维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol. 19 No. 4
1994 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

94,19(4)
257-262

溶菌酶在胃癌中的表达及超微结构定位

R735.202

病理解剖教研室 徐 夏 苗穗林

提 要 应用免疫组织化学ABC法观察溶菌酶(Lysozyme,LZM)在各型胃癌及其转移淋巴结、十二指肠溃疡切端胃粘膜的表达,结果显示该酶在粘液细胞型胃癌的阳性率最高,在转移淋巴结癌细胞中的表达有增强趋势,十二指肠溃疡切端的胃粘膜中主要存在于胃固有腺体的颈粘液细胞、胃小凹底部的柱状细胞及十二指肠腺细胞。蛋白A胶体金免疫电镜证实LZM主要贮存于胃癌细胞的分泌颗粒,其中以中等电子密度分泌颗粒较多。

关键词 溶菌酶(LZM);胃癌;免疫组织化学;免疫电镜
中图分类号 R735.202

溶菌酶(LZM)在正常人体的分布及胃炎、胃癌时的表达均有报导[1,2,3,4],但对LZM与肿瘤浸润性生长的关系未见报告。关于LZM在胃癌细胞内定位至今国外仅5例免疫电镜报导,认为该酶存在于类潘氏细胞的电子致密颗粒内[5]。本实验的目的是进一步确定LZM在癌细胞内的定位以及在不同组织学类型癌细胞中的表达,并通过比较胃癌原发灶与淋巴结转移灶癌细胞LZM的活性,以探讨LZM与胃癌细胞生物学行为的关系。

材料与方法

1. 光镜HE及免疫组织化学

手术切除胃癌标本74例,其中10例取转移淋巴结。另取十二指肠溃疡切端胃粘膜组织10例作对照。上述标本均经10%甲醛固定,石蜡包埋,连续切片(5μ),分别作HE及LZM免疫组化染色。免抗人LZM、ABC药盒为DAKO公司产品。

采用常规ABC染色方法

用1%牛血清白蛋白代替一抗作为阴性对照。并以组织中嗜中性白细胞和单核巨噬细胞作为阳性对照。

染色结果按细胞着色数10%、25%、50%分为+、++、+++;细胞着色强度:浅黄色+,深棕褐色+++,间于两者之间++。综合评价:细胞着色数及着色强度均在++或以上者为阳性。+为弱阳性。

2. 常规电镜及免疫电镜

(1)常规电镜:新鲜胃癌组织立即投入2.5%戊二醛溶液固定2h,或PG液(1%多聚甲醛、0.01%戊二醛)固定4~6h,按电镜标本常规制作,H—600型透射电镜观察。

(2)免疫电镜:新鲜胃癌组织切成2×2×2mm大小,入上述PG液固定4~6h,1%锇酸后固定15min,环氧树脂618包埋,做半薄切片经免疫金银法定出阳性部位后,切600~800Å超薄切片捞于无支持膜镍网上,进行蛋白A胶体金染色。

染色方法如下:3%H_2O_2蚀刻;1%牛血清白蛋白封闭;免抗人LZM(1∶100);蛋白A胶体金(1∶5);每次抗体孵育后用0.02MTBS(pH7.4)冲洗3次,每次10min,待镍网干燥后进行铅、铀衬染;电镜

维普资讯 http://www.cqvip.com

观察。同时以1%牛血清白蛋白代替一抗，设置阴性对照。

结　果

1. 光镜

(1)十二指肠溃疡切端胃粘膜组织

胃体及胃底腺体LZM阳性染色部位均处于胃小凹底部柱状细胞及其下方的颈粘液细胞，而浅表部位的粘液细胞、壁细胞及主细胞均为阴性，十二指肠腺LZM呈弱阳性，粘膜固有层及粘膜下层间质内嗜中性白细胞、单核巨噬细胞LZM为强阳性。

(2)胃癌

74例进展期胃癌，其中粘液细胞癌20例，粘液腺癌10例、低分化腺癌34例。高分化腺癌10例。

①粘液细胞癌　梭形上皮样癌细胞LZM染色较弱或阴性；单核细胞样癌细胞LZM染色弥漫于胞浆呈深棕褐色(图1)，有时细胞核被遮蔽。印戒细胞LZM染色呈胞浆弥漫的棕黄色或淡黄色，有时细胞浆外周环形着色，形成中空的空晕状染色。粘液腺癌染色特点同粘液细胞癌。

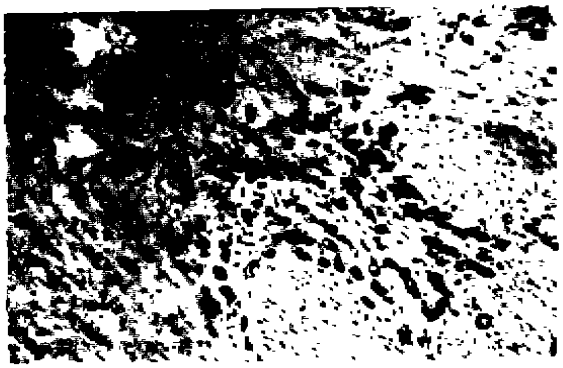


图1　粘液细胞癌：单核细胞样癌细胞LZM染色强阳性

ABC法　×100倍

②低分化腺癌　LZM弥漫分布于胞浆，但各细胞着色深浅不一。

③高分化腺癌　胞浆丰富的癌细胞LZM呈现棕黄色分布于胞浆顶部；而细胞核大，胞浆少的癌细胞LZM呈阴性。

以上四种类型胃癌中，粘液细胞癌LZM阳性率最高。

表1　各组织学类型胃癌LZM活性比较

组织学类型	酶活性				合计	阳性率%
	卅	++	+	−		
粘液细胞癌	8	7	2	3	20	75
粘液腺癌	1	4	3	2	10	50
低分化腺癌	5	15	4	10	34	58.8
高分化腺癌	1	2	4	3	10	30

(3)胃癌与转移淋巴结

在10例胃癌(2例粘液细胞癌、1例粘液腺癌、5例低分化腺癌、2例管状腺癌)与淋巴结转移灶的对比研究中，LZM活性在转移淋巴结的癌细胞有增强趋势(图2)。

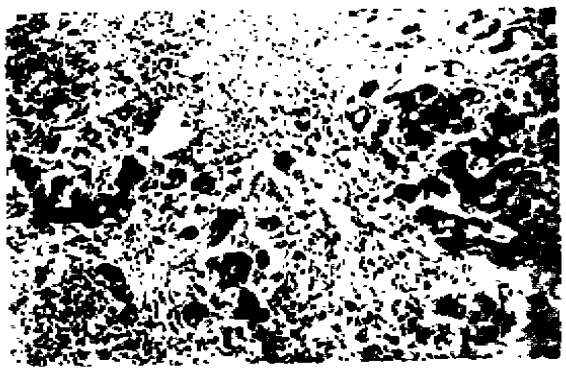


图2　转移至淋巴结的癌细胞LZM强阳性

ABC法　×200倍

对42例胃癌LZM染色阳性程度与淋巴结转移率进行比较，发现LZM阳性病例其淋巴结转移率(49.18%)高于LZM弱阳性(33.13%)及LZM阴性(14.72%)病例。LZM染色阳性、弱阳性病例的淋巴结转移率(46.5%)明显高于LZM染色阴性的病例(14.72%)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　原发灶、淋巴结转移灶癌细胞 LZM 活性比较

酶活性	卅	廾	＋	－	合计	阳性率%
A. 胃癌细胞	1	2	2	5	10	30
B. 转移至淋巴结癌细胞	2	5	2	1	10	70

秩和检验：A ∶ B　$P<0.05$

2. 电镜

(1)常规电镜

粘液细胞癌梭形上皮样细胞胞浆内可见较多游离核蛋白体，分泌颗粒及其他细胞器少见；单核细胞样癌细胞胞浆内见较多形状、大小、电子密度各异的分泌颗粒，粗面内质网、高尔基体不多见(图 3)；印戒样细胞粘液颗粒充满胞浆，并相互融合，将细胞核挤向一边，粗面内质网、高尔基体极少见。粘液腺癌结构与粘液细胞癌类似。

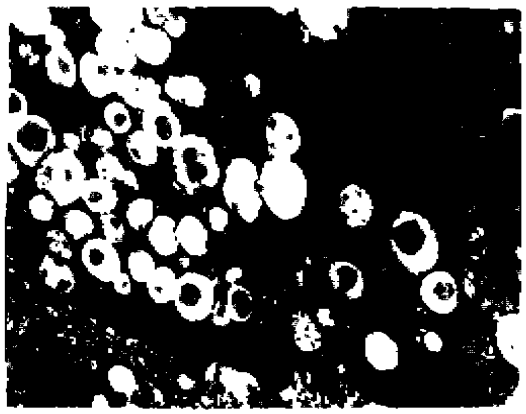


图 3　粘液细胞癌：单核细胞样癌细胞胞浆内较多分泌颗粒，粗面内质网少，可见线粒体　×12,000 倍

低分化腺癌细胞分化稍高者胞浆内可见少量分泌颗粒，粗面内质网、高尔基体少见。

高分化腺癌核大、胞浆少者分泌颗粒极少，胞浆丰富者细胞顶部可见中等电子密度分泌颗粒。

(2)免疫电镜

10 例胃癌(3 例粘液细胞癌、1 例粘液腺癌、5 例低分化腺癌。1 例管状腺癌因免疫金银半薄切片 LZM 染色呈阴性而未能定位)。包埋后蛋白 A 胶体金染色 LZM 定位于不同形状及电子密度的分泌颗粒内，以中等电子密度呈指纹状结构的分泌颗粒 LZM 标记金颗粒较多(图 4)。偶见粗面内质网池内极少量的 LZM 标记。因含分泌颗粒的癌细胞内极难找见高尔基体，故无法观察 LZM 标记情况。

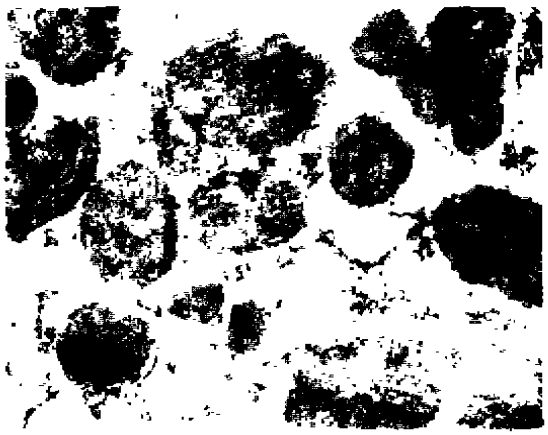


图 4　粘液细胞癌：LZM 连接的金颗粒标记在形态、大小不一，中等电子密度的分泌颗粒内

免疫电镜×65,000 倍

讨　论

本实验免疫电镜观察到 LZM 主要集中在分泌颗粒内，故分泌颗粒多的癌细胞在光镜下 LZM 染色深，反之则浅。若分泌颗粒弥散于胞浆，则显示细胞浆均匀着色；分泌颗粒位于高分化腺癌管腔内侧缘，则胞浆顶部着色。

在胃癌中以粘液细胞癌 LZM 阳性率最高，这与 Wittkend[4]的报导一致。但 Ohtani 等认为 LZM 存在于胃癌细胞的类潘氏颗粒内，作者在本实验中油镜及电镜下均未发现 LZM 阳性癌细胞与潘氏细胞之间的关系。

根据免疫电镜观察粗面内质网池内有极

维普资讯 http://www.cqvip.com

少量 LZM 标记，分泌颗粒内 LZM 标记较多推测 LZM 在粗面内质网合成，经高尔基体加工、包裹，最后贮存、浓缩于分泌颗粒。

LZM 对肿瘤的生长与蔓延是促进或抑制目前尚有不同见解。

关于 LZM 抑制肿瘤生长的论点，其依据多为动物实验。如 Sava 通过种植 Lewis 肺癌的小鼠口服 LZM，发现转移癌的重量较对照组减轻 60%，且小鼠生存期延长[4]。但 Vacca 等在临床上观察到 LZM 对多发性骨髓瘤治疗无效[7]。

鉴于 LZM 在炎症情况下由胃腺上皮分泌，经腺腔到胃内杀灭细菌[8]。其机理为 LZM 具有 β—N—乙酰葡萄糖胺酶活性，能破坏细菌细胞壁壳多糖或低聚糖的 β(1→4) 糖苷键[9]，而癌间质中蛋白多糖如硫酸肝素等的结构与壳多糖的 β(1→4)糖苷键结构相似，故推测该酶亦可降解蛋白多糖，使其网状结构被破坏，故易于浸润、转移。胃癌的 β—N—乙酰葡萄糖胺酶染色阳性及癌细胞间质甲苯胺兰异染反应减弱支持上述推论[10]。司履生用免疫组化方法观察胃癌局部淋巴结，发现其 T 淋巴细胞功能受到明显抑制[11]。Stephen 通过动物实验证实 LZM 作为自身抗原，能引起 T_H 细胞的耐受。Tahara 报道进展期胃癌癌细胞 LZM 阳性则患者预后差[3]。上述报道提示癌细胞分泌的 LZM 可能导致机体免疫能力降低。推测 LZM 可能在肿瘤的浸润、转移中或对宿主的免疫功能有一定影响。本实验观察到浸润至肌间隙和转移至淋巴结的癌细胞 LZM 表达增强，且 LZM 阳性病例其淋巴结转移率高，均支持上述推论。但其具体作用机制尚须进一步探讨。

参 考 文 献

1 Franken C, et al. J Histochem Cytochem 1989; 37 (4): 493

2 Reitamo S, et al. Acta Pathol Microbiol Scand Sect A1979; 87: 451

3 TAHARA E, et al. Histopathology 1982; 6: 409

4 Wittekind Ch, et al. Virchows Archiv A 1986; 409: 715

5 Ohtani H, et al. Acta-Pathol-Jpn 1988; 38(7): 861

6 SAVA G, et al. Clin Expl Metastasis 1988; 6: 245

7 Vacca A, et al. Chemiother N 1985; 2: 147

8 Mollen kopt-C, et al. Z-Gastroenterol 1990; 28 (7): 327

9 Chipman DM. Sierce 1969; 165: 454

10 苗德林，等．中华病理学杂志 1987; 16(4): 269

11 司履生，中华病理学杂志 1987; 16(3): 219

12 Adelsteins S, et al. Science 1991; 251: 1223

（收稿日期 1993—12—25）

EXPRESSION OF LYSOZYME IN GASTRIC CARCINOMA AND ITS UITRASTRUCTURAL IMMUNOLOCALIZATION

Xu Man, et al

Dept. of Pathology

Immunohistochemical localization of lysozyme was examined in various types of gastric carcinoma and its metastatic lymphonodes as well as the resected gastric tissue with duodemal ulcers which （下转第 269 页）