

用组织微阵列技术分析鼻咽癌变 多阶段组织细胞周期蛋白 D₁ 过表达*

宋鑫¹⁾ 赵晓荣¹⁾ 王—²⁾ 周建华³⁾ 关新元⁴⁾ 曹亚¹⁾**

(¹⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; (²⁾第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438;

(³⁾中南大学湘雅医院病理学教研室, 长沙 410078; (⁴⁾香港大学临床肿瘤学系, 香港)

摘要 为了探讨细胞周期蛋白 D₁ (Cyclin D₁) 在鼻咽癌变多阶段病变组织中的蛋白质表达与鼻咽癌变的关系, 应用组织微阵列 (tissue microarray) 技术, 采用免疫组化方法检测 Cyclin D₁ 在鼻咽癌旁粘膜上皮单纯性增生/化生 (simple hyperplasia/metaplasia, SH/SM)、异型增生/化生 (atypical hyperplasia/metaplasia, AH/AM) 和鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 的蛋白质表达, 阳性表达率分别为 30.0% (3/10)、90.0% (18/20) 和 62.9% (39/62), 其中在异型增生/化生中呈“一过性增高”, 表明 Cyclin D₁ 高表达可能为鼻咽癌发生过程中的早期事件; 异型增生/化生可能是鼻咽癌变的重要“关卡”。

关键词 组织微点阵技术, 鼻咽肿瘤, 多阶段, 细胞周期

学科分类号 R734, Q633

肿瘤是多基因变化导致细胞周期紊乱, 细胞失控性生长所致的一类疾病^[1]。细胞周期受一系列因子的共同调控, 其中最主要的是一组细胞周期蛋白 (Cyclin), 而与肿瘤关系最密切的首推 Cyclin D₁^[2]。当细胞受刺激进入周期后最早表达的是 Cyclin D₁, Cyclin D₁ 为连接外界生长因子、信号转导与细胞调控机制的纽带^[3], 因此, Cyclin D₁ 被认为是一种在分子流行病学研究中非常有用的生物学指标^[4]。Cyclin D₁ 作为 G1/S 检测点重要的调节因子之一, 正在成为人们日益关注的热点。实验证明, Cyclin D₁ 与结肠癌癌变多阶段密切相关且参与结肠癌变^[5], 与头颈肿瘤癌变多阶段也有密切的关系^[6]。

我们前期的研究工作, 在 mRNA 水平上, 用 AtlasTM Human cancer cDNA array 检测人体正常鼻咽组织与鼻咽癌组织基因表达, 发现鼻咽癌组织 Cyclin D₁ 表达上调^[7]; 用 AtlasTM Rat cDNA Expression Array 检测小鼠鼻咽柱状上皮单纯性增生、异型增生和鼻咽癌多阶段组织也发现 Cyclin D₁ 表达逐渐上调; 在蛋白质水平上, 我们已初步证实 Cyclin D₁ 在人体鼻咽癌组织异常过表达, 表明可能与鼻咽癌的发病有关^[8], 在此工作基础上, 为了进一步从蛋白质水平验证 Cyclin D₁ 在鼻咽癌变中的作用, 我们利用组织微阵列技术, 利用癌旁单纯性增生/化生 (SH/SM)、异型增生/化生 (AH/AM)、鼻咽癌等序贯性变化的多阶段组织, 构建了含 92 个鼻咽癌变多阶段组织微点阵, 利用免疫组织化学方法在同一条件下高通量快速筛选了 Cyclin D₁ 差异表

达, 以期探讨其与鼻咽癌癌变多阶段的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验中所用实验材料均取自中南大学湘雅医学院病理教研室在 1996~1998 年的病理组织存档蜡块, 共 40 例, 男性, 23 例, 平均年龄 50.7 岁; 女性, 17 例, 平均年龄 49.3 岁, 均为鼻咽非角化性癌 (non-keratinizing carcinoma)。按照 1991 年世界卫生组织 (WHO) 编著的《肿瘤组织学国际分类》(第二版) 有关上呼吸道和耳肿瘤的组织学类型分类标准进行组织学分型^[9], 采用鼻咽癌 92 分期^[10]进行肿瘤临床分期。40 例标本中, 17 例住院病人, 其中, 2 例 II 期病人, 13 例 III 期, 2 例 IV 期; 其余 23 例为门诊病人, 缺乏临床分期资料。

1.2 试剂

鼠抗人 Cyclin D₁ 单克隆抗体 (DCS-6, DAKO); 链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶 (streptavidin peroxidase, SP) 试剂盒为 Zymed 公司产品; 二氨基联苯胺 (DAB) 为 Sigma 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 组织微阵列的构建^[11]: 把每个蜡块进行

* 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (G1998051201)、国家自然科学基金 (30000087 和 30100005) 和国家自然科学基金杰出青年基金 (39525022) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805448, E-mail: Ycao98@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2001-10-08, 接受日期: 2002-01-28

苏木素-伊红染色 (HE 染色) 以界定所要取的代表性的肿瘤区. 用空心的直径为 0.6 mm 的 (用于摄取蜡块中待检组织的) 组织圆筒 (Tissue cylinder) 从每个供体组织块的代表性肿瘤区打孔, 深度为 0.4 mm, 然后用特制的精密仪器 (Beecher Instruments, USA) 转移组织到受体石蜡块中与之匹配的间距为 0.1 mm 的小孔中; 把最后分布有组织微点阵的受体蜡块切片之后, 依据石蜡切片辅助系统 (Instrumedics Inc., Hackensack, New Jersey) 转移 5 μ m 厚的含 108 个点的组织微阵列蜡膜至载玻片上. 每个鼻咽癌组织蜡块取代表性的肿瘤区 1 或 2 个点, 代表了 90% ~ 95% HE 切片中的肿瘤区^[4], 癌旁单纯性增生/化生、异型增生/化生依每个取材区拥有的数量至少取 1 个, HE 染色对所取样本确认, 共点了 108 个点, 其中 4 个点缺失, 5 个点为少数肿瘤细胞; 2 个点在免疫组化实验中脱失, 5 个点为非目的组织, 这样, 共得到 92 个可解释的点阵点, 其中癌旁单纯性增生/化生、异型增生/化生和鼻咽癌分别为 10、20、62. 构建的阵列分布模式图见图 1.

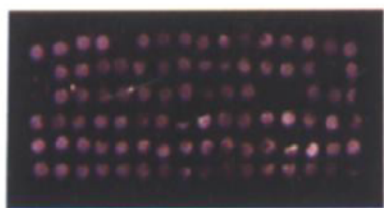


Fig. 1 Tissue microarray pattern map

1.3.2 SP免疫组化法: 置组织微阵列载玻片于

60 $^{\circ}$ C 烤箱 20 min; 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 3% H_2O_2 室温孵育 30 min; 切片放入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 置微波炉内加热修复抗原 750 W 共 10 min; 10% 正常羊血清封闭, 室温孵育 20 min; 滴加 1:50 鼠抗人 Cyclin D₁ 单克隆一抗工作液于湿盒, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜; 即用型兔抗鼠二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 30 min; DAB 显色试剂显色; 脱水, 中性树胶封片.

对照: Cyclin D₁ 以乳腺癌为阳性对照, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 分别代替一抗和二抗作阴性对照.

染色结果判断标准: 两位病理科医师评估所有组织切片与免疫组化结果. 核着色视为阳性; 在核浆均有着色时, 以核着色为基准作为判断标准, 因为 Cyclin D₁ 在胞浆合成后, 移位入核才能发挥作用. 参照 Fromowitz 方法^[12] 在高倍镜下对核着色反应作如下评分: a. 无着色为 0, 淡黄色为 1, 棕黄色为 2, 棕褐色为 3; b. 阳性范围: 小于 5% 为 0, 5% ~ 25% 为 1, 26% ~ 50% 为 2, 51% ~ 75% 为 3, 大于 75% 为 4. 两项结果相加, 小于 2 为阴性 (-), 2 ~ 3 为弱阳性 (+), 4 ~ 5 为中度阳性 (++), 6 ~ 7 为强阳性 (+++).

1.3.3 统计学分析: 采用 SPSS10.0 统计软件处理, Pearson Chi-square 分析.

2 结 果

Cyclin D₁ 蛋白主要表达于细胞核, 呈黄色, 棕黄色或棕褐色, 集中或散在分布; 有些胞浆淡

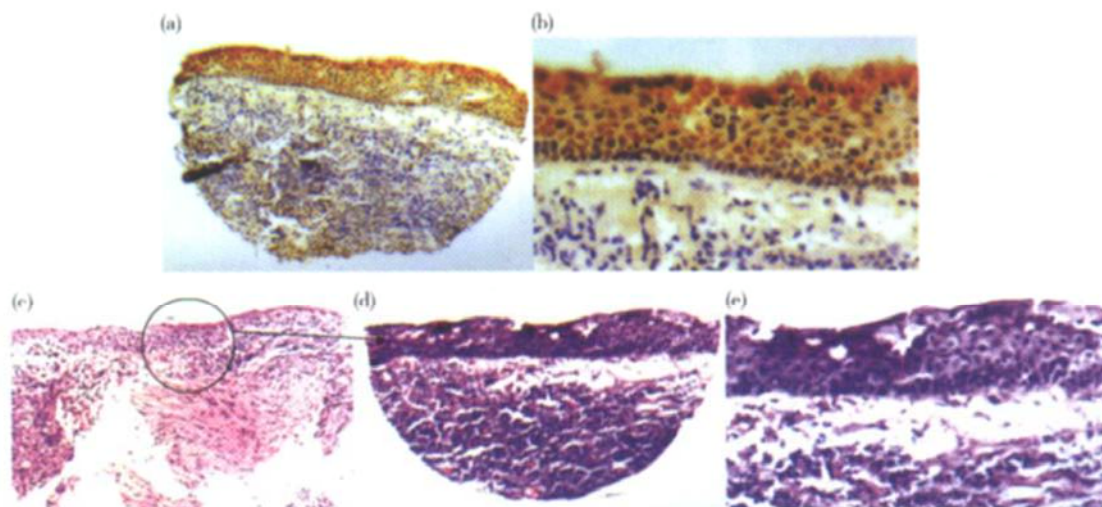


Fig. 2 Simple hyperplasia (SH) in the nasopharyngeal mucous squamous epithelium in the paracarcinoma microarray construction pattern map

(a), (b): (Cyclin D₁ SP method) hyperplastic cellular nuclear staining with brown color, showing mid-positive and locating in the inner epithelium; (c) ~ (e): (HE staining) incassate mucous epithelium, but without cellular abnormality; increasing cellular stratum, but accordant nuclear size and shape without increasing karyotin and significant nucleolus. Magnifications are $\times 100$ for (a), (c) and (d); and $\times 200$ for (b) and (e).

染 (图 2~ 图 4). Cyclin D₁ 在鼻咽癌旁柱状上皮单纯性增生/化生 (SH/SM)、异型增生/化生 (AH/AM) 和鼻咽癌中, 阳性表达率分别为 30.0% (3/10)、90.0% (18/20) 和 62.9% (39/62), 有显著性差异 ($\chi^2 = 11.029$, $P < 0.05$), 其中, 异型增生/化生

与鼻咽癌比较, 有显著性差异 ($\chi^2 = 5.239$, $P < 0.05$). Cyclin D₁ 在异型增生/化生中呈“一过性增高”. 在异型增生/化生中, 轻度、中度例数分别为 6 例, 8 例和 6 例; 阳性数分别为 6 (100%), 6 (75%) 和 6 (100%), 无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1).

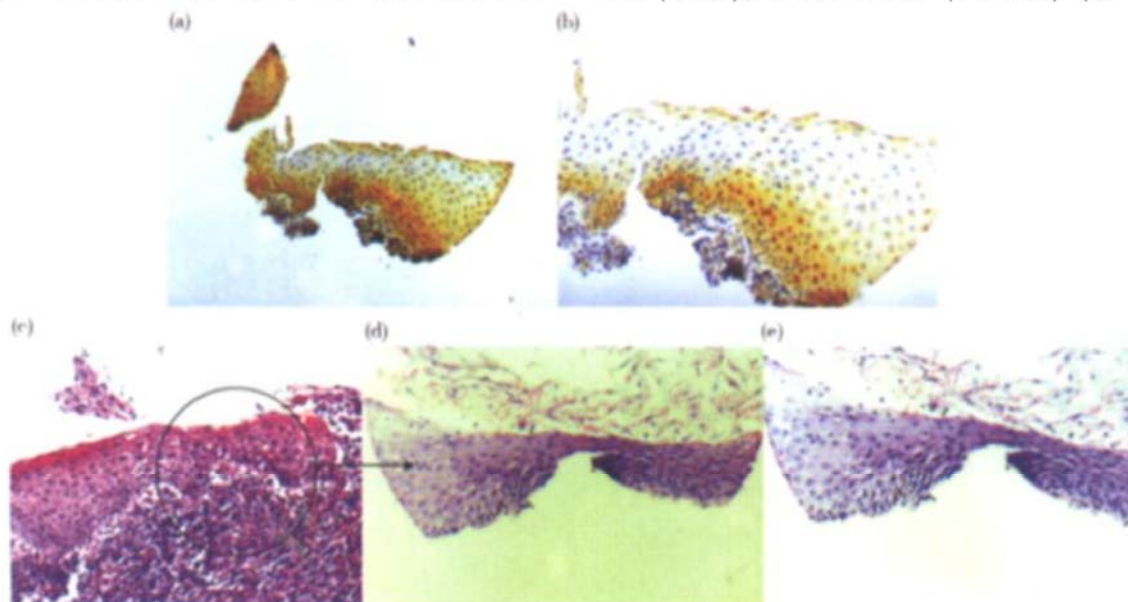


Fig 3 Atypical hyperplasia (AH) in the nasopharyngeal mucous epithelium in the paracarcinoma microarray construction pattern map

(a), (b): (Cyclin D₁ SP method) AH cellular nuclear staining with yellow-brown color, showing strong positive and locating mainly in the analogical granular cell and acanthoid cell strata; (c) ~ (e): (HE staining) cubiform and polyhedral hyperplastic cell, arranging mainly in disorder with part or thorough keratogenesis; abundant cytoplasm; large and round nuclear, large nucleolus and slightly stained karyotin. Magnifications are $\times 100$ for (a), (c) and (d); and $\times 200$ for (b) and (e).

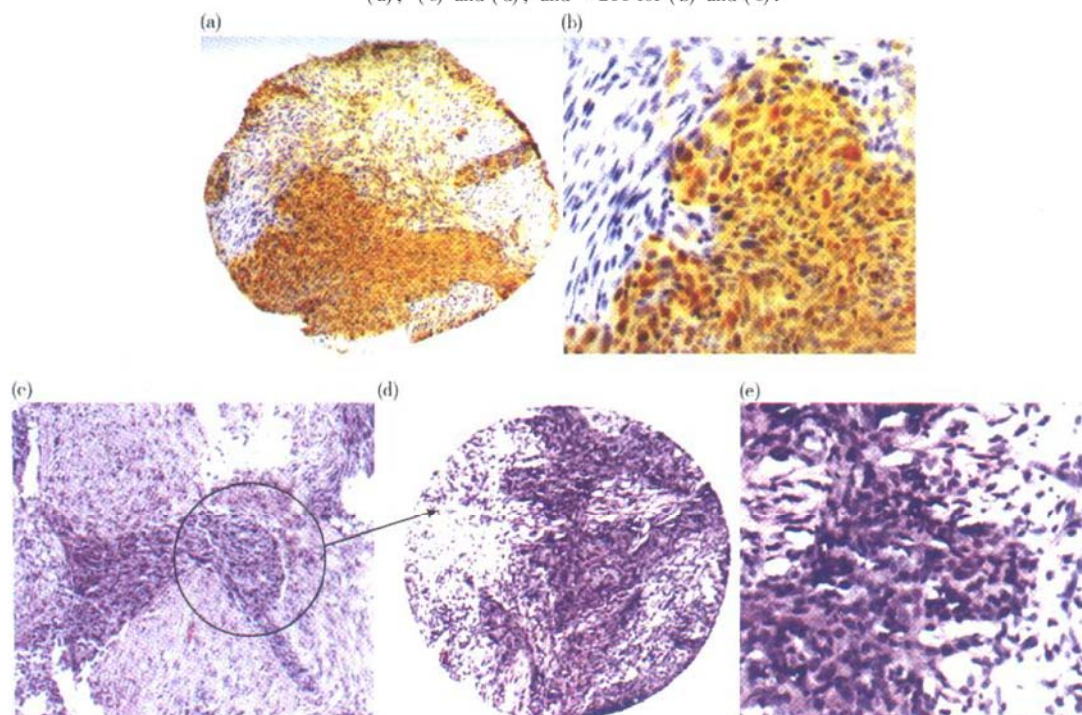


Fig 4 Nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissue microarray construction pattern map

(a), (b): (Cyclin D₁ SP method) cancerous cellular nuclear staining with brown or yellow-brown color, showing mid-positive or strong positive and locating collectively in the cancerous nest; (c) ~ (e): (HE staining) round, elliptical and irregular cancerous cell arranging in group or uniformly; large nuclear with rough and fine granular highly-density karyotin, mainly without main significant nucleolus; acidophil cytoplasm. Magnifications are $\times 100$ for (a), (c) and (d); and $\times 200$ for (b) and (e).

Table 1 Cyclin D₁ expression in the SH/SM, AH/AM and NPC

Group	Total case	Slight mid-positive	Strong-positive	Total positive / %
SH/SM	10	3	0	30 ¹⁾
AH/AM	20	9	9	90 ¹⁾
low-grade	6	3	3	100
mid-grade	8	3	3	75
high-grade	6	3	3	100
NPC	62	26	13	62.90

¹⁾ $P < 0.05$.

3 讨 论

鼻咽癌发生过程中可能经历的单纯性增生/化生、异型增生/化生、鼻咽癌一系列序贯性变化,为癌变的多阶段性提供了很好的形态学证据,但是,事实上鼻咽癌的演进缺乏很明显的形态学时相;而且早期鼻咽癌缺乏明显的临床症状,所以大多数病人在就医时已多为 III 或 IV 临床分期阶段,因此在没有进行大规模流行病学普查并且对可疑病人取材的情况下,各阶段标本难以获得;而多阶段细胞系及转基因动物模型尚未建立,这给多阶段鼻咽癌发病的分子变化研究带来了困难.新近发展起来的组织微阵列技术被认为是一种从群体水平分析筛选分子改变的方法^[4],使我们有可能用免疫组化方法在一张切片上一次性高通量快速研究大量样本.同时又可为鼻咽癌变多阶段组织的选材提供技术支持,从而为从分子水平上阐述鼻咽癌发生过程中,可能经历多步骤和多阶段逐步演进的病理过程的本质提供理想的技术平台.

Cyclin D₁ 是一种调节细胞周期行进的重要正性调节蛋白,与 CDK4 结合并激活其活性,推动细胞通过 G1/S 检测点向前行进. Cyclin D₁ 过表达可以促使细胞向恶性转化而形成肿瘤;与多种肿瘤的发生关系密切^[2]. 因此我们采用组织微阵列技术,对 Cyclin D₁ 在鼻咽癌变多阶段组织的蛋白表达进行研究. 令人感兴趣的是,癌旁单纯性增生/化生、异型增生/化生和鼻咽癌中,异型增生/化生的阳性表达率呈“一过性增高”现象 ($P < 0.05$), Cyclin D₁ 蛋白在异型增生/化生中阳性表达率高于鼻咽癌近 30% ($P < 0.05$),上述结果提示 Cyclin D₁ 蛋白过表达可能为鼻咽癌发生过程中的早期事件. 因为 Cyclin D₁ 过表达发生于癌前阶段中;类似的研究认为 Cyclin D₁ 蛋白过表达是结肠癌变多阶段过程

中的一个早期事件^[5];更为直接的证据是,在以 EB 病毒 ED-L2 启动子连接 Cyclin D₁ 靶基因的转基因小鼠的舌、食管和前胃这些特异部位组织中发现不典型增生表型改变^[13],说明 Cyclin D₁ 确实在癌变多阶段的早期发生改变.

鼻咽癌的发生发展过程,具有一个相当长的包括癌前状态和癌前病变的癌前阶段,后者可表现为局部可见的病理组织形态改变. 鼻咽柱状上皮异型增生/化生被认为是鼻咽癌的癌前病变^[14]. 我们的实验显示, Cyclin D₁ 蛋白在异型增生/化生中阳性表达率呈 90.0% 的高表达,而且,轻、中、重度异型增生/化生阳性表达率之间无显著性差异 ($P > 0.05$),这些结果为病理组织形态学及流行病学随访方面资料推断的鼻咽癌前病变,提供了重要的分子生物学证据. 因此,我们推测异型增生/化生可能是鼻咽癌癌变多阶段的重要“关卡”.

我们目前的实验结果,尚不能从本质上解释 Cyclin D₁ 在鼻咽癌旁呈异型增生/化生病变的粘膜组织中,呈“一过性增高”过表达这一令人思索的现象. 但是,可以推测必然存在着 Cyclin D₁ 上下游众多基因变化的复杂机制,我们前期的研究工作表明,环境因素 EB 病毒编码的 LMP1 通过其介导的 NF- κ B、AP-1 信号传导途径及其之间的 cross-talk^[15,16],整合信号于细胞周期重要调节因子 Cyclin D₁,从而参与鼻咽细胞增殖紊乱及凋亡失控^[17]. 具体机制仍有待于我们继续研究.

致谢 感谢刘宝安教授和栗占三教授在病理学方面给予的热情指导与帮助.

参 考 文 献

- Sherr J. Cancer cell cycle. *Science*, 1996, **274** (5293): 1672 ~ 1677
- Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclinD and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 1994, **79** (4): 573
- Sherr C J. Mammalian G1 cyclin. *Cell*, 1993, **73** (6): 1059~1065
- Robert L C, Lori A C, David L R. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 2000, **80** (12): 1943~ 1949
- Arber N, Hibshoosh H, Moss S F, *et al.* Increased expression of Cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*, 1996, **110** (3): 669~ 674
- Izzo J G, Papadimitrakopoulou V A, Li X Q, *et al.* Dysregulated cyclin D₁ expression early in head and neck tumorigenesis: *in vivo* evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene*, 1998, **17** (18): 2313~ 2322
- 谢 鹭, 许亮国, 何志巍, 等. 用肿瘤 cDNA 阵列分析鼻咽癌组织的基因表达. *自然科学进展*, 2000, **10** (4): 378~ 382

- Xie L, Xu L G, He Z W, *et al.* Prog Nat Sci, 2000, **10** (4): 378~ 382
- 8 肖 绘, 邓锡云, 曹 亚, 等. 鼻咽癌中 D 型周期素的差异性表达及 cyclinD1 基因扩增的研究. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2000, **35** (4): 302
 - Xiao H, Deng X Y, Cao Y, *et al.* Chin J Otorhinolaryngol, 2000, **35** (4): 302
 - 9 Shanmugaratnam K, Sobin L H. Histological Typing of Tumors of The Upper Respiratory Tract and Ear. 2nd. Berlin: Springer Verlag, 1991. 32~ 34
 - 10 Min H Q, Hong M H, Ma J, *et al.* A new staging system for nasopharyngeal carcinoma in China. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994, **30** (5): 1037~ 1042
 - 11 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of hundreds of specimens. Nat Med, 1998, **4** (7): 844~ 847
 - 12 Fromowitz F B, Voila M V, Chao S, *et al.* Ras P²¹ expression in the progression of breast cancer. Humanpathol, 1987, **18** (12): 1268~ 1275
 - 13 Nakagawa H, Wang T C, Zukerberg L, *et al.* The targeting of the cyclin D1 oncogene by an Epstein Barr virus promoter in transgenic mice causes dysplasia in the tongue, esophagus and forestomach. Oncogene, 1997, **14** (10): 1185~ 1190
 - 14 Feng B C, Liu K L. A morphological study of stromal microvasculature of nasopharyngeal precancerous lesions. Chinese medical J, 1991, **104** (5): 422~ 424
 - 15 廖 伟, 邓锡云, 曹 亚, 等. EBV LMP1 在 NPC 细胞中调控 NF- κ B 的研究. 病毒学报, 2000, **16** (3): 198~ 202
 - Liao W, Deng X Y, Cao Y, *et al.* Chinese Journal of Virology, 2000, **16** (3): 198~ 202
 - 16 罗非军, 邓锡云, 曹 亚, 等. EB 病毒 LMP1 上调鼻咽癌细胞 AP-1 活性. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, **16** (4): 551~ 555
 - Luo F J, Deng X Y, Cao Y, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2000, **16** (4): 551~ 555
 - 17 赵晓荣, 邓锡云, 曹 亚, 等. Cyclin D 在鼻咽癌中的表达及功能初步分析. 生物化学与生物物理学报, 2000, **32** (2): 194~ 196
 - Zhao X R, Deng X Y, Cao Y, *et al.* Acta Biochem Biophys Sin, 2000, **32** (2): 194~ 196

Tissue Microarray Analysis of Cyclin D₁ Gene Overexpression in The Multistage Carcinogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma^{*}

SONG Xin¹⁾, ZHAO Xiao-Rong¹⁾, WANG Yi²⁾, ZHOU Jian-Hua³⁾, GUAN Xin-Yuan⁴⁾, CAO Ya^{1)**}

¹⁾ Cancer Research Institute, Xiang Ya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾ Pathology Department, Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China;

³⁾ Pathological Teaching & Research Section, Xiang Ya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

⁴⁾ Clinical Oncology Department, Hong Kong University, Hong Kong, China)

Abstract In order to investigate the relation between Cyclin D₁ protein expression in multistage tissue of pathological changes during the nasopharyngeal carcinogenesis and nasopharyngeal carcinoma (NPC), the simple hyperplasia/ metaplasia, atypical hyperplasia/ metaplasia in the nasopharyngeal paracarcinoma mucous epithelium and NPC were studied for Cyclin D₁ expression with immunohistochemical streptavidin-peroxidase (SP) method by tissue array technique. The positive rates were 30.0% (3/10), 90.0% (18/20) and 62.9% (39/62) respectively, among which hightening “instantaneously” in the atypical hyperplasia/ metaplasia appeared. It is shown high Cyclin D₁ expression may be an early incident in the course of nasopharyngeal carcinogenesis, and that atypical hyperplasia/ metaplasia probably be an important “toll-gate”.

Key words tissue microarray technique, nasopharyngeal neoplasm, multistage, cell cycle

^{*} This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998051201), The National Natural Sciences Foundation of China (30000087, 30100005) and the Youth Fund of National Science Foundation of China (39525022).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-731-4805448, E-mail: Ycao98@public.cs.hn.cn

Received: October 8, 2001 Accepted: January 28, 2002