

文章编号:1005-6947(2004)04-0272-04

· 实验研究 ·

采用组织芯片技术检测胃黏膜病变中缺氧诱导因子-1 α 的表达

刘勇, 路名芝, 袁晟

(江西省人民医院 病理科, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 研究缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在胃黏膜病变中的表达及其意义。方法 采用组织芯片技术制作120例各类胃黏膜病变的组织芯片,免疫组织化学方法检测HIF-1 α 的表达。结果 120例各类胃黏膜病变中HIF-1 α 阳性率为28.3%。慢性浅表性胃炎、伴肠化生慢性萎缩性胃炎、伴异型增生慢性萎缩性胃炎和肠型胃癌中HIF-1 α 的阳性率分别为0.0%, 10.0%, 40.0%和63.3%。肠型胃癌和伴异型增生慢性萎缩性胃炎中HIF-1 α 的阳性率均显著高于慢性浅表性胃炎和伴肠化生慢性萎缩性胃炎($P < 0.05$)。结论 HIF-1 α 可以作为一种较好的胃癌前病变标志物。应用组织芯片大规模检测临床组织样本是可行的,具有高效、快速、方便、经济、准确的特点。

关键词:组织芯片; 胃肿瘤/病理学; 缺氧诱导因子

中图分类号:R735.2; R392.11

文献标识码:A

Detection of the expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in gastric mucosal disease by using tissue chip technique

LIU Yong, LU Ming-zhi, YUAN Sheng

(Department of Pathology, People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Objective** To study the significance of expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) in gastric mucosal diseases. **Methods** Using tissue chip technique to create tissue chip in 120 cases of vary gastric mucosal disease, and using S-P immunohistochemical methods to detect the expressions of HIF-1 α in these tissue chips. **Results** The positive rates of HIF-1 α was 28.3% in 120 tissue chips of gastric mucosal diseases. The positive rates of HIF-1 α was 0, 10.0%, 40.0% and 63.3% in chronic superficial gastritis, chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia, chronic atrophic gastritis with dysplasia and intestinal type gastric cancer, respectively. The positive rates of HIF-1 α of intestinal type gastric cancer and chronic atrophic gastritis with dysplasia were significantly higher than that in chronic superficial gastritis and chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia ($P < 0.05$). **Conclusions** The results demonstrate that HIF-1 α is a good marker of gastric precancerous lesion. It is feasible to use of tissue chip for a rapid screen of massive tissue specimens clinically, and it is a high efficacy, economic and accurate method for detecting gastric precancerous lesion.

Key words: TISSUE CHIP; STOMACH NEOPLASMS/pathol; HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR

CLC number: R735.2; R392.11

Document code: A

缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,其活性对维持肿瘤细胞的能量代谢、新血管生成、促进肿瘤增殖和转移起着重要作用。HIF-1是一种异源二聚体,主要由HIF-1 α

和HIF-1 β 两个亚单位组成;HIF-1 α 决定HIF-1的氧调节活性,HIF-1 β 决定HIF-1二聚化的稳定性^[1]。作者采用组织芯片技术制作120例各类胃黏膜病变的组织芯片,用免疫组织化学方法检测HIF-1 α 的表达,探讨其在胃黏膜病变中表达的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 从本院病理科档案材料中选

项目基金:江西省卫生厅重大科技计划资助项目(20010106)。

收稿日期:2003-02-20; **修订日期:**2003-06-27。

作者简介:刘勇(1970-),男,江西吉安人,江西省人民医院副主任医师,主要从事病理方面的研究。

取1999~2002年石蜡包埋组织120例,其中慢性浅表性胃炎30例,伴肠化生慢性萎缩性胃炎30例,伴异型增生慢性萎缩性胃炎30例,肠型胃癌30例。所有标本均经10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋。

1.1.2 组织芯片制作机的主要组成 (1)打孔针:目前常用的打孔针有直径为0.6mm和2.0mm的两种,为了特定需要可购买到直径为1.0mm和1.5mm打孔针。每一种打孔针中心都有1根配套的实心针,它能将采集到的组织蜡芯推出。本实验采用1.0mm打孔针。(2)距离调节器:用它能准确地控制打孔针前后左右移动的距离,从而使组织芯能整齐地排列在组织芯片蜡块中。本仪器系本实验室自制。

1.2 组织芯片制作^[2]

1.2.1 组织芯片的基本制作过程 第一,设计芯片,即根据需要按不同的种类或顺序设计组织样品的排列方式;第二,根据设计将受体蜡块进行打孔,孔径大小与供体组织钻取孔径大小一致;第三,对供体组织HE切片作形态学观察并在供体蜡块上准确标记所需要的靶点;第四,利用打孔仪钻取靶点组织,并转移至受体蜡块相应的孔位上,即制成所需的阵列蜡块;第五,常规方法作4~5 μ m切片,裱于玻片上,以备实验使用。

1.2.2 组织芯片模块制备 将熔化石蜡(加入等量的蜂蜡)制作4cm \times 2cm \times 1cm大小的空白蜡块,设计15 \times 8点组织阵列,用打孔机制成模块。

1.2.3 组织芯片的设计和制备 将原蜡块放在45 $^{\circ}$ C温箱中烘5~10min,然后用打孔针从组织块选定部位逐个取出组织芯,随即置于预先设计的阵列模块中,排布成组织芯片。最后,将制成的组织

芯片面朝下放在55 $^{\circ}$ C的铜板上30min,轻压模块使组织柱在模块中排平。对组织芯片蜡块切片,切下的组织平整地粘贴于载玻片上。一个组织芯片蜡块一般可切4~5 μ m的连续切片约100张。

1.3 组织芯片免疫组化标记^[3]

兔抗人多克隆抗HIF-1 α 抗体为武汉博士德生物工程有限公司产品,工作浓度1:100,生物素-链霉菌卵白素检测系统(S-P)试剂盒,购自福州迈新生物技术有限公司。3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,20%鸡蛋清封闭内源性生物素,严格按照说明书操作,DAB显色。TBS代替一抗作阴性对照,以已知阳性切片作阳性对照。

1.4 结果判断^[4]

染色阳性信号呈棕黄色,采用显微摄像计算机图像分析系统,计算组织芯片中阳性细胞和肿瘤细胞或腺上皮细胞的数量。判断标准为:无阳性细胞为阴性(-);阳性细胞<肿瘤细胞或腺上皮细胞的50%者为阳性(+);阳性细胞>肿瘤细胞或腺上皮细胞的50%者为强阳性(++).

1.5 统计学分析

实验数据的统计学分析采用配对资料 χ^2 检验。

2 结果

免疫组化标记示HIF-1 α 阳性位于细胞核(图1,2,3)。120例各类胃黏膜病变中HIF-1 α 阳性表达34例,阳性率为28.3%。各类胃黏膜病变中HIF-1 α 的表达情况见附表。肠型胃癌和伴异型增生慢性萎缩性胃炎中HIF-1 α 的阳性率均显著高于慢性浅表性胃炎和伴肠化生慢性萎缩性胃炎($P < 0.05$)。

图1 组织芯片蜡块

图2 组织芯片的单个组织芯

图3 胃癌细胞核示HIF-1 α 阳性

附表 各类胃黏膜病变中 HIF-1 α 的表达

病变类型	例数	HIF-1 α			
		(-)	(+)	(++)	%
慢性浅表性胃炎	30	30	0	0	0 [†]
伴肠化生慢性萎缩性胃炎	30	27	3	0	10.0 [†]
伴异型增生慢性萎缩性胃炎	30	18	9	3	40.0
肠型胃癌	30	11	11	8	63.3

注:† 与肠型胃癌比较 $P < 0.01$

3 讨论

组织芯片(组织微阵列)一般是指将数十至上千个小组织整齐地排放在一张载玻片上而制成的组织切片。组织芯片技术原理:通过组织芯片制作机细针打孔的方法,从众多的组织蜡块(供体蜡块)中采集到数十至上千的圆柱形小组织(组织芯),并将其整齐排放到另一个空白蜡块(受体蜡块)中而制成组织芯片蜡块。然后,对组织芯片蜡块进行切片,再将切片转移到载玻片上而制成组织芯片。组织芯片的特点是:体积小,信息含量大,一次性实验即可获大量结果。组织芯片可做 HE 染色、特殊染色、免疫组化染色、DNA 和 RNA 原位杂交、荧光原位杂交。组织芯片蜡块可做 100~200 张连续切片。这样用同一套组织芯片即可迅速对上百种生物分子标记(如抗原, DNA 和 RNA)进行分析、检测,因而倍受组织病理学家的重视^[2]。1998 年 Kononen 等^[5]首次采用组织芯片技术将 645 例乳腺癌组织固定于载体上,同时进行多种基因检测,结果发现 *erbB-2* 和 *myc* 表达在雌激素受体(ER)阴性者明显高于 ER 阳性者, *p53* 阳性者明显高于 *p53* 阴性者;而 *CCND1* 基因则与 *p53*, ER, *erbB-2* 表达无明显关系。从此,众多学者开始对组织芯片技术进行研究,并不断将其发展和完善,其应用也愈来愈广泛^[6,7]。笔者制作了慢性浅表性胃炎、肠化生、异型增生、肠型胃癌 4 种病变在一起的胃黏膜疾病组织芯片,每张芯片上有 120 个样品,排列整齐,圆形或类圆形,较少的皱折和掉片现象。仅用 1 张芯片即完成了全部实验,极大地节约了研究经费和降低了劳动量,在最短的时间内可获得胃黏膜疾病中 HIF-1 α 表达的全部数据。本研究提示,应用组织芯片大规模高效检测临床组织样本是

可行的;组织芯片技术与传统的病理学技术相比,具有快速、方便、经济、准确的特点,该项技术应用前景广阔。

肿瘤细胞存在着对缺血缺氧的自身调节和适应,其机制主要是提高葡萄糖转运、糖酵解及形成肿瘤血管体系。HIF-1 作为缺氧条件下广泛存在于细胞内的一种转录因子,调节多种基因的表达, HIF-1 的靶基因涉及肿瘤细胞能量代谢、血管生成、肿瘤转移、离子代谢及儿茶酚胺代谢等,这些靶基因的启动子或增强子内含有一个或多个缺氧反应元件,典型的核苷酸序列为 5'-TACGTGC-3',是 HIF-1 的 DNA 结合位点, HIF-1 与缺氧反应元件结合调节基因产物的表达量。这些基因产物在维持肿瘤细胞的能量代谢、新血管生成、促进肿瘤增殖和转移起着重要作用^[8]。Zhong 等^[9]分析了 179 例肿瘤标本中 HIF-1 α 的表达,发现 19 种类型肿瘤中有 13 种可见 HIF-1 α 呈不同程度的表达,其中结肠、前列腺、乳腺的癌前病变中发现 HIF-1 α 的阳性表达。Bos 等^[10]发现正常乳腺组织和乳腺的良性病变中无 HIF-1 α 表达,在高分化导管原位癌、低分化导管原位癌和浸润性导管癌中 HIF-1 α 的阳性率为 55%, 75% 和 100%; HIF-1 α 水平增高与肿瘤细胞高增殖状态、血管内皮生长因子的表达和微血管密度相关。另外,除缺氧外某些癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活也会影响 HIF-1 的表达。Jiang 等^[11]证明在缺氧和非缺氧条件下,癌基因 *v-src* 产物可使 HIF-1 α mRNA 转录和 HIF-1 的 DNA 结合活性增加。Ravi 等^[12]发现肿瘤细胞中肿瘤抑制基因 *p53* 纯合性缺失可使 HIF-1 α 水平升高。

本组实验结果显示,肠型胃癌和伴异型增生慢性萎缩性胃炎中 HIF-1 α 的阳性率均显著高于慢性浅表性胃炎和伴肠化生慢性萎缩性胃炎,且前二种病变中 HIF-1 α 的阳性率无明显差异。此结果提示 HIF-1 α 可以作为一种较好的胃癌前病变标志物。胃癌及其癌前病变中 HIF-1 α 过度表达,可能与某些癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活有关,其机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Semenza GL, Agani F, Booth G, *et al*. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 553-555.

- [2] 刘勇. 生物芯片技术及其在肿瘤研究中应用[J]. 江西医学检验, 2002, 20(6): 376-378.
- [3] 刘勇,路名芝. 细胞周期调控因子 p27、cyclinE 和 Ki-67 在早期胃癌中的表达[J]. 中华普通外科杂志, 2002, 17(5): 366.
- [4] 刘勇,路名芝,文进. 细胞周期调控基因 P21WAF1/CIP1 在膀胱移行细胞癌中的表达[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(6): 443-444.
- [5] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. *Nat Med*, 1998, 4(6): 844-847.
- [6] Moch H, Kononen J, Kallioniemi OP, *et al.* Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? [J]. *Adv Anat Pathol*, 2001, 8(1): 14-20.
- [7] Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, *et al.* Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(7): 803-806.
- [8] 樊利芳,刁路明,陈德基. 缺氧诱导因子-1 与肿瘤[J]. 中华病理学杂志, 2002, 31(2): 168-170.
- [9] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(8): 5830-5835.
- [10] Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, *et al.* Levels of hypoxia-inducible factor 1 alpha during breast carcinogenesis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(3): 309-314.
- [11] Jiang BH, Agani F, Passaniti A, *et al.* V-src induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(8): 5328-5335.
- [12] Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, *et al.* Regulation of tumor, or angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(1): 34-44.

文章编号:1005-6947(2004)04-0275-01

· 病例报告 ·

原发灶不明的腹壁转移性黏液腺癌 1 例

欧阳植庭

(中南大学湘雅医院 普外科, 湖南 长沙 410008)

关键词:黏液腺癌, 转移性; 黏液腺癌/继发性; 病例报告

中图分类号: R735.5

文献标识码: D

患者 女, 62岁。2004年2月23日入院。患者于1999年10月发现右上腹壁一拇指大小包块并伴有痛、痒、红肿, 包块逐渐增大, 于2000年3月在当地医院行穿刺活检, 诊断为“腹壁炎性包块”, 给予消炎治疗无效, 不久包块穿刺处有胶冻状液体溢出, 约5~1ml/d。2000年10月在当地医院住院, 诊断为“腹壁窦道”, 行

窦道切除术, 术后伤口愈合。2001年4月右上腹壁包块复发并溃烂, 在当地医院诊断为“腹壁窦道伴感染”。行窦道切开清除术, 术后伤口经久不愈, 且切口周围出现数个直径约为2cm, 1.5cm及1cm, 0.5cm的红色硬结, 并先后破溃流胶冻状液60~70ml/d。体重下降10kg。体查: 甲状腺及乳房均未扪及肿块, 腹部平坦未扪及包块。胸片心肺未发现异常。胃镜及结肠镜检查均未发现明显异常。全消化道钡餐检查未发现异常。B超检查未发现腹部及妇科病变。腹壁溃

烂处组织病检报告为腹壁转移性高分化黏液腺癌。患者放弃进一步治疗。自动出院。

讨论 高分化黏液腺癌常见于消化道、甲状腺、乳腺及卵巢。消化道及卵巢肿瘤常见于腺内转移, 其次为肺、颅内及骨转移; 而甲状腺癌、乳腺癌常见于区域性淋巴转移, 其次为骨及肺部转移。腹壁转移为癌肿的晚期表现, 常见有原发肿瘤的临床表现。类似本例发生腹壁转移癌达4年多而始终未发现原发癌灶者实属罕见。

收稿日期: 2004-03-06。

作者简介: 欧阳植庭(1945-), 男, 湖南资兴人, 中南大学湘雅医院主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。