论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0886-03

人脑星形细胞肿瘤微血管组织芯片的构建

王清良,卞修武,章 容,蒋雪峰 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 制作含有不同微血管形态的人脑星形细胞肿瘤组织芯片,并探讨其在血管生成研究中的应用价值。**方法** 从200例人脑胶质瘤组织标本中选择含有不同类型微血管形态组织36例作为供体组织,经打孔、取样、点样等步骤,制作AstMV组织芯片,并进行CD34、FⅧ-RAg和CD105免疫组化标记,观察微血管形态特点和血管生成活性。**结果** 成功制作出了含有不同微血管形态的组织微阵列(组织芯片)AstMV系列,自行制作了取样及点样定位器具。CD34、FⅧ-RAg及CD105均在微血管内皮细胞膜或(和)细胞质表达,不同的内皮细胞标记物所显示的微血管数有所不同,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级星形细胞肿瘤中CD34、FⅧ-RAg标记的微血管数明显多于CD105标记的微血管数,亦明显多于相应Ⅰ级星形细胞肿瘤标记的微血管数。**结论** 构建不同微血管形态的肿瘤组织芯片在血管生成研究中有重要的应用价值。本研究为进一步构建数字化肿瘤微血管以及研究星形细胞肿瘤微血管与血管生成因子间的数学模型关系奠定了基础。

关键词: 星形细胞肿瘤;组织芯片;血管生成

中图法分类号: R318.04; R322.13; R730.264 **文献标识码**: A

Construction of tissue microarray with astrocytic tumor microvessels of human brain

WANG Qing-liang, BIAN Xiu-wu, ZHANG Rong, JIANG Xue-feng (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct tissue microarray with astrocytic tumor microvessels (AstMV) of human brain and investigate astrocytic tumor angiogenesis. **Methods** Thirty-six specimens containing different microvessels from 200 specimens were selected as donor blocks, which was followed by punching, sampling and seeding samples with tissue microarray apparatus. The tissue microarrays were used to detect the expression of CD34, FⅧ-RAg and CD105. **Results** Tissue microarray of AstMV was successfully constructed and an instrument for location was made. CD34, FⅧ-RAg and CD105 were expressed on endothelial cell membrane or (and) plasma. There were difference in microvessel number between astrocytic tumors and between endothelial markers. In the grade Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ astrocytomas, microvessels labeled by CD34 and FⅧ-RAg antibodies were more than those detected by CD105 antibody. There were number difference in microvessels labeled by CD34 and FⅧ-RAg antibodies between grade Ⅰ and grade Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ tumors. **Conclusion** Construction of tissue microarray containing different tumor microvessels might be of significance in evaluating tumor angiogenesis. This study may be the basis for constructing digital tumor microvessel models and exploring the mathematic relation between astrocytic tumor microvessels and vascular growth factors.

Key words: astrocytic tumor; tissue microarray; angiogenesis

恶性胶质瘤的生长和演进与瘤组织中活跃的血管生成有密切关系[1,2]。因此,深入研究血管生成特性和发生机制对于恶性胶质瘤抗血管生成治疗,有重要意义。组织芯片,又称组织微阵列(tissue microarray),它是将数十个、数百个乃至上千个组织标本按预先的设计整齐地排列在某一载体上而成的微缩组织切片,可同时对几百甚至上千种正常或疾病以及疾病发展不同阶段的组织样本进行研究,并可以与DNA、RNA、蛋白质、抗体等技术相结合,以及与传统的病理学技术、组织化学及免疫组化技术相结合,在基因、基因转录和表达产物生物学功能3个水平上进行研究。因此,组织芯片是基因芯片(gene chip)和蛋白质芯片(pro-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370552)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370552)

作者简介:王清良(1974-),男,四川省富顺县人,硕士,医师,主要从事肿瘤病理及组织芯片方面的研究。电话:(023)68765459

通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247,E-mail: bianxiuwu@263.net

收稿日期:2006-01-27;**修回日期**:2006-03-07

tein chip)的技术补充，它们一起构成了生物芯片(biochips)系列，被誉为医学、生物学领域的一次革命。本研究通过构建含有不同恶性程度星形细胞肿瘤微血管的组织芯片，探讨其微血管密度和血管生成因子表达及其与肿瘤分化程度的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

人脑星形细胞肿瘤标本来源于西南医院脑外科手术标本，共 36 例。为与既往研究有延续性和可比性，肿瘤按 Kernohan 分级，其中Ⅰ级 6 例，Ⅱ级 16 例，Ⅲ级 8 例，Ⅳ级 6 例。另选 6 例非脑疾病死亡尸检脑组织作对照。所用一抗兔抗人 FⅧ-RAg 多克隆抗体、鼠抗人 CD34 单克隆抗体和鼠抗人 CD105 单克隆抗体均来自 Zymed 公司，二抗羊抗兔 Envision™，羊抗鼠 Envision™均来自 Gene 公司，DAB 显色剂来自 Dako 公司。组织芯片仪购自美国 Beecher Instruments 公司。载玻片(上海精轮工业玻璃有限公司)用 1∶10 的多聚赖氨酸溶液处理。

1.2　方法

1.2.1　组织芯片的制作　　在 HE 切片上选择 3 个血管丰富且血管形态特殊的胶质瘤组织区域，对照切片，在石蜡块上进行相应标记。制作受体蜡块，平整蜡块表面，厚度以 1.0～1.2 cm 为宜。把受体蜡块固定在固定槽中，调节 X、Y 轴上微量标尺指示器为零，调节组织芯片仪左边的距离定位螺丝，确定打孔深度为 3 mm，然后向下打孔。移走细针，用粗针对准预先做好的标记，挖取供体组织。由于该芯片仪缺乏进针定位及点样定位相关部件，本研究自行制作了相应简易器具，即：一部分用于挖取供体组织使用，包含 8 个依次相差 0.5 mm 的圆柱体，最短的圆柱体高 2 cm；另一部分为把组织放入受体蜡块时使用，它包含 1 个与打孔深度一样高的圆柱体和 1 个 3 mm 的一侧缺损的中空圆柱体。利用上述器具将粗针里的组织放入受体蜡块的孔中。全部点样完毕，取出组织芯片蜡块，放入 37 ℃烤箱中 15 min。取出后，用载玻片平整蜡块表面，然后按照常规石蜡切片方法进行切片，装盒备用。每隔 10 张切片选 1 张进行 HE 染色。

1.2.2　免疫组化染色及结果判定　　采用 Envision 法进行免疫组化染色。一抗包括 CD34、FⅧ-RAg 和 CD105 抗体。PBS 替代一抗作空白对照，正常脑组织作正常对照。CD34、FⅧ-RAg 及 CD105 阳性染色以内皮细胞膜或(和)细胞质内的棕黄色染色为准。

1.2.3　微血管计数　　对染 CD34、FⅧ-RAg 和 CD105 抗体的组织芯片上的每一点(直径 0.6 mm，面积大约为 0.283 mm^2)上的微血管进行分别计数，同一标本的每点微血管数取 3 点的平均值。

1.3　统计学方法

计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据进行有重复双因素方差分析。

2　结果

2.1　组织芯片构建情况

成功构建了含有 108 个点的星形细胞肿瘤组织的微阵列蜡块，由此切片得到连续的星形细胞肿瘤微血管组织芯片(图 1)。该芯片各点排列整齐，目标点清晰，部分芯片无任何一点组织脱落，完整率达(98.2 ± 1.8)%。各点组织的形态结构均有很好的代表性，能反映原病理切片的结构特点，并含有相应的典型的新生微血管结构。

组织芯片中的微血管形态的主要表现形式有：①内皮细胞呈索状排列，形成原始、幼稚的微血管；②厚壁微血管；③微血管呈“肾小球样”结构；④管腔大的薄壁微血管，形成血管心假菊形团结构。

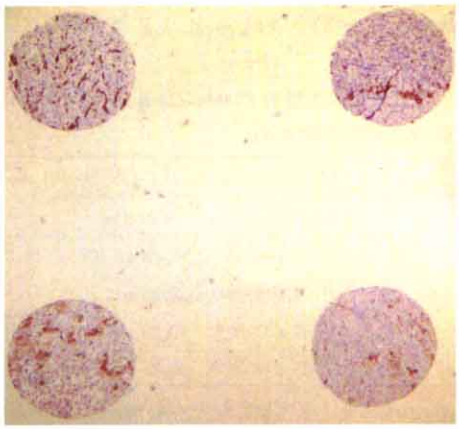
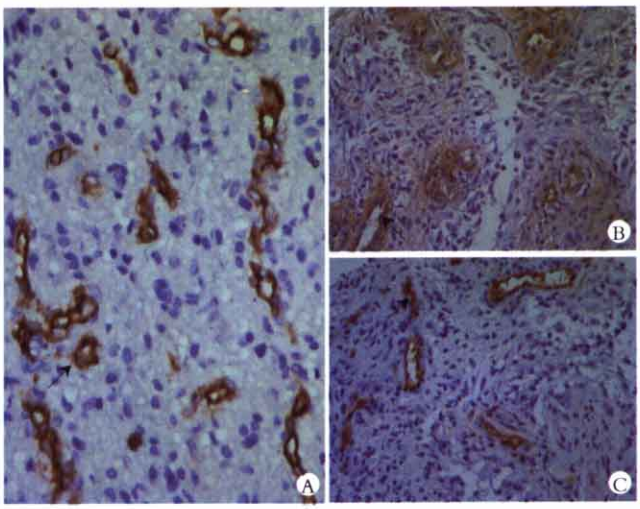


图 1　组织芯片　(IHC ×40)

2.2　免疫组化结果

2.2.1　CD34、FⅧ-RAg、CD105 染色结果　　抗 CD34、FⅧ-RAg、CD105 抗体均能显示出星形细胞肿瘤的微血管(图 2)。它们主要表达于内皮细胞的细胞质内，呈棕黄色。内皮细胞呈梭形，细胞质较丰富，核卵圆形、短梭形，染色质较均匀，单个或多个内皮细胞围在一起，形成了肿瘤的微血管。



A：CD34；B：FⅧ-RAg；C：CD105

图 2　组织芯片上各抗体标记的微血管情况　3 种抗体均能很好地显示肿瘤微血管(箭头)　(IHC ×400)

2.2.2　微血管密度计数及统计分析　　对各级星形细胞肿瘤

中用不同的标记物标记的平均每点的微血管数目进行统计，并分类整理，实验数据用有重复双因素方差分析，结果如表1。在星形细胞肿瘤Ⅰ级，CD34 、FⅧ-RAg 和 CD105 三种抗体检测的微血管数在统计学上无明显差别；在星形细胞肿瘤Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级，CD34 、FⅧ-RAg 标记的微血管数在各级明显多于 CD105 标记的微血管数，两者分别与 CD105 相比，相差非常显著（$P<0.01$）；对于 CD34、FⅧ-RAg，星形细胞肿瘤Ⅰ级与星形细胞肿瘤Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ各级的微血管数相比，相差非常显著（$P<0.01$）；对于 CD105，各级别星形细胞肿瘤间标记出来的微血管数，在统计学上无显著差异（$P>0.05$）。CD34 和 FⅧ-RAg 在各级别星形细胞肿瘤间标记的微血管数相比，无显著差异（$P>0.05$）。

表1 不同级别星形细胞肿瘤 CD34、FⅧ-RAg、CD105 标记的微血管数情况及统计值（$\bar{x}\pm s$）

肿瘤分级	n	不同抗体每点显示的血管（0.283 mm^2/点）		
		CD34	FⅧ-RAg	CD105
Ⅰ	6	20.75±6.03	17.58±5.07	9.83±5.49
Ⅱ	16	41.92±14.78[ab]	38.83±13.97[ab]	11.17±9.12
Ⅲ	8	48.42±22.36[ab]	40.00±7.24[ab]	14.25±2.79
Ⅳ	6	55.42±17.06[ab]	41.25±5.98[ab]	15.00±10.79

a：$P<0.01$，与Ⅰ级比较；b：$P<0.01$，与 CD105 比较

3 讨论

组织芯片由 Kononen 等[3]于1998年率先报道，其后得到了广泛的应用，研究内容包括膀胱移行细胞癌[4]、结直肠癌[5]、肺癌[6]等，而胶质瘤方面的研究较少[7]。国内在2000年开始报道有关组织芯片方面的应用，其内容主要包括肝癌[8]、胃癌[9]、结直肠癌等。星形细胞肿瘤是人脑最常见的肿瘤，其恶性程度不同，其血管增生程度及相关蛋白的表达也有差异。胶质瘤组织中瘤细胞散在分布，分布的均一性较好，间质成分少，不同区域差异性较癌组织小，所以很适合进行组织芯片的制作。因此，有必要收集大量的标本来做组织芯片，进行更好地研究。

本实验用组织芯片技术对星形细胞肿瘤微血管进行了分析。由实验结果可以看出，不同级别的星形细胞肿瘤，其微血管密度是不同的；而且，对于不同的标记物，观测到的微血管数也是不同的。在星形细胞肿瘤Ⅰ级，CD34 、FⅧ-RAg 和 CD105 三种抗体检测的微血管数在统计学上无明显差别；在星形细胞肿瘤Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级，CD34 、FⅧ-RAg 标记的微血管数在各级明显多于 CD105 标记的微血管数；对于 CD34 、FⅧ-RAg，星形细胞肿瘤Ⅰ级与星形细胞肿瘤Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ各级的微血管数相比，具有明显差异；对于 CD105，各级别星形细胞肿瘤间标记的微血管数在统计学上无显著差异。因此，研究星形细胞肿瘤微血管增生情况以及其分级，最好选用 CD34 和 FⅧ-RAg 这两种抗体；同时由于 CD34 和 FⅧ-RAg 在各级别星形细胞肿瘤间标记的微血管数无显著差异，因此，二者任选其一即可。这与用传统切片得到的研究结果基本符合，表明组织芯片在肿瘤血管生成等研究方面有很好的应用性和重复性。至于三者在星形细胞肿瘤微血管内皮细胞上表达存在差异的具体原因，还需要进行更进一步的研究。

星形胶质细胞瘤微血管组织芯片的成功构建，对今后构建数字化肿瘤微血管以及研究星形细胞肿瘤微血管与血管生成因子间的数学模型关系具有重要的意义。通过连续切片，同时对星形细胞肿瘤组织芯片上各种微血管进行标记，然后进行三维重建，则可重建出各种微血管的立体形态结构。同时，对血管周围的各种血管生成因子的浓度梯度进行重建，可观测其与新生血管的关系，从而探讨其在血管生成中的意义。这些结果最终将为进一步研究肿瘤微血管与血管生成因子间的数学模型关系奠定基础。

参考文献：

[1] BIAN X W, DU L L, SHI J Q, *et al*. Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000, 22(3): 267-274.

[2] 卞修武. 血管生成、治疗性血管生成和抗血管生成[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 249-250.

[3] KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, *et al*. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. Nat Med, 1998, 4(7): 844-847.

[4] VISAPAA H, SELIGSON D, EEVA M, *et al*. 8q24 amplification in transitional cell carcinoma of bladder[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2003, 11(1): 33-36.

[5] JOURDAN F, SEBBAGH N, COMPERAT E, *et al*. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression [J]. Virchows Arch, 2003, 443(2): 115-121.

[6] TAN D, LI Q, DEEB G, *et al*. Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study[J]. Hum Pathol, 2003, 34(6): 597-604.

[7] WANG H, WANG H, SHEN W, *et al*. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes[J]. Cancer Res, 2003, 63(15): 4315-4321.

[8] 刘 凯,何 煦,赵连三,等. 利用组织芯片研究 Rb 基因在原发性肝细胞肝癌中的表达[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2002, 9(3): 177-179.

[9] 张 霁,王 怡,寿成超,等. 利用生物芯片技术探讨支原体与胃癌的关系[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(14): 961-965.

（编辑 汪勤俭）