

应用组织芯片和 ISH 技术检测人体多种 肿瘤中 hTER mRNA 和 hTERT mRNA 的表达

杨 军,王康敏,苏宝山,黄 莺,赵世平

(西安交通大学第二医院病理科,西安 710004)

摘 要:目的 探讨组织芯片技术在原位杂交中的应用及 hTER 和 hTERT 在人体多种常见肿瘤中的表达。方法 利用自行研制的专用器具制作组织芯片,采用原位杂交技术(ISH)检测 230 例人体肿瘤和正常组织中 hTER 和 hTERT 基因的表达。结果 组织芯片中组织样本的组织学结构完整,满足病理学实验要求;采用组织芯片技术消耗的实验材料、试剂为普通方法的 1/23。在人体正常组织和良性肿瘤、恶性肿瘤组织中,hTER 和 hTERT 的表达与肿瘤的性质明显相关($P < 0.005$)。结论 组织芯片技术提供了一种快速、有效的组织学方法,可广泛应用于原位杂交实验,并有可能在肿瘤生物学研究中发挥重要的作用。同时,hTER 和 hTERT 表达上调有可能作为人体肿瘤诊断与鉴别诊断的重要组织学指标。

关键词:组织芯片;肿瘤;端粒酶;原位杂交(ISH)

中图分类号:R433; R73 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-0659(2002)03-0236-03

Tissue chip and ISH analysis of hTER mRNA and hTERT mRNA expressions in different human tumor types

Yang Jun, Wang Kangmin, Su Baoshan, et al

Department of Pathology, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

ABSTRACT: Objective To explore the application and values of tissue chip in ISH, and to analyse hTER and hTERT mRNA expressions in different human tumor types. **Methods** Patent embedding instrument was used to prepare tissue chips. Then, ISH was used to determine the expressions of hTER mRNA and hTERT mRNA in 230 specimens of human tissues (10 cases of normal tissues; 13 cases of benign tumors; 207 cases of malignant tumors). **Results** The histological structure of the specimens was complete in tissue chips. It met the requirements of pathological experiments. The quantities of the experimental reagents and materials of the experiments were only 1/23 times of making the same experiment by common methods. The expressions of hTER mRNA and hTERT mRNA in normal tissues, benign and malignant tumors were significantly related to characterization of tumor ($P < 0.005$). **Conclusion** Up-regulation of hTER and hTERT expression can be used as an important histological sign for the diagnosis and identification of human tumor. And tissue chip provides a rapid and powerful histological method that may be used in ISH and plays an important role in tumor biology.

KEY WORDS: tissue chip; tumor; human telomerase; in situ hybridization (ISH)

生物芯片技术一般包括基因芯片和蛋白芯片。

1988年 Kono¹报道了一种组织微阵列(Tissue

microarray)技术,也叫组织芯片(Tissue chip)技术,是生物芯片(Biochip)的一个新类型。本研究应用这一技术和原位杂交技术(in situ hybridization technology, ISH)检测 230 例人体多种肿瘤和正常组织中端粒酶 hTER mRNA 和 hTERT mRNA 的表达。

收稿日期:2001-10-10 修回日期:2001-11-09

基金项目:陕西省科技攻关项目(No. 2001 K10-G2);西安市科技发展计划项目(No. YG200120);西安交通大学第二医院基金(No. KG2001-01)

作者简介:杨军(1972-),男(汉族),病理学在读博士,主治医师,研究方向:肿瘤生物学。

1 材料和方法

1.1 标本来源 230 例标本均取自 1999 年西安交通大学第二医院病理科外检标本,其中包括恶性肿瘤 207 例:胃腺癌 22 例,食管鳞癌 21 例,十二指肠腺癌 3 例,结肠腺癌 12 例,直肠腺癌 5 例,肝细胞癌 7 例,肝胆管细胞癌 1 例,胆囊腺癌 4 例,胰腺腺癌 2 例,喉鳞癌 8 例,上颌窦鳞癌 1 例,扁桃体鳞癌 1 例,肺鳞癌 4 例,肺腺癌 2 例,膀胱移行细胞癌 12 例,输尿管移行细胞癌 2 例,肾盂移行细胞癌 1 例,肾脏透明细胞癌 17 例,乳腺癌 26 例,甲状腺乳头状癌 14 例,甲状腺滤泡状癌 3 例,甲状腺髓样癌 3 例,子宫内膜腺癌 2 例,宫颈鳞癌 5 例,外阴鳞癌 1 例,卵巢囊腺癌 3 例,平滑肌肉瘤 2 例,B 细胞淋巴瘤 5 例,髓母细胞瘤 5 例,神经母细胞瘤 2 例,视网膜母细胞瘤 1 例,肾母细胞瘤 2 例,精原细胞瘤 1 例,恶性黑色素瘤 2 例,神经纤维肉瘤 1 例,软骨肉瘤 1 例,恶性纤维组织细胞瘤 3 例;良性肿瘤 13 例:乳腺纤维腺瘤 2 例,胃平滑肌瘤 1 例,小肠平滑肌瘤 1 例,神经纤维瘤 2 例,胃息肉 1 例,结肠息肉 1 例,甲状腺腺瘤 4 例,肾上腺腺瘤 1 例;正常对照组织 10 例:胃粘膜 1 例,食管粘膜 1 例,小肠粘膜 1 例,肝脏组织 1 例,乳腺组织 1 例,宫颈组织 1 例,支气管粘膜 1 例,肾脏组织 1 例,脾脏组织 1 例,甲状腺组织 1 例。

1.2 包含 23 例样本的组织芯片制备 按照本研究室建立的制备方法制备 4×6 规格(行×列)的组织芯片(容量为 23 份组织样本/张)。其制备方法如下:先在光学显微镜下对 230 例入选标本石蜡蜡块的 HE 切片进行观察,选择合适区域,利用自行研制的专用器具挖取蜡块内组织,挖取出的组织呈圆柱形,直径 1.5 mm,长 3 mm,将其每 23 例样本为一组依次包埋于同一石蜡蜡块中并编号。然后,常规石蜡切片,厚 5 μm,附于涂有 1 g L⁻¹多聚赖氨酸的载玻片上,烤干,制备组织芯片共 20 张。

1.3 原位杂交 10 人份 hTER 和 hTERT 原位杂交试剂盒均购自北京医科大学病理学系。按说明书操作。

1.4 结果判断

1.4.1 组织芯片质量判定 从切片有无皱折、缺损、脱片和实验消耗时间、试剂、材料等方面与常规切片比较。

1.4.2 原位杂交结果判定 细胞质或细胞核内出现紫棕色颗粒为阳性。染色强度分级为:阴性(-):肿瘤细胞不显色;阳性(+):阳性细胞数 <

25%;阳性(++) :肿瘤细胞呈紫色,并且阳性细胞数为 25%~50%;强阳性(+++) :肿瘤细胞呈深紫色,阳性细胞数 >50%。

1.5 结果统计 秩和检验。

2 结果

2.1 组织芯片观察结果 制作的 20 张组织芯片上,直径 1.5 mm 的圆形组织样本均以规则的点阵方式排列,组织学结构完整;18 份组织样本脱片,可分析样本 221 例(共 442 份组织样本),平均脱片率为(3.9±2.4)%;原组织样本石蜡蜡块完整,仍可继续切片;原位杂交切片染色背景清晰、对比良好(见图 1~3)。

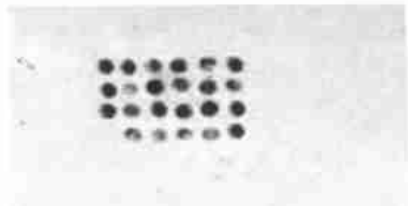


图 1 制备的 4×6 规格组织芯片
ISH 检测 hTER 的表达



图 2 组织芯片上组织样本显微结构
ISH 检测 hTER 的表达

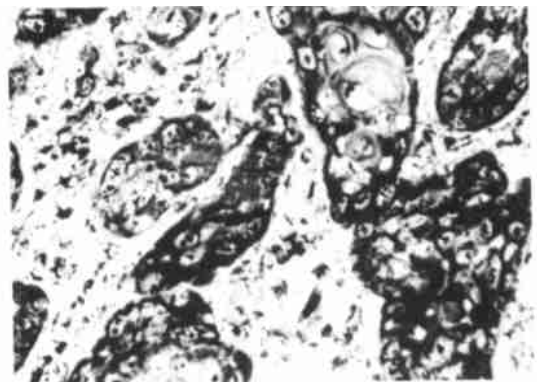


图 3 hTER mRNA 在食道鳞状细胞癌中的表达
ISH 法 NBT/BCIP 显色,阳性信号位于细胞
浆中(+++) ×200

2.2 原位杂交检测结果

2.2.1 hTER mRNA 和 hTERT mRNA 的表达 见表 1。

表1 hTER mRNA和hTERT mRNA在230例人体肿瘤和正常组织中的表达率

标本	例数 (例)	可分析例数 (例)	-		+		#		##	
			hTER	hTERT	hTER	hTERT	hTER	hTERT	hTER	hTERT
恶性肿瘤	207	201	23	36	33	62	66	53	79	50
%		97.1	11.4	17.9	16.4	30.8	32.8	26.4	39.3	24.9
良性肿瘤	13	11	5	7	5	4	1	0	0	0
%		84.6	45.5	63.6	45.5	36.4	9	0	0	0
正常对照	10	9	4	7	5	2	0	0	0	0
%		90	44.4	77.8	55.6	22.2	0	0	0	0

注: $H_{ChTER} = 110.048$, $H_{ChTERT} = 100.245$, $P < 0.005$

2.2.2 hTER mRNA和hTERT mRNA阳性细胞的组织学分布 hTER阳性信号分布于肿瘤细胞的细胞质和部分细胞核中,在正常组织中hTER的表达仅限于基底层,只有少数基底细胞出现弱阳性表达,在良性肿瘤中阳性细胞呈散在性分布,且多为弱阳性表达,在恶性肿瘤中阳性细胞呈团状、巢状、片状弥漫性分布。hTERT阳性信号分布于肿瘤细胞的细胞质中,而阳性细胞的分布与hTER的分布规律相似,即在正常组织中仅限于基底层,只有少数散在的基底细胞出现弱阳性表达,在良性肿瘤中呈散在性分布,且多为弱阳性表达,在恶性肿瘤中阳性细胞呈团状、巢状、片状弥漫性分布。

3 讨论

3.1 人体肿瘤与端粒酶 本研究利用组织芯片和原位杂交技术对207例人体常见恶性肿瘤、13例良性肿瘤和10例正常组织进行了hTER和hTERT mRNA的检测,结果提示:随着病程的进展,hTER和hTERT的表达明显上调($P < 0.005$),表明hTER和hTERT的活化与肿瘤的发生和进展显著相关。

但是在本实验中还发现,11.4%(23/207)恶性肿瘤中hTER阴性,17.9%(36/207)恶性肿瘤中hTERT阴性,而在55.6%(5/9)正常组织中hTER呈弱阳性表达,22.2%(2/9)正常组织中hTERT呈弱阳性表达。推测前者可能是存在其他的端粒酶外机制导致肿瘤的发生;对于后者,有研究发现hTER和hTERT的表达与细胞的高增殖活性有关²,Kenji³等学者发现细胞的增殖与hTERT的表达关系更为密切,推测可能是这些正常对照组织中包含有不典型增生、高增生性上皮,而不典型增生的细胞、腺体细胞象肿瘤细胞一样拥有高的增殖活性,因而正常对照组织中hTER和hTERT表达上调。这一结果揭示可能hTER亚基和hTERT亚基表达上调在肿瘤发生的过程中仅发挥着基础

性的作用,而各亚基间的表达水平及其之间的相互平衡、各亚基的转录和转录后修饰及某些我们目前还不知的因素可能在端粒酶活性调节和肿瘤的发生发展中发挥重要作用。

从阳性信号和阳性细胞的分布来看,随病变程度的增加hTER和hTERT的表达上调,且hTER和hTERT阳性细胞向全层弥散。这与Kazuo Y等研究宫颈癌的结果一致⁴。

因此认为,hTER和hTERT表达上调、分布紊乱对于鉴别肿瘤的良恶性具有重要意义,并有可能作为恶性肿瘤诊断的病理组织学指标。

3.2 组织芯片技术 组织芯片技术是针对在原位检测不同样本的同一实验指标设计的。可同时对数十个组织样本进行DNA、RNA或蛋白水平的原位组织学研究。

本研究利用自行研制的已取得国家专利的制作组织芯片的专用器具(专利号ZL 00207528.8,专利号ZL 00262393.5),在制备的4×6规格的20张组织芯片上,共有460份组织样本,其中18份组织样本脱片,平均脱片率仅为(3.9±2.4)%。仅用10人份hTER和hTERT原位杂交试剂便完成了对230例标本中hTER和hTERT两个指标的原位杂交检测,所消耗的实验材料、试剂和时间仅为普通方法的1/23,因此可极大地节约实验材料,提高了实验效率。运用组织芯片和FISH技术,Schraml⁵等学者在一周内检测了17种肿瘤397例样本中CCND1、CMYC和ERBB2三种癌基因的表达。Richter⁶在两周内检测1842例膀胱癌患者中2317份样本中cyclin E基因CCNE的表达。可见应用这一技术使得一次切片、染色便可完成普通方法所需要的几十次实验操作,这对于大样本的回顾性研究具有重大意义。同时,由于组织块的选取是依据原组织蜡块的HE切片为依据的,可人为控制组织实质和间质的比例,并避开了过多的间质

(下转第254页)

的适宜的应激能够升高血清中的甲状腺激素水平⁸。我们在实验中发现,单纯缺水应激组大鼠血清中的甲状腺激素水平显著升高,而情绪应激组大鼠血清中的甲状腺激素水平无显著变化,这就意味着,应激也能对甲状腺系统的活动进行调节,但这种调节作用是复杂的,多方面的,而且还会因应激原的不同而有所不同。与单纯缺水应激相比,情绪应激引起的反应可能更为广泛,不但能够活化甲状腺系统,而且同时激活抗甲状腺系统,以限制应激引起的反应。

GH系统也与应激反应有关,急性应激可以降低大鼠外周血中GH的分泌⁹,这种作用是通过下丘脑CRF的释放,导致生长抑素分泌增加引起的¹⁰。本实验发现,慢性情绪应激与慢性生理性应激对外周血中的GH均无显著影响。这也从另一方面说明了,机体对应激的反应是一种复杂的生理过程,随着应激的持续进行,多个过程被启动,促进GH分泌的机制与抑制GH分泌的机制相互作用,相互影响,从而使外周血中GH并未表现出明显的变化。

由以上可知,应激刺激对机体的影响是复杂的、多方面的,能够通过调节HPA轴,甲状腺系统等多个系统的活动而对机体进行调节。不同类型应激的作用也不尽相同,情绪应激较单纯缺水应激强度更大,引起的反应也更为广泛,能够激活多个系统,共同协调应激引起的生理、生化反应,以最大限度地降低应激引起的损害,使动物能更好地适应环境。

参考文献:

- 1 Sabban EL, and Kvetnansky R. Stress-triggered activation

(上接第238页)

和出血及坏死区,减少其对实验结果的影响。此外,由于将多个组织样本排列于同一切片,使原位杂交尽可能地在同一条件下进行,减少了传统实验方法中不同样本间的实验误差。组织芯片作为一种新的生物芯片,可与原位杂交技术相结合,应用于组织学的原位研究中,并将会在很大程度上提高病理组织学的研究效率。

参考文献:

- 1 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimen J. Nat Med, 1998, 4 (7): 844 - 847.
- 2 Belair CD, Yeager TR, Lopez PM, et al. Telomerase activity a biomarker of cell proliferation, not malignant

of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events J. Trends Neuroscience, 2001, 24 (2): 91 - 98.

- 2 邵枫,林文娟,王玮雯,等.心理应激的免疫抑制作用及其神经内分泌反应的相关性J. 心理学报,2001,33(1):43 - 47.
- 3 Hölcher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks J. Behavioural Brain Res, 1999, 100 (1-2): 225 - 235.
- 4 Stillman MJ, Shukitt-Hale, Barbara, et al. Spatial memory under acute cold and restraint stress J. Physiology and Behavior, 1998, 64(5): 605 - 609.
- 5 Dayas CV, Buller KM, Day TA. Medullary neurons regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor J. Neuroscience, 2001, 105 (3): 707 - 719.
- 6 Dayas CV, Buller KM, Day TA. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala J. Eur J Neurosci, 1999, 11(7): 2312 - 2322.
- 7 Cremaschi GA, Görelík G, Klecha AJ. Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis J. Life Sciences, 2000, 67(26): 3171 - 3179.
- 8 Kioukia N, Bekris S, Antoniou K. Effects of chronic mild stress(CMS) on thyroid hormone function in two rat strains J. Psychoneuroendocrinol, 2000, 25(3): 247 - 257.
- 9 Eck JB, Kuhn CM. Effect of ether stress on growth hormone during development in the neonatal rat J. Neuroendocrinol, 1992, 56(5): 605 - 610.
- 10 Rivier C, Vale W. Involvement of corticotropin releasing factor and somatostatin on stress-induced inhibition of GH secretion in the rat J. Endocrinol, 1985, 117 (6): 2478 - 2482.

(编辑 韩维栋)

transformation J. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (25): 13677 - 13682.

- 3 Kenji N, Elizabeth W, James K, et al. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer J. Am J Pathol, 1998, 153(3): 857 - 864.
- 4 Kazuo Y, Raheia A, Jan N, et al. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions J. Cancer, 1998, 82(7): 1319 - 1327.
- 5 Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types J. Clin Cancer Res, 1999, 5 (8): 1966 - 1975.
- 6 Richter J, Wagner U, Kononen J, et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer J. Am J Pathol, 2000, 157(3): 787 - 794.

(编辑 卓选鹏)