

组织芯片技术检测食管癌前病变相关预警标志物

滕梁红, 吕宁, 赵晓航, 薛丽燕, 刘芳, 林冬梅, 王卉心, 何祖根, 谢永强, 刘秀云

滕梁红, 吕宁, 薛丽燕, 林冬梅, 何祖根, 谢永强, 刘秀云, 中国协和医科大学 中国医学科学院 肿瘤医院 肿瘤研究所病理科 北京市 100021
赵晓航, 刘芳, 王卉心, 中国协和医科大学 中国医学科学院 肿瘤医院 肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
滕梁红, 女, 1975-03-30 生, 山东省鄄城县人, 汉族, 2003 年中国协和医科大学临床病理学硕士, 现任首都医科大学宣武医院病理科住院医师。
国家自然科学基金, No. 30271460, No. 30225045, No. 30171049
国家高技术(863)研究发展计划, No. 2004AA227060
项目负责人: 吕宁, 100021, 北京市, 中国协和医科大学 中国医学科学院 肿瘤医院 肿瘤研究所病理科。 nlu03@126.com, zhaoxh@pubem.cicams.ac.cn
电话: 010-87788548
收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2004-11-04

Detection of tumor-associated biomarkers in precancerous lesions of esophagus

Liang-Hong Teng, Ning Lv, Xiao-Hang Zhao, Li-Yan Xue, Fang Liu, Dong-Mei Lin, Hui-Xin Wang, Zu-Gen He, Yong-Qiang Xie, Xiu-Yun Liu

Liang-Hong Teng, Ning Lv, Li-Yan Xue, Dong-Mei Lin, Zu-Gen He, Yong-Qiang Xie, Xiu-Yun Liu, Department of Pathology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Xiao-Hang Zhao, Fang Liu, Hui-Xin Wang, National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271460, No. 30225045, No. 30171049 and National Hi-Tech Research and Development Program of China, No. 2004AA227060
Correspondence to: Ning Lv, Department of Pathology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China. nlu03@126.com
Received: 2004-10-18 Accepted: 2004-11-04

Abstract

AIM: To investigate the expressions of annexin I, Grp94, p53, Ki-67 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and precancerous lesion, in order to provide valuable clues for early diagnosis.

METHODS: Seventy-two specimens were collected, including dysplasia, *in situ* carcinoma, early ESCC, ESCC and lymph metastatic carcinoma. The expression of annexin I, Grp94, mutant p53 and ki-67 were detected using immunohistochemical staining (IHC).

RESULTS: Compared with the normal esophageal epithelia, the expressions of annexin I, Grp94, mutant p53 and ki-67 were abnormal in precancerous lesions. Loss of annexin I (68.3%), positive expression of p53 (67.6%) and

ki-67 (71.1%) were observed in low grade lesions ($P < 0.01$), and Grp94 expression was increased significantly (62.0%) in early invasive cancer ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Annexin I, mutant p53 and ki-67 may be the biomarkers of early ESCC, and Grp94 may be an important biomarker of progressive ESCC.

Key Words: Annexin I; Mutant p53; ki-67; Grp94; ESCC

Teng LH, Lv N, Zhao XH, Xue LY, Liu F, Lin DM, Wang HX, He ZG, Xie YQ, Liu XY. Detection of tumor-associated biomarkers in precancerous lesions of esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(1):6-9

摘要

目的: 检测 annexin I, Grp94, p53, Ki-67 四种候选肿瘤标志物在食管癌及癌前病变中的表达情况, 为食管癌的早期检测提供依据。

方法: 72 例单纯手术切除食管鳞癌及其癌旁伴有的不同程度癌前病变, 构建组织芯片; 应用免疫组化方法检测 annexin I, Grp94, 突变型 p53, Ki-67 蛋白在食管鳞癌及不同程度癌前病变中的表达差异。

结果: 四种蛋白在食管癌前病变中均有异常表达, 与正常鳞状上皮比较存在显著性差异: annexin I 在低度癌前病变组(轻度不典型增生/中度不典型增生)丢失率为 68.3%, ($P = 0.000$); p53 和 Ki-67 的阳性表达率分别为 67.6% 和 71.1% ($P = 0.000$); Grp94 在早期浸润性癌呈极显著过度表达, 表达增强率 62.0% ($P = 0.000$)。

结论: Annexin I, Ki-67, p53 蛋白为食管癌早期预警研究提供了重要线索; Grp94 蛋白作为食管鳞癌进展期标志物具有参考价值。

关键词: annexin I; 突变型 p53; ki-67; Grp94; 食管癌

滕梁红, 吕宁, 赵晓航, 薛丽燕, 刘芳, 林冬梅, 王卉心, 何祖根, 谢永强, 刘秀云. 组织芯片技术检测食管癌前病变相关预警标志物. *世界华人消化杂志* 2005; 13(1):6-9
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/6.asp>

0 引言

联合应用多种肿瘤标志物检测癌前病变分子水平的异常改变, 已成为食管癌早期预警研究的重要策略之

一. 我们利用组织芯片首次将食管不同期别鳞癌及不同程度癌前病变共同组合, 同时进行 annexin I, Grp94, p53, Ki-67 四种候选肿瘤标志物检测, 发现在食管癌及癌前病变中的异常表达, 揭示其在食管癌早期诊断的预警价值^[1-7].

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2002-05 收治单纯手术根治的食管鳞状细胞癌标本 464 例, 选择癌旁伴有延续性或散在的多发性不同程度癌前病变的病例 72 例, 其中早期癌 23 例, 中晚期癌 49 例, 伴有淋巴结转移者 22 例; 男 55 例, 女 17 例; 中位年龄 59(33-78) 岁. 72 例标本共构建 3 组芯片. 标本经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 切片, HE 染色, 镜下选择不同程度的病变包括低度癌前病变(轻度不典型增生和中度不典型增生)、高度癌前病变(重度不典型增生和原位癌), 早期浸润癌, 中晚期浸润癌、淋巴结转移癌以及切缘正常鳞状上皮的区域, 在供体蜡块上定位标记打孔靶位. 组织芯片仪 MTA-1(Manual Tissue Arrayer, Beecher Instrument, Silver Spring, MD), 针吸组织直径为 0.6 mm, 靶位间距 1.0 mm. 为防止脱片每靶位组织重复装载一次. 最后将受体蜡块进行 4 μm 连续切片, 进行常规 HE 染色和免疫组化染色.

1.2 方法 免疫组织化学染色(immunohistochemistry staining, IHC)采用 SP 法, 按试剂盒步骤操作. 使用的抗体包括: 小鼠抗人 annexin I 抗体(1:100); 大鼠抗人 Grp94(1:50), (美国 Santa Cruz 公司). 小鼠抗人 Ki-67(工作液); 突变型小鼠抗人 p53(克隆号 DO-7, 工作液)(Maixin Biotech 公司). 采用微波炉热抗原修复, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, DAB 显色. 对于 annexin I, Grp94, 以细胞膜、胞质和胞核出现均匀分布的棕黄色颗粒为表达阳性, 采用以下标准评价表达程度: 着色强度评分: 未着色(0 分)、浅黄色(1 分)、浅棕色(2 分)和深棕色(3 分); 观察结果评分, 即阳性细胞占病变细胞的百分比: <5%(0 分); 5-25%(1 分); 26-50%(2 分); 51-75%(3 分)和 >75%(4 分). 染色强度评分和观察结果评分的乘积为表达程度: 强表达(9-12 分)、表达减弱(5-8 分)、明显减弱(0-4 分). 对于 p53 和 Ki-67, 评分标准为: 未着色(0 分)、阳性细胞占病变细胞的百分比 <10%(1 分)、10-50%(2 分)、>50%(3 分). 0 分和 1 分被认定为阴性, 2 分和 3 分被认定为阳性.

统计学处理 采用 SPSS 10.0 分析软件对数据进行 χ^2 检验.

2 结果

Annexin I 在正常鳞状上皮呈一致性强阳性表达, 在

部分低度癌前病变的病例开始出现丢失(68.3%, 28/41; 图 1A), 在高度癌前病变、浸润性癌和淋巴结转移癌中丢失率进一步增加(图 1B), 分别为 77.3%(51/66)、82.3%(65/79)和 94.1%(16/17). 低度癌前病变与正常上皮相比存在非常显著差异($P = 0.000$). 在正常鳞状上皮 Grp94 均为阴性表达, 低度癌前病变部分表达增强(18.2%, 8/44; 图 2A), 高度癌前病变中 Grp94 表达增强率增加(24.3%, 18/74); 浸润癌中表达增强率明显增加(图 2B; 62.0%, 49/79). 高度癌前病变和浸润性癌间表达存在非常显著差异($P = 0.000$); 部分淋巴结转移癌中 Grp94 表达阳性(37.5%, 6/16).

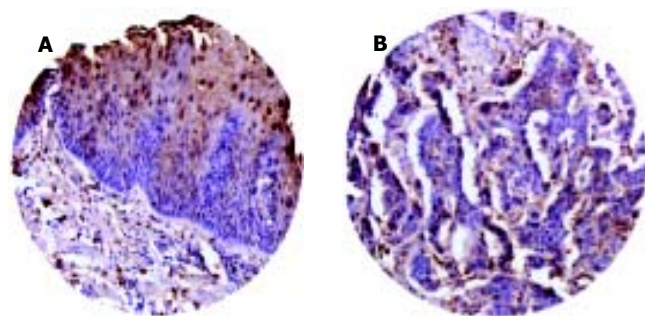


图 1 组织芯片中 annexin I 的表达. A: 轻度不典型增生中底层异型的细胞 annexin I 开始出现丢失 $\times 100$; B: 浸润性鳞癌中 annexin I 明显丢失 $\times 100$.

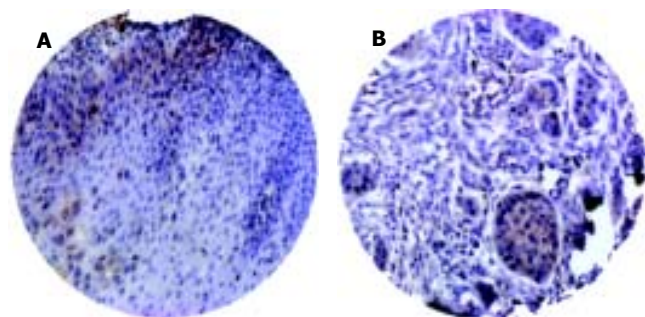


图 2 组织芯片中 Grp94 的表达. A: 轻度不典型增生中 Grp94 开始出现表达 $\times 100$; B: 浸润性鳞癌细胞中表达阳性 $\times 100$.

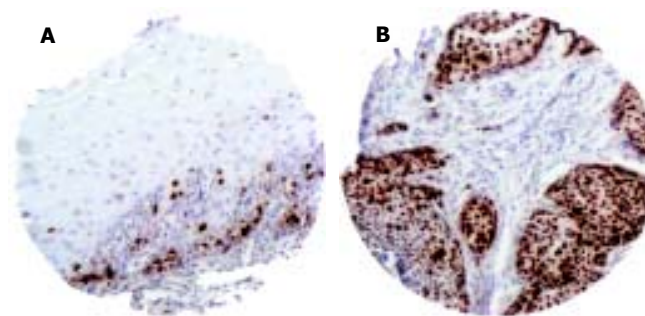


图 3 组织芯片中 p53 的表达. A: 轻度不典型增生中, 底层异型的细胞 p53 开始出现表达 $\times 100$; B: 浸润性鳞癌细胞中 p53 表达阳性 $\times 100$.

正常鳞状上皮中 p53 突变蛋白表达阴性(100%, 0/59). 在低度癌前病变及其进展的各阶段病变中 p53 蛋白的阳性表达明显增加(图 3A-B): 阳性率分别为

表1 四种候选肿瘤标志物在食管鳞癌和癌前病变中的表达(%)

候选标志物	正常	低度癌前病变	高度癌前病变	浸润癌	淋巴结转移癌
Annexin I 减弱率	0	68.3 ^a	77.3	82.3	94.1
Grp94 增强率	0	18.2	24.3	62.0 ^b	37.5
p53 阳性率	0	67.6 ^a	66.7	65.0	76.5
Ki-67 阳性率	1.79	71.1 ^a	87.1	92.3	93.8

^a*P* < 0.001 vs 正常. ^b*P* < 0.001 vs 高度癌前病变.

67.6%, 66.7%, 65.0% 和 76.5%. 与正常上皮相比, p53 蛋白在低度癌前病变中的表达具有非常显著的统计学差异 (*P* = 0.000). Ki-67 蛋白在正常鳞状上皮几乎不表达 (1.79%, 1/55). 在低度癌前病变→高度癌前病变→浸润癌→淋巴结转移癌的发展过程中阳性率逐渐增加 (图 4A-B): 分别为 71.1%, 87.1%, 92.3% 和 93.8%. Ki-67 的表达在正常和低度癌前病变之间存在非常显著差异 (*P* = 0.000, 表 1).

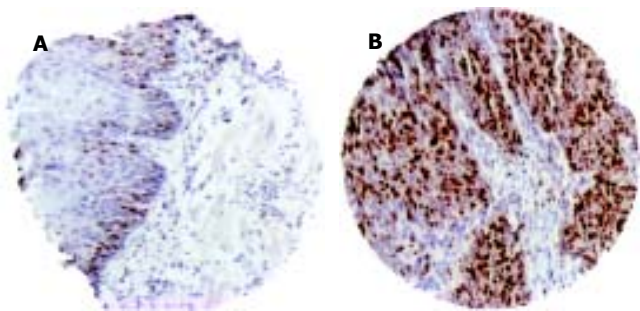


图4 组织芯片中Ki-67的表达. A: 轻度不典型增生中, 底层异型的细胞 Ki-67 开始出现表达 × 100; B: 浸润性鳞癌细胞中 Ki-67 表达阳性 × 100.

3 讨论

组织芯片 (TMA) 技术可以按照不同的实验设计将成百数千个组织标本组合排列在一个石蜡块中, 从而通过一张切片同时对大量组织标本进行各种不同类型的组织原位检测分析研究. 目前该项技术在肿瘤研究领域已成为必要方法之一, 但尚无报道利用 TMA 技术进行食管癌和癌前病变的研究. 我们采用 TMA 技术结合免疫组化观察了 annexin I, Grp94, p53 以及 Ki-67 在食管癌及其癌旁癌前病变中的异常表达.

结果显示, 四种抗体最终用于有效评价的病变数分别占设计病变总数的 78.9–81.0%. 充分体现了组织芯片技术研究肿瘤早期病变的重要应用价值. 在食管癌的演变过程中, 相同的癌前病变形态却可以出现向正常逆转或者进展为癌两种情况, 因此寻找在癌前病变阶段即可筛选出“高危”病例的肿瘤标志物将是一项非常有意义的工作. Annexin I 参与体内细胞信号传导、细胞分化和凋亡等^[8]. 在不同肿瘤组织中的表达呈现显著变化^[1, 9–20], 可能是癌变过程中先于形态学异常的早期变化^[10]. 本研究结果与 Paweletz *et al*^[1]

报道一致. 说明 annexin I 表达的异常改变是食管癌发生过程中的非常早期事件. Grp94 蛋白 (葡萄糖调节蛋白 94, glucose-regulated protein 94) 作为热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP 90) 家族成员之一, 在肝细胞癌^[2]、肺癌^[3]、乳腺癌^[4]等肿瘤中表达上调, 提示 Grp94 过度表达与癌变机制有关. 目前有关 Grp94 在人食管鳞癌及其癌前病变的研究报道甚少^[21]. 通过免疫组化分析 Grp94 在食管鳞癌及其癌前病变中的表达异常, 显示从食管正常鳞状上皮演变到浸润性鳞癌的各个病变阶段病变中, Grp94 阳性表达率呈逐渐增加趋势, 其中最显著的改变发生在浸润性鳞癌阶段 (62.0%, *P* = 0.000). 这一结果提示 Grp94 表达异常发生在食管鳞癌进展期间, 对早期浸润预警以提示局部微创治疗指征以及预测预后都将有重要参考价值.

p53 基因突变或缺失导致 p53 蛋白异常表达与许多肿瘤的发生密切相关已是不争的事实. p53 蛋白过表达在肿瘤发生发展的早期阶段已经显现^[5]. 本结果表明, 癌旁远端正常鳞状上皮 p53 蛋白无表达, 而在低度癌前病变阳性率为 67.6%, 与正常比较存在统计学显著差异 (*P* = 0.000). 进一步证实 p53 蛋白表达异常可能是癌前亚形态学的很早期事件^[5]. Ki-67 作为细胞增生相关核抗原, 其阳性表达是细胞具有增生活性的标志. 在有关肿瘤的研究发现 Ki-67 阳性表达也作为预示癌变的高危指标之一^[5]. 我们的结果显示在食管正常鳞状上皮细胞与癌前病变比较 Ki-67 的阳性表达率存在显著差异 (*P* = 0.000). 从低度癌前病变开始随着病变程度的加重 Ki-67 阳性表达逐渐增强 (71.1–93.8%), 其表达增强趋势与形态学异型性程度相吻合, 提示在食管癌前病变进展中 Ki-67 表达增强指数可能对癌变危险性的早期预警研究有重要参考价值. 联合应用 annexin I, p53 和 Ki-67 有可能作为食管癌发生发展过程中非常早期阶段的癌变风险的预警标志物.

4 参考文献

1 Paweletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, Bichsel VE, Gillespie JW, Calvert VS, Vocke CD, Hewitt SM, Duray PH, Herring J, Wang

- QH, Hu N, Linehan WM, Taylor PR, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Petricoin EF 3rd. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:6293-6297
- 2 Tanaka K, Kondoh N, Shuda M, Matsubara O, Imazeki N, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Yamamoto N, Yamamoto M. Enhanced expression of mRNAs of antiseecretory factor-1, gp96, DAD1, and CDC34 in human hepatocellular carcinomas. *Biochim Biophys Acta* 2001;1536:1-12
- 3 Wang Q, An L, Chen Y, Yue S. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperon GRP94 in human lung cancer tissues and its clinical significance. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115:1615-1619
- 4 Gazit G, LU J, Lee AS. De-regulation of GRP protein expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 1999;54:135-146
- 5 Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p 53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- 6 Dong Wang L, Bin Yue W, Zhou Y, Wei Feng C, Liu B, Zhou Q, Ying Jia Y, Zheng S, Gao SS, Ji Xie X, Min Fan Z, Min Niou H, Hao Zhuang Z, Yang CS, Min Bai Y, Jun Qi Y. Endoscopic screening and determination of p53 and proliferating cell nuclear antigen in esophageal multistage carcinogenesis: a comparative study between high- and low-risk populations in Henan, northern China. *Dis Esophagus* 2002;15:80-84
- 7 Hu N, Huang J, Emmert-Buck MR, Tang ZZ, Roth MJ, Wang C, Dawsey SM, Li G, Li WJ, Wang QH, Han XY, Ding T, Giffen C, Goldstein AM, Taylor PR. Frequent inactivation of the TP53 gene in esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk population in China. *Clin Cancer Res* 2001;7:883-891
- 8 张立勇, 赵晓航, 吴旻. 膜联蛋白 I 的结构和功能. *生物化学与生物物理进展* 2002;29:514-517
- 9 Xin W, Rhodes DR, Ingold C, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Dysregulation of the Annexin family protein is associated with prostate cancer progression. *Am J Pathol* 2003;162:255-261
- 10 Masaki T, Tokuda M, Ohnishi M, Watanabe S, Fujimura T, Miyamoto K, Itano T, Matsui H, Arima K, Shirai M, Maeba T, Sogawa K, Konishi R, Taniguchi K, Hatanaka Y, Hatase O, Nishioka M. Enhanced expression of the protein kinase substrate Annexin 1 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;24:72-81
- 11 Vishwanatha JK, Salazar E, Gopalakrishnan VK. Absence of annexin I expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and cell lines. *BMC Cancer* 2004;4:8
- 12 Zhi H, Zhang J, Hu G, Lu J, Wang X, Zhou C, Wu M, Liu Z. The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003;106:327-333
- 13 Kang JS, Calvo BF, Maygarden SJ, Caskey LS, Mohler JL, Ornstein DK. Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:117-123
- 14 Xia SH, Hu LP, Hu H, Ying WT, Xu X, Cai Y, Han YL, Chen BS, Wei F, Qian XH, Cai YY, Shen Y, Wu M, Wang MR. Three isoforms of annexin I are preferentially expressed in normal esophageal epithelia but down-regulated in esophageal squamous cell carcinomas. *Oncogene* 2002;21:6641-6648
- 15 Da J, Meng X, Wang P, Yang Z, Zhu Y. Significance on expressions of Annexin-I and its correlative gene proteins in endometrial hyperplasia, atypical hyperplasia and endometrial carcinoma. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2001;30:256-259
- 16 Garcia Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Herrero Zapatero A, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, Rodrigo JP. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol* 2004; 164:73-79
- 17 Luo A, Kong J, Hu G, Liew CC, Xiong M, Wang X, Ji J, Wang T, Zhi H, Wu M, Liu Z. Discovery of Ca²⁺-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 2004;23:1291-1299
- 18 Mulla A, Christian HC, Solito E, Mendoza N, Morris JF, Buckingham JC. Expression, subcellular localization and phosphorylation status of annexins 1 and 5 in human pituitary adenomas and a growth hormone-secreting carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:107-119
- 19 Smitherman AB, Mohler JL, Maygarden SJ, Ornstein DK. Expression of annexin I, II and VII proteins in androgen stimulated and recurrent prostate cancer. *J Urol* 2004;171(2 Pt 1): 916-920
- 20 Hu N, Flaig MJ, Su H, Shou JZ, Roth MJ, Li WJ, Wang C, Goldstein AM, Li G, Emmert-Buck MR, Taylor PR. Comprehensive characterization of annexin I alterations in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(18 Pt 1): 6013-6022
- 21 Chen X, Ding Y, Liu CG, Mikhail S, Yang CS. Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans. *Carcinogenesis* 2002;23:123-130

编辑 潘伯荣 审读 张海宁