

## 组织芯片检测甲状腺转录因子-1蛋白在肺癌细胞核中表达的定量研究

白晓燕, 申洪(南方医科大学病理学教研室, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 揭示甲状腺转录因子-1(TTF-1)蛋白在正常成人肺泡II型上皮细胞、人胚胎肺泡上皮细胞、肺癌原发灶及淋巴结转移灶中的表达特点及规律。方法 用组织微阵列技术构建包含20例正常成人肺组织、15例胚胎肺组织、100例肺癌原发灶及其相应的55例淋巴结转移灶的765点阵的石蜡组织芯片。用免疫组化SP法检测该芯片中TTF-1蛋白的表达。用Leica Q500MC图像分析系统定量测试组织芯片上TTF-1蛋白的表达强度。结果 胚胎肺泡上皮细胞核TTF-1阳性单位(PU)值小于正常成人肺泡II型上皮细胞核TTF-1的PU值( $P<0.001$ );不同类型肺癌细胞核TTF-1的PU值均小于胚胎肺泡上皮细胞和正常成人肺泡II型上皮细胞核TTF-1的PU值( $P<0.001$ );肺腺癌和肺小细胞癌细胞核TTF-1的PU值均大于肺鳞癌和肺大细胞癌细胞核TTF-1的PU值( $P<0.001$ );肺鳞癌细胞核TTF-1的PU值大于肺大细胞癌细胞核TTF-1的PU值( $P<0.001$ )。肺的腺癌、鳞癌和大细胞癌淋巴结转移灶中癌细胞核TTF-1的PU值均大于其原发灶癌细胞核TTF-1的PU值( $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ,  $P<0.05$ );肺小细胞癌淋巴结转移灶癌细胞核TTF-1的PU值与其原发灶癌细胞核TTF-1的PU值基本相同( $P>0.05$ )。有淋巴结转移的肺癌原发灶癌细胞核TTF-1的PU值大于无淋巴结转移的肺癌原发灶癌细胞核TTF-1的PU值( $P<0.001$ );癌细胞核TTF-1的PU值与肺癌大体类型、分化程度和患者性别无关( $P>0.05$ );TNM II-IV期癌细胞核TTF-1的PU值大于I期( $P<0.001$ )。结论 TTF-1的表达量在正常成人肺泡II型上皮细胞、胚胎肺泡上皮细胞和肺癌细胞核中的表达具有差异性并依次减少;肺癌细胞核TTF-1的表达具有癌组织类型差异性,腺癌和小细胞癌相对较高,鳞癌和大细胞癌极少;TTF-1胞核高表达的肺癌易发生转移, TTF-1胞核高表达的肺的腺癌、鳞癌和大细胞癌细胞为具有明显转移能力的肺癌细胞的重要标志之一。

**关键词:**肺癌;组织芯片;甲状腺转录因子-1;免疫组化

中图分类号:R730.23 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)10-1423-04

## Quantitative study of thyroid transcription factor-1 protein expression in lung carcinoma cell nucleus by tissue microarray

BAI Xiao-yan, SHEN Hong

Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To investigate thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression in normal human adult type II alveolar epithelial cells, embryonic pneumocytes, lung carcinoma cells and lymph node metastases of lung cancer. **Methods** Lung carcinoma tissue microarray was constructed containing 765 cores of 20 normal adult lung tissues, 15 embryonic lung tissues, 100 lung carcinomas and 55 corresponding lymph node metastases. TTF-1 protein expression on the microarray was detected by immunohistochemical SP method using TTF-1 monoclonal antibody and assessed quantitatively with Leica Q500MC image analysis system. **Results** The number TTF-1 positive units (PU) was smaller in the nuclei of embryonic pneumocytes than in those of normal adult type II alveolar epithelial cells ( $P<0.001$ ). The nuclei of lung carcinoma cells had smaller TTF-1 PU than normal adult type II alveolar epithelial cells and embryonic pneumocyte nuclei ( $P<0.001$ ). The lung adenocarcinoma and small cell lung carcinoma cell nuclei had greater TTF-1 PU than squamous cell carcinoma and large cell lung carcinoma cell nuclei ( $P<0.001$ ). TTF-1 PU was greater in squamous cell carcinoma cell nuclei than in large cell lung carcinoma cell nuclei ( $P<0.001$ ). In lung adenocarcinoma, squamous cell lung carcinoma and large cell lung carcinoma, TTF-1 PU was greater in the cancerous cell nuclei of lymph node metastases than in the corresponding primary carcinoma cell nuclei ( $P<0.001$ ,  $P<0.001$ , and  $P<0.05$ , respectively). In small cell lung carcinoma, TTF-1 PU of the cancerous cell nuclei of lymph node metastases was similar to that of primary carcinomas ( $P>0.05$ ). TTF-1 PU was greater in lung carcinoma with lymph node metastases than in those without metastasis ( $P<0.001$ ). TTF-1 PU of the cell nuclei was not associated with the tumor growth pattern, differentiation and patients' gender ( $P>0.05$ ), but was greater in TNM stage II-IV than in stage I ( $P<0.001$ ).

**Conclusions** The amount of TTF-1 in the cell nuclei decreases in the order of normal adult type II alveolar epithelial cells, embryonic pneumocytes and lung carcinoma cells. TTF-1 expression is higher in adenocarcinoma and small cell carcinoma and lower in squamous carcinoma and large cell carcinoma. Stronger TTF-1 expression is associated with greater likelihood of lung carcinoma metastatic, and can be an important hallmark for metastasis potential of lung

收稿日期:2005-10-15

基金项目:国家自然科学基金(30271462),广东省科技攻关计划(2KM04501S),广州市科技攻关重点项目(2003Z2-E0061, E0062)

Supported by National Natural Science Foundation of China(30271462), Key Science Research Projects of Guangzhou province (ZKM04501, 2003Z2-E0061, E0062)

作者简介:白晓燕(1976-),女,博士

通讯作者:申洪,电话:020-61648227, E-mail:hongshen@fimmu.com

adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma.

**Key words:** lung carcinoma; tissue microarray; thyroid transcription factor-1; immunohistochemistry

TTF-1 是核转录蛋白 NKx2 基因家族成员之一,由常染色体 14q13 的单一位点基因所编码产生并能参与调控许多基因的表达。在胚胎的肺、甲状腺和前脑的上皮中表达,在胎盘形成过程中具有提高转录活性的作用<sup>[1,2]</sup>,可看作是这些器官发生的启动子。由于 TTF-1 存在于胚胎肺组织上皮细胞内,胚胎肺组织是一种幼稚的肺组织,肺癌组织也是一种幼稚的组织,因此我们推测在肺癌组织中可能具有 TTF-1 蛋白的异常表达。

传统检测肿瘤组织相关基因蛋白原位表达的方法是用大组织切片进行免疫组织化学染色,每张切片只能检测 1 例,不同样本间因实验条件可能有少许不一,有可能产生组间及批间误差。采用组织芯片技术<sup>[3]</sup>可在一个蜡块上排列数百例组织芯,通过一张切片可同时检测数百例组织的基因蛋白表达可避免不同样本间因实验条件的差异所造成的误差。在组织芯片基础上定量检测分析不同类型肺组织中 TTF-1 蛋白表达的状况并进行定量测试的研究尚未见文献报道。本文应用组织芯片技术及免疫组化定量测试技术检测及分析 TTF-1 蛋白在正常成人肺组织、胚胎肺组织和不同类型肺癌及其淋巴结转移癌组织中的表达特点,探索其变化规律及其与肺癌转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料与分组

组织来自南方医院病理科 2003-2004 年间尸检及病理活检标本。患者术前未接受放疗或化疗。分组及样本含量如表 1:

所有标本经 10%福尔马林液固定,石蜡包埋(作为供体蜡块),3 μm 厚连续切片,第一张行 HE 染色作为基本观察切片,其余备用。

1.2 方法

1.2.1 肺癌组织芯片的制作 采用组织微阵列制作仪,将肌肉组织(阴性对照,随机选取 5 个组织芯),正常成人肺组织(自身内对照,阳性对照),胚胎肺组织,肺腺癌原发灶及其相应淋巴结转移癌,肺鳞癌原发灶及其相应淋巴结转移癌,肺小细胞癌原发灶及其相应淋巴结转移癌,肺大细胞癌原发灶及其相应淋巴结转移癌按上述顺序依次排列在一个空白蜡块内。其中,不同类型肺癌原发灶均按从有淋巴结转移组到无淋巴结转移组的顺序排列。从每例标本中随机各取 4 个组织芯(对于正常肺组织,避开出血区域随机取点;对于肿瘤组织,避开坏死区域在肿瘤实质部位随机取样),

表 1 标本分组及样本含量

Tab.1 Groups and contents of the specimens

Group	n
Normal adult lung tissues	20
Embryonic lung tissues	15
Lung carcinomas*	
Adenocarcinoma	35
Well differentiated	21
Moderately to poorly differentiated	14
Squamous cell carcinoma	40
Well differentiated	23
Moderately to poorly differentiated	17
Small cell carcinoma	14
Large cell carcinoma	11
With lymph node metastases	55
Adenocarcinoma	20
Squamous cell carcinoma	24
Small cell carcinoma	6
Large cell carcinoma	5
Without lymph node metastases	45
General types	
Peripheral	59
Central	41
TNM Stage	
Stage I	62
Stage II-IV	38

According to the classification<sup>[4]</sup> of WHO/IASLC in 1999

制作成 1 个含 765 个组织芯的蜡块。

1.2.2 免疫组化检测 TTF-1 蛋白表达 采用 S-P 法进行免疫组化染色。鼠抗人 TTF-1 单克隆抗体(克隆号 8G7G3/1,工作液)、SP 试剂盒和 DAB 试剂盒为美国 Neomarkers 公司产品。DAB 显色 5 min 后不复染以保证显色反应的单一性。染色结果可疑者重复实验。每次免疫组化染色均设空白、阳性和阴性对照。PBS 取代一抗做空白对照,肌肉组织做阴性对照,正常肺组织做自身阳性内对照。

1.2.3 免疫组化结果判定及 TTF-1 定量测试 根据空白、阳性和阴性对照的显色情况,在确定无假阳性和假阴性的前提下,以细胞核染成棕黄或棕褐色为阳性。用 Leica Q500MC 图像分析系统,在 40 倍物镜下,从每个样本随机选取的 4 个有代表性的组织芯内随机选取 20 个视野作为此样本的测量区域进行测试。正常成人肺的每个视野随机测试 10 个阳性肺泡 II 型上皮细胞;胚胎肺的每个视野随机测试 10 个阳性肺泡上皮细胞;肺癌组织及淋巴结转移癌组织的每个视野随机测试 10 个阳性癌细胞。每例样本共测试 200 个阳性细胞,用交互式测量法测量每个阳性细胞核的灰度值 Gα,同时在相应的 20 个视野中测试背景灰度 Gβ 并取其平均值,按照文献中建立的免疫组织化学染色强度的定量测试方法检测每个阳性细胞核的阳性单位(PU)值,取每个样本中 200 个阳性细胞 PU 值的均值作为该样本阳性细胞的 PU 值<sup>[5-7]</sup>。

1.3 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计分析软件进行处理。各组实

验数据以平均值±标准差表示。组间比较采用 *t* 检验和方差分析,组间多重比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 TTF-1 蛋白在正常成人肺泡 II 型上皮细胞、胚胎肺泡上皮细胞和不同类型肺癌细胞核中的表达

TTF-1 在正常成人肺泡 II 型上皮细胞、胚胎肺泡上皮细胞和不同类型肺癌细胞核中的表达呈阳性,但程度不同 (图 1, ①-⑥)。胚胎肺泡上皮细胞核 TTF-1 的 PU 值小于正常成人肺泡 II 型上皮细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P<0.001$ );肺腺癌、鳞癌、小细胞癌和大细胞癌细胞核 TTF-1 的 PU 值均小于胚胎肺泡上皮细胞和正常成人肺泡 II 型上皮细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P<0.001$ );肺腺癌和肺小细胞癌细胞核 TTF-1 的 PU 值均大于肺鳞癌和肺大细胞癌细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P<0.001$ );肺小细胞癌细胞核 TTF-1 的 PU 值与肺腺癌细胞核 TTF-1 的 PU 值基本相同 ( $P>0.05$ );肺鳞癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于肺大细胞癌细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P<0.001$ ,表 2)。

2.2 TTF-1 蛋白在肺癌原发灶与淋巴结转移灶癌细胞核中的表达

TTF-1 在肺的腺癌、鳞癌、小细胞癌和大细胞癌淋巴结转移灶癌细胞核中的表达呈阳性 (图 1, ⑦-⑩),但表达程度有所不同。肺腺癌淋巴结转移灶中癌

表 2 正常成人肺泡 II 型上皮细胞、胚胎肺泡上皮细胞和肺癌细胞核 TTF-1 表达的 PU 值

Tab.2 TTF-1 positive unitvalue of normal adult type II alveolar epithelial cells, embryonic pneumocytes and lung cancerous cells (Mean±SD)

Group	n	TTF-1 PU
Normal adult type II alveolar epithelial cells (a)	20	35.11±2.83 <sup>b,c1,c2,c3,c4</sup>
Embryonic pneumocytes (b)	15	21.62±1.87 <sup>a,c1,c2,c3,c4</sup>
Lung cancer cells		
Adenocarcinoma (c1)	35	13.62±1.62 <sup>a,b,c2,c4</sup>
Squamous cell carcinoma (c2)	40	4.22±1.11 <sup>a,b,c1,c3,c4</sup>
Small cell carcinoma (c3)	14	14.07±1.96 <sup>a,b,c2,c4</sup>
Large cell carcinoma (c4)	11	3.11±0.81 <sup>a,b,c1,c2,c3</sup>

a, b, c1, c2, c3, and c4:  $P<0.001$  vs group a, b, c1, c2, c3, and c4, respectively

细胞核 TTF-1 的 PU 值明显大于其原发灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P=0.000$ );肺鳞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值也明显大于其原发灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P=0.000$ );肺小细胞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值与其原发灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值基本相同 ( $P=0.752$ );肺大细胞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值明显大于其原发灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P=0.010$ );总体比较,肺癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于肺癌原发灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值 ( $P=0.000$ )。

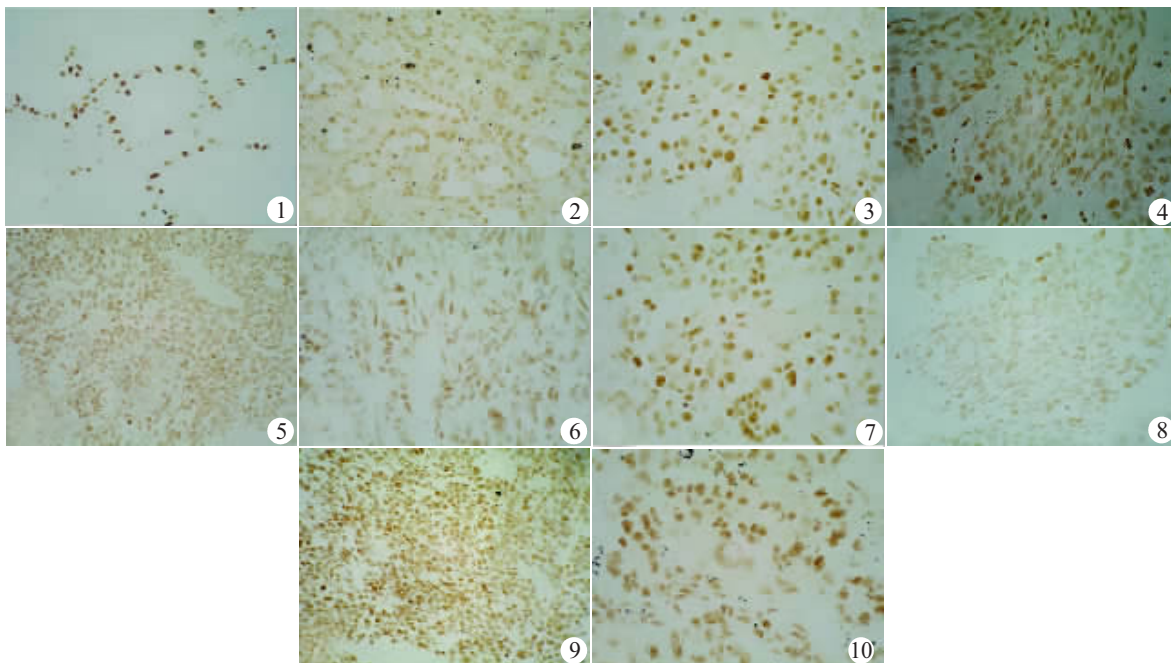


图 1 TTF-1 在不同肺组织免疫组化结果

Fig. 1 Immunohistochemistry for TTF-1 expression in different lung tissues

(SP staining without counterstaining by hematoxylin, original magnification: ×40)

- ①: Normal adult lung tissue; ②Embryonic lung tissues; ③Adenocarcinoma of the lung; ④ Squamous cell carcinoma of the lung; ⑤ Small cell lung carcinoma; ⑥Large cell lung carcinoma; ⑦ Lymph node metastases of adenocarcinoma of the lung; ⑧ Lymph node metastases of squamous cell carcinoma of the lung; ⑨ Lymph node metastases of small cell lung carcinoma; ⑩ Lymph node metastases of large cell lung carcinoma



### 2.3 肺癌患者性别及临床病理特征与组织芯片上 TTF-1 表达的关系

组织芯片中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值与患者性别、肿瘤大体类型和肺癌的分化程度无关 ( $P>0.05$ ); 按有无淋巴结转移分为两组, 两组间 TNM 分期差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.962, P=0.327$ ); 有淋巴结转移组肺癌原发灶癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于无淋巴结转移组 ( $P=0.000$ ); TNM 分期 II - IV 期癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于 I 期 ( $P=0.000$ )。

### 3 讨论

以往对肺癌中 TTF-1 表达的研究为定性观察, 探讨了 TTF-1 在不同类型肺癌中的表达情况, 但其表达的量化特点及基于量化改变的变化规律尚未见报道<sup>[5]</sup>。其在肺癌淋巴结转移灶中的表达状况均未见报道。

我们应用组织微阵列技术, 在同一张组织芯片上同时检测 100 例肺癌组织中 TTF-1 蛋白的表达, 结果表明: 不同类型肺癌组织癌细胞核 TTF-1 的 PU 值均小于正常成人肺泡 II 型上皮细胞, 也小于胚胎肺泡上皮细胞, 且差异均具有显著性。因此, 正常成人肺泡 II 型上皮细胞、胚胎肺泡上皮细胞和肺癌细胞核 TTF-1 的表达具有差异性, 依次减少; 肺癌细胞核 TTF-1 的表达量明显减少。

我们还注意到, 肺腺癌和肺小细胞癌癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于肺鳞癌和肺大细胞癌; 肺鳞癌癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于肺大细胞癌。因此肺癌细胞核 TTF-1 的表达具有癌组织类型差异性, 不同类型的肺癌细胞核 TTF-1 的表达量有别, 肺腺癌和肺小细胞癌癌细胞核 TTF-1 的表达高而肺鳞癌和肺大细胞癌癌细胞核 TTF-1 表达低。

进一步对不同临床病理特征肺癌患者的癌细胞核 TTF-1 表达强度进行比较发现, 肺腺癌高分化组 TTF-1 的 PU 值与其中 - 低分化组相近; 肺鳞癌高分化组 TTF-1 的 PU 值与其中 - 低分化组基本相同。对肺的腺癌、鳞癌、小细胞癌和大细胞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值进行比较, 发现不同类型肺癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 蛋白的表达强度有别, 其变化规律与其相应的肺癌原发灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值的变化规律类同, 即: 肺腺癌和肺小细胞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于肺鳞癌和肺大细胞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值; 肺鳞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值大于肺大细胞癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的 PU 值。因此, 不同类型肺癌淋巴结转移灶中癌细胞核 TTF-1 的表达有一定的差异性。

对于免疫组织化学染色的显色反应强度, 目前仍

多采用半定量评判方法, 评判者之间的判断标准带有一定主观倾向, 这是分析过程中误差的主要来源之一; 也使得数据的统计方法受到限制。我们采用免疫组化显色反应强度的 PU 定量方法来解决免疫组化分析标准的客观化与分析结果的量化和可比性问题。PU 值的意义在于一方面排除了切片或涂片本底因素的影响, 另一方面它不受不同计算机图像分析系统中灰度的设定方法及不同的灰度分级因素的影响<sup>[6]</sup>。PU 值分为 100 个等级, 其大小与阳性反应程度成正比关系。

我们在对免疫组化做定量测试时, 切片不进行苏木素复染。这样测得的 PU 值来自单一免疫组化显色反应产物, 保证了测试结果的准确性。如果切片进行了苏木素复染, 则测试结果就会受另一种染色因素的影响, 所得的 PU 值就不是纯免疫组化显色反应的结果, 不能反映所测样本中蛋白表达的真正状况。

检测肿瘤组织中相关基因及蛋白表达常规的方法是在一个蜡块内包埋一例组织标本, 每次只能切出含有一份组织样品的切片, 不仅工作量大, 费时费力, 使用试剂量多, 而且不同组间、不同批次间因操作误差可能会对实验结果造成影响, 不利于对大样本量指标进行快速高效的检测。组织芯片技术将成百上千的小组织集中在一个蜡块上, 通过一张切片即可同时检测数百例组织的基因及蛋白表达<sup>[7,8]</sup>, 不仅提高了检测效率, 还可排除一系列相关因素导致的组内和批间差异, 进一步提高了检测结果的可比性。

### 参考文献:

- [1] Stenhouse G, Fyfe N, King G, et al. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma[J]. J Clin Pathol, 2004, 57: 383-7.
- [2] Lau SK, Luthringer DJ, Eisen RN. Thyroid transcription factor-1: a review[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002, 10(2): 97-102.
- [3] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. Nat Med, 1998, 4: 844-47.
- [4] Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al. In collaboration with pathologists from 14 countries. Histological typing of lung and pleural tumors [M], 3rd ed. Berlin: Springer Verlag, 1999.
- [5] Barlesi F, Pinot D, Legoffic A, et al. Positive thyroid transcription factor 1 staining strongly correlates with survival of patients with adenocarcinoma of the lung[J]. Br J Cancer, 2005; 93(4): 450-2.
- [6] Shen H. Study on quantitative method of intensity of immunohistochemical staining (II)[J]. J Cell Mol Immunol, 1994, 4: 33-5.
- [7] Au NH, Cheang M, Huntsma DG, et al. Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: a tissue microarray study of 284 cases and 18 markers[J]. J Pathol, 2004, 204(1): 101-9.
- [8] Frierson HF, Moskaluk CA Jr, Powell SM, et al. Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas[J]. Hum Pathol, 2003, 34: 605-9.