

免疫组化方法检测肿瘤标志在肺癌组织芯片中表达的可靠性研究

乔贵宾^{1,2}, 吴一龙^{2*}, 区伟², 杨学宁², 钟文昭², 林嘉颖², 赵建², 谢丹³, 关新元³

Reliability of Tissue Microarrays for Immunohistochemical Detection of Tumor Markers in Non-Small Cell Lung Cancer

QIAO Gui-bin^{1,2}, WU Yi-long¹, OU Wei², YANG Xue-ning², ZHONG Wen-zao², LIN Jia-ying², ZHAO Jian², XIE Dan³, GUAN Xin-yuan³

1. Department of Thoracic Surgery, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China;

2. Department of Cardiothoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University;

3. Department of Clinical Oncology, Hong Kong University (* Corresponding author)

Abstract: Objective Tissue microarrays allow high-throughput molecular profiling of cancer specimens by immunohistochemistry. This study aimed at investigating the reliability and validity of tissue microarrays for immunophenotyping. **Methods** We constructed triplicate tissue microarrays (TMAs) containing specimens from 418 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), and randomized selected 50 full tissue sections from these tumors. TMAs and full tissue sections slides were immunohistochemically stained with antibodies against Ki-67 and p53. Data on full tissue sections were compared to the results of TMAs. **Results** Concordance for Ki-67 and p53 stainings between tissue arrays with triplicate cores per tumor and full sections were 98% and 96%, respectively. TMAs (three cores per tumor) were reliable for detection of Ki-67 and p53 in NSCLC tissues, kappa values were 0.95 and 0.91, respectively. **Conclusion** Triplicate 0.6-mm core biopsies sampled on tissue arrays provide a reliable system for high-throughput expression profiling by immunohistochemistry when compared to standard full sections, and suitable for large-scale retrospective clinical study.

Keywords: Non-small cell lung cancer; Tissue microarrays; Ki-67; p53

摘要:目的 用免疫组化方法检测肺癌组织芯片肿瘤标志的可靠性和有效性进行了探讨。方法 建立含有 418 例非小细胞肺癌标本的组织芯片,并随机选取了 50 例与组织芯片标本相对应的全组织标本。用免疫组化方法研究并对比了 Ki-67 和 p53 在组织芯片和全组织标本中的表达情况及其符合程度和可靠性。结果 组织芯片和全组织切片中 Ki-67 和 p53 表达的一致率分别为 98% 和 96%。非小细胞肺癌三位点组织芯片检测 Ki-67 和 p53 表达的可靠性好, Kappa 值分别为 0.95 和 0.91。结论 三位点组织芯片可有效、可靠地检测肿瘤标志物在非小细胞肺癌中的表达。本研究表明组织芯片技术特别适用于大样本、回顾性的临床研究。

关键词: 肺肿瘤; 组织芯片; Ki-67; p53

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)08-0467-04

0 引言

组织芯片技术(Tissue chip),又称组织微阵列技术(Tissue microarray),是伴随 cDNA 芯片技术而发展起来的一种新的方法,它可将多个样本的少量组织高密度地固定于固相载体上,然后用不同的基

因、寡核苷酸、抗体与之进行杂交,从而研究目的基因在不同组织之间的差异扩增、丢失和表达情况。它的出现为大样本的肿瘤学基础和临床研究带来了方便^[1,2]。由于组织芯片是从石蜡包埋的全组织标本中选择具有代表性的区域穿刺构建而成的,芯片上每个位点只有 0.6mm 直径,再加上肿瘤组织细胞的异质性,组织芯片检测肿瘤标志物的有效性和可靠性就成了大家关注的问题。近年来,已有研究者就组织芯片检测乳腺癌、前列腺癌中肿瘤标志物表达情况的有效性和可靠性进行了探讨^[1,3],并发现对全组织标本进行多点穿刺,增加其在芯片上的位点数,可减少组织芯片和全组织标本检测结果的差异,提高组织芯片检测的可靠性和有效性。有关用免疫

收稿日期: 2004-05-10; 修回日期: 2004-06-10

基金项目: 广州市科技局重点攻关项目(2001-Z-044-01); 广东省重点医学科技攻关专项课题(WSTJJ20030726440102560203401); 国家高新技术研究发展计划重大课题(2004-1)

作者单位: 1. 510010 广州军区广州总医院胸外科; 2. 广东省人民医院肿瘤中心、胸外科, 广东省肺癌研究所; 3. 香港大学临床肿瘤学系(*通讯作者)

组化方法检测肺癌组织芯片肿瘤标志表达情况的可靠性目前尚未见报道。

本研究构建了含有 418 例非小细胞肺癌标本的组织芯片,该芯片包含了所有分期和几乎所有的病理类型的非小细胞肺癌标本。每例肿瘤在芯片上有三个直径为 0.6mm、最具代表性的位点。用免疫组化方法对组织芯片及其上 50 个随机病例所对应的全组织标本进行了 Kt67 和 p53 检测,并对用免疫组化方法检测肺癌组织芯片肿瘤生物标志的可靠性进行了评价。

1 对象和方法

1.1 研究对象

病例为 1994 年 1 月~1997 年 12 月进行手术、并符合纳入标准的全部非小细胞肺癌患者,共 418 例。所有病例均由组织病理学确诊。纳入标准:(1)无其他部位原发肿瘤;(2)术前未接受放疗和化疗等治疗;(3)死亡原因明确。标本均取自于手术切除的肺肿瘤组织;所有标本均经 10% 福尔马林固定及石蜡包埋。

1.2 临床病理资料

在进行比较的 50 例非小细胞肺癌病例中,男性 28 例,女性 22 例,中位年龄为 59 岁(32~78 岁,平均年龄为 58.18 岁)。中位生存时间为 32 个月(3~104 月,平均 34 月)。所有患者都接受了开胸手术。组织病理学检查表明腺癌为主要的病理类型,共有 32 例。15 例鳞癌,2 例腺鳞癌,1 例大细胞癌。11 例为 期 NSCLC,17 例 期,15 例 A 期,5 例 B 期,2 例 期。大部分肿瘤为中分化(50%),低分化和高分化分别为 18% 和 32%。

1.3 组织芯片的构建

组织芯片的构建方法如前所述^[4]。组织芯片仪(Beecher Instruments, Silver Spring, MD)用于组织芯片的构建。首先,将供体石蜡标本切片,进行苏木素-伊红染色,然后根据苏木素-伊红切片在每个供体蜡块标本上穿刺 3 个最具代表性的肿瘤区域供芯片构建。芯片上每个标本直径为 0.6mm,间距为 0.1mm。最后 418 例 NSCLC 标本随机构建在 3 块组织芯片上,每个肿瘤在芯片上有 3 个对应的位点。受体蜡块构建完成后进行连续切片(切片厚 5 μ m),并装裱在载玻片上。用随机数字法选取了 418 例病例中的 50 例供对比性研究,对该 50 个病例的全石蜡包埋标本切片,与组织芯片一起进行对比性免疫组化染色。

1.4 染色方法

免疫组化采用标准的 ABC 染色法。组织芯片

经过梯度脱腊和水化后,用 0.3% 的双氧水阻断内源性过氧化物酶。再将组织芯片浸入 10mM 的柠檬酸缓冲液(pH 6.0)在微波炉中进行抗原修复 10min。10% 的正常兔血清阻断非特异性结合。p53 鼠抗人单克隆抗体(Ab-6, clone DO-1, Onco-gene Research Products, Cambridge, 稀释 1 500); Kt67 鼠抗人单克隆抗体(Ab1, clone k-3, Onco-gene Research Products, Cambridge, 稀释 1 200)室温下分别孵育 1h。然后用 1 100 稀释度的标有生物素的兔抗鼠免疫球蛋白在室温下孵育 30min。最后用亲和素生物素过氧化物复合物在室温下反应 30min, DAB 显色。Meyer's 苏木素复染细胞核。一抗用正常血清代替作为阴性对照,已知的阳性切片作为阳性对照。

1.5 结果评定

由于肿瘤的异质性,免疫组化染色结果在显微镜下进行半定量评定。细胞核呈现棕黄色视为 Kt67 或 p53 染色阳性。根据阳性肿瘤细胞在整个肿瘤中的比例和染色强度,将 Kt67 或 p53 染色分为 2 个组:(1)当所有的肿瘤细胞都为阴性或少于 10% 的肿瘤细胞为阳性时,结果判断为 Kt67 或 p53 低表达。(2)当大于 10% 的肿瘤细胞为阳性时,结果判断为 Kt67 或 p53 高表达。

所有的免疫组化结果均由两位病理医师盲法随机读片。所有切片的免疫组化结果均读片两次以上。

1.6 评价标准

对组织芯片上每个位点的免疫组化染色进行评价,然后对每个标本的三个位点结合起来与其对应的全组织标本的免疫组化结果进行对比评价。评判芯片标本与全组织标本一致性的标准如下:如果肿瘤在芯片上的三个位点全部都用来评价免疫组化结果,有 2 个以上位点与全组织标本结果一致则判断为符合。如果有一个位点丢失,仅有两个位点可供评价免疫组化结果,只有这两个位点都与全组织标本结果一致时才判断为符合;两个位点结果不同时,判断为无法评价;如果仅有一个位点标本可供评价,无论与全组织标本一致与否,皆视为无法评价;其他情况视为不符合。最后,将可评价的病例的组织芯片免疫组化结果与全组织芯片免疫组化结果比较,分析一致性和可靠性。

1.7 统计分析

资料由 SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 软件包处理。组织芯片与全组织切片免疫组化结果的关系采用 kappa 法分析^[5]。Kappa 值 > 0.8 视为关系密切。

2 结果

2.1 组织芯片与全标本切片免疫组化染色结果的比较

由于在组织芯片制作和染色过程中存在一些芯片位点的丢失,所以芯片上部分病例的免疫组化结果无法与全组织标本的免疫组化结果进行比较。我们详细记载了组织芯片上各位点的 p53 和 Ki67 表达情况,并与全组织标本的免疫组化结果进行比较。组织芯片与全组织标本免疫组化的结果比较详见表 1。在可评价的病例里,用组织芯片检测 Ki67 和 p53 与用全组织切片检测相比,分别有 14% 和 12% 的无法评价病例;在可供评价的病例中,分别有 98% 和 93% 的一致率。不可评价病例包括组织芯片上有两个以上标本位点丢失或虽只有一个位点丢失,但可供评价的两个位点的免疫组化结果却不一致的病例。

表 1 三位点非小细胞肺癌组织芯片与全组织标本检测 ki67 和 p53 表达一致性的比较

肿瘤标志	可评价位点	与全组织标本比较	一致性评价	例数	%
Ki67	3 个位点(N=38)	...	符合	28	56*
		..	符合	9	18
		.	不符合	1	2
	2 个位点(N=7)	..	符合	5	10
		.	无法评价	2	4
		.	不符合	0	
1 个位点(N=3)	.	无法评价	3	6	
	.	无法评价	0		
	-	无法评价	2	4	
p53	3 个位点(N=32)	...	符合	22	44**
		..	符合	8	16
		.	不符合	1	2
	2 个位点(N=14)	..	符合	12	24
		.	无法评价	2	4
		.	不符合	0	
1 个位点(N=1)	.	无法评价	1	2	
	.	无法评价	0		
	-	无法评价	3	6	

注: . 组织芯片和全组织标本结果一致; .. 组织芯片和全组织标本结果不一致; * 43 例可供评价,符合率为 98% (42/43); ** 44 例可供评价,符合率为 96% (42/44)

2.2 用免疫组化方法检测肺癌组织芯片中 Ki67 和 p53 表达的可靠性 在 50 个 NSCLC 病例中,有 43 例可在组织芯片上评价 Ki67 的表达情况。在这 43 例病例中,用全组织标本进行免疫组化检测时,发现有 22 例为 Ki67 高表达。而用组织芯片检测时,则发现有 21 例为高表达。仅有 1 例未能用组织芯片

检出 Ki67 高表达。统计学分析发现,用组织芯片检测 Ki67 表达状态与用全组织标本检测相比有较好的一致性和可靠性,Kappa 值为 0.95。

由于 p53 蛋白的半衰期较短,因此用免疫组化方法检测出的细胞核 p53 一般均为功能异常的 p53 蛋白。在 50 个 NSCLC 病例中,有 44 例可在组织芯片上评价 p53 的表达情况。在这 44 例病例中,用全组织标本进行免疫组化检测时,发现有 19 例为 p53 高表达。而用组织芯片检测时,则发现有 17 例为高表达。有 2 例未能用组织芯片检出 p53 高表达。统计学分析发现,通过组织芯片检测 p53 表达状态与用全组织标本检测相比有好的一致性和可靠性,Kappa 值为 0.91,见表 2。

表 2 三位点非小细胞肺癌组织芯片检测 ki67 和 p53 表达的可靠性

组织芯片	全组织标本切片		Kappa 值
	高表达	阴性或低表达	
Ki67			
高表达	21	0	0.95
阴性或低表达	1	21	
p53			
高表达	17	0	0.91
阴性或低表达	2	25	

3 讨论

组织芯片技术的出现为大规模检测石蜡包埋组织标本提供了快速、高效、经济的手段^[1]。一般来说,组织芯片的构建是在待检测的标本蜡块上,选取组织形态上最有代表性的三个肿瘤区域,分别穿刺直径为 0.6mm 的圆柱形标本块,并将其植入接受蜡块,做成由多个标本位点构成的微阵列,然后将接受蜡块切片而成组织芯片。有研究表明,组织芯片上 0.6mm 直径的标本,对评价标本的组织形态学特征、生物标志的 DNA、mRNA 或蛋白表达已经足够^[1,6-8]。但由于肿瘤形态以及生物学特征的异质性,即使同一个肿瘤,在不同的肿瘤细胞间,生物标志的表达水平也不尽一致。所以,在肿瘤生物标志的研究中,有人认为直径为 0.6mm 的组织芯片不能很好代表整个肿瘤的情况,因此主张采用标本直径为 2mm 的组织芯片进行检测。为了探讨用直径为 0.6mm 的组织芯片检测非小细胞肺癌的可靠性和一致性,本研究直接对比了 Ki67 和 p53 在直径为 0.6mm 的组织芯片及其对应的 50 例全组织非小细胞肺癌标本中的表达情况。由于 Ki67 和 p53 在肿瘤的发生发展中起重要作用,是以往的研究中最为常见的肿瘤生物标志^[2,9,10]。所以,本研究就 Ki67

和 p53 在肺癌组织芯片和全组织标本中的表达情况进行了对比。

以往的研究发现,组织芯片上标本位点的丢失是影响检测结果可靠性的重要因素^[3,6,7],由于在组织芯片切片和染色过程中会导致大约 15% ~ 30% 的芯片位点标本的丢失,如果在芯片构建时,每个肿瘤标本只在芯片上构建一个或两个标本位点时,就会导致有许多病例的标本丢失,从而无法评价结果,大大减低了组织芯片检测的有效性和可靠性。所以,在组织芯片构建时,通常在每个肿瘤标本上取 3 个以上在形态学上最具代表性的区域进行穿刺。我们的研究发现,同一肿瘤有三个标本位点的组织芯片与一个或两个标本位点的组织芯片相比,可有效提高检测效率,提高检测的可靠性和准确性。用三位点组织芯片检测 Ki67 和 p53 与全组织标本相比,不一致性仅分别为 2% 和 4%。理论上讲,随着每个肿瘤在芯片上标本位点的增加,组织芯片检测的准确性和可靠性会进一步提高。但从经济实用的观点来看,三个标本位点的组织芯片所达到的准确性和可靠性,已经足够用于常规的免疫组化检查。

与其他研究的结果相似^[3,6-8],我们的研究发现,用三位点组织芯片检测 Ki67 和 p53 的表达时,由于标本位点在切片和染色过程中的丢失或由于丢失一个位点后、另两个位点的免疫组化结果不一致而造成的结果无法评估分别为 10% (5/50) 和 12% (6/50)。与全组织标本相比,用三位点组织芯片检测 Ki67 和 p53 的一致率分别为 98% 和 96%。我们注意到,在所有三个位点全部可以评价,并且判断结果与全组织标本一致的病例中,包含了在三个位点中有两个位点是与全组织标本一致,而另一个则是相反的病例(Ki67 和 p53 分别为 9 例和 8 例),这也从另一个角度说明,三位点芯片可提高两位点芯片的检测效率,对在两位点芯片中难以得出结论的病例可做出准确的判断。

本研究还发现,在组织芯片和全标本结果不一致的病例中,很少有在全标本切片中高表达的病例会在组织芯片中表现为低表达或正常表达。在全组织标本中,分别有 51% (22/43) 和 43% (19/44) 的病

例为 Ki67 和 p53 高表达,而在三位点组织芯片中则分别为 49% (21/43) 和 39% (17/44)。这说明三位点组织芯片可较准确、可靠地反映全组织切片中肿瘤标志物的免疫组化结果(Kappa 值大于 0.7)。但需要强调的是,在构建组织芯片时,一定要仔细研究肿瘤全组织标本的苏伊红染色切片,挑选在形态学上最具代表性的区域进行穿刺,才能保证组织芯片检测的准确性和可靠性。

总之,本研究发现直径为 0.6mm 的三位点非小细胞肺癌组织芯片可准确、有效地检测肿瘤生物标志的表达状态,是肺癌大样本分子生物学及预测预后研究可利用的可靠手段。

参考文献:

- [1] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. *Nat Med*, 1998, 4 (7): 844-847.
- [2] Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia [J]. *Am J Pathol* 1997, 147 (2): 545-560.
- [3] Mucci NR, Akdas G, Manely S, et al. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high-throughput tissue microarray to detect heterogeneous protein expression [J]. *Hum Pathol*, 2000, 31 (4): 406-414.
- [4] Drobnjak M, Latres E, Pollack D, et al. Prognostic implications of p53 nuclear overexpression and high proliferation index of Ki-67 in adult soft tissue sarcomas [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86 (7): 549-554.
- [5] Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research* [M]. 1st edition. London: Chapman and Hall, 1996. 404-408.
- [6] Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, et al. Tissue microarray analysis for gene amplification surveys in many different tumor types [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5 (8): 1966-1975.
- [7] Richter J, Wagner U, Kononen J, et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157 (3): 787-794.
- [8] Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, et al. Survival of gene amplification during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays [J]. *Cancer Res*, 1999, 59 (4): 803-806.
- [9] Cordon-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein in regulated normal human tissues [J]. *Am J Pathol*, 1994, 144 (3): 500-510.
- [10] Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene [J]. *Nature*, 1991, 351 (6326): 453-456.

[编辑:张麟;校对:刘红武]