DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.052
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1241-04

论著

粘蛋白在胆囊腺瘤样息肉中的表达及意义

陈东风,易 萍,郑 伟,周继红 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究4种粘蛋白在胆囊腺瘤样息肉中的表达规律并探讨其意义。方法 采用粘蛋白1(Mucin1,MUC1)、粘蛋白2(MUC2)、粘蛋白3(MUC3)及粘蛋白5AC(MUC5AC)的单克隆抗体,应用免疫组化和Western blot检测对照组胆囊24例,胆囊腺瘤样息肉19例。结果 MUC1、MUC2及MUC5AC免疫组化及Western blot表达在胆囊腺瘤样息肉组较对照组显著增高($P<0.01$),而MUC3在腺瘤样息肉组较对照组显著降低($P<0.01$)。结论 粘蛋白在胆囊腺瘤样息肉中呈现非同步表达,可能与其属癌前病变有关。

关键词:粘蛋白;胆囊;腺瘤样息肉
中图法分类号:R341;R730.26;R735.802 文献标识码:A

Expression and significance of mucin in cholecystic adenomatoid polyps

CHEN Dong-feng, YI Ping, ZHENG Wei, ZHOU Ji-hong (Department of Gastroenteroleogy, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the regular rules of mucins expression in cholecystic adenomatoid polyps and investigate its relationship with precancerous lesions. **Methods** Mucin1 (MUC1), Mucin2 (MUC2), Mucin3 (MUC3) and Mucin5AC (MUC5AC) were detected in the mucosa of 24 human normal gallbladders, and 19 gallbladders with adenousmatoid polyps with immunohistochemical and Western blotting methods. **Results** The positive rates by immunohistochemistry and optical density values (ODU) from Western blotting of MUC1, MUC2 and MUC5AC were increased significantly ($P<0.01$), but, MUC3 was decreased markedly ($P<0.01$) in the polyps group vs control. **Conclusion** The expressions of mucin are not consistent with adenomatoid polyps of gallbladder. Mucin may be associated with precancerous lesions in the cholecyst.

Key words: mucin; cholecyst; adenomatoid polyps

粘蛋白(Mucin,MUC)是一类以高度糖基化和含有连续重复肽链序列为特征的高分子量糖蛋白,在体内分布广泛,粘蛋白与某些肿瘤的发生、发展及预后有一定关系。多数学者认为胆囊息肉,尤其是腺瘤样息肉属胆囊癌的癌前病变,粘蛋白在胆囊腺瘤样息肉中的变化既往研究较少。本研究旨在研究4种粘蛋白MUC1、MUC2、MUC3和MUC5AC在胆囊腺瘤性息肉中的变化及意义,探讨粘蛋白与胆囊癌前病变的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象

所有患者均系我院及新桥医院1999年3月至2001年3月因胆囊结石或胆囊息肉而行胆囊切除术者,手术时无急性炎症发作。对照组胆囊标本24例,标本取自其它疾病行胆囊切除之胆囊,且经组织学检查证实无明显炎症、增生及化生等病理改变。19例胆囊息肉标本,息肉直径0.5~1.0 cm,均经病理检查证实为腺瘤样息肉。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 MUC1、MUC2、MUC3及MUC5AC单克隆抗体购自深圳晶美生物公司,抗体工作深度为1∶80。ABC染色试剂盒购自深圳晶美公司。

1.2.2 Western二抗(辣根过氧化酶标记的抗鼠IgG)购自北京中山试剂公司。Western blot发光试剂盒(NENTM公司 美国),PVDF膜(Behringer Mannhein公司),核酸蛋白分析仪(Beckman美国),转移槽(BIORAD 美国),胶片(FUJI 日本),GL Doc 2000图像分析系统(美国)。

1.3 方法

1.3.1 常规HE染色,光镜观察病理变化。

1.3.2 免疫组织化学染色 操作步骤按文献[1]进行。

1.3.3 Western blot杂交[2]

1.3.3.1 粘膜组织匀浆及样品制备 取胆囊粘膜或息肉组织100~200 mg置入10 ml离心管中,剪碎后加入细胞裂解液1 ml,充分匀浆,4 ℃ 12 000 r/min离心10 min,去上清液分装成20 μl/管,蛋白分析仪测定蛋白浓度,用三蒸水调校蛋白浓度为20 μg/ml,然后加入等体积缓冲液稀释备用。上样后煮沸5 min,短暂离心,按每孔60 μg蛋白准备上样。

1.3.3.2 电泳 垂直电泳槽中加入分离胶,然后用注射器注入浓缩胶,插入梳子,室温聚合1 h。待胶完全聚合后取下梳子,用滤纸吸净样品孔中液体。按每孔60 μg蛋白上样,每样上两块平行胶,按对照组、息肉组顺序上样。向电泳槽内加入Tris-甘氨酸电泳缓冲液,预电泳电压先以80 V恒压进行,待溴酚蓝指示剂入分离胶后将电压改为120 V电压,待指示剂到达底边处停止电泳,取胶。

1.3.3.3 电转膜 取分离胶置于转移缓冲液中30 min,按塑料孔板-海绵-滤纸电泳凝胶-PVDF膜-滤纸-海绵依次组装好转印夹层,置于转移槽中转膜,加入转移缓冲液,80 mA恒流电转移15~20 h。

1.3.3.4 杂交 取下PVDF膜,PBS洗3× 5 min。置于1% BSA/PBST中4 ℃封闭过夜,加入1∶100稀释的一抗,37 ℃× 1 h,取出PVDF膜1× PBST漂洗1× 15 min,4× 5 min加标记的相应二抗(1∶1 000),37 ℃× 1 h,PBST漂洗1× 15 min,4× 5 min。

1.3.3.5 制片 取NEN化学发光试剂A、B液各1 ml放入玻璃培养皿中混匀,加入PVDF膜约40 S后蛋白条带均匀发光

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970039)
作者简介:陈东风(1964-),男,重庆市涪陵区人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝脏损伤与修复、胆石症及消化介入方面的研究,发表论文40篇。电话:(023)68757342
收稿日期:2002-07-31;修回日期:2002-09-04

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

后取出，放入暗盒使 X 线胶片爆光 0.5～3 min，取出胶片放显影液中显影，清水冲洗后放入定影液中 20～30 min，冲洗、凉干、观察结果。

1.3.3.6 Western Blot 杂交分析 所得结果扫描入计算机，采用 GL Doc2000 图像分析系统进行图像分析处理。

1.3.4 统计学分析 所得数据采用 SPSS 统计软件(8.0)进行 χ^2 检验及 t 检验。

2 结果

2.1 光镜观察

所有对照组胆囊标本均无明显炎细胞浸润，也未见化生、增生。胆囊腺瘤样息肉病变皆为单发，0.2～0.5 cm，表面光滑、扁圆无蒂。镜下见粘膜局限性增生，固有膜下可见少许炎细胞浸润，未见典型恶变征象。

2.2 4 种粘蛋白在胆囊腺瘤样息肉中的免疫组化表达，见表 1

2.2.1 MUC1 免疫组化表达情况 经免疫组化染色观察发现对照组 MUC1 阳性表达主要由柱状细胞表达，胞浆内呈颗粒状乃至片状分布，胞核内无表达。腺瘤性息肉标本中 MUC1 表达广泛，细胞表面、胞浆内皆有表达，且着色颗粒多，染色呈深棕色。从表 1 可看出，胆囊腺瘤样息肉 MUC1 阳性表达率与对照组比较差异非常显著($P<0.01$)，见图 1。

表 1 MUC1、MUC2、MUC3 和 MUC5AC 在胆囊腺瘤样息肉中的表达

Tab 1 Positive rates of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC5AC in gallbladder adenomatoid polyps and control

Group	n	Positive cases (%)			
		MUC1	MUC2	MUC3	MUC5AC
Control	24	10(41.7)	5(21)	18(75)	13(54.2)
Adenomatoid polyps	19	17(89.5) **	16(84.29) *	2(10.5) **	17(89.5) **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control

2.2.2 MUC2 免疫组化表达情况 对照组阳性表达仅占 5 例(21%)，腺瘤样息肉组阳性表达高达 16 例(84.2%)，差异非常显著。MUC2 粘蛋白呈颗粒状分布于胞浆中，也见于细胞表面，但表达较弱。腺瘤样息肉组 MUC2 表达部位与对照组相同，但表达阳性及表达强度都较对照组高，见图 2。

2.2.3 MUC3 免疫组化表达情况 对照组 MUC3 表达阳性率高达 18 例(75%)，与 MUC1、MUC2 及 MUC5AC 不同的是，腺瘤样息肉组 MUC3 表达明显减少，仅 2 例(10.5%)，差异非常显著($P<0.01$)。同时 MUC3 在腺瘤样息肉组粘蛋白表达分布于胞浆内，胞核周围密度增大，核内仍无表达，见图 3。

2.2.4 MUC5AC 免疫组化表达 对照组胆囊标本粘蛋白弥漫均匀分布于胞浆两极区域，粘膜表面也有均匀的一层阳性表达产物。腺瘤样息肉组表达情况相似，仅阳性率显著升高($P<0.05$)，表达阳性密度总体观察稍有增强，见图 4。

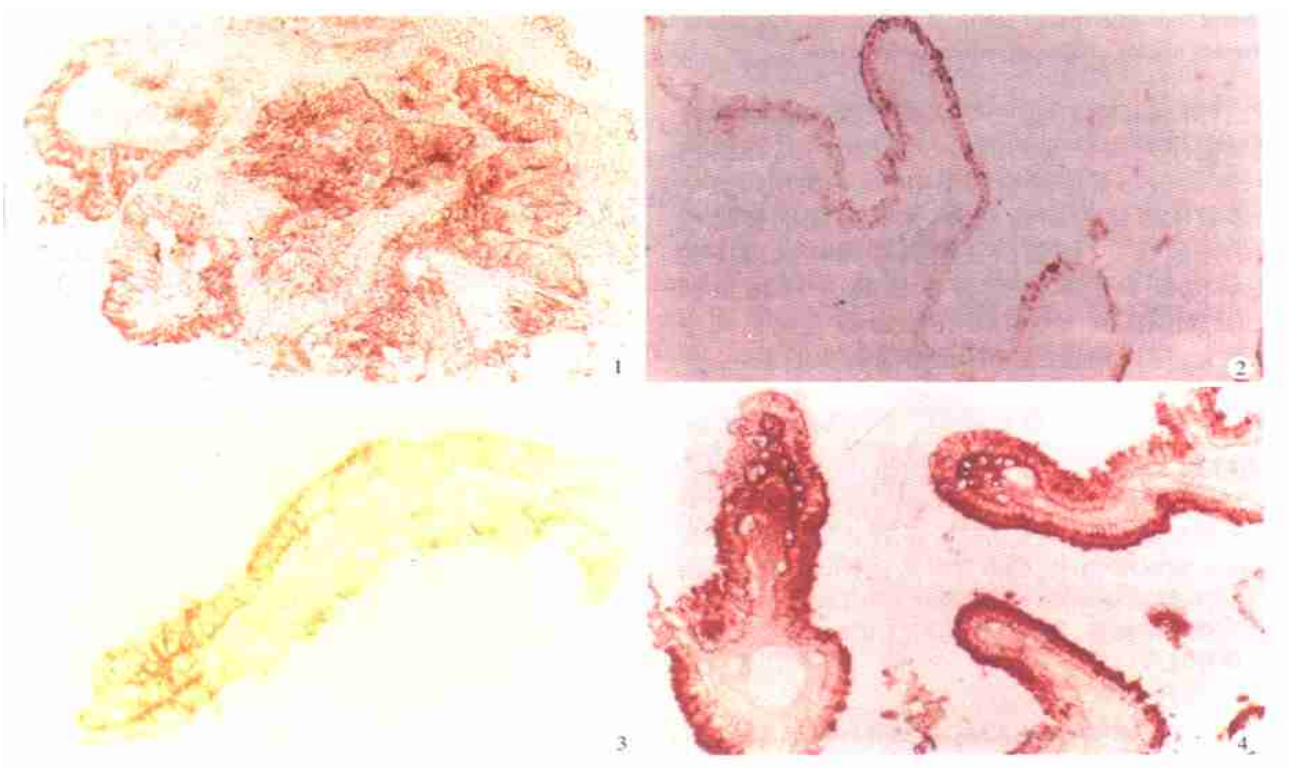


图 1 MUC1 在腺瘤样息肉中的表达 (ABC×200)

Fig 1 Expression of MUC1 in gallbladder adenomatiod polyps (ABC× 200)

图 2 MUC2 在腺瘤样息肉中的表达 (ABC×200)

Fig 2 Expression of MUC2 in gallbladder adenomatiod polyps (ABC× 200)

图 3 MUC3 在腺瘤样息肉中的表达 (ABC×200)

Fig 3 Expression of MUC3 in gallbladder adenomatiod polyps (ABC× 200)

图 4 MUC5AC 在腺瘤样息肉中的表达 (ABC× 200)

Fig 4 Expression of MUC5AC in gallbladder adenomatiod polyps (ABC× 200)

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

2.3　4 种粘蛋白 Western blot 杂交分析见表 2

表 2　4 种粘蛋白 western blot 杂交结果($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　ODV from Western blotting of mucin in cholecyst adenomatiod polyps and control($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Odu/mm² of western blotting which seanning by computer			
	MUC1	MUC2	MUC3	MUC5AC
Control	34.29±6.06	—	109.14±44.06	68.31±2.80
Adenomatoid polyps	174.59±41.6**	21.26±3.30	22.80±6.40**	286.10±39.15**

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* control; Odu: optical denstity values

MUC1 粘蛋白, Western blot 所得结果与免疫组化结果一致, 腺瘤性息肉组表达量显著高于对照组, 然而在 MUC2, 对照组胆囊几乎不表达, 这与免疫组化结果似乎相矛盾。事实上免疫组化结果也同样提示对照组 MUC2 表达与 MUC1、MUC3、MUC5AC 相比是最少的, 仅有 5 例, 但 Western blot 显示在腺瘤性息肉组已有一定的表达, 尽管无法进行统计分析, 但此时其表达明显增高。MUC3 同免疫组化结果相同, 在腺瘤性息肉组表达量同样显著低于对照组。MUC5AC 与 MUC1 和 MUC2 变化相一致, 腺瘤性息肉组较对照组显著升高($P<0.01$)。

3　讨论

粘蛋白(MUC)是一类含有寡糖链的糖蛋白, 其分子量较大, 糖链的比例约占整个分子量的 50%～90%。粘蛋白主要存在于胃肠道、呼吸道、泌尿生殖道表面细胞及其分泌的粘液中, 除保护和润滑功能外, 还参与细胞间粘附、细胞间通讯, 作为细胞受体等多种功能[3]。迄今, 已发现 9 种粘蛋白, 分别被命名为 MUC1～9。胆囊上皮细胞也可分泌粘蛋白, 胆汁中有丰富的粘蛋白成分, 对粘蛋白研究既往主要集中在胃肠道相关疾病, 与胆囊疾病, 尤其是与腺瘤样息肉的研究甚少[4]。

粘蛋白与癌前病变及癌的关系既往研究集中在胃肠道肿瘤及乳腺肿瘤等领域, 研究表明粘蛋白与胃癌及乳腺癌及其癌前病变有一定关系, 粘蛋白可作为一种肿瘤标志物[5], 并有学者发现粘蛋白相关性肿瘤疫苗可作为肿瘤生物治疗的一种方式, 有一定效果[6]。在胆囊的慢性炎症和胆囊结石的长期反复刺激下, 胆囊上皮细胞会发生化生、增生、不典型增生, 还可发生息肉。胆囊息肉, 尤其是腺瘤样息肉常伴有增生和化生, 与胆囊癌发生有一定关系, 被认为属癌前病变范畴[7]。

MUC1 和 MUC5AC 在对照组胆囊粘膜中皆有表达, 主要分布于柱状的细胞浆内, 而 MUC1 和 MUC5AC 也同时存在于细胞表面, 可能与 MUC1 和 MUC5AC 是跨膜蛋白有关, MUC1 和 MUC5AC Western blot 结果与免疫组化结果一致, 提示这两种粘蛋白广泛存在于胆囊上皮细胞中, 是胆囊上皮细胞合成和分泌的一种蛋白质。在胆囊息肉组, 免疫组化显示 MUC1 和 MUC5AC 较对照组阳性率明显升高($P<0.01$), 且阳性表达程度明显增高, 颗粒多、染色深、偶可见聚积现象, Western blot 也显示同样结果。提示在发生胆囊腺瘤样息肉时, MUC1、MUC5AC 表达明显增强, 这可能与其基因被激活, 使其呈现出增殖能力活跃的生物学性状[8], 从病理学角度看胆囊腺瘤样息肉常伴有化生和不典型增生, 可能属于胆囊癌前病变的一种。我们的研究结果与 MUC1 和 MUC5AC 在胃癌前病变中变化相类似[9], 这从另一个侧面提示胆囊腺瘤样息肉可能是一种癌前病变。

MUC2 在正常胆囊粘膜阳性率较低, 阳性颗粒数量少, 且主要存在于胞浆内, 这可能是因为 MUC2 属分泌蛋白有关。在腺瘤样息肉组阳性率显著增高($P<0.05$), 而 Western blot 结果与免疫组化略有不同, 对照组胆囊标本表达极微弱, 而在腺瘤样息肉时表达有所增加, 这与在膀胱癌研究中发现当细胞显示增生活跃、分化度变差时, MUC2 基因可被激活, 使得其蛋白表达有所增加[10]。尽管这与 MUC1、MUC5AC 变化相一致, 但为何正常胆囊上皮中 IHC 染色可出现阳性, 而 Western blot 几乎无杂交信号, 这可能与 MUC2 在正常胆囊粘膜表达少或免疫组化结果干扰因素较多有关[11]。

MUC3 主要分布于肠道, 肠癌时表达明显增强[12]。四种粘蛋白中, MUC3 在对照组阳性率最高, 是因为 MUC3 是正常胆囊上皮细胞分泌的主要粘蛋白[13]。但在胆囊腺瘤样息肉时, MUC3 表达却显著下降($P<0.01$), 结合病理观察腺瘤中不典型增生越重者 MUC3 表达越少, 其原因可能是癌前病变或发生癌变时 MUC3 大量消耗或基因关闭、突变所致。我们还在胆囊炎中的研究资料显示 MUC3 随炎症加重也进行性下降, 腺瘤时更低。这是否提示胆囊结石、慢性炎症、癌前病变是一个相互关联, 渐进发展的过程。

胆囊息肉样病变属胆囊癌前病变范畴, 4 种粘蛋白在正常胆囊粘膜及息肉时表达不同步, 提示疾病状态下粘蛋白表达有时序性。粘蛋白与胆囊腺瘤样息肉发生和发展有一定关系, 但它们是否为胆囊腺瘤样息肉向胆囊癌发展的始动或促进因素, 尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 蔡文琴, 王泊云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.496－497.

[2] 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1995.888－905.

[3] Voynow J A, Rose M C. Quantitation of mucin mRNA in respiratory and intestinal epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 11(6): 742－756.

[4] Klinkspoor J H, Yoshida T, Lee S P. Bile salts stimulate mucin secretion by cultured dag gallbladder epithelial cells independent of their detergent effect[J]. Biochem J, 1998, 332(pt1): 257－262.

[5] Yao T, Kouzuki T, Kajiwara M, *et al*. Serrated adenoma of the colorectum, with reference to its gastric differentiation and its malignamt potential

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

[J]. J Pathol, 1999, 187(5): 511—517.
[6] Apostolopoulos V, Saudrin M S, Mckenzie I F. Carbohydrate/peptide mimics: effect on MUC1 cancer immunotherapy[J]. J Mol Med, 1999, 77(5): 427—436.
[7] 于皆平, 沈志祥, 罗和生. 实用消化病学[M]. 北京: 科学出版社 1999. 1 321—1 322.
[8] Yamato T, Kurumaya H, Ohama K, *et al*. Frequent expression of mucin core protein MUC1 in non-neoplastic gallbladder mucosa[J]. Liver, 1999, 19(4): 281—287.
[9] Biemer-Huttmann A E, Walsh M D, McGuckin N A, *et al*. Immunohistochemical staining patterns of MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC mucins in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and traditional adenomas of the colorectum[J]. J Histochem Cytochem, 1999, 47(8): 1 039—1 048.
[10] Yamato T, Sasaki M, Watauabe Y, *et al*. Expression of MUC1 and MUC2 mucin core proteins and their mRNA in gall bladder carcinoma[J]. J Pathol, 1999, 188(1): 30—37.
[11] Ho S B, Shekels L L, Toribara N W, *et al*. Altered mucin core peptide expression in acute and chronic cholecystitis[J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(6): 1 061—1 071.
[12] Buisine M P, Colombel J F, Lecomte-Houcke M, *et al*. Abnormal mucins in cap polyposis[J]. Gut, 1998, 42(1): 135—138.
[13] Vandenhaute B, Buisine M P, Deharlleul Y, *et al*. Mucin gene expression in biliary epithetial cells[J]. J Hepatol, 1997, 27(6): 1 057—1 066.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)10-1244-01

6 例骨原发性平滑肌肉瘤临床病理、免疫组化研究及文献复习

Clinicopathologic and immunohistochemical study of 6 cases of primary leiomyosarcoma derived from bone and literature review

李增鹏, 仲召阳, 吴晓华, 陈 芳 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科, 重庆 400042）

骨原发性平滑肌肉瘤比较少见, 自 Evans(1965 年)首先报道 1 例发生于左胫骨上端的平滑肌肉瘤以来, 国内外共报道百余例, 我们报道 6 例骨原发性平滑肌肉瘤, 并结合文献对其临床病理特征及组织发生进行探讨。

1 材料和方法

6 例骨原发性平滑肌肉瘤选自大坪医院 1997—1999 年, 经病理确诊。全部标本用 10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片。试剂 SMA、Vimentin、S-100、CK、Desmin 均为 Dako 公司产品。

2 结果

2.1 临床资料

6 例骨原发性平滑肌肉瘤, 男性 5 例, 女性 1 例, 年龄 28～67 岁, 平均年龄 44 岁。临床症状最多见为疼痛, 其次为肿块及病理性骨折, 病变部位最多见于下肢长骨的干骺端, 尤其是膝关节附近 4/6(66.7%), 其次为股骨粗隆及胫骨, 各占 16.7%, 有 2 例发生复发及转移, 分别转移到肺和骨。X 线主要表现为溶骨性破坏, 3 例呈中心无明确境界的不规则斑片状溶骨性破坏, 2 例呈囊状多房膨胀性改变, 并且有溶骨性破坏。1 例为境界不清的斑片状溶骨区伴有不规则致密钙化影, 有明显的骨膜反应, 表现为 Codman 三角。

2.2 病理资料

2.2.1 巨检 肿瘤特征性的表现为浸润性的灰白色肿块伴有局灶性坏死和囊性变。损害范围 2～8 cm, 平均为 5.3 cm, 有 3 例(50%)穿透皮质, 累及软组织。肿块多为结节状, 质嫩, 呈鱼肉样。病变处骨皮质扩张变薄, 部分突破骨皮质向肌肉浸润性生长形成多个小结节。

2.2.2 光镜观察 肿瘤细胞呈束状排列, 部分区域显示有特征性的车辐状排列。高分化的平滑肌肉瘤, 瘤细胞长梭形, 胞浆丰富、红染, 有的核两端钝圆, 呈雪茄样, 核模清晰, 核染色质呈颗粒状, 核分裂多少不等, 另外可见有典型的血管外皮瘤样病变, 多形性的平滑骨肉瘤中, 瘤细胞大小不一, 形态各异, 核圆形、椭圆形, 梭形, 不规则形, 可见有多核细胞及巨细胞。核分裂像多见, 间质有出血、坏死及炎细胞浸润。上皮样平滑肌肉瘤中可见肿瘤细胞呈圆形, 核大空泡状, 有清楚的核仁。每 10 个高倍视野的核分裂例 1 到 16 例, 平均为 5～6 个。

2.3 免疫组化结果

所有肿瘤的 Vimentin 和 SMA 都强阳性, 弥漫分布, 有 3 例 Desmin 和 S-100 呈局灶性弱阳性, 1 例上皮样平滑肌肉瘤, 低分子量角量蛋白呈局灶性弱阳性。

2.4 随访

6 例均得到随访, 随访时间为 4～27 个月, 随访结果, 4 例无瘤生存, 2 例发生转移, 1 例转移到股骨上段, 另一侧转移到肺, 3 个月后死亡。

3 讨论

骨原发性平滑肌肉瘤比较少见, 发病年龄为 13～90 岁, 高峰年龄为 60～70 岁, 男女发病率大致相等。长期进行放化疗患者, 白血病、淋巴瘤以及 Paget 病的患者, 双侧视网膜母细胞瘤的患者, 易患有骨内平滑肌肉瘤。临床症状无特异性, 最多见为疼痛, 其次为肿块及病理性骨折。肿瘤具有孤立性发生的特点。本肿瘤较少发生转移, 转移最多见于肺, 其次为骨。骨

（下转 1247 页）

作者简介: 李增鹏(1958—), 男, 山东省济南市人, 副教授, 主要从事肿瘤方面的研究, 发表论文 10 篇。电话: (023)68757384

收稿日期: 2001-10-09; 修回日期: 2001-12-09

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