

# 应用 FISH 和组织芯片方法研究肺癌组织 Ets1 mRNA 的表达及意义

孙翠云,王新允,李艳,刘婷,郑海燕,王爱香,赵敏,吴兴业

Expression and Significance of Ets1 mRNA in Lung Cancer Tissue Microarray (TMA) Detected by FISH Method

SUN Cui-yun, WANG Xin-yun, LI Yan, LIU Ting, ZHENG Hai-yan, WANG Ai-xiang, ZHAO Min, WU Xing-ye

Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

**Abstract:** **Objective** To observe the expression of Ets1 mRNA in lung cancer tissue microarray by FISH method, and investigate the role and significance of it in lung cancer genesis and progress. **Methods** The expression of Ets1 mRNA in lung cancer was detected by tissue microarray technology and fluorescence in situ hybridization (FISH) method. **Results** 70.4% of lung cancer samples expressed Ets1 mRNA; the positive rate of lung cancer samples was significantly higher than that of normal lung tissue ( $P < 0.05$ ); the expression of Ets1 mRNA was related to the differentiation degrees, lymph node metastasis and clinical stages ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Tissue microarray technology has many advantages, such as high efficiency, convenience, economy and standardization; FISH is sensitive, steady, and preservative. Ets1 mRNA was highly expressed in lung cancer; it was related to the progress and malignant behavior; it may play an important role in lung cancer genesis and progress and offer basis to prognosis estimate and treatment.

**Key words:** FISH; Tissue microarray (TMA); Ets1; Lung cancer

**摘要:** **目的** 用荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 方法检测肺癌组织芯片 (tissue microarray, TMA) 中 Ets1 mRNA 表达情况,并探讨其在肺癌发生、发展中的作用和意义。**方法** 利用 mRNA FISH 方法和组织芯片技术,检测肺癌 Ets1 mRNA 的表达情况。**结果** 肺癌组中有 70.4% 表达 Ets1 mRNA,而正常肺标本中未见 Ets1 mRNA 表达,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Ets1 mRNA 的表达与肺癌的分化程度、淋巴结转移和临床分期显著相关 ( $P < 0.05$ )。**结论** 组织芯片技术可以使实验简便、经济和标准化; FISH 方法敏感性高,稳定性高,荧光染色保存时间长,可以较好地反映 mRNA 在细胞中的定位和含量。本研究发现 Ets1 mRNA 表达与肺癌的侵袭转移有关,因而 Ets1 基因可能成为肿瘤患者预后判断和指导临床治疗的重要指标。

**关键词:** FISH; 组织芯片; Ets1; 肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)10-0616-03

## 0 引言

转录因子 Ets1 在肿瘤的侵袭、转移和血管生成过程中发挥重要作用,通过与 VEGF、KDR 和 MMP1、MMP3、MMP9 以及 uPA 等基因的相互作用,参与肿瘤 ECM 降解,肿瘤血管生成等过程。Ets1 在多种肿瘤组织中表达,而在正常分化的组织中不表达,与肿瘤的恶性行为和不良预后相关。肺癌组织中 Ets1 的转录目前国内外研究较少。本研究采用组织芯片技术和 FISH 方法检测 Ets1 mRNA 在各种肺癌组织中的表达,并探讨其与临床病

理参数之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集天津医科大学总医院、第二附属医院病理科 1987~2003 年手术切除的肺癌石蜡包埋标本 54 例,其中男性 37 例,女性 17 例;年龄 33~78 岁,中位年龄 60 岁。所有病例术前均未行放、化疗。按照世界卫生组织 (WHO) 肺肿瘤组织学类型修订方案,对全部资料进行统一命名和分类:腺癌 20 例,鳞癌 20 例,小细胞癌 8 例,大细胞癌 6 例;高分化 17 例,中分化 13 例,低分化 10 例,未分化 14 例;中央型 25 例,周围型 29 例;有淋巴结转移 32 例,无淋巴结转移 22 例;临床分期 期 18 例, 期 23 例, 期

收稿日期:2005-01-27;修回日期:2005-02-25

基金项目:天津市科委重点攻关课题基金资助项目 (033804211)

作者单位:300070 天津医科大学病理教研室

10 例, 期 3 例。对照组取自同期正常肺组织 10 例, 包括 3 例手术切除炎症假瘤病例的正常肺组织和 6 例尸检的正常肺组织, 以及 1 例肺大疱的正常肺组织。肺癌组织每例取 4 点, 正常对照每例取 2 点, 制备组织芯片。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制备

设计 20 ×12 点阵, 每例肺癌取 4 个点, 每例正常肺组织取 2 个点, 共计 236 个点, 另外取 4 个子宫肌瘤组织放在阵列右下角以方便镜下定位。由病理专家重新阅片, 在切片选定肿瘤部位作一标记, 然后在原蜡块相应部位作标记。用组织芯片仪在受体空白蜡块上按设计好的位置打孔, 孔径 0.6mm, 孔心距 1.6mm。用穿刺针将标记好的供体组织柱取出, 依次将这 64 个病例的组织芯放入预先设计好的受体蜡块相应位置的孔中, 制成组织芯片蜡块。3 ~ 4μm 切片, 用进口氨基玻片捞片后将切片置于 58 温箱中过夜。

1.2.2 荧光原位杂交

探针为荧光素直接标记的针对 Ets1 mRNA 的寡核苷酸探针, 采用模板序列: GTAAA CTCGG GGGCC AGGAC TCTTT TGA, 探针合成序列: 5'-TCAAAGAGTCCTGGCCCCGAGTTTAC-3', 原位杂交试剂盒(天津灏洋生物制品科技有限公司)。实验步骤按试剂盒说明书进行。组织切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡后, 曲拉通打孔 15 分钟, 复合消化液 4 消化 8 分钟, 预杂交 37 1 小时, 杂交 37 4 小时, 用未加探针的杂交液作空白对照。甘油封片, 然后用荧光显微镜观察, 以荧光显微镜下观察胞浆中出现黄绿色荧光颗粒为阳性。

1.2.3 FISH 结果的判断

对组织芯片中各点进行评分, 根据荧光的强弱: 不着色为 0, 轻度着色为 1, 中度着色为 2, 强着色为 3; 根据着色肿瘤细胞占肿瘤细胞总数的百分比: 无着色为 0, 25% 为 1, 26% ~ 49% 为 2, 50% 为 3。两种积分相加为该点得分, 对组织芯片中来自同一病例的点的得分取平均值, 若 > 2 为阳性, 2 为阴性, 进行定性判断。

1.3 统计学方法

用 SPSS 11.5 统计软件包, 对 Ets1 mRNA 在各组中表达的阳性率进行比较, 采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率计算, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 组织芯片整体观察

芯片蜡块中可见 240 个点阵排列整齐, 无移位。

荧光原位杂交后基本无掉片、重叠和扭曲现象, 适合荧光显色的观察和结果的判定, 见图 1。

2.2 肺癌中 Ets1 mRNA 的表达情况 见表 1。

表 1 Ets1 mRNA 表达与临床病理参数的关系

分组	例数	阳性	阴性	阳性率 (%)	$\chi^2$	P
肺癌与对照					17.322	0.000
肺癌组	54	38	16	70.4		
对照组	10	0	10	0.0		
性别					0.610	0.435
男	40	27	13	67.5		
女	14	11	3	78.6		
年龄					0.018	0.892
60 岁	21	15	6	71.4		
< 60 岁	33	23	10	69.7		
肉眼类型					0.125	0.723
周围型	29	21	8	72.4		
中央型	25	17	8	68.0		
组织学类型					1.322	0.250
NSCLC	46	31	15	67.4		
SCLC	8	7	1	87.5		
分化程度					7.397	0.002
高-中分化	30	16	14	53.3		
低-未分化	24	22	2	91.7		
临床分期					3.952	0.047
+ 期	41	26	15	63.4		
+ 期	13	12	1	92.3		
淋巴结转移					7.388	0.007
有	32	27	5	84.4		
无	22	11	11	50.0		

2.2.1 Ets1 mRNA 在不同组别的表达情况

Ets1 mRNA 黄绿色荧光颗粒位于胞浆, 细胞核无荧光显色, 见图 2。Ets1 mRNA 在各组的阳性率分别为: 正常组 0, 肺癌组 70.4%; 肺癌组 Ets1 mRNA 的阳性率显著高于正常组 ( $P < 0.05$ )。

2.2.2 Ets1 mRNA 与不同临床病理参数的关系

Ets1 mRNA 在不同组织学类型阳性率分别为: NSCLC 67.4%, SCLC 87.5%, 差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。Ets1 mRNA 在肺癌中表达的阳性率与组织分化程度、淋巴结转移和临床分期显著相关 ( $P < 0.05$ ), Ets1 mRNA 在肺癌中表达的阳性率在不同性别、年龄和肉眼类型分组中差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

3 讨论

人类 Ets1 基因位于染色体 11q23.3, 其编码的分子量为 54 ×10<sup>3</sup> 的蛋白是一种转录因子, 含有一个由 85 个氨基酸组成的特异的 DNA 结合区。该区可以识别、结合嘌呤丰富的 DNA 核心序列

GGAA/T 进而调节相关基因的转录,这一序列存在于与细胞外基质降解以及血管生成有关的许多基因的 5'侧翼调节区如整合素、MMP1、MMP3、MMP9 等,因此 Ets1 基因可能与多种肿瘤的侵袭转移有关。近年已成为各国学者的关注热点。

本研究采用组织芯片技术和 FISH 方法。前期研究通过比较组织芯片和相应大切片的免疫组织化学染色结果,认为组织芯片技术可替代传统制片技术用于进行免疫组化、原位杂交和 FISH 的研究<sup>[1]</sup>。FISH 方法应用直接标记荧光素的针对 mRNA 的探针检测肺癌肿瘤组织中 Ets1 mRNA 的表达,灵敏性强,稳定性高,荧光染色保存时间长,可以较好地反映 mRNA 在细胞中的定位,并可根据荧光的强弱比较其含量多少,尤其结合组织芯片技术,同一张芯片上的组织经过完全相同的处理,我们可以根据荧光强弱来进行所有组织 mRNA 表达强弱的比较。

对人类各种肿瘤细胞免疫组织化学和原位 mRNA 分析已经证实 Ets1 参与基质降解酶的转录,而后者与肿瘤的侵袭转移有密切关系<sup>[2]</sup>。本研究发现 Ets1 mRNA 在肺癌组织中 70.4% 表达,而在正常肺组织中无表达;临床分期 + 期显著高于 + 期 ( $P < 0.05$ ),淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.05$ ),与 Bolon 等<sup>[3,4]</sup>通过原位杂交和免疫组织化学染色方法研究结果一致,说明 Ets1 mRNA 表达促进肺癌进展,与肺癌的侵袭转移有关。本研究还发现 Ets1 mRNA 表达阳性率随肺癌分化程度的降低而升高,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ),说明 Ets1 与肺癌的恶性程度有关。

丁印鲁等<sup>[5]</sup>采用反义核苷酸方法进行研究,在 matrigel 凝胶上培养 SGC-7901 细胞,发现该胃癌细胞株在体外能够形成管状结构,Ets1 的反义寡核苷酸可以减弱细胞增殖能力,降低体外侵袭能力,抑制体外血管通道形成,但正义核苷酸没有此作用。在肿瘤的发展过程中 Ets1 可能执行双重功能,通过诱导肿瘤血管形成,供给癌细胞营养和氧,又通过活化癌细胞的 ECM 降解酶提高肿瘤细胞的侵袭性<sup>[6]</sup>。

综上所述,Ets1 作为最大的信号依赖转录调控因子家族重要成员之一,介导细胞增殖、分化和恶性变,其过度表达和许多人类肿瘤的发生有关,本研究证实 Ets1 可能参与肺癌的发生、发展过程,与肺癌的侵袭转移和预后有密切关系,可作为肺癌预后判断的参考指标和肺癌治疗的靶基因。

(本文图见封 3)

参考文献:

[1] Wang Xinyun, Yao Zhi, Li Yan, et al. Expression of Survivin, PTEN and bFGF in lung cancer progression tissue microarray[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2004, 16 (4): 297-301.

[2] Kitange G, Kishikawa M, Nakayama T, et al. Expression of the Ets1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors[J]. Mos Pathol, 1999, 12 (6): 618-626.

[3] Bolon I, V Gouyer, M Devouassoux, et al. Expression of c-ets-1, collagenase1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas[J]. American Journal of Pathology, 1995, 147 (5): 1298-1310.

[4] Bolon I, Brambilla E, Vandebunder B, et al. Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets1 during progression of precancerous bronchial lesions [J]. Lab Invest, 1996, 75 (1): 1-13.

[5] 丁印鲁,李兆亭. Ets1 基因的反义寡核苷酸对胃癌体外血管生成拟态的影响[J]. 外科理论与实践, 2003, 8 (5): 394-397.

[6] Jurgen Dittmer. The biology Ets1 proto-oncogene [J]. Mol Cancer, 2003, 2 (1): 29-43.

[编辑: 安 凤]

## 赫赛汀对鼻咽癌细胞株体内外生长的影响

(正文见 610 页)

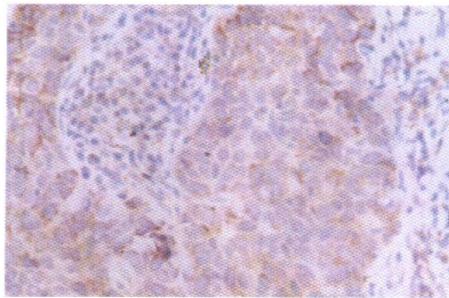


图1 鼻咽癌病理标本HER-2/neu基因阳性表达检测结果(苏木素复染×40)

## 应用 FISH 和组织芯片方法研究肺癌组织 Ets1 mRNA 的表达及意义

(正文见 616 页)

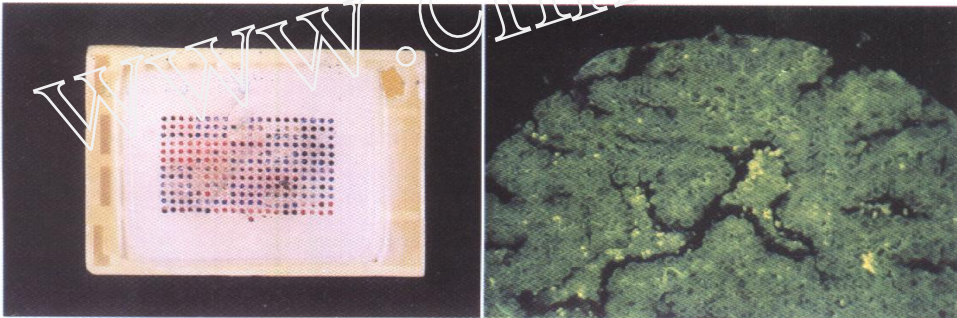


图1 组织芯片

图2 Ets1 mRNA在肺癌细胞浆中表达,呈黄绿色荧光颗粒 ×150

## 莪术瓜蒌汤含药血清诱导 PGLH7 细胞凋亡的实验研究

(正文见 640 页)

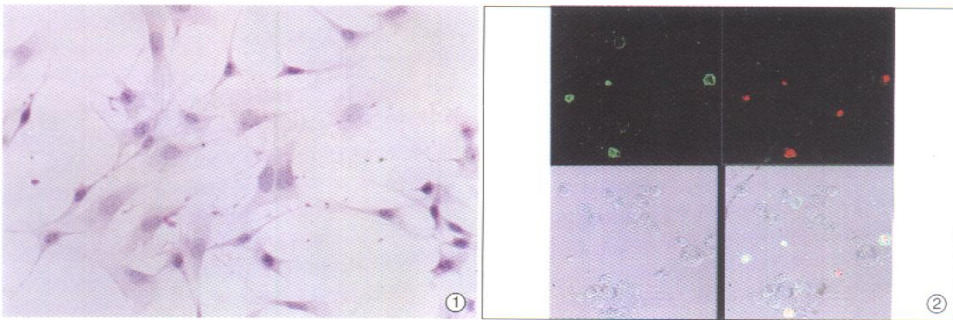


图1 对照血清组PGLH7细胞生长舒展,相邻细胞融合成片,似呈铺砖样排列;胞浆丰满、红染、稍透明,胞核大,圆形或椭圆形,核膜清楚;核仁明显,数目增多(HE×400)

图2 左上角为Annexin V荧光,部分细胞膜呈绿色;右上角为PI荧光,部分细胞核呈红色;左下角为荧光屏蔽后的涂片细胞形状;右下角为双标荧光,细胞膜和细胞核的合成,凋亡早期细胞膜呈绿色,核不着色;凋亡中晚期细胞膜呈绿色,核呈红色(激光共聚焦扫描显微镜Annexin V和PI双染法×200)