维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0264-03

大肠癌组织蛋白酶B表达及其与肿瘤微血管密度和生物学行为的关系

林 晓，王娅兰
（重庆医科大学基础医学院病理教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨不同类型大肠癌组织蛋白酶B（Cathepsin B ,CB）表达及其与肿瘤微血管密度（microvessel density，MVD）和生物学行为的关系。方法：采用免疫组化方法对47例不同类型大肠癌CB及MVD进行半定量和定量研究。结果：CB在大肠癌粘液性癌表达高于非粘液性癌，差别具显著性（$P<0.05$），CB强阳性组MVD值高于阴性组，二者具有显著差异（$P<0.05$）。大肠癌CB表达与淋巴结转移关系密切（$P<0.05$）。结论：结果提示，大肠癌CB表达与MVD值和肿瘤浸润转移有关，CB在粘液性大肠癌浸润转移中作用可能更为重要。

【关键词】大肠癌；组织蛋白酶B；浸润转移；血管生成；免疫组织化学
【中国图书分类法分类号】R 735.35 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-12-12

Cathepsin B expression and its relationship with microvessel density and biological behaviour in colorectal cancer

LIN Xiao, et al
(Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To discuss cathepsin B(CB) expression in colorectal cancer and its relationship with microvessel density (MVD) and biological behaviour. *Methods*: CB and MVD was detected by method of immunohistochemistry with ration and half-ration in 47 cases of colorectal cancer. *Results*: The prevalence of CB positive in mucinous colorectal carcinoma was significantly higher than that in non-mucinous colorectal carcinoma. There were also significant differences between mucinous colorectal carcinoma and non-mucinus colorectal cacinoma($P<0.05$). The quantity of MVD in the group with CB strong positive was greater than that in the group with CB negative . There were also significant differences between them ($P<0.05$). *Conclusion*: The results suggest that CB expression has corelation with MVD, invasion and metastasis in colorectal carcinoma. CB may be more important in the invasion and metastasis of mucinous colorectal carcinoma .

【Key words】Colorectal cancer; Cathepsin B;

恶性肿瘤细胞分泌多种水解酶，在其浸润转移过程中起着非常重要的作用。我们以往研究表明，大肠癌浸润转移与组织蛋白酶D有关，但在粘液性癌与非粘液性癌比较时，二者表达组织蛋白D差异无显著性，提示粘液性癌较非粘液性癌更易浸润转移尚存在其他作用更为密切的因素。组织蛋白酶B（Cathepsin B,CB）属溶酶体酶，可降解基底膜及细胞外基质成分，促进肿瘤的浸润和转移，而新生血管的形成，则为肿瘤浸润和转移提供了必要条件。CB在多种肿瘤中表达增强，与肿瘤浸润转移关系密切，国外文献报道较多，国内报道则甚少，仅在胃癌中有报道。而CB与粘液性大肠癌浸润转移的关系，国内外均未见文献报道。本研究采用免疫组化方法，对不同类型大肠癌（粘液性和非粘液性）CB表达进行了对比观察，同时，用CD34标记肿瘤微血管，观察CB与大肠癌微血管密度的关系，以探讨CB在粘液性大肠癌浸润转移中的作用。

作者介绍：林 晓（1972- ），女，实验师。
主要研究方向：肿瘤病理。

1 材料和方法

1.1 检测对象

选择1994 ~ 1995年手术切除大肠癌标本47例，其中粘液性大肠癌（包括印戒细胞癌，粘液腺癌）17例，非粘液性大肠癌30例；伴淋巴结转移者34例，无淋巴结转移者13例；（病理组织分型参照symonds等[1]方法）。取切端粘膜10例作对照。标本经10%甲醛溶液固定，石蜡包埋备用。

1.2 免疫组化试剂

兔抗人Cathepsin B抗体（即用型）购自博士德生物试剂公司；鼠抗人CD_{34}抗体（即用型）购自福州迈新生物技术

维普资讯 http://www.cqvip.com

公司。

1.3 免疫组化方法 按试剂说明书进行。

1.4 结果判断

CB，阳性颗粒呈棕色，位于细胞胞浆内。CB阳性结果判断标准参照shimizu[2]方法稍作修改。阳性细胞数：无阳性细胞染色=0，<1/3细胞染色=1，多灶性(<2/3细胞）染色=2，弥漫性(>2/3细胞)染色=3；染色阳性程度：无着色=0，强染色=2，中度染色（间于0-2之间）=1；将前述二者分值相加，则为最后结果。即0为（-），2为（+），3为（++），4为（+++）。>（+）者为阳性。MVD：凡染色棕色，明显与微血管分开的内皮细胞或内皮细胞簇均可视为单个微血管，先在低倍镜下（40×倍）找出3个微血管最丰富区（热点区），在（200×倍）下各计数1个视野，取其数值最高者代表该标本的MVD计数。管腔内径大于8个红细胞或有较厚肌层的血管不予计数[3]。

1.5 统计学方法

用SAS-system 统计软件进行统计学处理。

2 结 果

2.1 CB表达

2.1.1 对照组 大肠粘膜上皮细胞CB呈弱阳性，其均匀分布于柱状上皮近腔面胞浆。间质内巨噬细胞CB 强阳性，血管内皮细胞及成纤维细胞未见明确CB阳性。

2.1.2 大肠癌 粘液性癌（包括粘液腺癌，印戒细胞癌）CB阳性率为88.24%（15/17），癌细胞显示CB不同程度阳性，弥漫性胞浆着色（见图1），部分细胞有胞浆顶部浓集现象。印戒细胞癌肿瘤细胞染色最强（见图2）。粘液湖CB呈强弱不等的阳性，尤其以印戒细胞周围为甚（见图3）。非粘液性癌CB 阳性率为66.67%（20/30），分布于细胞浆。二者经统计学处理，具有显著性差异（秩和检验，U值=2.0068，$P<0.05$）（见表1）。



图1 粘液腺癌 癌细胞显示CB不同程度阳性，弥漫性胞浆着色免疫组化 ABC 染色 10×10 倍

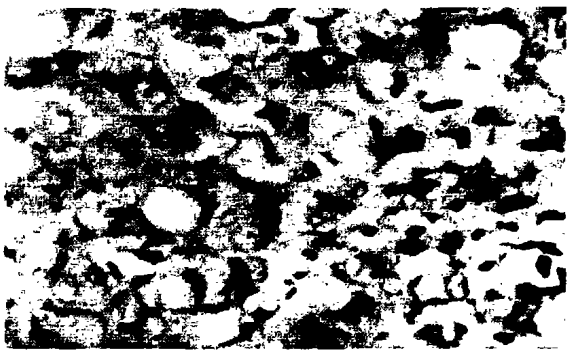


图2 印戒细胞癌 癌细胞显示CB强阳性免疫组化 ABC 染色 10×40 倍

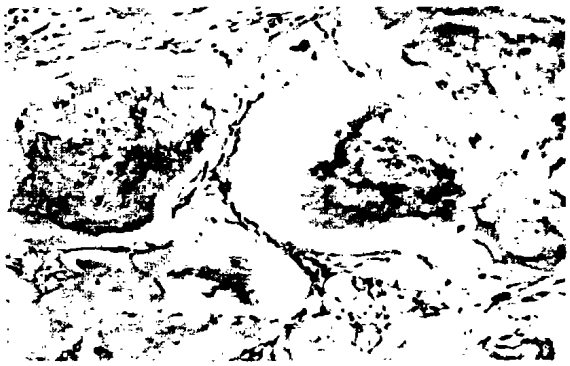


图3 印戒细胞癌 显示粘液湖内CB不同程度阳性，尤以印戒细胞周围为著 免疫组化 ABC 染色 10×10 倍

表1 粘液性、非粘液性大肠癌CB表达

临床病理学类型	-	CB+	++-+++	P
粘液性癌	2	7	8	<0.05
非粘液性癌	10	13	7	

2.1.3 部分与肿瘤组织临近的正常上皮细胞显示较肿瘤细胞本身更强的CB表达，肿瘤间质内巨噬细胞、成纤维细胞、部分血管内皮细胞亦呈阳性。

2.2 CB表达与淋巴结转移关系

伴淋巴结转移者 CB 阳性率为82.35 (28/34)，无淋巴结转移者 CB 阳性率为53.84（7/13）（见表2），二者经统计学处理，差异具有显著性（x^2检验，$x^2=4.01$，$P<0.05$）。

2.3 微血管密度（MVD）

2.3.1 CD34染色 呈单个内皮细胞/内皮细胞簇，肿瘤边缘间质内血管尤为密集。

2.3.2 伴淋巴结转移者MVD值高于无淋巴结转移者，经统计学处理二者具有显著性差异（t 检验，$t=3.18$，$P<0.01$）（见表2）。

2.4 CB表达与MVD值关系 随着 CB 表达的增强，MVD值增高，但仅CB阴性组与强阳性组二者

维普资讯 http://www.cqvip.com

差异具显著性（$P<0.05$）（见表3）。

表2 大肠癌局部淋巴结转移CB表达及MVD值

局部淋巴结转移	MVD($\bar{x}\pm s$)	CB表达		P
		−	+	
有	41.38 ± 14.75	6	28	<0.05*
无	65.79 ± 27.96	6	7	<0.01**

注：*:有无局部淋巴结转移大肠癌原发灶CB表达（χ^2检验 $\chi^2=4.01$，$P<0.05$）

**：有无局部淋巴结转移大肠癌原发灶MVD值（t检验 $t=3.87$ $P=0.004$）

表3 CB表达与MVD值

CB表达	MVD值	P
阴性	43.58 ± 16.44	>0.05*
弱阳性	57.55 ± 28.09	>0.05**
强阳性	73.40 ± 26.77	<0.05***

注：*： 阴性组与弱阳性组两两比较（q检验）

**：弱阳性组与强阳性组两两比较

***： 阴性组与强阳性组两两比较

3 讨 论

CB是一种溶酶体蛋白酶，存在于巨噬细胞及多种细胞溶酶体内，如乳腺、肝、肺、脾、肾等，其具肽链端解酶（exopeptidase）及肽链内切酶（endopeptidase）活性，参与多种蛋白成分的降解。我们在实验中亦观察到，对照组大肠粘膜间质巨噬细胞CB阳性，上皮细胞中亦存在CB，其均匀分布于柱状上皮近腔面胞浆，此结果与文献[4]报道一致。这可能与在前列腺、乳腺一样，其与细胞凋亡有关[5]。而恶性肿瘤时，其异常表达，并与肿瘤浸润有关。对此，国外文献报道较多，如乳腺癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、肺癌[5~7]。但在国内研究甚少，仅有其在胃癌中增多的报道[8]。在大肠癌，则仅有国外文献报道，低分化腺癌CB表达高于高分化者，而与粘液性大肠癌的关系则未见报道。本实验对粘液性及非粘液性大肠癌CB表达进行观察，结果表明，粘液性癌细胞CB不同程度阳性，多呈弥漫性分布，这可能是因为肿瘤细胞胞浆中组织蛋白酶B不能正常进入溶酶体而直接弥散入细胞浆，从而造成细胞内分布的改变。粘液湖内，CB亦呈不同程度阳性，尤以印戒细胞周围为著。非粘液性癌亦有CB表达，阳性率为66.67%；伴淋巴结转移者，大肠癌原发灶CB表达明显高于无淋巴结转移者，并具有统计学意义（$P<0.01$）。提示，CB与大肠癌浸润转移有关。癌细胞尤其是粘液湖内CB表达的增强，有利于基质的降解。因CB在酸性或中性条件下能有效破坏基底膜及细胞外基质，降解Ⅵ型胶原，层粘连蛋白，纤维结合素等，同时，其尚能激活尿激酶前体(Pro-UK)类型的纤维蛋白溶酶原激活剂（Pro-UPA），从而促进肿瘤细胞浸润转移。

众所周知，大肠粘液性癌恶性程度较非粘液性癌高。我们既往研究[9]表明，大肠癌CD表达在粘液性癌与非粘液性癌中无显著性差异，提示粘液性癌较非粘液性癌更易浸润转移尚存在其他作用更为密切的因素。本实验结果表明，粘液性大肠癌CB表达阳性率明显高于非粘液性癌，二者差别具统计学意义。提示CB与粘液性大肠癌浸润转移关系更为密切，其作用可能更为重要。但其进一步的分子机制及调节有待深入研究。

实验中还观察到，癌旁粘膜中CB表达呈阳性，且越接近癌组织阳性程度越高，这与胃癌情形相同[8]，提示癌旁粘膜可能对癌的浸润也有一定作用，其机制尚需进一步研究。

新生血管是肿瘤转移和生长的物质基础，与肿瘤生物学行为密切相关。我们的结果亦表明，有淋巴结转移的原发灶MVD值明显高于无淋巴结转移的原发灶（$P<0.01$）。目前认为，肿瘤新生血管的生成，受诸多因素的影响。肿瘤血管内皮细胞产生蛋白水解酶，在肿瘤血管生成过程中也起着重要作用。我们在实验中也观察到大肠癌间质内部分毛细血管内皮细胞及部分成纤维细胞CB表达阳性，与文献报道一致[8]。肿瘤新生血管的形成过程中，血管基底膜降解是第一步，其次是血管内皮细胞向肿瘤组织迁移。现认为，肿瘤间质内毛细血管及成纤维细胞分泌CB，可降解血管基底膜和细胞外基质，有利于血管内皮细胞的迁移，从而促进肿瘤新生血管的形成[10]。同时，我们将CB表达分为阴性，弱阳性，强阳性三组，分别对三组MVD值进行两两比较（q检验），结果显示，阴性组与强阳性组有显著性差异（$P<0.05$），提示肿瘤细胞产生多量的CB，对新生血管的形成亦有一定影响，这可能系CB降解产物对毛细血管形成有促进作用而致。

参 考 文 献

（下转第270页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

理指标，主要包括MCV异常、SCV异常和F波异常[6]，然而在小儿GBS中，周围神经运动肌肉复合电位(CMAP)波形消失和波幅显著降低的发生率很高，而MCV异常延迟不足1/3，表明小儿GBS中，周围神经传导阻滞和轴索变性很常见，而单纯脱髓鞘改变不常见，通过神经传导检查，不仅能明确是脱髓鞘改变还是轴索变性，而且可了解GBS严重程度；F波异常率在GBS中很高，表明神经近端损害明显，由于F波主要测定近端运动神经的传导，是MCV必要的补充；感觉传导异常在GBS中比运动传导明显减少，SCV多为正常。注射性神经损伤中，健侧神经传导结果全部正常，只出现注射侧单个肢体运动神经传导功能异常，大部分表现为运动传导波消失、神经传导阻滞，部分波幅显著降低，仅2.2%表现为MCV异常；注射性损伤的感觉传导图形异常率很高，多数患者感觉波消失，少部分SCV异常改变；由于注射性损伤大都存在单独腓神经传导异常，胫神经运动传导正常，故胫神经的F波异常率还不足1/3。灰髓炎综合征患者神经传导异常率低，且仅表现为患侧肢体腓神经或胫神经CMAP波幅稍降低，感觉传导和F波常为正常。肱骨骨折后桡神经传导异常率很高，表现为神经传导阻滞，运动波、感觉波、F波均消失。肌病患者MCV、SCV、F波均正常，仅部分患儿表现为运动波幅轻度降低。此外，6例急性脊髓炎患儿MCV、波幅、SCV均正常，但F波全部出现异常改变，提示病变部位可能位于脊髓前角。

故在临床工作中，若患儿跛行，通过神经传导功能检测证实仅有患侧肢体腓神经或胫神经CMAP波幅轻微下降，则不能肯定为注射性神经损伤。注射性神经损伤一定是注射后患侧单个肢体周围神经传导功能严重异常，表现为运动波消失、神经传导阻滞或伴有感觉传导异常，健侧均正常。GBS由于是多发性周围神经病，定会出现四肢多条神经的传导异常，神经传导阻滞、波幅显著降低、MCV异常、F波异常是GBS的特点。由于灰髓炎综合征患儿全部无F波即脊髓前角病变的改变，不可轻易诊断为脊髓灰质炎。在肌病和急性脊髓炎患者中，周围神经运动、感觉传导功能常为正常，而急性脊髓炎常有F波的异常。

参 考 文 献

[1] 蔡方成，张杰敏. 0～14岁小儿感觉神经传导功能[J]. 中华儿科杂志，1995;33:19-21.

[2] 赵 萍，张小春. 急性运动轴索神经病[J]. 国外医学. 儿科学分册，1995;22:124-127.

[3] 蔡方成，张杰敏. 0～14岁小儿上下肢神经F波研究[J]. 重庆医科大学学报，1994; 19:307-311.

[4] 蔡方成. 重视小儿周围神经疾病的诊断与研究[J]. 中华儿科杂志，1995;33:5-6.

[5] 朱庆生. 神经电生理检查在儿童药物注射性坐骨神经伤的诊断价值[J]. 中华儿科杂志，1995;16:164-166.

[6] 汤晓芙. 神经系统临床电生理学[M]. 第1版，北京：人民军医出版社，2002;3.

[7] Cai FC, Zhang JM. A study of nerve conduction and late responses in normal Chinese infants children and adults[J]. Child Neurol, 1997;12:13-18.

(上接第266页)

[1] symond DA, vickery AL. Mucinous Carcinoma of the colon and rectum [J]. Cancer, 1976;37:1891-1900.

[2] Shimizu M, Saiton Y,Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, bwnign and malignant human pancreatic tissues [J]. Hum pathol, 1990;21:607-612.

[3] 陈华江. 血管内皮生长因子及其受体在结直肠癌中的表达及其意义[J]. 实用癌症杂志，2000;15(5):472-477.

[4] Hazen G.M, Bleeker F.E, Lauritzen B. , et al. Comparative Localization of Cathepsin B protein and Activity in Colorectal Cancer[J]. J-Histochem-Cytochem,2000;48(10):1421-1430.

[5] Guenette RS, Mooibroek M, Weng K , et al. Cathepsin B , a cysteine protease implicated in metastatic pragression , is also expressed during repression of the rat prostat and mammary glands[J]. Eur J Biochem, 1994;226:311-321.

[6] Plebani M, Herszyi L, Cardin R, et al. Cystein and serine protease in gastric cancer[J]. Cancer, 1995;76(3):367-375.

[7] Teradu T, Ohta T, Minato H, et al. Expression of pancreatic trypsinogen /trypsin and cathepsin B in human cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinomas[J]. Hum Pathol, 1995; 26(7):746-752.

[8] 刘 颐，施 尧，王利民，等. 胃癌组织中组织蛋白酶B的表达研究[J]. 肿瘤， 1998;18(5):358-360.

[9] 王娅兰，苗德林，周 伟. 大肠癌组织蛋白酶D 表达及其与EGFR,PCNA 表达的关系[J]. 临床与实验病理学杂志，1998;14(3):261.

[10] Sinha AA, Gleason DF, Staley NA, et al . Cathepsin B in angiogenesis of human prostate: an immunohistochemical and immunoelectron microscopic analysis[J]. The Anatomical Record, 1995; 241:353-362.