

## · 临床研究 ·

## 肺癌中FHIT蛋白表达细胞芯片的研究

王新允 袁玲 郑海燕 刘娟 黄曦 武力 袁海洪 赵剑澜

**【摘要】**背景与目的 脆性组氨酸三联体 (fragile histidine triad, FHIT) 是1996年由Ohta等克隆的候选抑癌基因, 文献报道在多种与环境致癌物有关的恶性肿瘤中, 常有FHIT的改变。本研究应用免疫组化方法检测FHIT蛋白在细胞芯片中的表达情况, 进一步验证细胞芯片, 为快速、简便、经济、规范地进行各项细胞学检查提供一种新方法。方法 收集天津医科大学总医院、天津市第一中心医院及天津市胸科医院2005年5月-8月有肿瘤细胞的肺癌患者的胸水50例、非肿瘤患者胸水6例, 运用自制的细胞芯片检测装置, 制备112点细胞芯片。应用免疫组织化学方法检测细胞芯片中FHIT蛋白的表达, 采用SPSS 11.5统计软件进行数据处理。结果 细胞芯片排列整齐, 分布均匀, 无掉片, 符合观察需要。细胞芯片免疫组化染色结果与进行FHIT免疫组化染色的组织芯片中Ⅲ+Ⅳ期肺癌的检测结果进行比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结论 细胞芯片具有操作简单, 信息量大, 节约试剂, 减少误差, 诊断快速的特点, 在临床诊断、科学研究和流行病学筛选中具有广泛的应用前景。

**【关键词】** 细胞芯片; 细胞阵列检测装置; 免疫组化

**【中图分类号】** R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.02.07

**Expression of FHIT Protein in Lung Cancer by Cell Array**

Xinyun WANG, Ling YUAN, Haiyan ZHENG, Juan LIU, Xi HUANG, Li WU, Haihong YUAN, Jianlan ZHAO

Department of Pathology of Tianjin Medical University, Department of Pathology of General Hospital, Department of Pathology of 2nd Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Xinyun WANG, E-mail: xinyunwang@yahoo.cn

**【Abstract】 Background and objective** Fragile histidine triad (FHIT) is a candidate tumor suppressor gene. Aberrance of FHIT has been observed in multiple carcinomas induced by environmental carcinogens, especially in lung cancer. In this study, the expression of FHIT protein in cell array was detected to further development of cell array and for a rapid, simple, and economical method. **Methods** The lung cancer samples were collected from the Tianjin Medical University General Hospital, the First Central Hospital and the Tianjin Chest Hospital from May to August in 2005. A total of 112 dots cell array were constructed in this study including the pleural fluid of 50 cases of lung cancer and 6 cases of normal, the cell array was done with the home-made cell array survey setting. Immunohistochemical stains were performed. **Results** All points rank in a good order without distortion in cell array. After IHC stains of FHIT, the number of cells did not decrease. The positive expression was totally the same to that from the tissue microarray. **Conclusion** Cell array is a rapid and high-throughput technique with high specificity, which could be broadly used in the clinical diagnosis and the screen of epidemiology.

**【Key words】** Cell array; Cell array survey setting; Immunohistochemistry

This work was supported by a grant from the Key Project of Tianjin Natural Science Foundation of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (to Xinyun WANG)(No.033804211).

肿瘤标志物是对肿瘤进行诊断、分期、预后、监测治疗反应所必需的, 对肿瘤细胞的诊断尤其重要。目前检测恶性肿瘤细胞的方法, 只能一次检测一个标本, 浪费人力物力。芯片技术因能进行高通量检测而弥补这一缺陷。组织芯片可以原位检测基因和蛋白表达, 已在医学研究中得

到广泛应用<sup>[1,2]</sup>。由于细胞制成的涂片需要抗体量较多, 费用昂贵, 因此, 当今细胞诊断学的发展需要一种省时、价廉、高通量的检测方法。Oode等<sup>[3]</sup>于2000年成功研制出培养细胞的细胞芯片并利用它结合激光扫描细胞记数 (laser scanning cytometry, LSC) 进行DNA倍型分析和免疫组化等实验, 均取得了预期的效果。我们经过长期实践, 设计了一种新型的细胞芯片, 选用相对容易处理的肺癌患者胸水, 应用自制细胞芯片检测装置 (专利号ZL 200520027814) 摸索出一套制作细胞芯片的方法, 并对其进行了形态学的观

本研究受天津市科委自然科学基金重点项目 (No.033804211) 资助  
作者单位: 300070 天津, 天津医科大学病理教研室, 天津医科大学总医院病理科, 天津医科大学二附属医院病理科 (通讯作者: 王新允, E-mail: xinyunwang@yahoo.cn)

察和蛋白表达方面的可行性研究,希望能够为临床诊断、科学研究和流行病学筛查提供一种新方法。脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)是1996年由Ohta等<sup>[4]</sup>克隆的候选抑癌基因,文献报道在多种与环境致癌物有关的恶性肿瘤中,常有FHIT的改变。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 标本取自天津医科大学总医院、天津市胸科医院和第一中心医院,均为明确诊断为肺癌的病人,未经放疗或化疗,经涂片发现肿瘤细胞。实验前胸水暂时保存在0℃环境下(4℃冰箱中的冰水混合物中),保存时间不超过4 h。50例原发性肺癌伴胸水患者包括:男32例,女18例;年龄38岁-94岁,平均61.1岁;腺癌42例,鳞癌6例,小细胞癌2例;周围型45例,中心型5例;临床分期Ⅲb期13例,Ⅳ期37例。6例对照胸水标本均为非肿瘤性胸水。

1.2 材料 自制的细胞阵列检测装置,细胞芯片用载玻片为德国Menzel Glaser公司产品,所用显微镜为日本Olympus产品,型号为BX-50。免疫组化试剂:兔抗人FHIT单克隆抗体和DAB显色试剂盒均购自北京中衫金桥生物技术有限公司, PBS代替一抗作为阴性对照,以所提供阳性切片作为阳性对照。

### 1.3 方法

1.3.1 切片准备 所选载玻片为德国Menzel Glaser公司产品,盖玻片浸酸24 h,蒸馏水冲洗,无水乙醇冲洗,晾干装盒备用。

1.3.2 胸水细胞悬液制备 取下层胸水,离心1管取沉淀涂片, HE染色后显微镜下观察,选取有癌细胞的病例,并大致判断其所含细胞的多少分别取4-8管进行离心, 1 000 rpm,离心10 min,弃上清,取下层沉淀;每例各管合为1管,再离心;吸去上清,加入4℃ PBS洗细胞3次,每次3 min,混匀再离心后,吸去上清,最后调整细胞浓度制成细胞悬液,将所得细胞悬液置于4℃冰箱中备用。

### 1.3.3 细胞芯片的制作

1.3.3.1 点样 设计7×16点阵,每点直径1.5 mm,间隔1 mm,即相邻点之间距为2.5 mm,用微量移液器将准备好的细胞悬液点入阵列相应位置,每点约0.5 μL,每例细胞悬液点两个点。注意点样时点在玻片上的细胞悬液呈印迹样,使点阵每一点的细胞分布均匀,避免出现细胞过于稀疏或重叠现象。

1.3.3.2 固定 HE染色或免疫组化时,需在4℃冷丙酮或95%乙醇固定15 min。

1.3.3.3 染色 切片干燥15 min后进行HE染色;准备作免疫

组化的切片固定后保存于-20℃冰箱中,后期按照免疫组化的一般步骤进行实验。每例胸水标本在制作细胞芯片的同时涂片进行常规细胞学检查及免疫组织化学染色,并收集临床资料和病理学报告。

1.3.4 免疫组化SP法步骤 以已知阳性片作为阳性对照,以0.01 M PBS代替一抗作为阴性对照,显微镜下观察,阳性对照充分显色后,立即终止反应。具体步骤按说明书进行。

1.4 结果判断 免疫组化结果判定:显微镜下可见胞浆或胞核内存在棕黄色颗粒为阳性信号,以阳性细胞数>10%为阳性(+),癌细胞不着色或阳性细胞数<10%为阴性(-)。

1.5 统计学处理 统计学分析采用SPSS 11.5统计软件进行 $\chi^2$ 检验,检验水准 $\alpha$ 值规定为0.05。

## 2 结果

2.1 细胞芯片HE染色结果 细胞芯片为112点,点阵排列整齐,分布均匀。HE染色结果显示:细胞芯片整齐排列,无脱失,点与点之间无融合。HE染色镜下每点均可见具有诊断意义的肿瘤细胞,基本无重叠现象。检测结果与同时制作的相应涂片进行比较,结果完全一致。(图1A, C, D)。

2.2 细胞芯片免疫组化染色结果 细胞芯片进行了FHIT免疫组化染色(图1B)。经过染色后,细胞无明显减少,胞浆或胞核呈棕黄色颗粒状。细胞芯片FHIT免疫组化染色结果分别与各自细胞涂片免疫组化结果比较,检测结果完全一致;将细胞芯片检测阳性率62.0%(31/50)与进行FHIT免疫组化染色的Ⅲ+Ⅳ期肺癌的组织芯片阳性率60.6%(20/33)进行比较,差异均无统计学意义( $\chi^2=0.016$ ,  $P=0.898$ )。

## 3 讨论

FHIT是一候选肿瘤抑制基因,位于染色体3p14.2。FHIT跨越人类基因组中最常见的脆性部位-FRA3B。FHITcDNA全长1 095 bp,由10个外显子组成,分布在总长度为1 Mb的基因座上。在肿瘤细胞系及食管癌、膀胱癌等中可检测到FHIT基因的杂合性缺失,异常转录本及蛋白表达缺失,这些发现支持FHIT是一个肿瘤抑制基因。Sasaki等<sup>[5]</sup>通过RT-PCR分析FHIT基因异常与FHIT蛋白表达丢失之间的关系,证实两者存在一致性。因而我们采用免疫组化方法检测肺癌细胞芯片中FHIT蛋白表达,分析其表达与临床病理参数之间的关系,进而反映FHIT在肺癌发生中的作用是简单可行的。

从临床角度需要一种单次实验就能对大样本病例进行分析的方法, DNA芯片使得单次实验就能对成千的基因

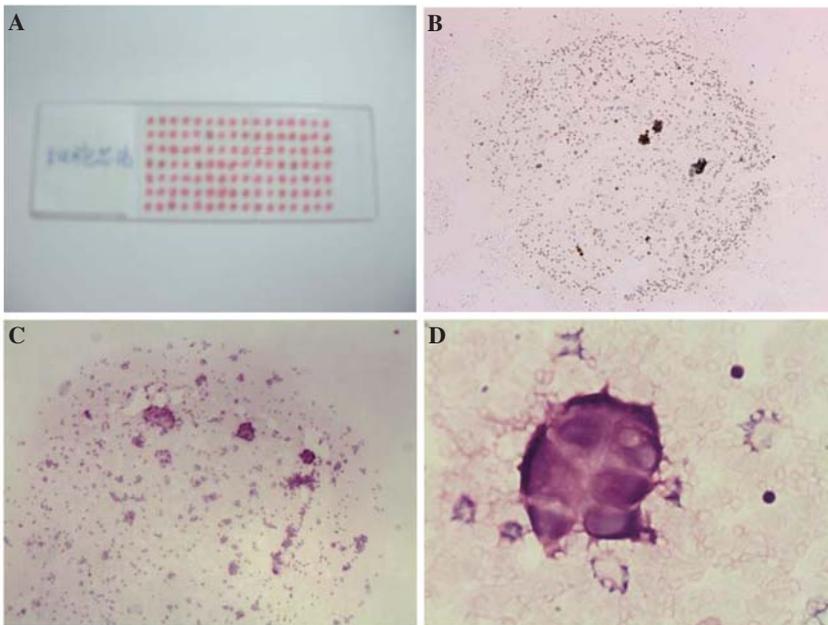


图1 肺癌细胞芯片

A: 细胞芯片;  
B: 肺癌细胞胞浆呈FHIT阳性表达 (SP×40);  
C: 肺癌胸水芯片一点 (HE×100);  
D: 肺癌胸水芯片一点 (HE×400)

Fig 1 Cell microarray on lung cancer

A: Cell microarray;  
B: Expression of FHIT in cytoplasm of lung cancer (SP×40);  
C: A dot on the microarray (HE×100);  
D: A dot on the microarray (HE×400)

进行分析成为可能。这项技术因为具有高分析效率而得到广泛应用。相应地,另一种高通量方法可应用于组织或细胞中以分析基因的表达情况。组织芯片就是近年来兴起的能够单次实验分析成百的组织样品中抗原的表达,在组织病理学研究中具有很大的优势。本课题组已成功研制出石蜡组织芯片和冰冻组织芯片,结合HE染色、免疫组化和荧光原位杂交等方法,对肺癌的浸润和转移进行了一系列研究,并尝试对肺癌的早期诊断进行一些探索<sup>[1,2,6]</sup>。

细胞芯片却拥有许多组织芯片不具备的优势,如能够快速分析多个样品中DNA倍型,也可以用染色体特异性DNA探针进行细胞遗传学分析。组织芯片则由于在组织切片过程中细胞核被截断而无法正确判断染色体数。细胞芯片能弥补这一劣势。因此二者结合能更好应用于科研和临床。

我们应用自己研制的细胞芯片检测装置,成功制作了胸水细胞芯片,并对其进行了HE染色观察,镜下每一组织芯中均可见具有诊断意义的肿瘤细胞,基本无重叠现象。我们进行了FHIT的免疫组化染色,各点形态完好,染色背景清晰,肿瘤细胞胞浆或胞核不同程度着色;细胞芯片免疫组化染色结果与其相应细胞涂片免疫组化结果相比较,检测结果完全一致;将细胞芯片免疫组化检测结果与进行FHIT免疫组化染色的组织芯片中Ⅲ+Ⅳ期肺癌的检测结果进行比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。总之,我们的结果进一步验证我们制作细胞芯片的方法是可行的,所制出的细胞芯片完全可以用于组织形态学观察和蛋白表达分析。细胞芯片可以替代细胞涂片进行临床诊断和科学研究,尤其在样本较多的情况下更显示其优越性。

细胞芯片同石蜡芯片一样,也存在点阵能不能代表原组织的问题,Camp等<sup>[7]</sup>研究乳腺癌时分别比较了从每个病例石蜡块中取出直径约0.6 mm的2-10个点的免疫组化结果,发现如果取直径为0.6 mm的两点进行测试,95%的实验结果相互吻合。我们在制作240点阵组织芯片时也得出了类似的结果<sup>[8]</sup>:组织芯片免疫组化结果与原组织结果相比较,直径约0.6 mm的组织芯随机取1点符合率为90.7%,取2个点符合率为94.4%,取3个点符合率为94.4%,取4个点符合率为96.3%,这4组的结果与普通免疫组化结果在统计学上均无统计学差异( $P>0.05$ ),考虑到经济实用以及染色过程中掉片的可能,选用每个病例取2点。我们在制作细胞芯片时,曾试验每例标本点2个、3个、4个点,结果无明显差异,所以设计每点直径1.5 mm,每个病例取2点。

在制作前应根据研究的需要设计好阵列图,每个点的直径和点之间的距离依据实验的要求而有所不同,如果对细胞数量要求不高,每个点的直径可以缩小,点样数量就可以更多。进行DNA倍型分析时多依赖于细胞计数,点越大,包含样本数越少,细胞浓度越大,细胞重叠越严重,要保证每个点的细胞数足够以做DNA倍型分析,而细胞又不致过分重叠,且1张片子能包含尽可能多的样品数,Oode<sup>[3]</sup>用外周血淋巴细胞及9种肿瘤细胞系制成细胞芯片结合激光扫描细胞计数进行DNA倍型分析时,提出调整细胞浓度,使得一张片子包含50个点,每点直径2 mm,相邻点之间距为3 mm,这样每个点中可计数细胞约为800-1 000,最符合实验要求。而本实验采取的是每点直径1.5 mm,相邻点之间距为2.5 mm,完全满足实验需要。

细胞芯片应用范围广,能观察多种类型细胞的形态。可用于免疫组织化学,原位杂交、荧光原位杂交染色及DNA倍体分析、染色体畸变分析等。能检测细胞中各种癌基因、抑癌基因、凋亡基因等的表达情况,可广泛应用于胸水、腹水、尿液、心包积液、脑脊液、痰、培养细胞等细胞学检测,将会对临床诊断和流行病学筛查及科研方面具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

1 Zheng HY, Wang XY, Wang AX, *et al.* Development and clinical application of frozen tissue microarray in lung cancer diagnosis. *Chin J Lung Cancer*, 2008, 11(3): 373-376. [郑海燕, 王新允, 王爱香, 等. 冰冻组织芯片的研制及可行性探讨. *中国肺癌杂志*, 2008, 11(3): 373-376.]

2 Wang XY, Liu T, Li Y, *et al.* Detection expressin of MRP-1/CD9 mRNA in lung cancers using tissue microarrays and fluorescence. *Chin J Cancer Res*, 2005, 17(3): 199-202.

3 Oode K, Furuya T, Harada K, *et al.* The development of a cell array and its combination with Laser-scanning cytometry allows a high-throughput analysis of nuclear DNA content. *Am J Pathol*, 2000, 157(3): 723-728.

4 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, *et al.* The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t (3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, 1996, 8(4): 587-597.

5 Sasaki H, Haneda H, Yukiue H, *et al.* Decreased fragile histidine triad gene messenger RNA expression in lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 2006, 7(6): 412-416.

6 Yuan L, Wang XY, Zheng HY. The biological significance of FITH protein expression in lung cancer and precancerous tissues detected by tissue microarray. *Chin J Lung cancer*, 2007, 10(3): 192-196. [袁玲, 王新允, 郑海燕. 应用组织芯片研究肺癌及癌前病变组织中FHIT的表达及其意义. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(3): 192-196].

7 Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissues microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 2000, 80(12): 1943-1949.

8 Wang XY, Zhu CZ, Liu T, *et al.* A study on manufacture of tissues microarray. *J Tianjin Med Univer*, 2005, 11(1): 24-35. [王新允, 朱丛中, 刘婷, 等. 组织芯片研制的几点体会. *天津医科大学学报*, 2005, 11(1): 24-35.]

(收稿: 2008-11-26 修回: 2008-12-30)  
(本文编辑 孙丹)

· 启 事 ·

《中国肺癌杂志》免收作者审稿费声明

为缩短审稿周期, 加快文章发表速度, 扩大大刊学术影响, 经研究决定, 自2008年4月20日起, 《中国肺癌杂志》免除所有作者审稿费。本刊专家审稿费用仍照常发放, 由本刊承担相关支出。

所有投稿作者仅需提供单位介绍信和基金证明即可。

投稿方式为E-mail投稿: [cnlungca@gmail.com](mailto:cnlungca@gmail.com); [cnlungca@yahoo.com.cn](mailto:cnlungca@yahoo.com.cn)

详情可以访问本刊网站: [www.lungca.org](http://www.lungca.org) / E-mail编辑 / 来电垂询022-27219052/27219219。

《中国肺癌杂志》编辑部  
2008年5月

关于参考文献的使用说明

参考文献应以作者亲自阅读过的近5年内公开发表的文献为主, 随着科技信息的迅速更新和传播, 最好为近2年内发表的文献, 一般不采用内部资料(如系重要的学术会议论文集则除外)。参考文献依次用阿拉伯数字排列于文末; 在文中则依照其顺序用阿拉伯数字加方括号以右上角形式标出, 宜标在所引文献的作者的右上角, 如张华<sup>[1]</sup>、国外文献<sup>[1,2]</sup>、国外文献<sup>[1-3]</sup>、Franchi等<sup>[1]</sup>, 不标在所引文献的文末, 但如果仅引用一句话而未列出引文作者, 则可标在文末; 文中与文末标注符号须一致。

《中国肺癌杂志》编辑部  
2009年2月