维普资讯 http://www.cqvip.com

295-299

第22卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.22 No.4
1997 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1997

组织蛋白酶D在大肠癌分布与浸润关系研究

R735.35

基础医学院 病理教研室 王娅兰* 苗德林 王顺和

提 要 采用免疫组化ABC法观察各型大肠癌、大肠绒毛状乳头状瘤和癌切端大肠粘膜组织蛋白酶D的分布、超微结构变化及其与Ⅰ、Ⅲ型胶原关系。结果提示:第Ⅲ型粘液细胞癌(印戒细胞癌)组织蛋白酶D分布于胞浆,所形成的粘液池内粘液亦呈阳性,且靠近印戒细胞周围更强。管状腺癌胞核丰富者多为阴性,低分化腺癌胞浆丰富者则组织蛋白酶D弥漫于胞浆。粘液池内胶原溶解、消失。电镜下,可见第Ⅲ型粘液细胞癌分泌功能旺盛,癌细胞附近亦有间质胶原溶解。提示组织蛋白酶D在大肠癌浸润中能降解间质Ⅰ、Ⅲ型胶原,故粘液细胞癌浸润性强与该酶活性有关。

关键词 组织蛋白酶D; Ⅰ型胶原; Ⅲ型胶原; 浸润生长; 粘液细胞型大肠癌
中图分类号 R735.35

大肠肿瘤 肿瘤浸润

恶性肿瘤在生长过程中分泌水解酶有助于癌细胞的浸润,我们曾对胃肠癌的生物学行为进行研究[1,2],观察到不同类型胃肠癌细胞可分泌糖苷酶,降解癌细胞周围结缔组织中的蛋白聚糖,从而有利于癌组织浸润。目前研究认为,肿瘤细胞所分泌的胶原蛋白酶、组织蛋白酶、血纤维蛋白溶酶原激活物等与肿瘤浸润关系更为密切。Saku等[3]报道,胃印戒细胞癌及低分化腺癌组织蛋白酶D为阳性,而高分化腺癌为阴性。但对肠癌报道甚少。国内尚未见胃肠癌方面的报道。为此,观察了不同类型大肠癌、大肠绒毛状乳头状瘤、切端大肠粘膜等组织蛋白酶D的分布与Ⅰ、Ⅲ型胶原关系和大肠癌超微结构变化,以探讨该酶在大肠癌浸润生长中的作用。

1 材料和方法

选择1985－1993年外科手术切除大肠癌62例,结肠绒毛状乳头状瘤8例,癌切端大肠粘膜20例作对照。组织均用10%甲醛液固定,石蜡包埋,连续切片(5μM),分别作HE常规染色及组织蛋白酶D和Ⅰ型胶原免疫组化染色。大肠癌病理组织学分型参照全国大肠癌病理协作组统一标准[4],并略作修改。抗组织蛋白酶D多克隆抗体由英国Leed大学Reid教授提供,Ⅰ型胶原购自Sigma公司,兔抗Ⅰ型胶原抗体自行制备,ABC试剂盒为Vector产品。

1.1 免疫组织化学染色

1.1.1 组织蛋白酶D染色主要步骤(参照Reid[5]等的方法稍加修改):切片常规脱蜡,①0.3%H_2O_2－甲醇液室温处理20分钟;②1%牛血清白蛋白室温孵育30分钟;③抗组织蛋白酶D多克隆抗体(稀释度1:300),4℃过夜;④生物素标记的羊抗兔IgG(1:200)室温孵育1小时;⑤ABC试剂(1:1:100)室温孵育2小时;⑥0.04%二氨基联苯胺100ml加3%H_2O_2 30μl显色,5～10分钟,镜下控制;⑦苏木素复染胞核。

以TBS代替Ⅰ抗作阴性对照,人脾脏组织作阳性对照。

酶染色结果判断参照Henry[6]标准。

1.1.2 Ⅰ型胶原染色

1.1.2.1 Ⅰ型胶原多抗的制备[7,8] Ⅰ型胶原1mg溶于pH7.2,0.01 MPBS中,与等体积福氏完全佐剂充分混合直至完全乳化为止,于家兔皮下多点注射。10天后,不完全佐剂中加入0.5mg抗原(方法同前),再次皮下注射。以后每7－10天注射一次。用正常脾脏及门脉性肝硬变组织切片ABC免疫组化染色,观察脾包膜及脾小梁和肝结节Ⅰ型胶原染色结果以检测抗体[7],颈动脉采血,取血清备用。

1.1.2.2 Ⅰ型胶原免疫组化染色 常规脱蜡后,除需用0.2%胰酶消化外,余各步骤同组织蛋白酶D染色。以PBS和正常兔血清代替Ⅰ抗作阴性对照。Ⅰ型胶原抗血清稀释度为1:1。

染色结果判断参照Bedossa[9]等的标准。

1.2 常规电镜

取新鲜大肠癌标本8例及切端大肠粘膜组织立即固定于2.5%戊二醛液,1%四氧化锇后固定,环氧树脂618包埋,H－600型透射电镜观察。

2 结果

2.1 光镜

2.1.1 组织蛋白酶D的分布

2.1.1.1 对照组 切端大肠粘膜呈弱阳性,多数病例仅限于粘膜浅层腺上皮,主要分布于柱状上皮细胞近腔面胞浆。粘膜固有层间质单核巨噬细胞强阳性(见图1)。

2.1.1.2 绒毛状乳头状腺瘤 弱阳性,颗粒主要分布于核上胞浆,杯状细胞多系阴性。

* 女,1962－06出生,讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com



图1 癌切端大肠粘膜 柱状上皮细胞近腔面胞浆组织蛋白酶D弱阳性(↑处)
免疫组化染色(ABC法) ×200倍

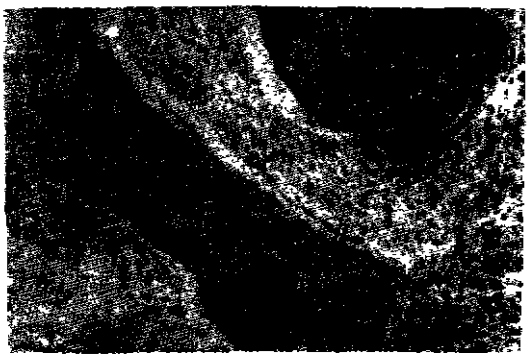


图2 粘液细胞癌第Ⅲ型细胞组织蛋白酶D弱到中度阳性(↑处),粘液池内粘液也示强弱不等的阳性(⇧处)
免疫组化染色(ABC法)×100倍

2.1.1.3 大肠癌 其中粘液细胞癌(包括部分呈腺管状排列者)22例,低分化腺癌21例,管状腺癌(包括乳头状腺癌)19例。

2.1.1.3 ①粘液细胞癌 可分为三型。三型细胞常同存于一病例中,是粘液细胞分化过程中的三种形态表现。

第Ⅰ型:癌细胞弥散分布,多为梭形上皮样细胞,体积小,胞浆少,核多呈梭形或椭圆形,此型癌细胞组织蛋白酶D多为阴性或弱阳性。

第Ⅱ型:主要是单核细胞样细胞,体积较上述细胞增大,胞浆增多,胞界清,核多呈圆形,有时偏于细胞一侧,散在分布,少数部分有形成腺管状趋势。组织蛋白酶D染色弱,弥漫于胞浆。

第Ⅲ型:即印戒细胞,多为圆形或椭圆形,胞浆丰富透亮。核多被挤至细胞一侧,使细胞呈印戒状。可分泌大量粘液至周围间质,形成粘液池"。组织蛋白酶D呈弱或中等度阳性,阳性颗粒弥漫于含粘液的胞浆。"粘液池"内亦呈强弱不等的阳性,尤以印戒细胞周围更明显(见图2)。

部分排列呈腺管状的粘液细胞癌,癌细胞成腺囊状排列,囊腔充盈大量粘液,其中可漂浮小堆癌细胞。组织蛋白酶D强或中等度阳性,阳性颗粒分布于胞浆顶部或弥漫于胞浆。

2.1.1.3 ②低分化腺癌 细胞形状各异,胞浆多少

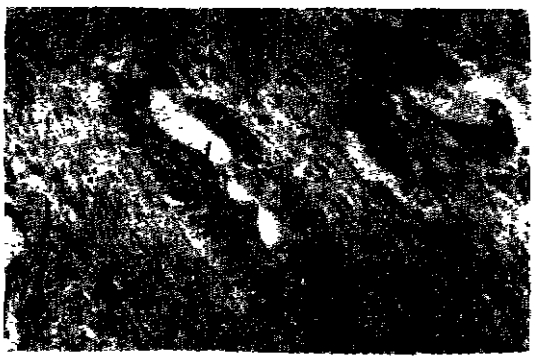


图3 管状腺癌 胞浆丰富者组织蛋白酶D示强弱不等阳性(⇧处),胞核丰富者则多为阴性(↑处)。
免疫组化染色(ABC法)×200倍



图4 粘液细胞癌Ⅰ型细胞 核大浆少,仅见少许肿胀线粒体(↑处)及较多的游离核蛋白体(⇧处)
×12,000倍

维普资讯 http://www.cqvip.com



图5 粘液细胞癌Ⅱ型细胞 核不规则，线粒体较多且内室肿胀(↑处)，粗面内质网多呈扩张状态(⇧处)，粘液颗粒少。×10,000倍

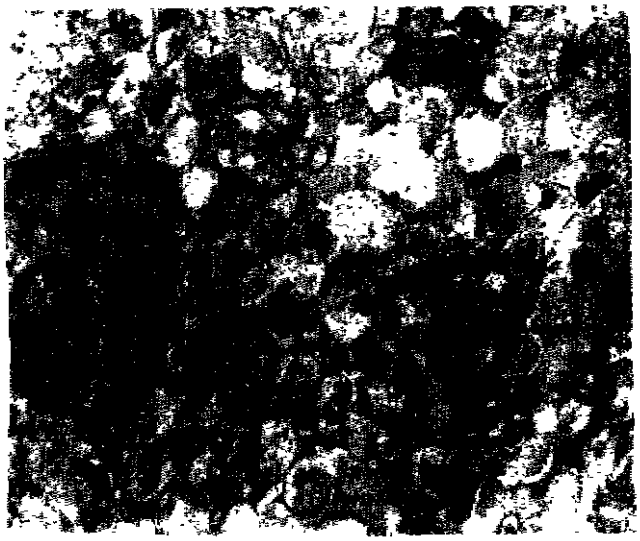


图6 粘液细胞癌Ⅲ型细胞 胞浆丰富，含大量分泌颗粒(↑处)，细胞器轮廓多被遮盖，核被挤至细胞一侧 ×17,000倍



图7 低分化腺癌 核大，异染色质少，可见溶酶体颗粒(↑↑处)及粗面内质网(⇧处)，高尔基氏复合体(⇧处)和丰富的游离核蛋白体(↑处) ×25,000倍



图8 管状腺癌 核短杆状，细胞间桥粒连接相对较多(↑处)，胞浆内较多线粒体(↑处)和粗面内质网(⇧处)，可见溶酶体颗粒 ×8,000倍

不等。呈腺管状、小梁状或片块状排列。胞浆丰富者组织蛋白酶D多呈阳性，弥漫于胞浆。

2.1.1.3 ③管状腺癌 可分为两种：A)胞浆丰富型：细胞核呈单层排列，常位于细胞基底，胞浆丰富，组织蛋白酶D阳性强弱不等，分布于管腔面或整个胞浆；B)胞核增多型：胞核多，排列重叠，多为3－6层，常达胞浆顶部，胞浆少，组织蛋白酶D多系阴性(见图3)。

各型大肠癌组织间质内单核巨噬细胞组织蛋白酶D示强阳性。

2.1.2 Ⅰ型胶原分布 Ⅰ型胶原位于基底膜以外的间质中，常与Ⅲ型胶原混合存在。在浸润癌病灶周围多为2＋，病灶中心癌巢间则0～1＋不等。粘液细胞癌所形成的粘液池内无Ⅰ型胶原阳性反应。

2.2 常规透射电镜

2.2.1 粘液细胞癌

第Ⅰ型：细胞体积小，核大胞浆少，核浆比例增

维普资讯 http://www.cqvip.com

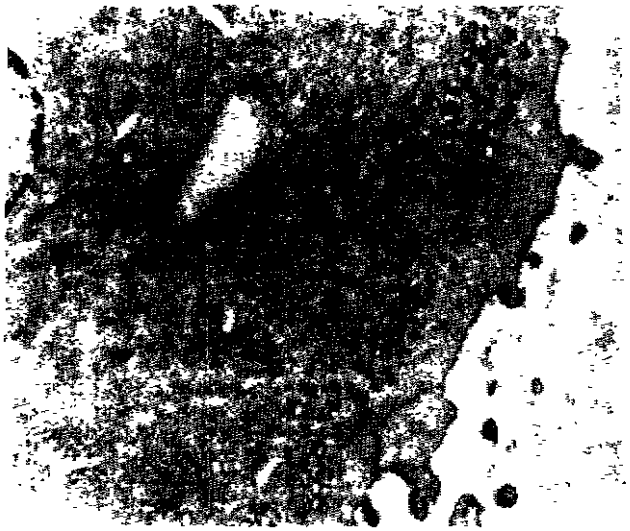


图9 管状腺癌 腔面微绒毛少且短，分泌颗粒位于腔面胞浆顶部，部分可见半月形致密核心(↑处)
×12,000倍



图10 第Ⅲ型粘液细胞癌(印戒细胞癌)附近间质胶原纤维断裂、溶解(↑处)
×20,000倍

大，细胞器少，仅见少许肿胀线粒体及较多的游离核蛋白体，未见分泌颗粒(见图4)。

第Ⅱ型：细胞体积较前增大，较多内室肿胀之线粒体，粗面内质网常见，多呈扩张状态，偶见高尔基氏复合体，粘液颗粒多少不等，系单层膜圆形颗粒，中心为低电子密度物质填充(见图5)。

第Ⅲ型：细胞浆内含大量大小不等、低电子密度的粘液颗粒，有的相互融合，遮盖了大部分细胞器轮廓，核被挤到一侧使细胞呈印戒状。少数粗面内质网及肿胀线粒体被挤压至核旁和胞浆边缘，偶见高尔基氏复合体(见图6)。

2.2.2 低分化腺癌

细胞体积大，核大异染色质少，可见溶酶体颗粒、内质网、高尔基氏复合体及丰富的游离核糖体，线粒体肿胀(见图7)。

2.2.3 管状腺癌

腔面微绒毛短且稀疏，细胞间桥粒相对较多。可见粗面内质网及较多的线粒体，偶见高尔基氏复合体。分泌颗粒多在细胞顶部。该颗粒圆或卵圆形，电子密度中等偏高，部分有一半月形致密核心(见图8、9)。

2.2.4 癌细胞周围胶原

癌细胞(印戒细胞)附近胶原断裂溶解，Ⅰ型细胞附近胶原结构较完整(见图10)。

3 讨论

3.1 组织蛋白酶D在不同类型大肠癌中的分布与肿瘤浸润

不同组织学类型大肠癌中，以粘液细胞癌恶性程度最高，低分化腺癌次之，管状腺癌相对较低。作者之一[1,2]等曾对不同类型胃肠癌糖苷水解酶包括β－葡萄糖醛酸酶、芳香硫酸酯酶等的活性进行组织化学染色，结果表明，印戒细胞癌酶活性较其它类型为高，提示这是印戒细胞癌较其它类型胃肠癌易于浸润转移的原因之一。本实验结果则显示，对照组肠粘膜及绒毛状乳头状腺瘤组织蛋白酶D阳性弱，阳性颗粒分布于顶部胞浆。粘液细胞癌阳性反应主要在第Ⅱ、Ⅲ型细胞，胞浆内弥漫分布，粘液池内粘液亦为阳性，且以印戒细胞周围为强。电镜下，亦见第Ⅱ、Ⅲ型细胞浆丰富，分泌颗粒逐渐增多。提示粘液癌细胞合成分泌功能较强，能向细胞外间质分泌组织蛋白酶D。管状腺癌酶染色阳性者主要位于胞浆顶部，而电镜下可见相对较多的细胞连接装置，高尔基氏复合体少见，分泌颗粒多位于细胞顶部胞浆，推测该型癌细胞因排列呈完整的腺腔结构，细胞连接装置相对较多，酶可能主要向腔面分泌，而向间质内溢出较少。低分化腺癌由于大部分结构多无完整的腺腔，

维普资讯 http://www.cqvip.com

其酶染色强弱不等，弥漫于胞浆，电镜下可见高尔基氏复合体和溶酶体，偶见分泌颗粒，故它亦可将酶直接分泌至间质。

印戒细胞癌乳酸脱氢酶活性较其它类型大肠癌为高，无氧酵解显著，故易在癌细胞周围形成一个酸性环境[1]，使组织蛋白酶D更易发挥蛋白水解作用。

3.2 组织蛋白酶D对Ⅰ、Ⅲ型胶原降解机理

Ⅰ、Ⅲ型胶原分子均由三条多肽链构成。Ⅰ型胶原中，有两条相同的α_1链及一条α_2链，Ⅲ型胶原中则为三条相同的α_1链。分子间通过共价键交联形成胶原纤维[10,11]。组织蛋白酶D对两型胶原均有降解作用。体外实验表明，组织蛋白酶D对Ⅰ型胶原降解作用主要位点在α_1链羧基本端非螺旋区C_6(Leu)和C_7(Ser)之间(—Gly—Tyr—Asp—Leu—SerC_6↑C_7—Phe—Leu—Pro—Gln)，对Ⅲ型胶原位点可能在α_1链胺基末端非螺旋区与分子交联有关的赖氨酸羧基侧[12]，(—Lys—Ser—Gly—Val—Ala—Gly－N_{11}↑$N_{12}N_{13}$—Gly—Gly—Ile)。

在结缔组织内，Ⅰ、Ⅲ型胶原α_1链距NH_2－末端大约2/3处能与纤维连接蛋白单体的NH_2－末端42－KDa处结合，同时，胶原与蛋白聚糖、蛋白聚糖与纤维连接蛋白相互间均有特殊的结合点，从而构成网状结构，形成一天然屏障。本实验观察到，电镜下Ⅰ型粘液细胞附近胶原纤维尚完整，而印戒细胞附近胶原纤维断裂、溶解。粘液池内除胶原被溶解外，平滑肌、血管等亦被溶解。鉴于组织蛋白酶D可以降解蛋白聚糖、肌动蛋白、肌球蛋白及纤维连接蛋白，从而提示本实验中粘液池内胶原、肌肉、纤维连接蛋白及蛋白多糖全部崩解，均与组织蛋白酶D有关。可见，该酶破坏宿主间质的天然屏障功能更为广泛，有利于肿瘤的浸润生长。

参 考 文 献

1 苗德林，等.肿瘤.1987:7(4):155
2 Miao DL. et al. Chinese J Cancer Res. 1991;3(4):64
3 Saku T, et al. Gut. 1990;31:1250
4 全国大肠癌病理研究协作组.中华肿瘤杂志 1986;8(2):156
5 Reid WA, et al. J Clin Pathol. 1986; 39:1323
6 Henry JA, et al. Cancer. 1990;65:256
7 Becker U, et al. Immunology 1976;31:57
8 陶义训主编.免疫学和免疫学检验 人民卫生出版社 1989;83
9 Bedossa P, et al. Histochemistry. 1987; 88:85
10 McCullagh KG, et al. J Pathol. 1980;130:45
11 Madri JA, et al. Human Pathol. 1980;11(4):353
12 Scott PG, et al. Eur J Biochem 1981:114:59

(收稿日期 1991－01－09)

A study on the relationship between the distribution of Cathepsin D and invasion in colorectal adenocarcinoma

Wang Yalan, et al
Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences

The distrbution of Cathepsin D and type I collagen fibers in various types of adenocarcinoma, villous papillary adenoma and normal mucosa of human colorectum were investigated by means of immunohistochemical and electronmicroscopical techniques. The results showed that the Cathepsin D distributed in the cytoplasm of type Ⅲ mucinous cell carcinoma as well as in the mucous pools of extracellular stroma. The cathepsin D also presented in the cytoplasm of poorly－differentiated adenocarcinoma with rich cytoplasm, whereas the cathepsin D usually was negative in the tubular adenocarcinoma having more nuclei. Where the mucous infiltrated, the collagen fibers, smooth muscles and vessels were lysed. The electron microscopc results showed that the secretion function of the type Ⅲ mucinous cell carcinoma was high and the collagen fibers adjacent to the type Ⅲ mucinous cell carcinoma was lysed. So the present study suggested that the cathepsin D is able to degrade type Ⅰ and Ⅲ collagen fibers in extracellular stroma and faciliates cancer invasion.

KEY WORDS Cathepsin D; Collagen type Ⅰ, Ⅲ; Invasion; Mucinous cell carcinoma