nisms and inotropic action in disease [J]. Hypertension, 2009, 54 (3): 598 - 604.
[4] 龚永生,范小芳,高钰琪, 等. 缺氧致大鼠心肺组织中 apelin 的表达降低[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1188 - 1190.
[5] Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, *et al*. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 26274 - 26279.
[6] Kalea A Z, Batlle D. Apelin and ACE2 in cardiovascular disease[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2010, 11(3): 273 - 282.
[7] Azizi M, Iturrioz X, Blanchard A, *et al*. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5): 1015 - 1024.
[8] Jia Y X, Lu Z F, Zhang J, *et al*. Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas [J]. Peptides, 2007, 28(10): 2023 - 2029.
[9] Adamczak M, Wiecek A, Funahashi T, *et al*. Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension[J]. Am J Hypertens, 2003, 16(1): 72 - 75.

(收稿:2010-11-03;修回:2010-11-29)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2011)11-1199-03

短篇论著

双重免疫组化技术检测乳腺癌 STAT5 和 ER 相关表达的意义

刘华庆[1],匡晓燕[2] (563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院病理科[1];563002 贵州 遵义,遵义医药高等专科学校病理教研室[2])

【摘要】 **目的** 优化双重免疫组织化学技术,检测乳腺癌中 STAT5 和 ER 蛋白表达的相关性,并分析两者联合检测在乳腺癌治疗方案的制定及预后评估中的参考意义。**方法** 用不同染色顺序优化双重免疫组织化学技术,并用优化的方法检测 50 例乳腺癌组织中 STAT5 和 ER 蛋白的共表达。**结果** 染色顺序为 STAT5→NBT/BCIP 显色→ER→DAB 显色者阳性对比明显,双标记效果理想;乳腺癌肿瘤细胞 STAT5-ER 双标记阳性率、ER 单标记阳性率均高于 STAT5 单标记阳性率,差异有显著性($P<0.05$),而双标记阳性率和 ER 单标记阳性率比较无显著性差异。**结论** 应用优化的双重免疫组织化学技术检测乳腺癌组织中 STAT5 和 ER 的相关表达,有助于指导临床预测乳腺癌的内分泌治疗反应及其预后。

【关键词】 双重免疫组织化学;乳腺癌;STAT5;ER
【中图法分类号】 R730.43;R737.9 **【文献标志码】** A

多种生物标记物的异常表达在乳腺癌的发生、演进中具有重要作用,如 ER、PR、HER2、Ki-67、P53、nm23 等。本研究应用优化的双重免疫组织化学技术,检测乳腺癌组织中信号转导子和转录激活子 5(signal transducers and activator of transcription-5, STAT5)和 ER 蛋白的共表达,为重要肿瘤标记物的检测提供有效的技术手段,并为乳腺癌临床病情评估、预后判断及用药提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 标本及实验材料

50 例原发性乳腺浸润性导管癌石蜡包埋组织,均取自 2010 年 1 月 - 2010 年 6 月遵义医学院附属医院病理科临床送检标本。STAT5 兔抗人多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司进口产品,ER(SP1)兔抗人单克隆抗体以及双染检测试剂盒、DAB 显色剂、NBT/BCIP 显色剂购于北京中杉金桥公司。

1.2 双重免疫组织化学染色

石蜡切片 4 μm,脱蜡至水洗,高压抗原修复,冷却后水洗,3% H_2O_2 10 min,PBS 洗 3 次 ×5 min;分别加一抗 ER(1∶100)、STAT5(1∶100)。预实验将切片分 4 组:①加 ER→DAB 显色→STAT5→NBT/BCIP 显色;②加 ER→NBT/BCIP 显色→STAT5→DAB 显色;③加 STAT5→DAB 显色→ER→NBT/BCIP 显色;④加 STAT5→NBT/BCIP 显色→ER→DAB 显色。镜下控制显色,水洗;常规脱水、透明、封固。预实验成功后,选用最佳结果的 1 组大批实验,用已知阳性的乳腺癌标本作阳性对照,用 PBS 代替一抗作空白对照。两个指标还需分别单独做免疫组织化学,即抗原修复后的切片分别加 ER/STAT5→二抗→DAB 显色。

1.3 阳性结果判断

双重免疫组织化学染色可观察到 3 种不同着色特征的细胞[1]:仅 STAT5 阳性即 S 型,细胞核呈蓝黑色;仅 ER 阳性即 E 型,细胞核呈棕黄色;STAT5-ER 共表达阳性即 SE 型,细胞核呈黄蓝色。每张切片在高倍镜(400 ×)下选择 5 个代表性视野,各视野观察 100 个肿瘤细胞,双标记阳性细胞百分数即计 SE 型细胞所占比率。SE 型细胞所占百分比 < 25% 为双标记阴性(-),25% ~50% 为双标记弱阳性(+),51% ~75% 为双标记中度阳性(++),> 75% 为双标记强阳性(+++)[2]。单标记染色 STAT5 和 ER 阳性位于细胞核呈棕黄色,阳性细胞所占的比率即为 STAT5、ER 蛋白表达阳性细胞百分数。以阳性细胞所占百分比 < 5% 为阴性或(-),5% ~25% 为弱阳性(+),26% ~75% 为阳性(++),> 75% 为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件进行 χ^2 检验,α 取 0.05。

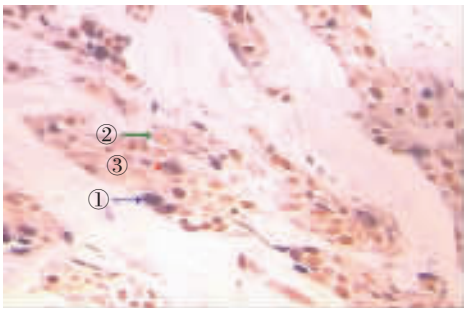
2 结果

①组 ER 棕黄色阳性被 STAT5 蓝黑色覆盖,双标记对比不明显;②组 ER 阳性蓝黑色较强,STAT5 棕黄色偏弱,两者对比不明显;③组 STAT5 阳性棕黄色被 ER 阳性蓝黑色覆盖,双标

【通信作者】 刘华庆,电话(0852)8608053,Email:liuhuaqing818@163.com

记对比不明显；④组 STAT5 阳性蓝黑色与 ER 棕黄色阳性对比明显，双标记效果理想。

双重免疫组织化学染色结果镜下观，见 3 种阳性显色的肿瘤细胞，分别为 STAT5 阳性表达位于细胞核，呈蓝黑色；ER 阳性表达位于细胞核，呈棕黄色；STAT5-ER 双标记阳性则同一细胞中胞核呈黄蓝色（图 1）。



① S 型癌细胞核呈蓝黑色，仅 STAT5 阳性表达；② E 型癌细胞核呈棕黄色，仅 ER 阳性表达；③ SE 型癌细胞核呈黄蓝色，STAT5-ER 双标阳性表达

图 1 乳腺癌细胞 STAT5-ER 双重免疫组化表达 （双重 IHC 染色 ×400）

50 例乳腺癌组织中双标记阳性表达 13 例（26.0%），STAT5、ER 单标记阳性表达分别为 4 例（8.0%）、14 例（28.0%）。双标记阳性率和 ER 单标记阳性率均高于 STAT5 单标记阳性率，差异有显著性（$\chi^2 = 5.741$、$P = 0.017$；$\chi^2 = 6.775$、$P = 0.009$），而双标记阳性率和 ER 单标记阳性率比较无显著性差异（$\chi^2 = 0.051$、$P = 0.822$）（表 1）。

表 1 乳腺癌中 STAT5-ER 双重免疫组织化学的表达（$n = 50$）

表达指标	阳性表达情况			
	+	++	+++	合计（%）
STAT5 单表达	0	3	1	4（8.0%）
ER 单表达	2	8	4	14（28.0%）
STAT5-ER 双表达	3	7	3	13（26.0%）

3 讨论

STAT 的组成性活化可刺激细胞增殖、阻止细胞凋亡，与多种肿瘤的发病机制相关[3]。近年来某些国内外研究[4-5]相继报道 STAT5 在乳腺上皮细胞增生、分化及恶性转化中的重要作用。Fox 等[6]研究发现，乳腺癌细胞中存在 STAT5 与 ER、ERFR 之间的信号整合作用。E2 通过 ER 刺激 STAT5 介导的磷酸化和转录，而 E2 诱导的 STAT5 转录活化又需要 EGFR 激酶活化。Yamashita 等[7]报道乳腺癌中 STAT5 表达程度与 ER 和 PR 表达程度、癌组织分化程度正相关，且 ER 阳性乳腺癌中，STAT5 阳性组的内分泌治疗有效率、复发后治疗生存率均显著高于 STAT5 阴性组。Walker 等[8]发现乳腺癌中 STAT5 对 STAT3 具有显性效应作用。另有[9-10]报道乳腺癌的发病机制也涉及催乳素（PRL）及其受体（PRLr）关联的 JAK2/STAT5 信号传导活化。

以上研究结果均显示乳腺癌中 STAT5 与 ER、PR 信号传导途径之间存在重要关联，与激素依赖性乳腺癌的发生、发展密切相关，STAT5 可作为乳腺癌辅助诊断、预测预后，以及选择治疗靶向的重要指标。

目前 ER、PR 和 HER-2 已成为乳腺癌患者选择化疗方案的 3 项常规参考指标，ER、PR（+）是预测内分泌疗效的重要依据。然而，ER（+）患者应用内分泌治疗的有效率为 50% ~60%[11]，相当一部分 ER 和 PR 高水平表达的乳腺癌患者对内分泌治疗无反应。仅以 ER、PR 的表达水平作为判断乳腺癌内分泌疗效及预后的指标，有局限性，联合检测 STAT5 更利于临床筛选内分泌治疗敏感的病例，制定优化的个体化治疗方案。

本研究设计应用优化的双重 IHC 技术，检测乳腺浸润性导管癌中 STAT5 和 ER 蛋白的共表达。STAT5-ER 双标记阳性表示对三苯氧胺和芳香化酶抑制剂等内分泌疗效肯定，STAT5 单标记阳性可考虑选择酪氨酸激酶抑制剂针对 STAT 途径靶向治疗[12]，ER 单标记阳性者后续其他检测指标和相应治疗方案。

双重免疫组织化学能在同一张切片上同时显示 2 种抗原，有助于了解两种蛋白分子表达、转运或代谢途径的相关性[7]。在进行双重免疫组织化学染色之前，每种抗体须先单独做实验，摸索各种抗体的抗原修复条件、抗体稀释浓度及孵育时间；观察抗原定位、着色深浅以及阳性率[13]。在石蜡切片上使用时必须注意：不是任意 2 个抗体都能在同一组织中定位，必须考虑所选择的 2 个抗体的修复方法应该一致或 1 个抗体的修复对另一个抗体的染色结果没有影响。本实验中 STAT5 和 ER 都需用高压修复，这保证了抗原修复的一致性，使结果准确可靠。

本实验对双重免疫组织化学技术进行了摸索优化。在预实验中，若先用 DAB 显色，后用 NBT/BCIP 显色，则棕黄色易转为灰黑色，与 NBT/BCIP 的蓝黑色产物相混淆，降低对比度；先做 ER，后做 STAT5 对比也不明显。所以先做 STAT5，用 NBT/BCIP 显色后再做 ER，用 DAB 显色，这样乳腺癌肿瘤细胞 STAT5 阳性呈蓝黑色，ER 阳性呈棕黄色，STAT5 和 ER 共同阳性细胞呈黄蓝色，对比明显。

本实验应用优化的双重免疫组织化学技术，检测 50 例原发性乳腺浸润性导管癌中 STAT5 和 ER 蛋白表达的相关性。结果显示，双标记共表达的阳性率显著高于 STAT5 单标记阳性率，也验证了 STAT5 和 ER 在乳腺癌中活化表达的正相关性。而 ER 单标记阳性率也显著高于 STAT5 单标记阳性率，且与 STAT5-ER 双标记阳性率比较无显著差异，这也提示在乳腺癌的发病机制中，除 STAT5 以外，还存在其他作用于 ER 信号途径的复杂分子机制，有待全面、深入的研究。

参考文献：

[1] 黄阗，何韶衡，李明才，等. 应用双重免疫组化技术研究肥大细胞亚

型与食管癌的相关性[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(15): 881 - 883.
[2] 李孟圈, 刘娟娟, 李靖若, 等. mTOR 在乳腺癌发生发展中的作用及其与 C-erbB-2 的关系[J]. 山东医药, 2009, 49(13): 59 - 61.
[3] Quesnelle K M, Boehm A L, Grandis J R. STAT-mediated EGFR signaling in cancer[J]. J Cell Biochem, 2007, 102(2): 311 - 319.
[4] Barash I. Stat5 in the mammary gland: controlling normal development and cancer[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(2): 305 - 313.
[5] 张秀忠, 任泽强, 张静. STAT5 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(7): 444 - 447.
[6] Fox E M, Bernaciak T M, Wen J, *et al*. Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(8): 1781 - 1796.
[7] Yamashita H, Nishio M, Ando Y, *et al*. Stat5 expression predicts response to endocrine therapy and improves survival in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(3): 885 - 893.
[8] Walker S R, Nelson E A, Zou L, *et al*. Reciprocal effects of STAT5 and STAT3 in breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(6): 966 - 976.
[9] Fang F, Rycyzyn M A, Clevenger C V. Role of c-Myb during prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5a signaling in breast cancer cells[J]. Endocrinology, 2009, 150(4): 1597 - 1606.
[10] Galbaugh T, Feeney Y B, Clevenger C V. Prolactin receptor-integrin cross-talk mediated by SIRPα in breast cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(10): 1413 - 1424.
[11] 王雅杰. ER、PR 和 HER-2 与乳腺癌个体化治疗[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(2): 97 - 100.
[12] Silva C M, Shupnik M A. Integration of steroid and growth factor pathways in breast cancer: focus on signal transducers and activators of transcription and their potential role in resistance[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(7): 1499 - 1512.
[13] 戴艳枝, 刘勇, 杨梅青. P504S/P63 免疫组化双标记法对前列腺疾病的诊断意义[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(1): 76, 84.

(收稿: 2010-11-02 修回: 2011-01-04)
(编辑 邓强庭)

文章编号: 1000-5404(2011)11-1201-02

短篇论著

10 例原发性气管肿瘤临床分析

陈爱平[1,2], 黄光武[1], 苏纪平[1] (530021 南宁, 广西医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科; 257000 山东 东营, 胜利油田中心医院耳鼻咽喉科[2])

【摘要】 目的 回顾性分析 10 例原发性气管肿瘤患者的临床资料, 总结原发性气管肿瘤的临床诊疗经验。**方法** 回顾性分析 2001 年 1 月 - 2006 年 12 月在我院住院治疗的 10 例原发性气管肿瘤患者的临床资料。年龄 2 ~ 75 岁, 平均 41.5 岁。良性肿瘤 3 例(乳头状瘤 2 例, 平滑肌瘤 1 例), 恶性肿瘤 7 例(鳞状细胞癌 3 例, 腺样囊性癌 2 例, 黏液表皮样癌和腺鳞癌各 1 例)。气管袖状切除端端吻合 5 例, 内镜下肿瘤切除 4 例, 单纯放射治疗 1 例。**结果** 5 例行气管袖状切除, 均顺利完成手术。2 例儿童气乳头状瘤行硬性气管镜下切除肿瘤, 术后均复发。2 例恶性肿瘤行软性支气管镜高频电刀电切术。1 例鳞癌经单纯放射治疗后呼吸困难缓解。**结论** 手术治疗是气管肿瘤的首选治疗, 气管袖状切除 + 端端吻合术式可靠, 术后并发症少。

【关键词】 气管肿瘤; 临床表现; 诊断; 手术; 放疗
【中图法分类号】 R734.1
【文献标志码】 A

原发性气管肿瘤指发生于环状软骨以下和气管隆突以上的肿瘤。原发性气管肿瘤罕见, 气管肿瘤占上呼吸道肿瘤 2%[1]。该病发生部位隐蔽, 缺乏特异性表现, 早期漏诊率和误诊率相当高。广西医科大学第一附属医院 2001 年 1 月 - 2006 年 12 月收治了 10 例原发性气管肿瘤临床资料, 现回顾性分析并报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

10 例原发性气管肿瘤患者中, 男性 6 例, 女性 4 例。年龄 2 ~ 75 岁, 平均 41.5 岁。良性肿瘤 3 例(乳头状瘤 2 例, 平滑肌瘤 1 例。恶性肿瘤 7 例(鳞状细胞癌 3 例, 腺样囊性癌 2 例, 黏液表皮样癌和腺鳞癌各 1 例。临床表现为气短、呼吸困难 9 例, 咳嗽 7 例, 咳痰 6 例, 痰中血丝 4 例, 胸痛 3 例, 声音嘶哑 2 例, 呛咳 1 例。

1.2 诊断和治疗方法

气管镜检查 9 例, CT 检查 7 例, 胸片检查 5 例。气管袖状切除端端吻合 5 例, 所有恶性肿瘤术后均给予放疗。内镜下肿瘤切除 4 例, 单纯放射治疗 1 例。

2 结果

5 例曾被误诊, 误诊为支气管炎 3 例, 误诊为支气管异物、哮喘各 1 例, 误诊率为 50%, 误诊时间 1 ~ 14 个月。气管镜检查 9 例, 均证实气管肿瘤诊断。CT 检查 7 例, 有 1 例气管隆突处肿瘤漏诊。胸片检查 5 例, 4 例漏诊。5 例行气管袖状切除, 切除后气管缺损长度 3 ~ 5 cm, 均顺利完成一期无张力气管端端吻合。术后并发喉返神经牵拉损伤 1 例、吻合口肉芽增生 1 例。2 例儿童气管内乳头状瘤行硬性气管镜下切除乳头状瘤,

【通信作者】 黄光武, E-mail: hgw1288@yahoo.com.cn