DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.011
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)07-0587-04

论著

应用组织芯片检测结直肠腺瘤-腺癌β-连环蛋白的表达及其意义

段光杰,阎晓初,章 容,刘丽梅 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨β-连环蛋白(β-catenin,β-cat)表达与结直肠癌发生和浸润转移的关系。方法 制作400个点阵的结直肠腺瘤-腺癌组织芯片,免疫组化检测β-cat的表达。结果 ①组织芯片经HE和免疫组化染色,可获取的有效信息量分别达到了98.8%和98.0%。②β-cat胞核表达率在腺瘤癌变组织(35.9%)显著高于腺瘤(16.7%)及腺癌组织(19.7%)($P<0.05$)。③腺瘤伴不典型增生Ⅲ级β-cat胞质、胞核表达率分别为71.4%、35.7%均显著高于Ⅰ级29.6%、3.7%($P<0.05$)。④溃疡型、淋巴结转移阳性及C-D期组β-cat胞核表达率(分别为29.2%、30.7%、30.2%)均显著高于息肉型、淋巴结阴性及A-B期组(分别为8.8%、10.8%、10.9%)($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 β-cat胞质及胞核表达,可能是结直肠癌发生的早期事件;β-cat胞核表达与结直肠癌淋巴结转移及Dukes分期有关。

关键词:组织芯片;结直肠肿瘤;连环蛋白;免疫组织化学
中图法分类号:R392.31;R394.2;R735.3 文献标识码:A

Detection of beta-catenin expression in colorectal adenoma and adenocarcinoma by tissue chips and its significance

DUAN Guang-jie, YAN Xiao-chu, ZHANG Rong, LIU Li-mei (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation of β-catenin expression with the carcinogenesis and progression of human colorectal cancer. Methods The colorectal adenoma-carcinoma tissue chips including 400 cores were constructed and the expression of β-catenin in 220 cases of colorectal adenoma and carcinoma was detected by immunohistochemical staining. Results The effective rates of information by tissue chips stained by hematoxylin-eosin and immunohistochemistry were 98.8% and 98.0%, respectively. The nuclear expression rate of β-catenin was 35.9% in malignant changes in adenoma, which was significantly higher than that in adenoma (16.7%) and carcinoma (19.7%) ($P<0.05$). Both cytoplasmic and nuclear expression rates of β-catenin (71.4%, 357.7%, respectively) in adenoma with severe dysplasia were significantly higher than that in adenoma with mild dysplasia (29.6%, 3.7%, respectively) ($P<0.05$). In adenocarcinoma tissue, the nuclear expression rates of β-catenin in ulcerative type (29.2%), positive lymph node metastasis (30.7%), and late stages (30.2%) were significantly higher than those in polypoid type (8.8%), negative node metastasis (10.8%), and early stages (10.9%) ($P<0.05$ or $P<0.01$). Conclusion Both cytoplasmic and nuclear expressions of β-catenin are possibly the early events in the carcinogenesis of colorectal cancer. β-catenin nuclear expression is related to lymph node metastasis and Dukes' stages in colorectal cancer.

Key words: tissue chip; colorectal tumor; catenin; immunohistochemistry

β-连环蛋白(β-catenin,β-cat)是一个多功能蛋白,它可与膜表面上皮型钙粘蛋白(E-cadherin,E-cad)胞内区结合,介导同型细胞相互粘附,同时也是Wnt信号转导通路中关键的调节因子,其突变或异常表达可能参与肿瘤的发生及进展[1]。组织芯片(tissue chip),又称为组织微阵列(tissue microarray),它通过将成百上千的小块组织样本高密度地固定排列在一载体上,可高通量、快速、平行检测大批量组织样本中的多项实验指标,大大提高了实验效率[2,3]。本研究拟采用组织芯片及免疫组化技术,检测β-cat在正常结直肠粘膜、腺瘤、腺瘤癌变及腺癌组织的表达情况,探讨其与结直肠癌发生和浸润转移的关系。

作者简介:段光杰(1975—),男,云南省施甸县人,硕士,医师,主要从事肿瘤分子病理方面的研究 电话:(023)68754264
通信作者:阎晓初,电话:(023)68754432,E-mail:yxchwq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-09-24;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 临床资料

采用本院1995—2002年间经肠镜活检或手术切除的腺瘤组织60例(不典型增生Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级分别为27、19、14例)、腺瘤癌变40例、腺癌120例(高、中、低分化各40例),另取无任何肠道疾病的遗体捐献者尸检正常粘膜组织20例。所有标本经10%福尔马林液固定,石蜡包埋。

120例腺癌组织中,男性56例,女性64例,年龄26~80岁,平均55.7岁。肿瘤直径1.5~11.0 cm,平均4.0 cm。病变发生在直肠63例,左半结肠27例,右半结肠30例。溃疡型65例,息肉型46例,浸润型9例。发生淋巴结转移者53例(44.2%),远处脏器(肝、肺)转移者14例(11.7%)。根据Duke′s分期,A、B、C、D期分别为39、27、40、14例。

1.2 结直肠腺瘤-腺癌组织芯片的制备

采用美国Beecher阵列仪制作:将HE切片做镜下诊断并标记取样部位(癌旁粘膜及癌均取样),打孔采样装置根据标记对供体组织蜡块进行采样,同时也可对受体蜡块进行打孔。阵列仪的定位装置可将供体蜡块的组织芯准确放入受体块的孔内,重复上述操作,可制备出孔径、孔距、孔深完全相同的组织微阵列蜡块。通过切片、捞片后,即成为组织芯片。

1.3 免疫组织化学染色

采用Envision™二步法,DAB显色,除了芯片内部的正常及癌旁粘膜作内对照外,每批染色均设外部阳性对照和阴性对照。β-cat单克隆抗体工作液购自Maxim公司。

1.4 结果判定

记数每个点阵全部正常粘膜或肿瘤细胞,参照文献[4]分别从胞膜、胞质、胞核3方面观察β-cat的表达,以胞膜阳性细胞数>90%胞质阳性细胞数>30%,胞核阳性细胞数>1%分别记为β-cat胞膜、胞质、胞核表达。

1.5 统计学方法

应用SPSS10.0软件进行χ^2检验及Fisherman精确概率检验。

2 结果

2.1 组织芯片的HE及免疫组化染色有效性观察

5个阵列蜡块(共400个点阵)经切片HE染色观察,残缺点数分别为0、0、1、1、3个,共记5个,每个点阵有效信息量达96.3%~100%(平均98.8%)。经免疫组化染色,残缺点数分别为0、1、1、2、4个,共计8个,可分析的组织点包括正常粘膜20例、癌旁粘膜156例、腺瘤60例、腺瘤癌变39例、腺癌117例(表1)。免疫组化总有效信息量占95.0%~100%(平均98.0%)。

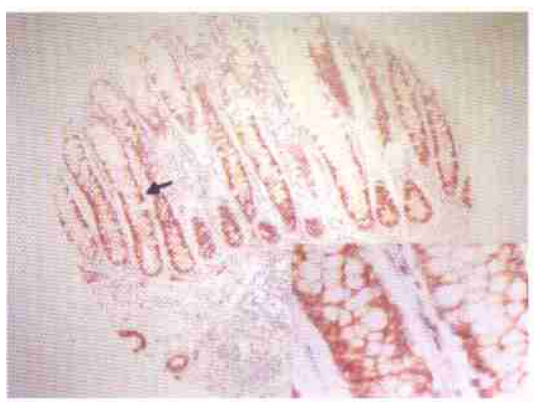
2.2 β-cat在结直肠粘膜及肿瘤组织的表达

β-cat呈棕黄色细颗粒状表达于正常粘膜上皮细胞-细胞接触侧的胞膜上(图1)。腺瘤、癌变及腺癌组织β-cat胞膜表达显著减弱,并出现明显的胞质、胞核表达($P<0.05$,$P<0.01$)(图2~3)。其中,腺瘤癌变β-cat胞质表达率(69.2%、56.4%)明显高于腺瘤组织(43.3%)($P<0.05$),胞核表达率(35.9%)显著高于腺瘤(16.7%)及腺癌组织(19.7%)($P<0.05$);三者胞膜表达率无明显差异($P>0.05$)(表1)。

表1 β-cat在结直肠正常粘膜、癌旁粘膜、腺瘤、癌变及腺癌组织的表达

Tab 1 Expressions of β-catenin in normal colorectal mucosa, mucosa adjacent to the carcinoma, adenoma, malignant changes, and adenocarcinoma

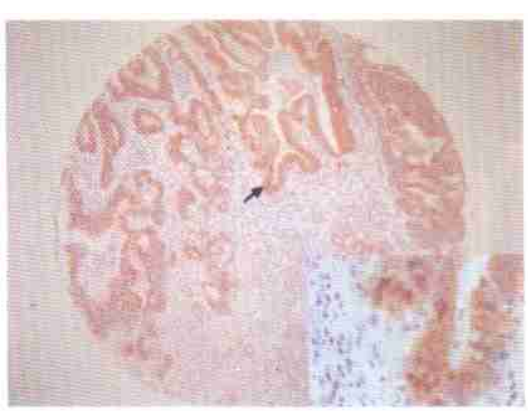
Type of tissue	*n*	Membranous expression		Cytoplasmic expression		Nuclear expression	
		n	%	n	%	n	%
Normal mucosa	20	18	90.0	1	5.0	0	0.0
Mucosa adjacent to cancer	156	100	64.1	10	6.4	1	0.64
Adenoma	60	8	13.3	26	43.3	10	16.7
Malignant changes in adenoma	39	7	17.9	27	69.2	14	35.9
Adenocarcinoma	117	20	17.0	66	56.4	23	19.7



Right lower: High magnification showing β-catenin expression in the membranes (×400)

图1 正常结肠粘膜组织β-catenin主要表达于上皮细胞-细胞接触侧的胞膜上 (Envision™×100)

Fig 1 β-catenin expression is mainly localized at the membranes of cell-to-cell borders in normal colorectal mucosa (Envision™×100)

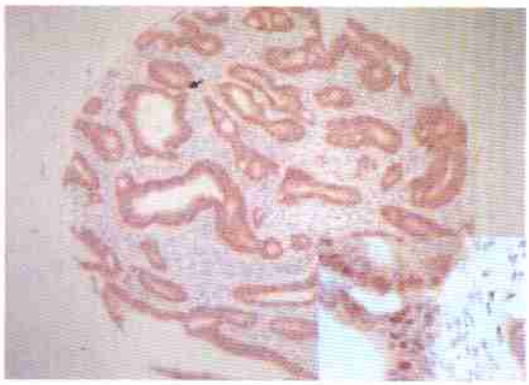


Right lower: High magnification showing nuclear β-catenin staining (×400)

图2 结肠腺瘤癌变β-catenin胞膜表达消失,伴有胞质及胞核表达 Envision™×100

Fig 2 Colon malignant changes in adenoma show the disappearance of membranous staining and an increased cytoplasmic and nuclear staining of β-catenin (Envision™×100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



Right lower: High magnification showing nuclear β-catenin staining (× 400)

图 3　直肠中分化腺癌β-**catenin** 胞膜表达消失, 并出现明显的胞质及胞核表达 (Envision™× 100)

Fig 3　Rectal adenocarcinoma shows the disappearance of membranous staining and a remarkably increased cytoplasmic and nuclear staining of β-catenin (Envision™× 100)

2.3　β-cat 表达与结直肠腺瘤组织分级的关系

随着组织分级的增高, β-cat 胞质、胞核表达率依次增高, 不典型增生 II级胞质胞核表达率分别为 71.4%、35.7%, 均显著高于不典型增生Ⅰ级者 29.6%、3.7% ($P<0.05$, $P<0.01$)。3 级间胞膜表达率无明显差异。

2.4　β-cat 表达与结直肠腺癌组织临床病理参数的关系

溃疡型腺癌β-cat 胞质表达率显著高于息肉型者($P<0.05$)。而β-cat 胞核表达率在溃疡型、淋巴结转移阳性及 C-D 期组均显著高于息肉型、淋巴结阴性及 A-B 期组($P<0.05$, $P<0.01$)β-cat 胞膜表达率在各参数产是差异无显著性($P>0.05$)(表 2)。

表 2　β-**cat** 表达与结直肠腺癌临床病理参数的关系

Tab 2　Relationship between β-catenin expression and clinicopathological parameters of adenocarcinoma

	n	Membranous expression		Cytoplasmic expression		Nuclear expression	
		n	%	*n*	%	*n*	%
Gross type							
Ulcerative	65	12	18.5	44	67.7	19	29.2
Polypoid	45	8	17.8	21	46.7	4	8.8
Infiltrated	7	0	0	1	14.2	0	0
Differentiation							
Well	39	7	17.9	25	64.1	10	25.6
Moderated	40	11	27.5	27	67.5	8	20.0
Poor	38	2	5.3	14	36.8	5	13.2
Lymph node metastasis							
Negative	65	13	20.0	35	53.8	7	10.8
Positive	52	7	13.5	31	59.6	16	30.7
Distant metastasis							
Negative	104	19	18.3	61	58.7	20	19.2
Positive	13#	1	7.7	5	38.5	3	23.1
Ducks' stages							
A-B	64	13	20.1	35	54.7	7	10.9
C-D	53	7	13.2	31	58.5	16	30.2

#: One of the 14 samples lost during staining

3　讨论

β-cat 在分化成熟的正常粘膜细胞主要与 E-cad 结合, 调节同型细胞间的粘附性; 小部分则与胞浆内结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)蛋白、糖原合成激酶-3β (glycogen synthase kinase 3β, GSK-3β)及骨架蛋白(conductin/axin)组成的多蛋白复合体降解, 从而维持胞质内游离β-cat 的低水平状态。APC 或β-cat 基因本身的突变均可引起β-cat 降解障碍, 在胞质内积聚并向核内转移, 与 T 细胞因子-4(T cell factor-4, Tcf-4)结合, 启动靶基因(c-myc, cyclin D1, MMP-7 等)的复制与转录, 导致细胞增殖或侵袭表型的形成[1, 5]。

本实验观察到正常结直肠粘膜β-cat 主要表达于上皮细胞-细胞接触侧的胞膜上, 而腺瘤、癌变及腺癌组织均出现了明显的β-cat 胞膜表达缺失及胞质、胞核表达。向德兵等[6]用免疫组化研究发现大肠腺瘤癌变β-cat 异位表达率显著高于大肠腺瘤及大肠癌, 认为β-cat 异位表达可能参与了大肠癌的发生发展。本实验分别从胞膜、胞质、胞核三方面定位检测分析β-cat 的表达, 结果显示β-cat 胞核表达率显著高于腺瘤及腺癌组织, 胞质表达率在腺瘤癌变及腺癌组织显著高于腺瘤($P<0.05$), 而胞膜缺失表达则广泛存在于腺瘤及腺癌组织中, 提示与结直肠癌发生密切相关的可能是β-cat 胞质及胞核表达, 而非胞膜缺失表达。同时β-cat 胞质、胞核表达率在腺瘤不典型增生 II级已显著高于Ⅰ级($P<0.01$), 而与癌变组织无明显差异, 说明β-cat 胞质积聚及胞核易位在癌变前的腺瘤晚期阶段就已发生, 可能是结直肠癌发生的早期事件。Shimizu 等[7]在研究中也发现在大肠腺瘤-腺癌序列中β-cat 在胞核的聚集早于 p53 突变, 并认为β-cat 胞核聚集可以作为大肠腺瘤组织癌变的预测指标。

在腺癌组织中, 溃疡型与息肉型β-cat 胞质、胞核表达率存在显著性差异, 前者明显高于后者($P<0.05$), 国外 Chiang 等[8]也有类似的发现, 他们认为这两种类型可能存在不同的生长机制, 息肉型的生长与 K-ras 基因突变导致细胞过度增殖有关, 而溃疡型则与β-cat 胞核易位引起靶基因基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)的过度表达导致组织酶性溶解相关。目前, 国内还没有这方面的研究报道, 进一步从基因及蛋白水平检测β-cat、K-ras 和 MMP-7 在结直肠肿瘤组织的表达及相互关系可能有助于发现这两种类型不同的生长调控机制。β-cat 异常表达与肿瘤浸润转移及预后的关系尚有不同意见, Brabletz 等[5]认为β-cat 胞核表达与大肠癌淋巴结转移及 Dukes 分期有关[9]。而对肝癌的研究却发现β-cat 胞核表达的患

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

者反而预后更好[10]。本研究结果显示淋巴结转移阳性及 Dukes 分期 C、D 期组β-cat 胞核表达率均显著高于淋巴结阴性及 A、B 期组($P<0.01$),与 Barbletz 等[5]的报道一致,提示β-cat 胞核表达的癌细胞可能具有更高的侵袭力,易发生淋巴结转移。

组织芯片除具有基因芯片等微阵列技术的优点外,最为突出的是它将基因、蛋白水平的研究与组织形态相结合,能在细胞水平定位和蛋白水平检测,因此在肿瘤病理,尤其是分子病理研究中具有极大的潜力和价值[2,3]。本实验采用的组织芯片经 HE 和免疫组化染色,可获取的有效信息量分别达到了 98.8%和 98.0%,完全可满足蛋白表达分析的需要。此外,本实验在阵列设计上保证了每张芯片包含有正常粘膜及癌旁粘膜,为免疫组化设置了内对照,使染色结果更加可靠。当然,组织芯片毕竟是一项新兴的生物学研究技术,由于肿瘤细胞具有异质性,芯片上微小的样本组织能否完全代表原组织标本目前尚有一定分歧。如何更好的防止制作和应用过程中的组织错位、脱片和抗原氧化等问题还有待不断探索研究。

参考文献:

[1] Bright Thomas R M, Hargest R. APC, β-catenin and hTCF: an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(2): 107-117.

[2] 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.

[3] 周小鸽, 张劲松, 张小平, 等. 组织芯片技术在检测正常组织和肿瘤组织抗原表达中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2002, 31(2): 181-182.

[4] Aust D E, Terdiman J P, Willenbucher R F, *et al*. Altered distribution of beta-catenin and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers[J]. Mod Pathol, 2001, 14(1): 29-39.

[5] Brabletz T, Jung A, Kirchner T. Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer[J]. Virchows Arch, 2002, 441(1): 1-11.

[6] 向德兵, 吴晓华, 李增鹏, 等. 大肠癌β-连环素和上皮钙黏附素表达及其意义[J]. 肿瘤防治杂志, 2002, 9(1): 39-42.

[7] Shimizu M, Yoshimi N, Shimizu S, *et al*. The relationship between the histopathological atypia and expression β-catenin in colonic neoplasms resected by endoscopy; comparison with that of p53 protein[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1999, 96(9): 1050-1056.

[8] Chiang J M, Chou Y H, Chen T C, *et al*. Nuclear beta-catenin expression is closely related to ulcerative growth of colorectal carcinoma[J]. Br J Cancer, 2002, 86(7): 1124-1129.

[9] Ougolkov A V, Yamashita K, Mai M, *et al*. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer[J]. Gastroenterology, 2002, 122(1): 60-71.

[10] Mao T L, Chu J S, Jeng Y M, *et al*. Expression of mutant nuclear beta-catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis[J]. J Pathol, 2001, 193(1): 95-101.

(编辑 张大春)

(上接 583 页)

3 讨论

食管内支架置入术虽然简便安全,但为了确保万无一失,要注意以下几点:① 病例选择要注意一些禁忌证和危险因素。如:食道静脉曲张、严重心肺功能不全等、食管病变部位在第二胸椎平面以上、有溃疡病、大出血、血小板低者等均不适合置入内支架。② 术前准备要充分。如术前麻醉效果不好,病人术中躁动、恶心、呕吐,不配合手术,心脏不好的病人要作心电监护。③ 支架选择恰当。选择支架长度时结合最近的食管钡餐片测量出狭窄长度,支架应以狭窄段为中心,两端至少大于狭窄段 2 cm,狭窄段位于主动脉弓高度时,支架的上端或下端必须跨过主动脉弓,以免支架对主动脉弓形成剪力作用,造成大出血[2]。选择支架硬度时,尽量用软型支架,因为软型支架在置入高位食管狭窄时,不易引起咽部异物感,又可减轻由于支架的撑力而引起的病人的疼痛。在喷门口和吻合口放置支架时注意支架下端不要过长以免刺激胃壁引起呕吐等。

对狭窄的预扩张。狭窄严重的病人,支架置入前要进行预扩张,现在一般采用的是球囊或萨氏扩张器,扩张到能通过支架放送器就行,个别病人如狭窄不很,也可直接释放支架,这样不仅能节约费用,还可以减少支架移位和脱落的几率,如过分扩张,会增加病人的痛苦,特别是放疗后引起的瘢痕组织,组织坚韧,不易过分扩张[3]。

支架置入后的饮食控制。术后不能立即吃冷的东西,以半流食,软食为主,禁食大块食物,因支架置入处食管蠕动功能基本消失而易致食团嵌塞,1~3 个月逐渐恢复正常饮食。正确指导病人的饮食,才能确保支架长期开通。

食管支架置入术是一种经济、快速、痛苦小、安全有效的治疗食管狭窄的方法。支架置入后还应及时进行放化疗治疗,这样才能在改善病人饮食的情况下,延长患者的生存时间。

关键词:食管;支架;恶性狭窄
中图法分类号:R571.105 文献标识码:B

参考文献:

[1] 郭卫民, 王执民, 杨仁杰, 等. 内支架置入对食管良恶性狭窄姑息性治疗的临床应用[J]. 介入放射学杂志, 2001, 10(3): 149-151.

[2] 张绪平, 易玉海, 刘汝勤. 预防食管支架置入术并发症的几点体会[J]. 医学影像学杂志, 2000, 10(4): 269.

[3] 曹德华, 黄裕宏, 耿兴祥, 等. 国产被膜网状支架治疗食管癌性狭窄初步究[J]. 介入放射学杂志, 2001, 10(1): 37-39.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net