

表 7. 均质型、非均质型白斑增殖细胞、倍体异常细胞百分数分析 ($\bar{x} \pm s$)

分组	增殖细胞百分比 (%)	倍体异常细胞千分比 (%)
均质型	0.65 ± 2.56^a	0.01 ± 0.04^b
非均质型	4.10 ± 6.60^a	0.40 ± 0.00^b

a 秩和检验, $\alpha = 0.05$, $P = 0.010 < 0.05$

b 秩和检验, $\alpha = 0.05$, $P = 0.000 < 0.05$

表 8. 均质型、非均质型白斑增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	增殖细胞 DI 值	倍体异常细胞 DI 值
均质型	1.545 ± 0.441	1.368 ± 0.212^a

非均质型	1.670 ± 0.171	2.170 ± 1.517^a
------	-------------------	---------------------

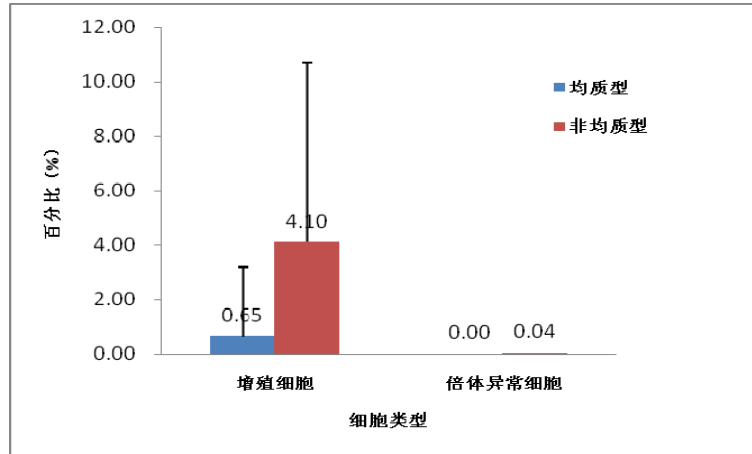
a 单因素方差分析 $P=0.000 < 0.01$ 

图 7. 均质型、非均质型白斑增殖细胞、倍体异常细胞百分比比较

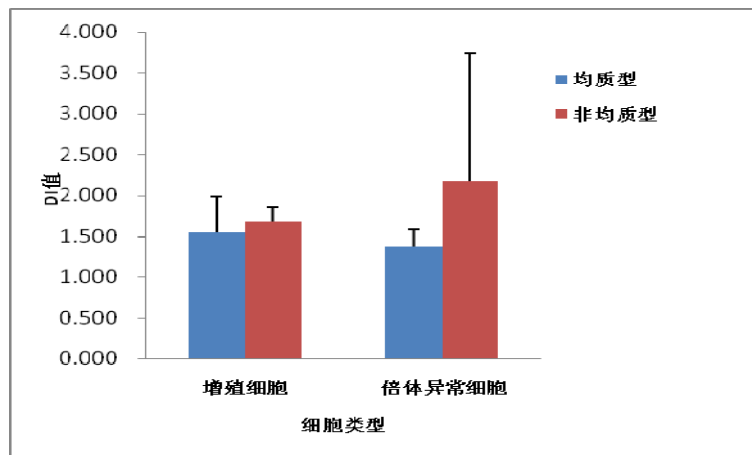


图 8. 均质型、非均质型白斑增殖细胞、倍体异常细胞 DI 值比较

9. 口腔癌伴或不伴淋巴结转移 DNA 定量分析结果

本实验共收集 43 例口腔癌/重度异常增生受试者，其中伴有淋巴结转移 5 例，占 11.63%；不伴有淋巴结转移 38 例，占 88.37%。将该 43 例样本 DNA 定量分析结果进行统计学分析（见表 9、表 10；图 9、图 10），结果可见：①口腔癌伴淋巴结转移的病例其增生细胞的 DI 值要显著高于不伴有淋巴结转移的病例，且具有统计学意义；②口腔癌伴淋巴结转移组增生细胞百分比要高于不伴有淋巴结转移组，但无显著统计学差异，考虑可能因为伴淋巴结转移组的病例数较少，需进一步扩大样本数量；③两组倍体异常细胞百分比、倍体异常细胞

DI 值之间无明显统计学差别。

表 9. 伴或不伴淋巴结转移的口腔癌/重度异常增生组细胞百分数比较(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	增殖细胞百分比	倍体异常细胞百分比
伴淋巴结转移	8.23±9.38	0.09±0.06
不伴淋巴结转移	3.72±5.87	0.12±0.24

表 10. 伴或不伴淋巴结转移的口腔癌/重度异常增生组细胞 DI 值比较($\bar{x} \pm s$)

分组	增殖细胞 DI 值	倍体异常细胞 DI 值
伴淋巴结转移	2.086±0.698 ^a	2.855±0.557
不伴淋巴结转移	1.687±0.157 ^a	3.386±1.571

^a 秩和检验, $\alpha=0.05$, $P=0.049 < \alpha$

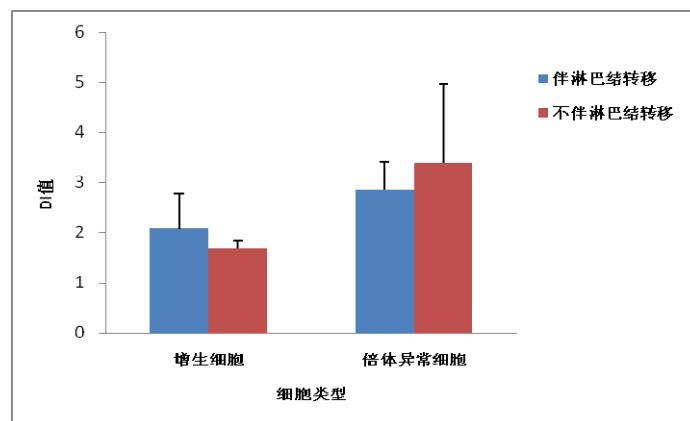


图 10. 伴或不伴淋巴结转移的口腔癌/重度异常增生组细胞 DI 值比较

10. 口腔癌 TNM 分期 DNA 定量分析结果

43 例口腔癌/重度异常增生按 WHO2005 年标准^[15]进行 TNM 分期。TNM 分期等级越高病变严重程度越重。本实验共收集 0 期 6 例 (13.95%), I 期 11 例 (25.58%), II 期 16 例 (37.21%), III 和 IV 期 10 例 (23.25%)。

对 43 例样本的粒细胞、增殖细胞百分比、倍体异常细胞百分比进行统计学分析 (见表 11; 图 11)。分析结果: ①粒细胞百分比: 随着 TNM 分期等级的增加, 粒细胞百分总体呈上升趋势, 除 0 期外各组均较正常对照组显著增加, 具

有显著统计学差异，可见 0 期口腔癌炎症程度最轻，与正常对照组最接近；②增殖细胞百分比：0 期、I 期、II 期、III/IV 期各组增殖细胞百分比均较正常对照组显著升高（秩和检验， $\alpha=0.005$ ， $P=0.000<\alpha$ ），具有统计学意义，且呈递增趋势，但组间不具有显著统计学差异；③倍体异常细胞百分比：各期倍体异常细胞百分比均较正常对照组显著增加（秩和检验， $\alpha=0.005$ ， $P=0.000<\alpha$ ），具有统计学意义，但各组之间无明显差异。综上所述，随着病变严重程度的增加，炎症程度、增殖细胞呈上升趋势。

表 11. 口腔癌 TNM 分期 DNA 定量分析结果比较(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	粒细胞	增殖细胞	倍体异常细胞
III/IV 期	61.47 \pm 30.73 ^a	6.50 \pm 8.39	0.08 \pm 0.05
II 期	50.07 \pm 24.76 ^b	4.33 \pm 7.08	0.19 \pm 0.36
I 期	52.99 \pm 26.28 ^c	3.37 \pm 4.49	0.08 \pm 0.11
0 期	25.60 \pm 21.72	2.02 \pm 2.65	0.06 \pm 0.06
正常对照	14.30 \pm 10.81 ^{abc}	0.20 \pm 0.36	0.00 \pm 0.00

a、b、c 秩和检验， $\alpha=0.005$ ， $P=0.000<0.005$

11. DNA 定量分析方法与组织病理学一致性分析

本实验共收集 102 例口腔癌、口腔白斑受试者，108 例正常对照组受试者。该 108 例正常对照组受试者观察半年，均未出现口腔白斑、口腔癌等口腔黏膜

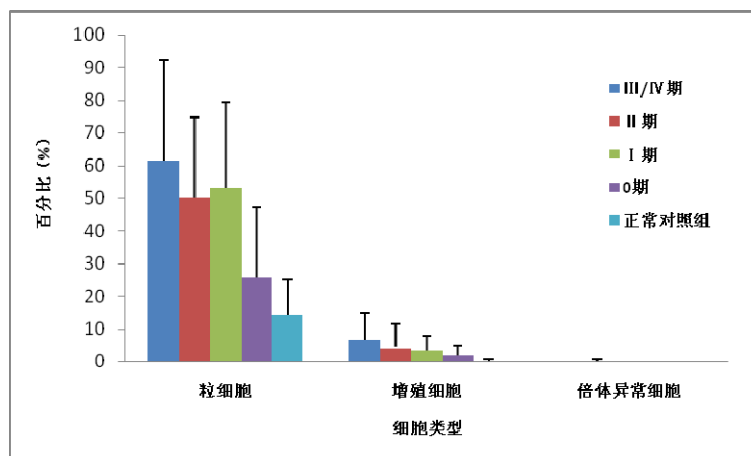


图 11. 口腔癌 TNM 分期各组细胞百分比比较

疾病。将 210 例样本进行 DNA 定量分析, 将其结果与组织病理学结果进行比较, 病理学诊断为口腔癌及重度异常增生的样本为阳性, 其余为阴性结果。结果: 43 例口腔癌/重度异常增生患者中有 41 例 DNA 定量分析检测结果为阳性(见图 12), 21 例口腔白斑伴上皮中度异常增生患者有 2 例为阳性(见图 13), 25 例口腔白斑伴上皮轻度异常增生患者中有 1 例为阳性(见图 14), 13 例口腔白斑不伴异常增生均为阴性(见图 15), 108 例正常对照组受试者 DNA 定量分析结果均为阴性(见图 16)。结论: ①用 DNA 定量分析方法分析口腔癌/重度异常增生病例, 出现 2 例假阴性病例, 其敏感性为 95.35%; ②用该方法分析口腔白斑、正常校正组病例出现 3 例假阳性病例, 其特异性为 98.20%; ③阳性预测值为 93.18%, 阴性预测值是 98.80%。

12. 巴氏染色细胞学分析

经首都医科大学附属北京口腔医院病理科专家读片, 总结得出:

口腔癌/重度异常增生上皮细胞形态特征:

- (1) 细胞单个散在, 圆形, 核深染, 核增大, 核浆比明显增大(见图 17a);
- (2) 细胞单个散在形态不规则, 出现异型性, 即可见到怪异状细胞, 如蝌蚪状; 核深染, 细胞核增大, 核浆比明显增大(见图 17b);
- (3) 细胞片状排列, 核深染, 细胞核增大, 大小不一, 排列紊乱, 部分可见到核仁, 核浆比明显增大(见图 17c);
- (4) 裸核肿瘤细胞, 结构清楚(见图 17d);

口腔癌/重度异常增生样本背景污秽, 可见较多坏死组织碎屑和炎症细胞。

口腔白斑上皮中度异常增生上皮细胞形态特征: 细胞核增大, 大小不一, 排列不规则, 核浆比例稍增大; 背景可见炎症细胞(见图 17e)。

口腔白斑上皮轻度异常增生上皮细胞形态特征: 细胞核部分呈棒状、不规

则型，部分细胞核极性消失，但分布较均匀，核浆比例正常；背景少见炎症细胞（见图 17f）。

口腔白斑不伴有异常增生上皮细胞形态与正常口腔黏膜上皮细胞形态类似（见图 17g）。

正常口腔黏膜上皮细胞的形态特征：底层细胞体积较小，核较大，染深蓝色，胞核圆形或椭圆形，居中，核浆比例约为 1：3；中间层细胞细胞呈多角形，细胞质丰富，浅蓝色或橘红色，胞核居中，呈圆形，核与细胞质比例为 1：5；表层细胞细胞质多为淡红色；背景少见炎症细胞（见图 17h）。

13.P16、P15 甲基化分析结果

对 102 例受试者中的 60 例进行 P16、P15 基因甲基化分析，其中包括 16 例口腔癌及重度异常增生，19 例白斑伴上皮中度异常增生，14 例白斑伴上皮轻度异常增生，11 例白斑不伴异常增生；同时包括 8 例正常对照。口腔癌/重度异常增生 P16、P15 甲基化阳性例数分别为 14 例、6 例；白斑伴上皮中度异常增生组为 17 例、11 例；白斑伴上皮轻度异常增生组为 12 例、4 例；白斑不伴异常增生组为 7 例、1 例；正常对照组均为阴性（见表 12；图 18）。可见随着口腔白斑组织病理学严重程度的增加，其 P16 基因、P15 基因甲基化的阳性率逐渐增高，且接近于口腔癌/重度异常增生组。

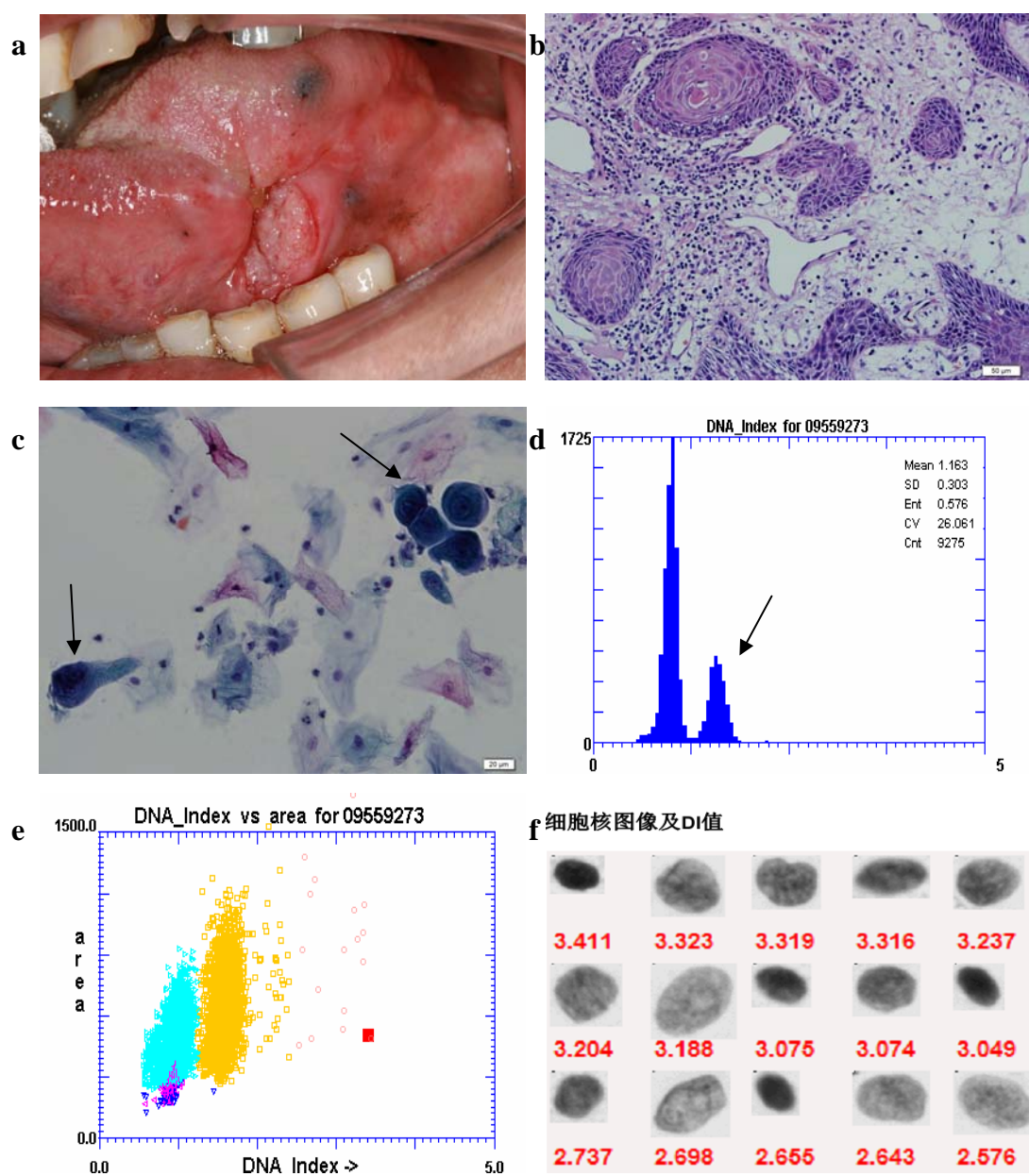


图 12. 口腔癌: a. 左舌癌; b. HE 染色 ($\times 200$); c. 巴氏染色 ($\times 400$), 可见肿瘤细胞 (箭头所指); d. DNA 定量分析柱状图, 可见异倍体峰 (箭头所指); e. DNA 定量分析散点图, 可见大量增殖细胞 (箭头所指); f. DNA 定量分析核图像, 可见大量倍体异常细胞。

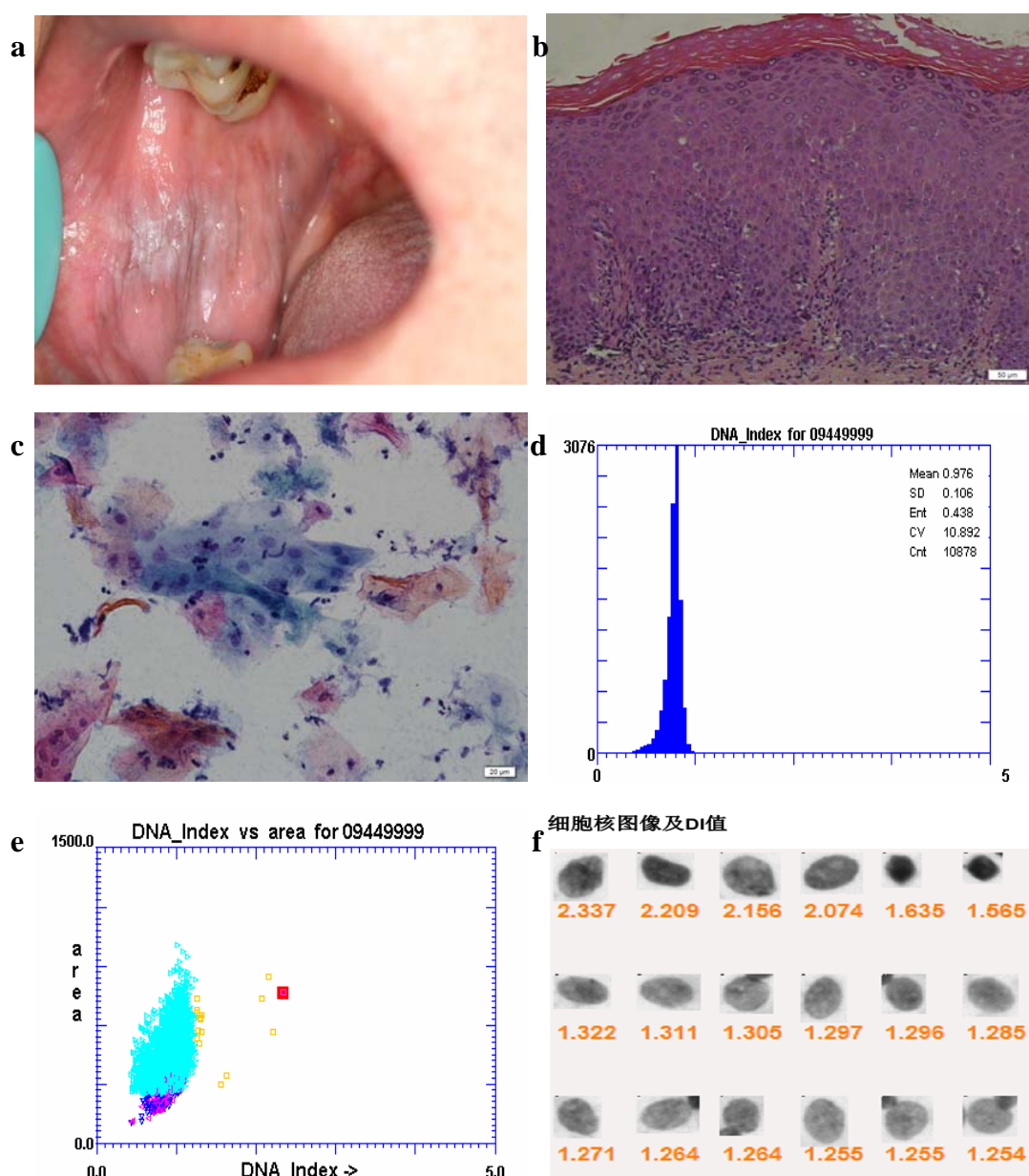


图 13. 口腔白斑伴上皮中度异常增生：a. 右颊白斑；b. HE 染色（ $\times 200$ ）；c. 巴氏染色（ $\times 400$ ）；d. DNA 定量分析柱状图；e. DNA 定量分析散点图；f. DNA 定量分析核图像，可见少量倍体异常细胞。

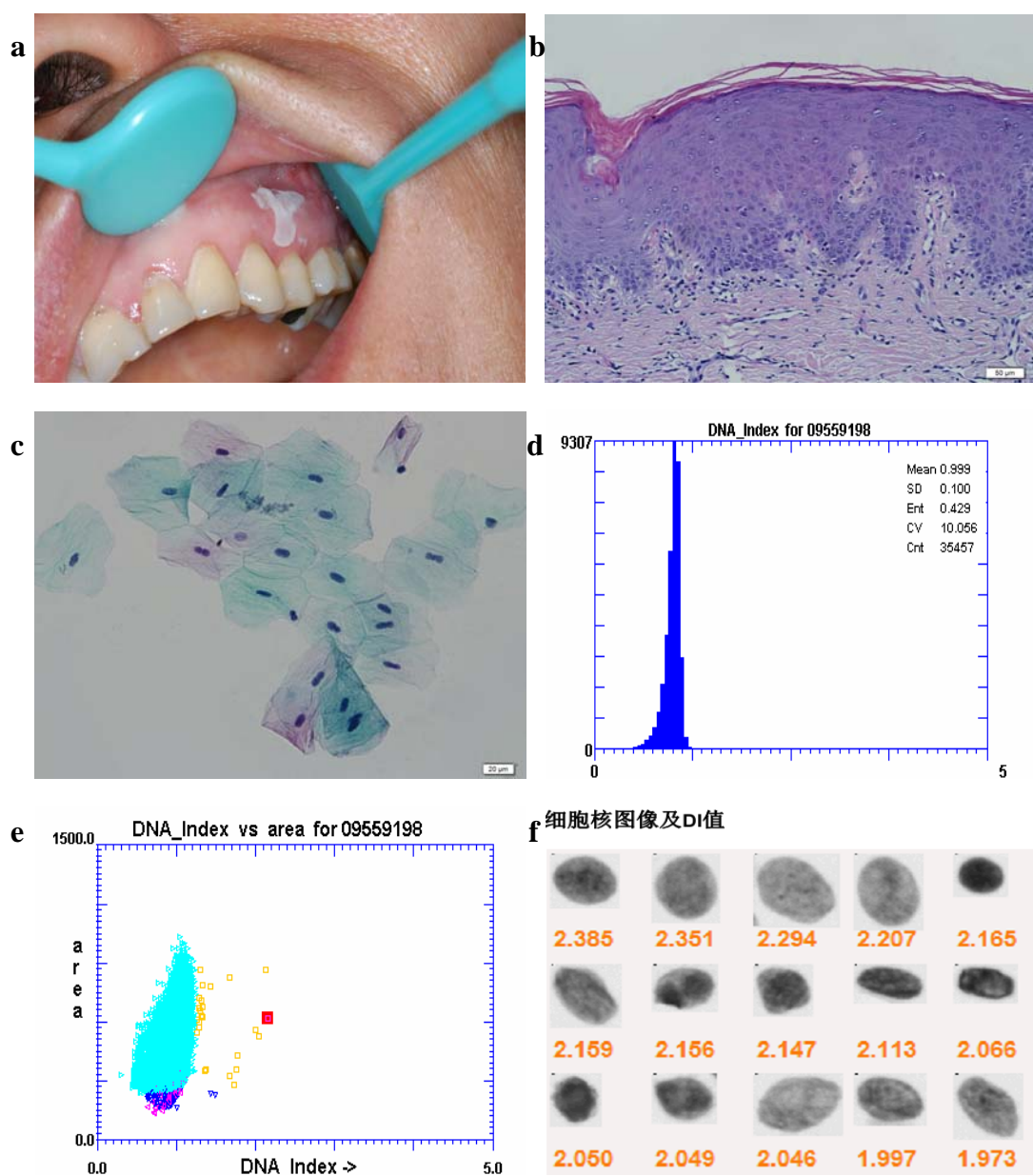


图 14. 口腔白斑伴上皮轻度异常增生：a. 牙龈白斑；b. HE 染色（ $\times 200$ ）；c. 巴氏染色（ $\times 400$ ）；d. DNA 定量分析柱状图；e. DNA 定量分析散点图；f. DNA 定量分析核图像，可见少量倍体异常细胞。

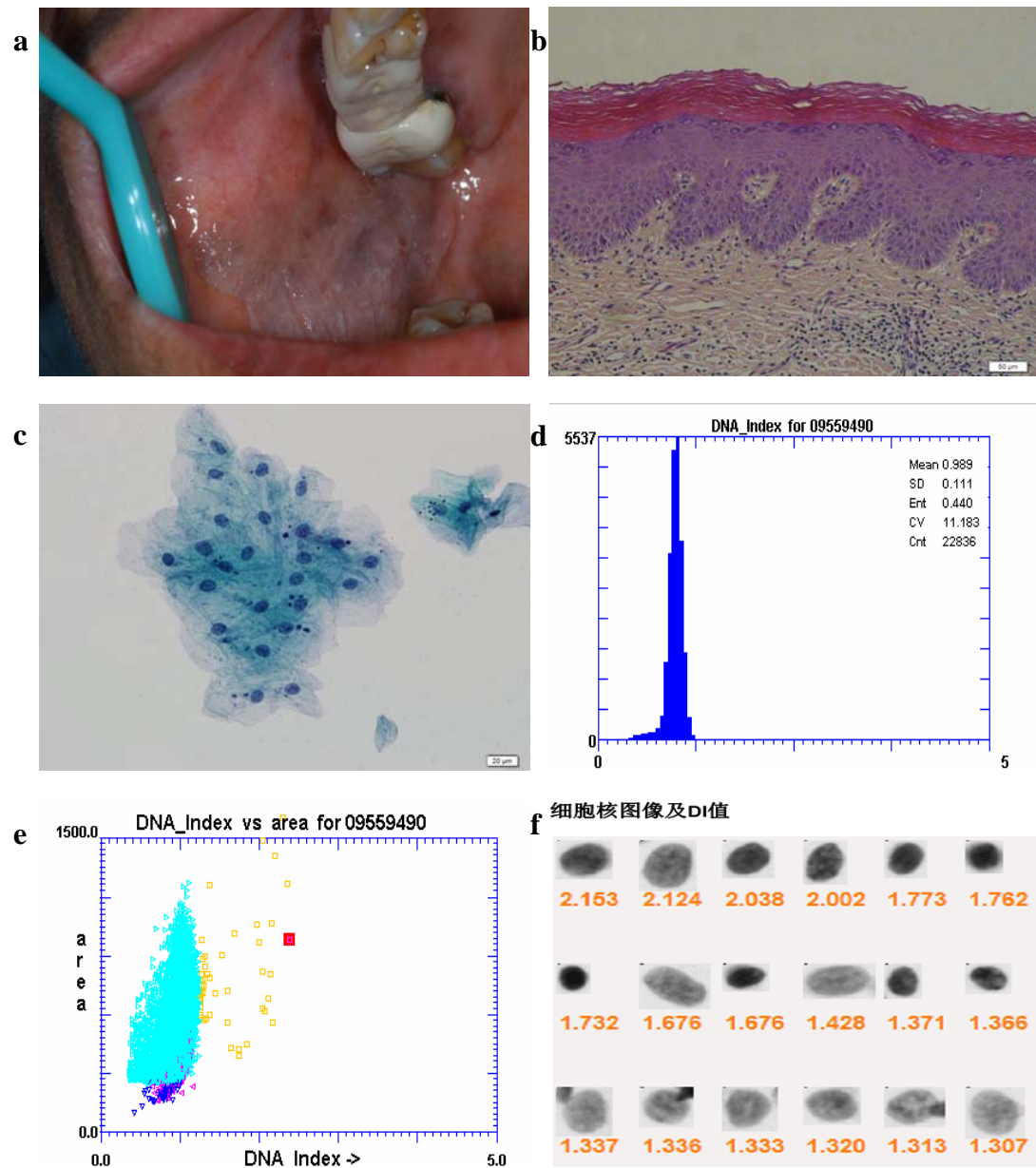


图 15. 口腔白斑: a. 右颊白斑; b. HE 染色 ($\times 200$); c. 巴氏染色 ($\times 400$); d. DNA 定量分析柱状图; e. DNA 定量分析散点图; f. DNA 定量分析核图像。

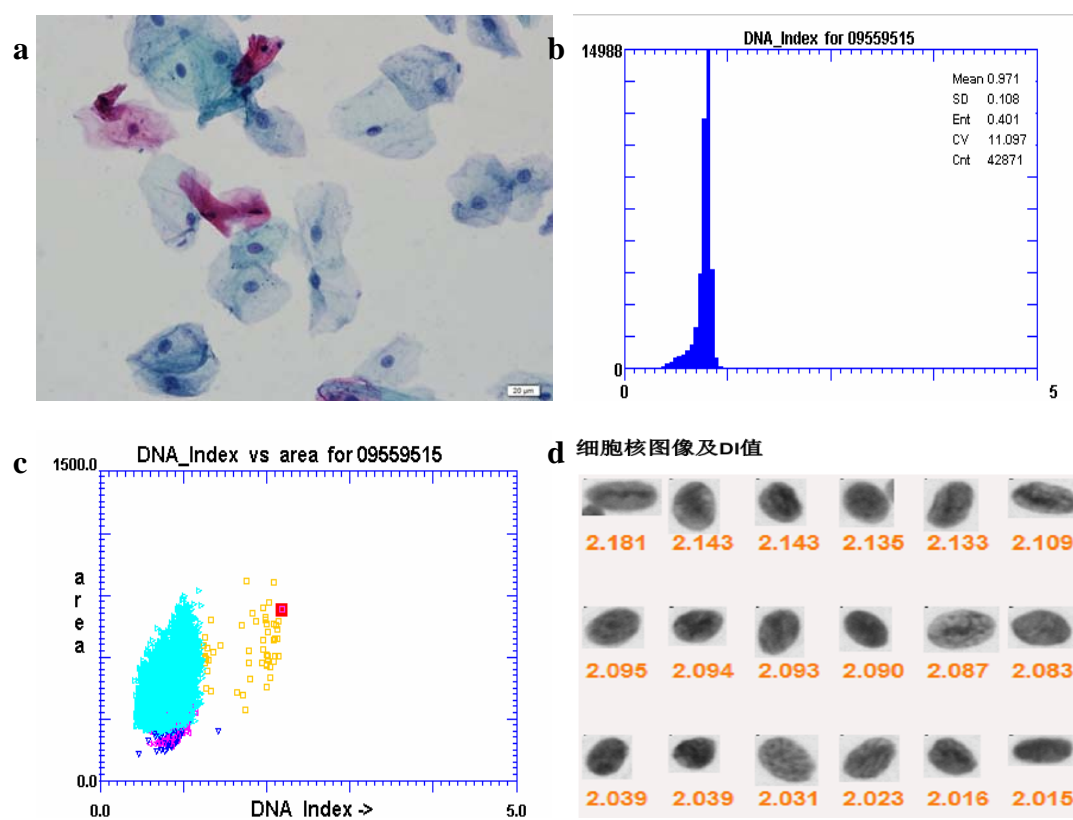
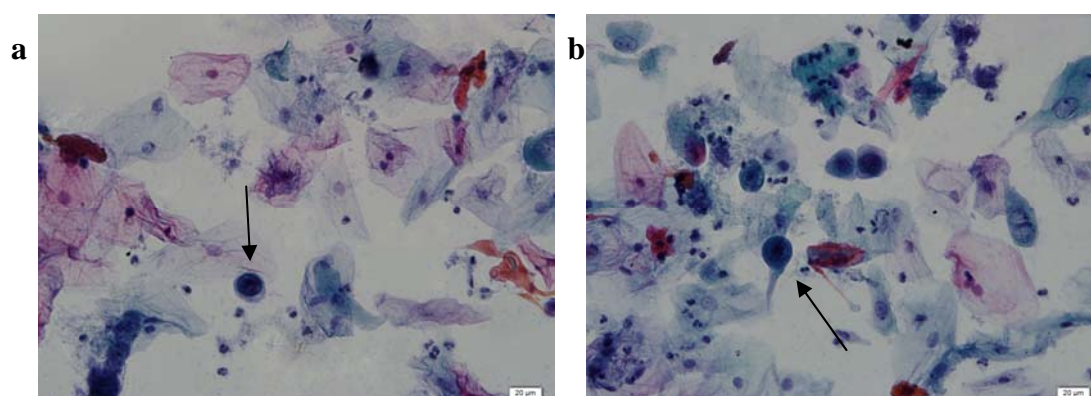


图 16. 阴性对照组: a. 巴氏染色 ($\times 400$); b. DNA 定量分析柱状图; c. DNA 定量分析散点图; d. DNA 定量分析核图像。



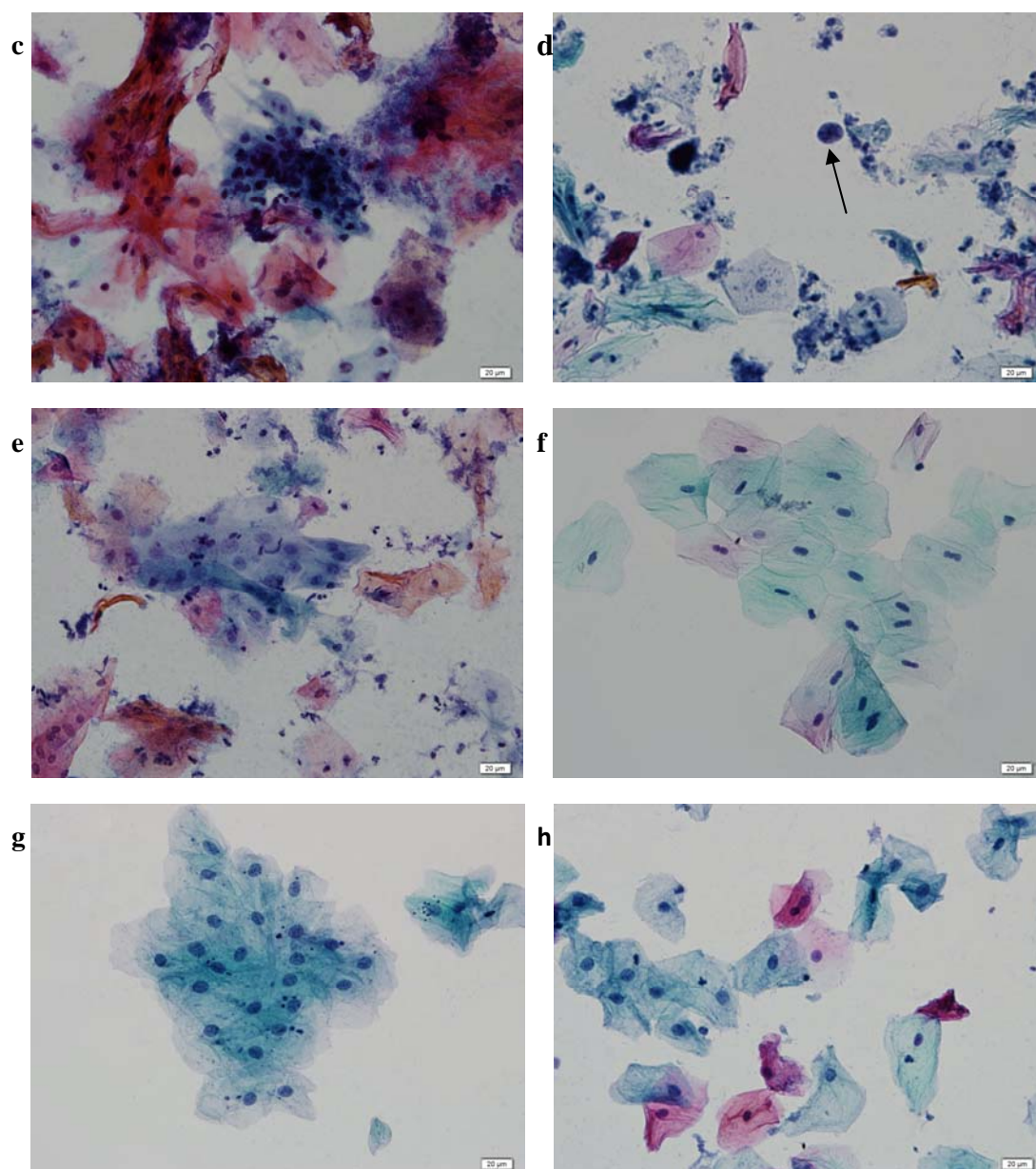


图 17. 巴氏染色 (×400) a. 口腔癌, 可见癌细胞 (箭头所指); b. 口腔癌, 可见癌细胞 (箭头所指); c. 口腔癌; d. 口腔癌, 裸核 (箭头所指); e. 口腔白斑伴上皮中度异常增生; f. 口腔白斑伴上皮轻度异常增生; g. 口腔白斑; h. 正常口腔黏膜。

将该 60 例病例 DNA 甲基化结果与 DNA 定量分析结果相比较,可见口腔癌/重度异常增生组 P16 与 DNA 定量分析一致性较 P15 基因高,为 81.25%;但是口腔白斑组 P15 与 DNA 定量分析一致性较 P16 基因高,为 77.27% (见表 13)。

表 12. P16、P15 基因甲基化阳性率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

分组	P16	P15
口腔癌/重度异常增生	87.50	37.50
白斑中度异常增生	89.47	31.58
白斑轻度异常增生	85.71	28.57
白斑不伴异常增生	63.64	9.09
正常对照组	0.00	0.00

表 13. P16、P15 基因甲基化与 DNA 定量分析一致性比较(% , $\bar{x} \pm s$)

分组	P16	P15
口腔癌/重度异常增生	81.25	43.75
白斑中度异常增生	15.79	73.68
白斑轻度异常增生	14.29	71.43
白斑不伴异常增生	36.36	90.91
正常对照组	100.00	100.00

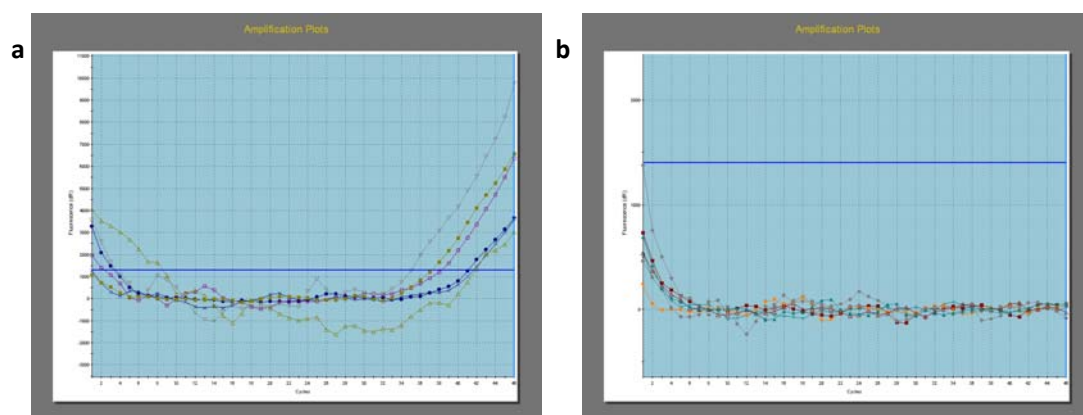


图 18a.P16、P15 基因甲基化阳性 PCR 扩增曲线 b.P16、P15 基因甲基化阴性 PCR 扩增曲线

14.P16 基因甲基化结合 DNA 定量分析

60 例口腔癌、口腔白斑受试者用 DNA 定量分析诊断，16 例口腔癌/重度异常增生有 15 例阳性，44 口腔白斑有 1 例阳性，8 例正常对照均为阴性，其诊断敏感性为 93.75%，特异性为 98.08%。将 P16 基因甲基化、DNA 定量分析相结合，诊断的敏感性升高到 100.00%，ROC 曲线下面积为 0.968，但特异性降低为 30.77%，约登指数为 0.308。（见图 19）。

15.P15 基因甲基化结合 DNA 定量分析

60 例口腔癌、口腔白斑受试者用 DNA 定量分析诊断，其诊断的敏感性为 93.75%，特异性为 98.08%。将 P15 基因甲基化结果、DNA 定量分析结果相结合，其诊断的敏感性仍为 93.75%，ROC 曲线下面积为 0.971（见图 19），但是特异性降低为 78.85%，约登指数为 0.726，较结合 P16 基因甲基化有好转，但仍然会出现较多假阳性病例。

16.P16、P15 基因甲基化结合 DNA 定量分析

60 例口腔癌、口腔白斑受试者用 DNA 定量分析诊断，其诊断的敏感性为 93.75%，特异性为 98.08%。将 P16、P15 基因甲基化结果、DNA 定量分析结果三者相结合，其诊断的敏感性提高为 100.00%，三者结合其 ROC 曲线下面积为 0.980（见图 19）。虽然敏感性升高，但是特异性降低为 30.77%，约登指数为 0.308 则会出现较多假阳性病例。

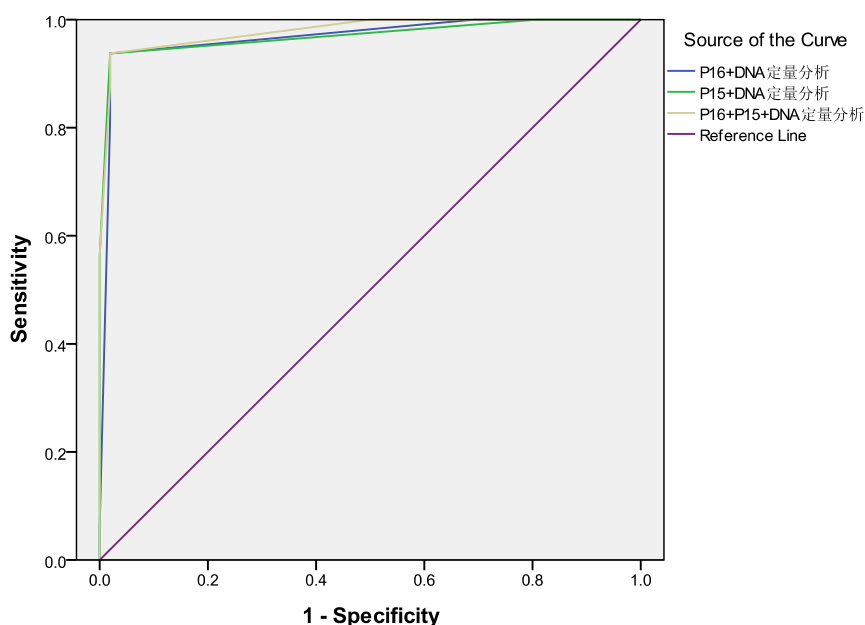


图 19. P16、P15 甲基化分析结合 DNA 定量分析 ROC 曲线

讨 论

在国际上口腔黏膜脱落细胞 DNA 定量分析诊断的标准还未完全统一，主要包括两种。一种是沿用宫颈癌的诊断标准，即①DI 值大于 2.5 为倍体异常细胞，该细胞数大于或等于 3 个为阳性；②出现异倍体峰为阳性；③异常增生细胞数百分比大于或等于 10%为阳性；三者只要满足一条即为阳性。另一种是加拿大 BC 省肿瘤中心所采用的诊断标准，即①DI 值大于 2.3 为倍体异常细胞，该细胞数大于或等于 5 个为阳性；②出现异倍体峰为阳性；③异常增生细胞数百分比大于或等于 10%为阳性。三者只要满足一条即为阳性。但是在国内，这一项技术还未完全开展。本实验将收集的 210 例标本按照上述两种诊断标准分别进行统计，进行 ROC 曲线分析，发现宫颈癌的诊断标准 ROC 曲线下面积为 0.994，加拿大 BC 省肿瘤中心的诊断标准为 0.996，两者之间无显著差异，但是将两者的约登指数进行比较，后者好于前者，故加拿大 BC 省肿瘤中心诊断标准其发现真正患者与非患者的总能力和真实性好于宫颈癌诊断标准。故本实验采用加拿大 BC 省肿瘤中心诊断标准为 DNA 定量分析阳性诊断标准。

一些研究表明用 DNA 图像定量分析技术分析口腔癌患者黏膜脱落细胞中异倍体情况,可以提高口腔癌早期诊断的敏感性和特异性,其敏感性从 94.6%-100% 不等,特异性从 92.9%-99.5%不等,与传统细胞学研究相比有显著提高^[19-22]。本实验单独用 DNA 定量分析分析 102 例口腔癌、口腔白斑患者口腔黏膜脱落细胞,其诊断的敏感性是 95.35%,特异性是 98.20%,阳性预测值是 93.18%,阴性预测值是 98.80%,与其他研究结果相接近,且 ROC 曲线下面积为 0.996,具有较好的准确性。从而认为在临床上疑似癌变的组织,可以用这种创伤小、敏感性和特异性较好的脱落细胞学技术结合 DNA 图像定量分析早期诊断,以减少不必要的创伤,从而早期发现口腔癌,提高患者的生存质量。

本实验分析了口腔癌/重度异常增生、口腔白斑、正常对照组各种细胞构成比例,发现随着病理分级严重程度的增加,正常细胞百分比逐渐降低,而淋巴细胞、粒细胞、增殖细胞、倍体异常细胞逐渐增多,尤其是粒细胞增加的幅度。同时增殖细胞 DI 值口腔癌/重度异常增生显著高于口腔白斑和正常对照。可见随着病理分级的增加其炎症程度、增殖活跃程度也随之增加。因此在临床上收集到的标本,即使样本中倍体异常细胞未达到阳性诊断标准,但若经抗炎治疗后粒细胞等炎症细胞构成比仍显著升高的,也应密切观察,减小复诊间隔时间。临床上许多慢性炎症可以导致肿瘤的发生,如宫颈癌,所以对于炎症细胞的监测至关重要,应及时给予必要的抗炎治疗。

与此同时本实验分析表明,口腔白斑随着病理等级严重程度的增加,其各组细胞构成比也趋于上述变化。并且中度异常增生组增殖细胞 DI 值较正常对照组显著升高,但与口腔癌/重度异常增生组之间无统计学差异;而白斑/轻度异常增生组增殖细胞 DI 值较口腔癌/重度异常增生组显著降低,但与正常对照组之间无显著性差异。可见中度异常增生增殖情况要高于单纯/轻度异常增生,与口腔癌接近;而单纯/轻度异常增生期增殖情况与正常对照组接近。综上所述,白斑伴上皮中度异常增生其细胞增殖程度要高于白斑单纯和轻度异常增生。

临床上将口腔白斑分为均质型(斑块型和皱纹纸型)和非均质型(溃疡型、

疣状型和颗粒型)。本实验收集 48 例均质型白斑和 20 例非均质型白斑, 其中均质性白斑均无恶变, 有 2 例 DNA 定量分析阳性; 非均质型白斑有 9 例恶变, 10 例 DNA 定量分析阳性。同时本实验研究表明非均质型白斑的增殖细胞百分比要显著高于均质型白斑, 可见非均质型白斑增生较活跃。由此可见非均质型白斑比均质型白斑更容易恶变, 这与临床认为非均质型白斑比均质型白斑更易癌变一致。故临床治疗过程中, 遇到非均质型白斑应提高警惕, 较均质型白斑更应该非保守治疗。

本实验对 43 例口腔癌/重度异常增生患者进行 DNA 定量分析, 统计发现随着 TNM 分期等级的升高, 其粒细胞、增殖细胞所占百分比呈上升趋势, 粒细胞代表炎症程度, 增殖细胞代表肿瘤的增殖活跃度。数据表明 TNM 分期等级越高, 其炎症程度越高, 增殖也越活跃, 肿瘤的预后也就越差, 因此可以根据 DNA 定量分析炎症细胞、增殖细胞所占百分比评估该患者预后, 以制定相应的治疗计划。但统计表明, 各组之间的差异不具有统计学差异, 故需扩大样本量进一步统计。

恶性肿瘤的转移方式包括淋巴结转移和血行转移, 本研究收集的病例中不包含血行转移的病例, 恶性肿瘤若伴有淋巴结转移其预后要比不伴有淋巴结转移的患者预后差, 其治疗方案的设计也会有所差别^[23], 因此我们将 43 例口腔癌/重度异常增生的患者按照是否伴有淋巴结转移进行分组, 包括 5 例伴淋巴结转移和 38 例不伴淋巴结转移的患者。数据表明伴有淋巴结转移的病例其增殖细胞所占百分比和增殖细胞的 DI 值均高于不伴有淋巴结转移的病例, 也就是表明伴有淋巴结转移的患者其肿瘤细胞增殖活跃, 其预后相对较差, 因此临床上对于口腔癌患者伴有 DNA 定量分析增殖期细胞 DI 值、百分比要显著增高的, 则应该加强淋巴结的监测。

本实验有 3 例 DNA 定量分析为阳性结果, 而病理学诊断未恶变的病例, 即假阳性病例。考虑的原因可能为: ①切取组织病理学检查的部位与刷取脱落细胞的部位不同; ②有研究表明口腔黏膜脱落细胞 DNA 含量的变化要早于病理学

的改变,提前时间从 1-32 个月不等^[23-25],故不能排除将来该病例恶变的可能性。故对该 3 例假阳性的病例应密切关注,加强复诊。

一些学者研究表明 DNA 定量分析出现假阴性的原因包括:①采集样本所选取的部位不恰当,从而未获得阳性细胞;②样本固定不当;③染色不当^[16]。本实验出现 2 例假阴性病例,其中有一例为念珠菌白斑,考虑可能是由于真菌感染所导致染色异常,从而使 DNA 定量分析检测为阴性。

将脱落细胞巴氏染色进行细胞学分析,也可以发现细胞核、细胞质多个参数的改变,Haveric、Nersesyan 等人刷取吸烟人群口腔黏膜脱落细胞发现核固缩、核溶解、核破裂等坏死细胞、双核细胞显著^[26-29];同时研究表明口腔癌患者的细胞核直径、核浆比较正常人群显著增加^[30]。但是口腔黏膜细胞学诊断标准尚未确定,本实验对口腔癌、口腔白斑患者的口腔黏膜脱落细胞进行分析,总结出一些变化,但仍需扩大样本,以明确细胞学诊断的标准。

P16 基因和 P15 基因通过不同的途径阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期,从而抑制细胞增殖,均属于抑癌基因。本实验同时对 60 例样本进行 P16、P15 基因甲基化的检测,包括 16 例口腔癌/重度异常增生病例,44 例口腔白斑病例和 8 例正常对照。结果表明 16 例口腔癌及重度异常增生病例中有 14 例 P16 基因甲基化检测阳性、6 例 P15 基因甲基化检测阳性,其阳性率为 87.50%和 37.50%。从口腔癌组织中检测 P16 基因甲基化阳性率在 20.80%-64.70%不等^[31-35],本实验的结果远高于这一结果,而 P15 基因甲基化的阳性率要远低于 P16 基因。出现甲基化检测阴性的病例考虑可能的原因:基因的甲基化并不是癌症发生的全部原因,还存在其他通路途径,因此会出现 P16、P15 基因甲基化检测阴性的病例;同时若 DNA 甲基化处理时亚硫酸盐处理不完全也可导致假阳性病例的出现^[36]。

44 例口腔白斑病例中有 36 例 P16 基因甲基化检测阳性,11 例 P15 基因甲基化检测为阳性,其阳性率分别为 81.82%和 25.00%,这一结果显著高于从组织中检测的 P16 基因甲基化结果,即 25.6%^[37],正常对照组均为阴性结果。考虑其阳性率升高的原因:①P16 基因是细胞周期有效调控者,其编码的蛋白可以阻

止细胞从 G₁ 期进入 S 期，从而抑制细胞增殖，而口腔白斑上皮角化增厚，P16 基因甲基化使细胞增殖活跃，因此 P16 基因甲基化可能是口腔白斑发生的原因之一，因此 P16 检测有大量阳性结果；②引物设计不合理^[36]，但因为该实验正常对照组 P16、P15 基因甲基化检测均为阴性结果，故排除这一原因。

本实验选取的 60 例进行甲基化检测的样本和 8 例正常对照组样本 DNA 定量分析的敏感性为 93.75%，特异性为 98.08%。若将 P16、P15 基因甲基化结果、DNA 定量分析结果相结合，其诊断的敏感性提高为 100.00%。虽然敏感性升高，但是特异性却降低为 30.77%，其约登指数为 0.308，则会出现较多假阳性病例。三者结合其 ROC 曲线下面积为 0.980，虽然该数值接近 1.000，但从曲线中可以看出其特异性较低，则在临床上会出现过度治疗的现象。综上所述在临床应用上，应该主要参考 DNA 定量分析结果，对于 DNA 定量分析结果为阴性，但临床上高度怀疑病损恶变时，可以采用 P16、P15 基因甲基化分析，以提高诊断的敏感性，防止假阴性病例的出现，延误患者病情。

全文小结

本研究将刷拭脱落细胞技术和 DNA 定量分析相结合，检测 43 例口腔癌患者，出现 2 例假阴性病例，其诊断的敏感性为 95.35%，证明 DNA 定量分析可以用于口腔癌的早期诊断；同时对 59 例口腔白斑患者，108 例正常对照组样本进行分析，出现 3 例假阳性病例，其特异性是 98.20%，表明 DNA 定量分析可以用于口腔白斑病的定期筛查，及早期发现口腔白斑恶变病例。DNA 定量分析方法其 ROC 曲线下面积为 0.996，约登指数为 0.9355，说明 DNA 定量分析具有较高的准确度和真实性。研究发现非均质型白斑的 DNA 定量分析阳性比例要高于均质型白斑，与临床认为非均质型白斑比均质型白斑更易癌变一致。DNA 定量分析结合 P16、P15 基因甲基化分析可以提高诊断的敏感性到 100%，但其特异性较低，故使用时要掌握使用时机，避免出现假阳性病例。

综上所述，DNA 定量分析具有较高的敏感性、特异性、真实性和准确性；加上口腔黏膜病损表浅、易于观察、取材方便；刷拭脱落细胞技术具有无创、操作方便、重复性高、容易被患者接受的特点，以上这些优势证明，刷拭口腔黏膜脱落细胞结合 DNA 定量分析技术可以用于口腔癌的早期诊断以及口腔白斑病的定期随诊观察，还可以作为口腔癌前病变治疗和口腔化学预防研究的中间终点。

参考文献：

- [1] Marsh D. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J of Pathol*,2011,223:470~481.
- [2] Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* ,2009,45:301~308.
- [3] Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med*,2004,33:398~404.
- [4] Haws J, Rhods NL, Williams B. Number of apoptotic cells in brush biopsies of patients with oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,2004,97:461.
- [5] Islam MN, Kornberg L. Anatomic Site Based Ploidy Analysis of Oral Premalignant Lesions. *Head and Neck Pathol*,2010,4:10~14.
- [6] Bocking A, Sproll C, Stocklein N, Naujoks C. Role of Brush Biopsy and DNA Cytometry for Prevention, Diagnosis, Therapy, and Follow up Care of Oral Cancer.*J of Oncol*,2011,10:1155~1162.
- [7] Maraki D, Hengge UR. Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. *J Oral Pathol Med*,2006,35:58~60.
- [8] Mehrotra R, Gupta A. Application of cytology and molecular biology In diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer*,2006,5:11.

- [9] 潘世扬. DNA 甲基化标志物在分子诊断与治疗中的价值. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3): 145~147.
- [10] Chang HW, Ling GS, Wei WI, Anthony Po-Wing Yuen. Smoking and Drinking Can Induce p15 Methylation in the Upper Aerodigestive Tract of Healthy Individuals and Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Cancer, 2004, 101: 125~132.
- [11] Melissa, Oliveira ZFL. Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma. Mol Biol Rep, 2011, 38: 5435~5441.
- [12] 李安. P16 基因在口腔肿瘤中的研究进展. 国际口腔医学杂志, 2008, 45: 219~221.
- [13] 孙小蓉, 汪键. DNA 定量细胞学. 湖北: 湖北科学技术出版社, 2006, 7~8, 57~58.
- [14] 刘红刚, 高岩. 头颈部肿瘤病理学和遗传学. 北京: 人民卫生出版社, 2006, 209~210.
- [15] Barnes L, Eveson JW. Pathology and Genetics Head and Neck Tumours WHO and TNM classification, International Agency for Research on Cancer, 2005. 165.
- [16] Babshet M, Nandimath K. Efficacy of oral brush cytology in the evaluation of the oral premalignant and malignant lesions. J Cytol, 2011, 28(4): 165~172.
- [17] 李元堂, 张炳昌. 临床脱落细胞学图谱分析及诊断. 山东: 山东大学出版社, 2008, 343.
- [18] Torsten WR, Meyer-Ebrecht D. Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer. Cancer Cyto, 2009, 25: 228~35.
- [19] Torsten WR, Weidenbach H. Cytologic and DNA cytometric early diagnosis of oral cancer. Analytical Cell Pathol, 2001, 22: 211~221.
- [20] Haws J, Rhods HL, Williams B. Number of apoptotic cells in brush biopsies of

- patients with oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,2004,97:461.
- [21] James J, Sciubba. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions: Computer-Assisted Analysis of the Oral brush biopsy. *J ADA*, 1999, 130:1445~1457.
- [22] Scheifele C, Maria A, Westhausen S. The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol*,2004,40:824~828.
- [23] Kerdpon D, Sriplung H. Factors related to advanced stage oral squamous cell carcinoma in southern Tailand.*Oral Oncol*,2011,37(3):216~221.
- [24] Maraki D, Hengge UR. Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. *J Oral Pathol Med*,2006,35:58~60.
- [25] Torsten WR, Weidenbach H. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: Report on four cases. *Analytical Cell Pathol*,2003,25:159~166.
- [26] Haveric A, Haveric S, Ibrul S. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods*,2010,20(5):260~266.
- [27] Nersesyan A, Muradyan R , Kundi M, Knasmueller S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis* , 2011, 26(2):295~301.
- [28] Joshi MS, Verma Y, Gautam AK, Parmar G, Lakkad BC, Kumar S. Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Archives of oral biology*,2011,56:63~67.
- [29] Lima CF, Oliveira LU. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *J Oral Pathol Med*, 2010,39:441~446.

- [30] Rashmi SKB, Goje SK, Hazarey VK, Ganvir SM. Cytomorphometric Analysis for Evaluation of Cell Diameter, Nuclear Diameter and Micronuclei for Detection of Oral Premalignant and Malignant Lesion. J. Oral Biosci, 2011, 53(2):158~169.
- [31] Supic G, Kozomara R. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. Oral Oncol, 2009, 45: 1051~1057.
- [32] Kaur J, Demokan S. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. International J of Cancer, 2010, 167:2367~2373.
- [33] Supic G, Kozomara R. Prognostic significance of tumor related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol, 2011, 47:702~708.
- [34] Nakahara Y, Shintani S. Detection of p16 promoter methylation in the serum of oral cancer patients. Res Head and Neck Oncol, 2006, 35:362~365.
- [35] Liu ML, Liu F. gene promoter hypermethylation in leukoplakia of the oral mucosa. Pathol and Lab Med International. 2010, 2: 71~77.
- [36]. Richard JS , Gillian LH. CpG island methylation phenotype (CIMP) in oral cancer: Associated with a marked inflammatory response and less aggressive tumour biology. Oral Oncol, 2007, 43:878~886
- [37] 范保星. DNA 甲基化检测方法. 国外医学遗传学分册, 2002, 25(2): 99~100.

综 述

口腔黏膜脱落细胞在口腔癌早期诊断中的研究进展

刘瑶综述 孙正审校

(首都医科大学附属北京口腔医院黏膜科 北京 100050)

【摘要】脱落细胞学检查是一种创伤小，操作简单，安全，容易被患者接受的检测方法，在口腔黏膜疾病中主要用于口腔癌前病变和口腔癌的早期诊断。导致口腔癌高死亡率的原因主要在于没有早期发现及早期治疗，而口腔黏膜脱落细胞学，结合 DNA 图像定量分析等辅助方法可用于口腔癌的早期诊断，且具有较高的敏感性和特异性。

【关键词】口腔黏膜脱落细胞；口腔癌；早期诊断

Role of brush cell and early detection of oral cancer

LIU Yao; SUN Zheng

(Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

【Abstract】 The brush biopsy is a non-aggressive, simple, well-accepted by patient, safe technique, for early diagnosis of oral premalignant and malignant lesion . The late diagnosis resulting in late treatment are the main causes of the low survival rate in patients with oral squamous cell carcinomas, however, the brush biopsy is increasingly used for early detection of oral cancer, additional use of the auxiliary cytometry, such as the DNA-image cytometry, which can increase the sensitivity and the specificity.

【Key words】 oral brush cell; oral cancer; early diagnosis

1. 概述 每年世界上有大约 405,000 例新发口腔癌病例，我国是全球六大口腔癌高发和高死亡率的国家之一，其危险因素包括吸烟、饮酒等^[1, 2]。尽管外科手术、放化疗技术飞速进展，口腔癌的五年存活率约 50%，主要原因在于患

者确诊及接受治疗时已经处于疾病的晚期。口腔癌若能早期诊断及早期治疗，可以大大提高五年生存率及生活质量^[3-7]。因此，口腔癌的早期诊断至关重要。

脱落细胞学检查是一种创伤小，操作简单，容易被患者接受的检测方法，已被广泛应用于临床，如宫颈癌、膀胱癌、食管癌等。随着薄层液基细胞制片技术和全自动细胞图像分析技术的进步，细胞学技术也在不断改进。口腔细胞学逐渐被用于诊断口腔黏膜疾病，在近五年的时间里国内外报道也不断增多^[8]，主要在口腔癌筛查及口腔癌前病变评估的应用领域，其辅助检查手段包括 DNA 图像定量分析、基因检测、表观遗传学及微卫星不稳定性检测、微核分析、核仁组织区银染分析及免疫细胞学等。目前口腔黏膜脱落细胞学可以用于口腔癌的早期诊断、治疗、追踪观察和评估预后，其应用研究受到越来越多的重视。

2. 薄层液基技术 随着 20 世纪 90 年代液基细胞学的发展，多种比较研究表明液基细胞学技术的应用使细胞学检查有了明显的进步。如，液基细胞学技术降低了宫颈脱落细胞检查中采样、涂片、固定过程中问题的发生率。与传统的巴氏涂片方法相比较，液基细胞学技术使宫颈癌细胞学诊断的假阴性率降低^[9]。同样的，在口腔癌的应用研究中，用薄层液基技术对口腔黏膜脱落细胞样本制片，可以降低样本量不足的缺点，能最大限度的保存所有有价值的细胞，传统脱落细胞学样本不足量达 12.4%，而应用了薄层液基技术后样本不足量降至 8.8%，同时可以减少重叠细胞、黏液、炎症细胞及血液对诊断的影响，从而降低假阴性率，提高对口腔癌诊断的敏感性和特异性，并且制片后剩余的样本还可以用于其它方面的检测^[10-13]。但是薄层液基制片技术也存在其不足，如制片过程较为复杂、费用较高等。

3. 脱落细胞学与口腔癌早期诊断 细胞学主要是用显微镜检查通过巴氏染色的口腔黏膜脱落细胞，以研究细胞形态学改变，包括细胞质（如细胞体积增加、空泡化等）和细胞核（如核增大、核固缩、多核等）的改变^[14]；也可研究细胞核区域参数（NA）、细胞质区域参数（CA）、核浆比（NA/CA），通过分析可以增加细胞学检查对于早期诊断口腔癌的敏感性，具有准确、客观、重复性

高的优点。吸烟是口腔癌重要的发病因素之一，Haveric、Nersesyan 等人刷取吸烟人群口腔黏膜脱落细胞发现核固缩、核溶解、核破裂等坏死细胞、双核细胞显著^[15-18]；同时研究表明口腔癌患者的细胞核直径、核浆比较正常人群显著增加^[19]。许多学者用该方法诊断口腔癌，其敏感性从 77%至 93%不等，特异性为 100%，准确度为 92%^[20、21]。由此可见通过常规细胞学检测，可以较准确的诊断口腔癌。

4. DNA 图像定量分析与口腔癌早期诊断 正常人体各种组织的细胞 DNA 含量应当是恒定的，成熟分化的细胞有 23 对染色体，DNA 含量为二倍体，异倍体的出现，是恶性肿瘤的早期指征之一。DNA 图像定量分析技术，利用 Feulgen 染色保证了细胞核的着色深浅度与 DNA 含量正相关这一原理，可以检测每个细胞核中 DNA 含量，计算 DNA 指数 (DI)，当 $DI=1\pm0.1$ 时为二倍体 (2C)，当 DI 超过 2C 范围时则定义为异倍体，异倍体的出现可以提示早期口腔癌的发生。研究表明用 DNA 图像定量分析技术分析口腔癌患者黏膜脱落细胞中异倍体情况，可以提高口腔癌早期诊断的敏感性和特异性，其敏感性从 94.6%-100%不等，特异性从 92.9%-99.5%不等，与传统细胞学研究相比有显著提高，从而认为在临床上疑似癌变的组织，可以用这种简单、创伤小的脱落细胞学技术结合 DNA 图像定量分析早期诊断^[22-26]。与此同时，在口腔危险区的肿瘤细胞中异倍体显著增高，尤其为舌部，故对于危险区的肿瘤要提高警惕^[27]。并且，口腔脱落细胞 DNA 含量的变化要早于病理学的异常，提前时间从 1-32 个月不等^[28、29]。综上所述脱落细胞学检查是一种用于早期诊断口腔癌的细胞学方法，DNA 图像定量分析可作为细胞学诊断或确认疑似癌变组织是否癌变的辅助手段，异倍体可以作为口腔癌的标记物，早于病理学诊断，用于口腔癌的早期诊断^[30]。

另有研究表明应用 DNA 图像定量分析技术分析口腔白斑患者的脱落细胞，可以分析口腔白斑是否有癌变倾向，其敏感性从 92.9-100%不等，特异性从 97.4-100%不等，且要早于病理学检查；同时吸烟的患者其 DNA 异倍体细胞检出率较不吸烟者显著增高^[23、25、28、31、32]。可见对于临床上疑似癌变者，伴有吸烟

危险因素者，患病部位在危险区者应给予 DNA 图像定量分析细胞 DNA 倍体，早期发现口腔癌，以提高五年生存率及预后。

与此同时，口腔扁平苔藓是公认的癌前状态，研究表明，用 DNA 图像定量分析技术分析口腔扁平苔藓糜烂型患者的脱落细胞，发现其异倍体的检出率要高于非糜烂型口腔扁平苔藓的患者。因此对于临床上伴有长期糜烂的口腔扁平苔藓的患者，要提高警惕性，早期发现癌变的病例^[33]。

5. 基因水平检测与口腔癌的早期诊断 一些学者研究表明，应用口腔脱落细胞学技术分析基因的改变可用于口腔癌的早期诊断，如 EMP1、基质金属蛋白酶 2 基因、高分子糖腱蛋白 C 基因、人端粒酶逆转录酶基因、谷胱甘肽 S 转移酶基因和 CK17 基因，其中 CK17 的表达在肿瘤分期 T1 及 T2 期、无淋巴结转移、病理诊断高分化口腔鳞状细胞癌患者中明显过表达，故当发现细胞中这些基因发生改变、表达明显增高时，提示口腔癌的早期发生。分子水平的改变要早于镜下及肉眼变化，故分子水平的分析可以用于口腔癌的早期诊断^[34-38]。

6. 表观遗传学改变、微卫星不稳定性与口腔癌的早期诊断 甲基化是表观遗传改变的重要原因，DNA 甲基化在人基因组中存在是一种十分常见的现象，通常胞嘧啶甲基化（C-CH₃）发生在基因的启动子或编码序列的 CpG 中，这种基因的甲基化可能会对基因的结构和功能产生一定的影响，如使基因的表达失常，通常会使基因的表达降低或使基因沉默，最终导致生物体产生发育障碍或引起各种疾病。尤其是抑癌基因启动子高甲基化，已经被确认为是目前各种临床肿瘤早期基因改变事件。DNA 的甲基化常会使基因的表达降低或使基因沉默，最终导致生物其改变在肿瘤的发生中起重要作用^[9, 39]。Rosas 等人用特异性甲基化 PCR 技术研究了头颈部肿瘤患者组织中和细胞涂片中 p16 基因、MGMT 基因、DAP-K 基因甲基化情况，并阐明这种特异性甲基化 PCR 技术对检测肿瘤 DNA 有一定的敏感性和高效性，对患者的跟踪报道也有潜在使用价值^[40]。Hsiao Wen Chang 等人用特异性甲基化 PCR 技术研究口腔癌脱落细胞 P15 基因，研究表明其敏感性达 65%^[41]。Cordeiro-Silva 等人也用特异性甲基化 PCR 技术分析口

腔癌患者口腔黏膜脱落细胞,发现多个基因,如 CDKN2A、SFN 等出现甲基化的现象^[42]。就此认为该方法可以用于口腔癌前病变的检测及其辅助手段,早期发现口腔癌,早期诊断并对患者追踪观察。

通常,基因的不稳性由杂合性缺失导致。杂合性缺失反应了染色体组基因座位中等位基因的缺失,如微卫星不稳性,即微卫星位点 DNA 长度的改变。研究表明微卫星的改变与头颈部鳞状细胞癌的发生密切相关,可以用于区分正常细胞中的肿瘤细胞,同时发现细胞学中肿瘤细胞的改变与组织病理学中的改变相似,再加上细胞学检查创伤小,故可以通过分析细胞学样本中的微卫星改变来早期发现口腔癌^[43-47]。与此同时口腔癌前病变的研究也逐渐向分子水平靠拢。研究表明用口腔脱落细胞学技术结合微卫星分析,可以提高口腔癌前病变诊断的敏感性和特异性,且等位基因的缺失随着病异常增生轻重程度的增加而增多,也就是说如果刷取的细胞样本中等位基因缺失位点越多,其癌变的可能性也就越大,从而可以早期监控,早期诊断口腔癌,其中 9p 位点基因不稳性最为常见^[44、48]。

7. 微核分析与口腔癌早期诊断 微核是细胞受到致癌物作用后染色体受损后的断片。研究表明,口腔白斑及扁平苔藓患者口腔黏膜脱落细胞的微核检出率显著高于正常人,且糜烂性扁平苔藓的检出率要高于非糜烂型扁平苔藓,与此同时随着病变程度的加重而增高,经过化学预防药物治疗后其检出率降低,可见微核可以作为口腔癌前病变及癌前状态癌变的标志物^[49-54],同时对于糜烂型扁平苔藓的患者也应该加强随访,以早期发现癌变病例。另一项研究报道表明口腔癌患者的黏膜脱落细胞中微核检出率显著高于正常人,并随着病理学分期的增加而增加,但是在III期和IV期之间无明显差异^[19、55、56]。故用口腔脱落细胞学技术结合微核的检查可以用于口腔癌的早期诊断。

8. 核仁组织区银染分析(AgNOR)与口腔癌早期诊断 癌变开始时,核仁组织区的数目和大小都会增加,因此通过分析其数目和面积,可以诊断早期癌症。目前研究报道用口腔脱落细胞学技术结合 AgNOR,检测口腔癌的敏感性

为 92.5%，特异性为 100%，较传统的方法有显著提高，可以减少假阴性、假阳性病例的出现，用于检测临床上疑似癌变的病例的早期诊断^[57]。研究表明无论是口腔癌患者还是正常人群，吸烟者的脱落细胞中 AgNOR 染色比不吸烟者深，表明吸烟会使细胞核增殖性能增强^[58、59]，也就是说在临床上可疑癌变病损，再加上伴有吸烟危险因素的人群，要加强监测，以早期发现口腔癌，早期治疗，提高生活质量和预后。

9. 免疫细胞学与口腔癌早期诊断 免疫细胞化学方法是通过寻找特定肿瘤类型中的特异性抗原来实现的。Brunotto 等人用免疫细胞学分析刷取的口腔癌黏膜细胞中 CK14 的表达情况，发现在口腔癌患者中 CK14 呈过表达状态，可以用此方法区分癌变组织及正常组织，定位疑似癌变细胞，提高诊断的敏感性^[60]。另一些研究报道用免疫细胞学分析口腔黏膜脱落细胞中 p53 蛋白、高分子腱糖蛋白-C、层粘蛋白 5、p53 及 ki67 蛋白的表达，两者的结合可以提高对口腔癌前病变癌变诊断的敏感性和特异性，其中 p53 蛋白的表达从肿瘤发生的早期阶段就开始出现，且与上皮增生的程度正相关，因此免疫细胞化学可用于口腔癌的早期诊断^[61-64]。

10. 多技术联合应用 将以上技术 (≥ 2 种) 应用于口腔黏膜脱落细胞中即为多技术联合应用。多技术联合应用在口腔癌早期诊断中作用明显。Hirshberg 等人将细胞学技术、荧光原位杂交技术、DNA 图像定量分析异倍体三种技术结合检测刷取的口腔癌患者的细胞，其敏感性为 100%，这三种方法结合应用可以用于潜在癌细胞的早期诊断^[65]。另外 Remmerbach 等人将脱落细胞学技术、细胞形态学分析、DNA 图像定量分析、AgNOR 结合起来分析刷取的口腔癌患者的细胞，发现其特异性与传统细胞学比较由 92.6% 升高为 100%^[3]。由此可见，多技术联合应用是一种敏感性高、特异性好的早期诊断口腔癌的手段，尤其用于收集脱落细胞数较少的病例研究。

11. 口腔黏膜脱落细胞的研究意义 综上所述，口腔脱落细胞学检查是一项可用于口腔癌早期诊断的有效方法，液基细胞学的应用，结合辅助手段，如

DNA 图像定量分析、免疫细胞化学、基因技术、AgNOR 可以提高其诊断的敏感性和特异性,降低假阴性率。同时可以对疑似口腔癌病例进行检测,以制定相应治疗计划^[66]。总而言之,口腔脱落细胞学检查是一种创伤小、简单易行、操作方便、重复性好、安全、患者易于接受的口腔癌的早期诊断方法,使患者得到早期治疗,从而可以提高口腔癌的治愈率,提高患者生活质量,降低死亡率,为口腔癌预防提供参考依据,降低口腔癌的发病率。随着各种新技术的发展,必然会有更多的新技术应用于口腔黏膜脱落细胞,将会有力地促进口腔癌的早期诊断。

参考文献:

- [1] Sciubba JJ. Oral cancer the importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*,2001,2:239~251.
- [2] Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*, 2009,45:301~308.
- [3] Torsten W.R, Dietrich ME. Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer. *Cancer Cyto*,2009,25:228~35.
- [4] Gillenwater A, Dapadimitrakopoulou V. Oral premalignancy: new methods of detection and treatment. *CurrOncol Rep*,2006,8:146~154.
- [5] Michele DM, Fedele S. Dysplasia/neoplasia surveillance in oral lichen planus patients: A description of clinical criteria adopted at a single centre and their impact on prognosis. *Oral Oncol*,2006,42:819~824.
- [6] Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*, 2009,45:301~308.
- [7] Marsh D. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J of Pathol*,2011,223:470~481.
- [8] Mehrotra R, Hullmann M, Smeets R. Oral cytology revisited. *J Oral Pathol Med*,2009,38:161~166.

- [9] Mehrotra R, Gupta A. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer*,2006,5:11.
- [10] Hayama HF, Motta CFA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesion. *Oral Med and Pathol*,2005,23(9):1927~1933.
- [11] Kujan O, Desai M. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: Results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol*,2006,42:810~818.
- [12] Navone R, Burlo P, Pich A. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology*, 2007,18:356~360.
- [13] Shah P, Deshmukh R. Exfoliative Cytology and Cytocentrifuge Preparation of Oral Premalignant and Malignant Lesions. *Acta Cytologica*,2012,56:68~73.
- [14] Mehrotra M, Gupta A. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Molecular Cancer*, 2006,5:11.
- [15] Haveric A, Haveric S, Ibrul S. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods*,2010,20(5):260~266.
- [16] Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis*,2011,26(2):295~301.
- [17] Joshi MS, Verma Y, Gautam AK, Parmar G, Lakkad BC, Kumar S. Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Archives of oral biology*,2011,56:63~67.

- [18] Lima CF, Oliveira LU. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *J Oral Pathol Med*, 2010,39:441~446.
- [19] Rashmi SK, Bhavasar, Goje SK, Vinay K. Hazarey, Sindhu, Ganvir M. Cytomorphometric Analysis for Evaluation of Cell Diameter, Nuclear Diameter and Micronuclei for Detection of Oral Premalignant and Malignant Lesion. *J. Oral Biosci*, 2011,53(2):158~169.
- [20] Mahmoud A, Edris M, Ahmed HG, Mohammed EA. Accuracy of oral exfoliative cytology in Sudanese patients undergoing oral biopsy. *RSBO*, 2011, 8(3): 255~260.
- [21] Babshet M, Nandimath K, Pervatkar SK, NaikmasurVG . Efficacy of oral brush cytology in the evaluation of the oral premalignant and malignant lesions. *J of Cyto*, 2011,28(4):165~172
- [22] Torsten WR, Weidenbach H. Cytologic and DNA cytometric early diagnosis of oral cancer. *Analytical Cell Pathol*, 2001, 22: 211~221.
- [23] Maraki D., Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med*, 2004,33:398~404.
- [24] Haws J, Rhods NL, Williams B. Number of apoptotic cells in brush biopsies of patients with oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2004,97:461.
- [25] James J, Sciubba. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions: Computer-Assisted Analysis of the Oral brush biopsy. *J ADA*, 1999, 130:1445~1457.
- [26] Scheifele C, Maria A, Westhausen S. The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol*, 2004,40:824~828.
- [27] Islam MN, Kornberg L. Anatomic Site Based Ploidy Analysis of Oral Premalignant Lesions. *Head and Neck Pathol*, 2010,4:10~14.
- [28] Maraki D, Hengge UR. Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis

- of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. *J Oral Pathol Med*,2006,35:58~60.
- [29] Torsten WR, Weidenbach H. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: Report on four cases. *Analytical Cell Pathol*,2003,25:159~166.
- [30] Bocking A, Sproll , Stocklein N, Naujoks C. Role of Brush Biopsy and DNA Cytometry for Prevention, Diagnosis, Therapy, and Follow up Care of Oral Cancer.*J of Oncol*,2011, 10:1155~1162.
- [31] Souto GR, Caliri MV. Tobacco use increase the number of aneuploid nuclei in the clinically healthy oral epithelium. *J Oral Pathol Med*,2010,39:605~610.
- [32] Pentenero M, Giaretti W. DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: Association with cigarette smoking and site. *Oral Oncol*,2009,45:887~890.
- [33] Sagredo A, Jimenez Y, Bagan JV. Cytometric analysis of oral scrapings of patients with oral lichen planus. *Cytopathology*, 2010,10:1111~1116.
- [34] Toyoshima T, Koch F, Kaemmerer P, Vairaktaris E, Al-Nawas B, Wagner W. Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary Results. *J Oral Pathol Med*,2009,38:530~534.
- [35] Patel K, Rhodus NL, Ondrey F. RNA yielded in oral brush biopsies for gene expression analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,2004,97:461.
- [36] Siddiq M, Ahmed. Molecular biology: an early detector of oral cancers. *Annals of Diagnostic Pathology*,2009,13:140~145.
- [37] Toyoshima T, Koch F. CK17 in oral squamous cell carcinoma cells by brush biopsy. *J of Cranio-Maxillofacial Surgery*,2008,36:S38.
- [38] Koch F, Toyoshima T, Biesterfeld S. mRNA detection of tumor genes by oral

- brush biopsy. J of Cranio-Maxillofacial Surgery,2008,36:S38.
- [39] 潘世扬. DNA 甲基化标志物在分子诊断与治疗中的价值.分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3): 145~147.
- [40] Rosas SL, Koch W. Promoter hypermethylation patterns of p16,O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. Cancer Res,2001,61:939~942.
- [41] Chang HW, Guang SL, Wei WI, Yuen PW. Smoking and Drinking Can Induce p15 Methylation in the Upper Aerodigestive Tract of Healthy Individuals and Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Cancer, 2004, 101:125~132.
- [42] Melissa, Oliveira ZFL. Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma. Mol Biol Rep,2011,38:5435~5441.
- [43] Sagredo AA, Maria TR. P53 mutation is rare in oral mucosa brushings from patients previously treated for a head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol,2009,45:661~664.
- [44] Califano J. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res,1996,56:2488~2492.
- [45] Rosin MP, Epstein JB. The use of exfoliative cell samples to map clonal genetic alterations in the oral epithelium of high risk patients. Cancer Res,1997,57:5258~5260.
- [46] Huang MF, Chang YC. Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. Oral Oncol,1999,35:296~301.
- [47] Spafford MF, Koch WM. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosa cells by microsatellite analysis. Clin Cancer

- Res,2001,7:607~612.
- [48] Jantine FB, Graveland AP. Screening for Oral Precancer with Noninvasive Genetic Cytology. *Cancer Prev Res*,2009,2(2):128~133.
- [49] 孙正,李宁. 口腔白斑患者口腔黏膜脱落细胞微核细胞率的研究. *北京口腔医学*, 1998, 6(4): 141~142.
- [50] Buajeeb W, Kraivaphan P. Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus. *Mutation Res*,2007,627:191~196.
- [51] Sarto F, Finottos, mazotti D. The micronucleus assay in exfoliative cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*,1987,2:11~17.
- [52] Manoj B. Mahimkar, Tanuja A. Samant, Sadhana Kannan, Tejas Patil. Influence of genetic polymorphisms on frequency of micronucleated buccal epithelial cells in leukoplakia patients. *Oral Oncol*,2010,46:761~766.
- [53] Oliveira PF, Andrade AF, Malheiros FF, Lacerda SA, José AA, Oliveira Cecch A. Evaluation of the Frequency of Micronuclei in Exfoliated Cells from Oral Lesions Previously Identified by Toluidine Blue. *Acta Cytologica*, 2011,55:344~349.
- [54] Sanchez-Siles M, Llor IR, Alonso FC, Jornet PL. A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Archives of oral biology*,2011,56:1148~1153.
- [55] Palve DH, Tupkari JV. Clinico-pathological correlation of micronuclei in oral squamous cell carcinoma by exfoliative cytology. *J Oral Maxillofac Pathol*,2008,12:2~7.
- [56] Jadhav K, Gupta N, Mujib BR. Micronuclei: An essential biomarker in oral exfoliated cells for grading of oral squamous cell carcinoma. *Journal of cytol*,2011,28(1):7~12.

- [57] Torsten WR, Weidenbach H. Diagnostic value of nucleolar organizer regions(AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Analytical Cellular Pathol*,2003,25:139~146.
- [58] Fontes PC, Correa GHM. Comparison of Exfoliative Pap Stain and AgNOR Counts of the Tongue in Smokers and Nonsmokers. *Head and Neck Pathol*, 2008,2:157~162.
- [59] Fontes PC, Correa GHM, Issa JS. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers. *Analytical and Quantitative Cytology and History*,2008,30(1):16~24.
- [60] Brunotto M. Zárate A Z. Valuation of exfoliative cytology as prediction factor in oral mucosa lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*,2005,2:E92~102.
- [61] Driemel O, Dahse R. High-molecular tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies. *Clin Oral Invest*,2007,11:93~99.
- [62] Driemel O, Dahse R. Laminin-5 immunocytochemistry:a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies. *Cytopathology*, 2007,18:348~355.
- [63] 刘宏伟等. 口腔癌前病变和鳞癌 P53 表达与微核的关系. *临床口腔医学杂志*, 2001, 17(1): 10~12.
- [64] Czerninski R, Kaplan I, Chetrit KAB. The use of staining for p53 and KI67 in brush biopsy samples from oral premalignant lesions: A Prospective case-controlled study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* , 2004,97(4):456~457.
- [65] Hirshberg A, Yarom N. Detection of non-diploid cells in premalignant and malignant oral lesions using combined morphological and FISH analysis—a new method for early detection of suspicious oral lesions. *Cancer Letters* , 2007, 253:282~290.

- [66] Seltzer P, Loewenstein RK, Deborah J. Carroll, Buechler RB. Application of Transepithelial Brush Biopsy for Oral Mucosal Lesions. Otolaryngology- Head and Neck Surgery,2012,2S:145.

附 录

1. 知情同意书

首都医科大学附属北京口腔医院

知情同意书

尊敬的患者：

您将被邀请参加一项临床研究——口腔黏膜脱落细胞在口腔癌早期诊断中的应用研究。请您仔细阅读下列信息，决定是否同意参加本研究，如有不清楚的地方，可向相关医生或研究员咨询。

本研究是首都特色临床医学应用发展项目。研究目的是希望通过检测口腔白斑、扁平苔藓等病变区脱落细胞中 DNA 的含量及 DNA 甲基化情况，研究该方法对口腔癌变早期诊断的可行性，为口腔癌及癌前病变治疗方案的选择、预后评价以及口腔癌的化学预防提供一定的依据。

本研究使用的脱落细胞学检查是一种创伤性小，容易被患者接受的检测方法，已被广泛用于临床，如宫颈癌、膀胱癌、食管癌的早期诊断及癌前病变的检测等。本研究在首都医科大学附属北京口腔医院进行。共有 400 人次与您一同参与该项研究。

研究过程：如果您同意参与这项研究，研究员会登记您的个人信息，对您的口腔状况及病损区做全面的临床检查并记录，同时会拍口内照片以留作档案，然后用经过消毒的牙刷在正常组织与病变交界处刷取脱落细胞。在刷取过程中为了减轻局部刺激会使用表面麻醉剂（丁卡因）。将刷取的细胞送到实验室做相关研究。并立即或一个月内做临床病理检查或手术切除。该项研究持续时间为两年，在手术切除或取病理后要定期复诊，复诊间隔为三个月到半年，若在复诊当中病情有所变化，需要延长观察期限。

受益：您参加该项研究将会得到免费的脱落细胞学检查，包括 DNA 异倍体测定及 DNA 甲基化测定。若我们发现您的样本中存在 DNA 异常，会及时通知您复诊做进一步临床检查和处理。同时您将被告知与自身健康状况有关的任何发

现。若研究结果能证实脱落细胞活检技术对口腔癌及癌前病变有早期诊断的价值、较好的特异性及灵敏度，那将为口腔癌和癌前病变的早期诊断做出贡献，将使大众受益。但手术费用及切取病理的费用需要您自行支付，与此同时您要承担复诊所带来的路费及检查费用。

风险和不适：刷拭细胞活检技术可能会带来轻微的疼痛，口腔黏膜会轻度充血，但在刷取细胞过程中会使用表面麻醉剂来减轻疼痛，不会影响之后的手术及取病理的操作。口腔黏膜的轻度充血会在二到三天内缓解。

医疗记录的公开和保密：有关您的临床及个人资料将记录在病例报告中，只有相关研究人员和有关管理部门可以查阅。在征得您同意之前您的个人隐私信息不会出现在任何公开的研究报告和公开出版物中。请您如实向医生报告自己的健康状况、既往史、家族史，如有隐瞒，可能影响该试验的可信度。

您的数据将被用于科学论文。发表的论文中不会出现您的姓名等个人信息。因法院命令或法律强制要求研究者报告传染性疾病（如肝炎、艾滋病等）的受试者个人信息时，您将会被告知所要透露给该特许机关的信息。

您是否参加此项研究完全出于自愿。您可以不参加或者在研究过程中退出此研究，此时请与研究员或医生联系。如果您不想我们继续使用您的资料，请书面撤销。即使您撤销了研究者使用您资料的批准，您也不能撤除先前递交的资料信息。在研究过程中，您有权利在任何时候提出疑问，并有权利得到相应的解答。

对于以上各项内容，请您详细阅读并完全理解，同意参加该研究，请在知情同意书中签字以示同意。

当受试者不能很好阅读该份文件时，可由代读者或翻译者帮助受试者理解。可由监护人签字。

知情同意签署页

我对此项研究已经了解。我的医师或研究员已就该研究的目的、方法、获益及风险进行了详细说明，对我询问的所有问题也给予了解答。如果我不参加此次研究或者中途退出将不影响我的治疗，也不会受到任何歧视和报复，而且也不会放弃我任何合法的权利。

在此，我自愿参加此项研究。

患者签名：_____

监护人签名：_____

联系电话_____

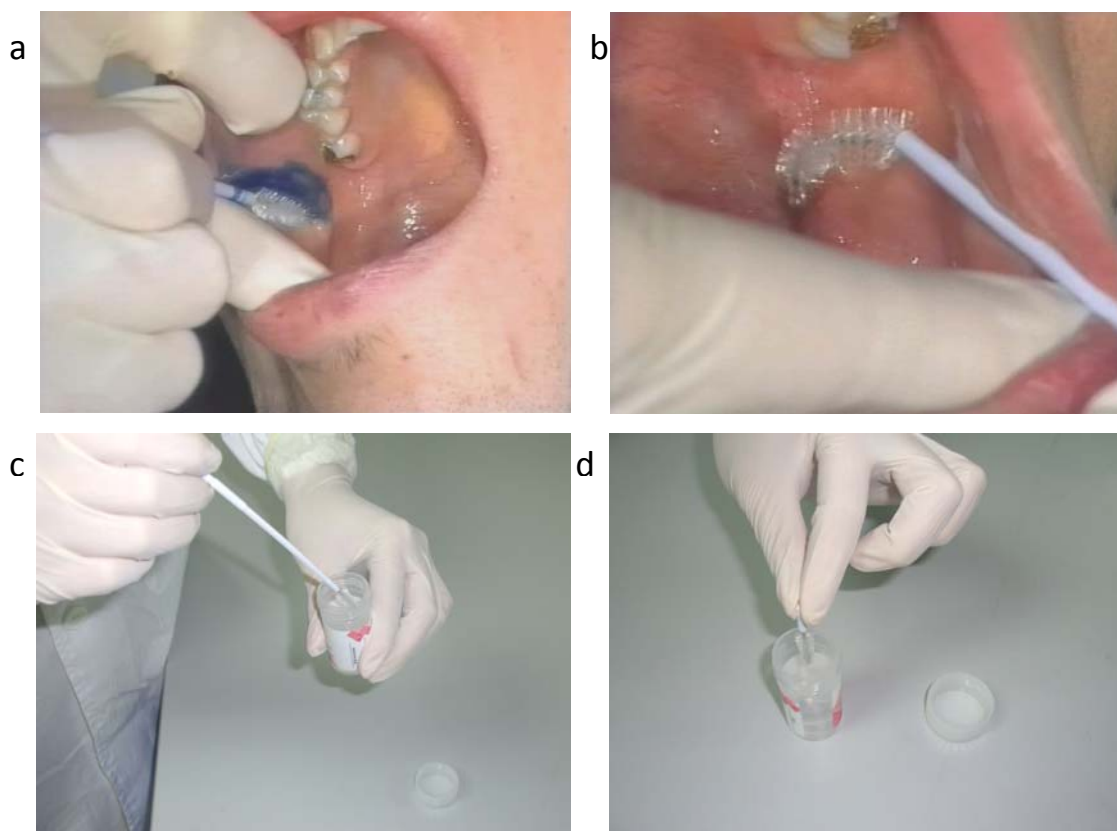
日期：_____

研究人员： 见证了以上过程

联系电话： 日期：

2. 口腔刷取材步骤

- 1 患者在医护人员协助下躺至牙椅上；
- 2 向患者交代刷取脱落细胞的目的，并填写申请单，包括姓名、性别、年龄、籍贯、电话、地址；
- 3 进行病史的询问和常规口腔检查，选取刷取的病变部位；
- 4 让患者用清水漱口 30 s；
- 5 调整好椅位，用低温消毒的口腔刷（Cervibrush）以中等力度，沿同一方向旋转刷拭 10-15 下，如图 a 所示，若取材部位较深或刷毛无法有效接触黏膜，可以先将刷头弯曲成一定角度，然后沿同一个方向刷取黏膜细胞，如图 b 所示；如果病损有触痛者，可以使用表面麻醉剂。



- 6 取完材后，将刷子伸入至标本保存液中，如图 c 所示；然后将刷头用剪刀剪

下，投入保存液中，如图 d 所示，旋紧瓶盖，适当摇晃。手柄丢弃至垃圾桶内；

- 7 在申请单和标本保存液瓶身上贴好标签；填写完整申请单；
- 8 保存：标本常温可保存 1 周，4 ℃可保存 1 月；请放置阴凉避光处保存。

致 谢

衷心感谢我的导师孙正教授，感谢您这两年来对我的培养与教育，您在百忙之中给予了我很多关怀和指导，把我领进口腔黏膜病学这一深奥的领域，并为我的课题倾入了大量心血。孙老师您学识渊博、治学严谨、良好的医德医风，让我看到了医学大家的风采，言传身教，令我由衷的敬佩和感动，您是我学习、生活、工作中的榜样。

真诚感谢张辛燕老师对我课题的悉心指导及论文的修改，是您给予我科研上莫大的动力，是您在我科研迷茫时指引了我方向，培养我坚忍不拔、严谨的科研态度。

真诚感谢病理科刘晓勇主任医师对我课题的悉心指导及病理诊断上的指导和帮助，感谢病理科汤晓飞主任医师、吴鸿儒老师、王风光老师、汪育苗老师对我实验的指导。

真诚感谢实验室宿颖老师对我实验的指导和帮助，使我的课题能够顺利进行。

真诚感谢美国陈晓欣老师对我实验指导和帮助。

真诚感谢厦门麦克奥迪公司及军区总医院麦克奥迪公司的各位老师的指导和帮助，帮助我顺利完成课题。

真诚感谢我的临床带教老师关晓兵老师、葛化冰老师、付洁老师、柏景坪老师、王红健老师及牙周科、黏膜科全体医护老师在临床和生活上给予我的细心指导，帮助我系统的掌握了口腔黏膜常见疾病的诊断和治疗，提高了我的动手能力。

真诚感谢轮转期间带我临床实习的各位医护老师，是您不厌其烦的教诲让我对各科的临床操作有了扎实的掌握。

真诚感谢辅导员曾立荣老师，是您在生活中给予我无限的关心和爱护，让我顺利完成学业。

真诚感谢教办杨凯老师、贾海鸥老师在学习和生活中给予我的关怀和帮助。

真诚感谢王怡娟同学帮我完成刷取口腔黏膜脱落细胞视频的工作；由衷感谢刘艾姝同学、王晓林同学、黄红青同学、任爽同学帮我收集样本；由衷感谢所有支持我实验，并成为正常校正组受试者的同学；由衷感谢我的室友，是你们在我迷茫、低落时给予我关心和勇气，让我顺利渡过每一次坎坷。

真诚感谢蓝爱仙学姐、朱晓茹学姐、赵湘学姐、刘学伟学长、张红利学妹、李冰学妹、李文珺同学在实验上给予我的帮助。

真诚感谢我的同学和朋友在生活上、学习上对我的关心和帮助，鼓励我、支持我，让我的生活充满幸福。

真诚感谢我的家人七年来对我的无私奉献，是他们无私的爱让我顺利完成学业。

衷心感谢所有关心我、帮助我的老师、朋友和家人。

个人简历

姓名	刘瑶
性别	女
民族	汉
出生日期	1987 年 8 月 6 日
籍贯	北京市
政治面貌	预备党员

学习经历

2000 年 9 月-2005 年 7 月	北京师范大学第二附属中学	高中
2005 年 8 月-2010 年 8 月	首都医科大学口腔医学院	本科
2010 年 8 月至今	首都医科大学口腔医学院	硕士研究生

获奖情况

2006~2007	学习优秀二等奖学金、三好学生、2006 年暑期社会实践先进个人
2007~2008	学习优秀二等奖学金
2008~2009	学习优秀一等奖学金、三好学生
2009~2010	学习优秀一等奖学金、三好学生、校级优秀团员
2010~2011	北京市三好学生、学习优秀一等奖学金

参与学术活动

2010.09	参加在北京口腔医院举办的“中西医结合新进展”学习班
2010.10	参加在北京举办的首都国际癌症论坛
2010.12	参加厦门麦克奥迪公司举办的“细胞 DNA 图像定量分析技术”操作使用与维护培训，并考核合格

- 2011.10 参加在南京举办的“中华口腔医学年会”，并担任会务
- 2011.10 参加在北京举办的“第六届世界药物流行病学大会”
- 2011.11 参加在北京口腔医院举办的“细胞诊断学”学习班，并讲解口腔黏膜脱落细胞刷取方法