

nm23 和 S- 100 蛋白在 B16 黑色素瘤模型鼠的表达和意义<sup>\*</sup>

王 忠 成

(哈尔滨医科大学大庆校区解剖学教研室 黑龙江 大庆 163319)

**摘要** 目的: 检测荷瘤鼠体内 nm23(肿瘤转移抑制因子)与 S- 100 蛋白的表达, 探讨其表达与肿瘤发生、转移的关系。方法: 将 B16 恶性黑色素瘤细胞人工植入 C57 小鼠背部皮下, 制荷瘤鼠模型, 取对照组和病变皮肤作免疫组化染色。结果: 早期肿瘤 nm23 和 S- 100 蛋白阳性表达的数密度和面密度明显增高, 与对照组、晚期组比较差异显著( $P < 0.05$ )。结论: 在 B16 黑色素瘤荷瘤鼠 nm23 和 S- 100 蛋白的表达与肿瘤的发生、转移呈负相关。

**关键词:** nm23; S- 100 蛋白; 黑色素瘤

**中图分类号:** R739.5 **文献标识码:** A

## The Expression and Significance of S- 100 Proteins and Nm 23 in Rats B16

WANG Zhong - cheng

(Department of Anatomy, Daqing Branch, Harbin Medical University, Daqing 163319, Heilongjiang, China)

**ABSTRACT Objective:** To determine the expression and significance of Nm23 and S- 100 Proteins and explore the relationship between them and tumor's forming and metastases. **Methods:** The cultured melanoma cells were transplanted into the hypoderm of the back of Rats C57 to make rat models. The pathological skins were taken out and were dyed by using method- immunity group. **Results:** The number density and area density of positive expression of Nm23 and S- 100 Proteins increased obviously. Compared to control group and late tumor group, the difference was more significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of Nm 23 and S- 100 Proteins in Rats B16 has negative relevance to the tumors' forming and metastases.

**Key words:** Nm23; S- 100 Proteins; Melanoma tumor

恶性黑色素瘤为临床上常见的恶性程度相当高的肿瘤。常原发于皮肤、粘膜, 可广泛浸润皮肤表皮至皮下组织或粘膜, 甚至邻近器官或组织, 并可通过淋巴或血行转移至远处。目前的研究表明 nm23 及 S- 100 蛋白的表达与肿瘤的浸润转移密切相关。但在 B16 黑色素瘤荷瘤鼠的表达研究还较少。本文通过免疫组化染色方法检测 nm23 及 S- 100 蛋白在 B16 黑色素瘤荷瘤鼠的表达情况, 探讨其表达与肿瘤浸润转移的相关性及意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

C57 纯系小鼠均为雌性, 40 只, 体重 18- 22g, 周龄 6- 8 周, 无菌环境中饲养。购自北京医科院动物研究所。B16 黑色素瘤细胞株购自哈尔滨医科大学肿瘤研究所。兔抗人 nm23 与兔抗小鼠 S- 100 蛋白、SABC 免疫组化染色试剂盒购自博士德生物有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 瘤液的制备:** B16 细胞用 RPMI1640 (Gibco 公司) (含 10% 胎牛血清及双抗) 培养, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的恒温环境中培养。约 2- 4 天传代。选取对数生长期的 B16 肿瘤细胞, 用 0.25% 的胰酶消化贴壁细胞约 2min, 并使细胞悬液调整到  $1 \times 10^6$  个/ml。

**1.2.2 肿瘤模型的制备:** 取 0.5ml 制备好的瘤液于无菌条件下接种在小鼠左侧背部皮下。接种数量 30 只。成瘤率为

100%。分别于第 14 天、25 天各脱颈处死 15 只。取肿瘤模型组织皮肤。标本经 4% 的多聚甲醛溶液固定。正常小鼠 10 只, 作为对照组。

**1.2.3 免疫组化(SABC 法) 染色:** 标本经冲洗、石蜡包埋、切片, 厚约 4μm。免疫组化染色按试剂盒说明操作。

### 1.3 统计学方法

对 nm23 与 S- 100 蛋白染色切片进行观察, 分别随机各抽取 20 张切片, 每张切片随机取 2 个高倍视野( $1 \times 132$ ), 输入图像分析软件处理系统(北航图像中心), 在显示器的图片中分别统计其数量分布(数密度)和所占的面积(面密度), 分别计算数密度和面密度平均值和标准差, 经 t 检验统计学处理。

## 2 结果:

### 2.1 外观及镜下观察

外观见肿瘤质地较软, 黑色, 表面光滑。镜下见瘤组织结构复杂, 呈巢状或弥散分布, 可见较多大小不等的黑色素颗粒。细胞体积较大, 核呈空泡状, 核仁明显, 胞浆丰富, 可见核分裂像。

### 2.2 nm23 基因的免疫组织化学染色

阳性染色细胞为棕黄色。主要表达于细胞浆和细胞核。对照组皮肤阳性表达较少(图 1)。肿瘤早期组 nm23 基因表达较多, 主要在癌周区(图 2), 晚期组阳性表达较少(图 3)。早期组 nm23 基因表达的面密度和数密度明显增高。分别与对照组和晚期组比较有显著差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )见表 1。

\* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(编号: D0234)

作者简介: 王忠成, (1960- ), 男, 讲师, 硕士, 研究方向肿瘤与免疫

(收稿日期: 2006- 04- 15 接受日期: 2006- 05- 23)

表1 nm23在对照组和肿瘤模型组织病变中表达的比较

Table 1 The comparison of the expression of nm23 in the pathological tissue of tumor models and in control group

	面密度 (Area density)	数密度 (Number density)
对照组 (control group)	0.53±0.22	0.13±0.04
早期组 (early group)	2.71±0.20*	0.48±0.08*
晚期组 (late group)	1.06±0.03	0.24±0.08

(面密度): \* 早期组与对照组比较 P< 0.05, \*\* 早期组与晚期组比较 P< 0.05

(Area density): \* The comparison of early group and control group, p< 0.05;

\*\* The comparison of early group and late group P< 0.05

(数密度): \* 早期组与对照组比较 P< 0.05, \*\* 早期组与晚期组比较 P< 0.05

(Number density): The comparison of early group and control group, p< 0.05;

\*\* The comparison of early group and late group P< 0.05.

2.3 S- 100 蛋白的免疫组织化学染色

细胞阳性染色为细胞浆内出现棕黄色染色。主要表达于细胞浆和细胞核。对照组皮肤阳性表达较少(图4)。肿瘤早期组 S- 100 蛋白表达阳性表达较多,主要表达于肿瘤交界处(图5),晚期组阳性表达较少(图6)。肿瘤早期组 S- 100 蛋白表达的面密度和数密度明显增多,分别与对照组和肿瘤晚期组比较有显著差异(P< 0.05, P< 0.05),见表2。

表2 S- 100 蛋白在对照组和肿瘤皮肤病变组中表达的比较

Table 2 The comparisons of the expression of S- 100 Proteins in the pathological tissue of tumor models and in control group

	面密度 (Area density)	数密度 (Number density)
对照组 (control group)	0.74±0.21	0.31±0.11
早期组 (early group)	3.30±0.68*	1.12±0.36*
晚期组 (relapse group)	0.90±0.24	0.51±0.11

(面密度): \* 早期组与对照组比较 P< 0.05, \*\* 早期组与晚期组比较 P< 0.05

(Area density): \* The comparison of early group and control group, p< 0.05; \*\* the comparison of early group and late group, p< 0.05

(数密度): \* 早期组与对照组比较 P< 0.05, \*\* 早期组与晚期组比较 P< 0.05

(Number density): \* The comparison of early group and control group, p< 0.05; \*\* the comparison of early group and late group p< 0.05.

3 讨论

3.1 nm23 在肿瘤模型鼠中的分布与表达

近年来, nm23 基因已证明是一种肿瘤转移抑制基因。1998 年 Steeg 等研究发现具高转移潜能的黑色素瘤细胞系 nm23 表达比低转移潜能的细胞系低 10 倍,因此推测 nm23 为

肿瘤转移抑制基因<sup>[1]</sup>。目前,对于 nm23 基因的研究日益增多。Hennessy 等研究了 71 例乳腺癌标本,他们发现, nm23 基因在分化良好的肿瘤高水平的表达, nm23 基因的表达与肿瘤淋巴结的转移呈负相关<sup>[2]</sup>。Florenes 等<sup>[3]</sup>对 33 例有转移的恶性黑色素瘤进行研究,发现在最初 2 年内转移的黑色素瘤 nm23 表达水平显著降低。nm23 在食管癌、胃癌、肝癌的表达已有很多报道,多数认为 nm23 的表达与癌组织的分化程度、组织学类型及淋巴转移呈负相关。由此可见, nm23 基因产物在抑制肿瘤转移中起重要的作用。

在本实验中观察到,在对照组和肿瘤晚期组皮肤中 nm23 表达较少;而在肿瘤早期组 nm23 表达较高。其表达的数密度和面密度与对照组和肿瘤晚期组相比较差异显著(P< 0.05, P< 0.05)。在早期组机体抵抗力较强, nm23 表达较高;在晚期组下降, nm23 表达较低。在本研究中,晚期组 nm23 基因的表达较早期的病变组织表达明显下降。越是晚期肿瘤 nm23 基因的表达越低。这与大多数学者的研究结果是一致的。本结果提示,在肿瘤组织中 nm23 基因的表达与肿瘤的转移呈负相关。具有抗肿瘤浸润和转移作用。是判断转移、预后的重要指标。

3.2 S- 100 蛋白在肿瘤模型鼠中的分布与表达

在肿瘤等抗原刺激下,树突状细胞(dendritic cell, DC)通过时相表达的粘附分子介导,其迁移速度加快并持续进入局部组织处理病原体;同时迅速迁移并大量聚集在淋巴结抗原递呈区,强烈而持久刺激 T 细胞而使其活化<sup>[4]</sup>。而机体在无外来抗原的状态下,树突状细胞少而缓慢地进入淋巴组织,虽亦可提呈抗原信息然而对 T 细胞的作用却是形成耐受而非活化。Mcwilliam 等<sup>[5]</sup>认为,支气管在吸入特异性抗原后,局部一系列趋化因子表达增高,促使外周血的树突状细胞前体细胞迅速动员聚集在抗原沉积区的粘膜上皮,这种早期局部组织的树突状细胞内迁移运动甚至快于早期中性粒细胞的浸润速度。本实验观察到肿瘤早期皮肤 S- 100 蛋白阳性树突状细胞分布的面密度和数密度与对照组相比差异显著(P< 0.05)。这提示在肿瘤抗原刺激下,树突状细胞迁移至肿瘤部位发挥抗肿瘤作用。树突状细胞是公认的功能最强的抗原提呈细胞。研究表明树突状细胞主要对淋巴细胞起抗原提呈,刺激初始型 T 细胞增殖使其功能活化,从而杀伤肿瘤细胞。研究胃癌、结肠癌、食管癌等发现, DC 的数量与肿瘤转移、肿瘤存活期、肿瘤大小等呈负相关。即肿瘤中 DC 浸润越多,预后越好<sup>[6]</sup>。

本实验观察到肿瘤早期与晚期相比差异显著(P< 0.05),肿瘤早期组与对照组相比差异显著(P< 0.05)。从而证明,皮肤黑色素瘤中的 DC 的浸润与肿瘤的进展有关。DC 强大的抗原提呈功能,能诱导出高效而特异的抗肿瘤免疫,通过 DC 提呈抗原给 CTL(细胞毒 T 细胞)并使之活化,从而诱导 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用。DC 参与机体局部抗肿瘤反应,并在发生、发展过程中有相应的变化,说明 DC 与抗肿瘤免疫密切相关。DC 不仅是抗原提呈细胞,而且具有重要的免疫调节作用。有研究表明,经抗原致敏的 DC 在体内能诱导特异性 CTL,直接抑制或杀伤肿瘤细胞。

(图1- 图6请见封3)  
(下转第34页)

值位于 0.5~1.0 之间。当 ROC 曲线下面积为 0.9 以上是表示诊断准确性较高<sup>[3]</sup>。应用这个客观指标可以对几种影像系统对某种疾病的诊断作出相对性评价。

本研究中 MRCP、US 及 CT 的曲线下面积 (AZ) 分别为 0.985, 0.974, 0.901, 均大于 0.9, 表明 MRCP、US 及 CT 均是诊断胰胆管疾患的有效方法。MRCP 曲线最靠近左上角, AZ MRCP > AZ US > AZ CT, 虽经检验无显著性差别, 仍表明 MRCP 诊断胰胆管疾患的效能优于 US 和 CT。本组在分析各影像诊断方法在不同部位、不同性质病变中的诊断效能过程中仅采用了敏感度、特异度、似然比等指标, 原因是与诊断阳性病例相对应的阴性病例较少有病理等金标准证实, 虽然较 ROC 分析不够全面, 但与以往检出率分析比较, 具有更客观的统计效能。

对于恶性胆道梗阻, MRCP 能直观显示胆管结构、扩张范围及断端形态, 而 US 显示胆管肿瘤由于边界不清或受气体干扰, 其范围不好精确确定。本研究 MRCP 诊断胰胆管恶性占位敏感度最高, 达 100%, 特异性和准确性为 99%, 优于 US 及 CT。但值得注意的是, MRCP 诊断恶性梗阻过程中, 肝癌肝门处转移与肝门部胆管癌易混淆, 总胆管下段、壶腹部和胰头部恶性占位的具体定位易出差错, 必须着重强调 MRCP 结合 MRI 图像综合观察和分析的重要性。

US 由于肠道气体干扰, 它对胆总管下段和胆肠吻合口附近病变检查受限。本组 US 诊断胆总管结石敏感度最低, 仅为 39%, 而对胆管炎的诊断更差, 敏感度仅为 9%, 说明了胆总管下段是超声诊断的盲点。而 CT 缺少多平面成像, 不能提供胆肠吻合口附近、胆道系统的直观解剖, 并由于相当部分胆石和胆汁密度接近, 故不易被检出。文献报道<sup>[4,5]</sup>, 对胆总管下段、

吻合口附近结石, MRCP 具有很高的检出率 90%, MRCP 诊断胆系结石的敏感度和特异度分别为 89%、90%, 诊断胆总管结石的敏感性为 88%~100%, 特异性为 91%~98%。本研究 MRCP 诊断胆系结石、胆总管结石的敏感度明显高于 US 及 CT, 有显著性差异。

MRCP 因受空间分辨率的限制, 难以显示微小的狭窄和轻微病变。同时对于胰腺病变, 只能显示胰管的阻塞和扩张情况, 有时胰管还显示不良或不显示, 需结合 MRI 图像观察。本研究中 MRCP 诊断胰腺炎症病变的敏感度最低, 敏感度为 28%。低于文献报道。尤其在显示胆囊炎和胰腺炎病变时, 诊断能力不如 US 及 CT。而胆管炎的诊断又较其它两种方法占优势。说明除 MRCP 本身诊断局限性外, 与本组研究中胆囊炎比例很大, 而 MRCP 诊断胆囊炎的习惯意识少可能有一定关系。

### 参考文献

- [1] 吴梅, 郭启勇, 马春梅, 等. 非侵入性影像学方法诊断梗阻性黄疸 (US, CT 和 MRCP) 的 meta 分析[J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(4): 608-613
- [2] 高培毅, 林燕, 张红梅. 颅内恶性胶质瘤术后早期 MR、CT 对残留肿瘤的检出的受试者操作特性分析[J]. 中华放射学杂志, 2000, 34(4): 240-243
- [3] 余松林. 医学统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 170-173
- [4] Lomas DJ, Bearcroft P. WP, Gimson AE. MR cholangiopancreatography: prospective comparison of a breathhold 2D projection technique MRCP[J]. Eur Radiol, 1999, (9): 1411-1417
- [5] Becker CD, Grossholz M, Becker M, et al. Choledocholithiasis and bile duct stenosis: diagnostic accuracy of MR cholangiopancreatography [J]. Radiology, 1997, 205(2): 523

(上接第 25 页)

综上所述, 随着肿瘤的发展, nm23 和 S-100 蛋白的表达有下降的趋势, 肿瘤在逐步发展过程中, 机体免疫功能受到抑制, 使肿瘤得以进行性生长。鉴于 nm23 和 S-100 蛋白的异常表达在皮肤黑色素瘤的恶性进展过程中所起的重要作用, 检测 nm23 和 S-100 蛋白的表达有助于判断机体免疫状态, 且可作为判断黑色素瘤恶性程度及预后的指标之一。因此检测 nm23 和 S-100 蛋白, 可以较客观准确地作为判断皮肤黑色素瘤浸润和转移的生物学指标, 为皮肤黑色素瘤的治疗及预后提供依据。

### 参考文献

- [1] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastasis potential[J]. Natl Cancer Inst, 1998, 80: 200-204
- [2] Hennesy C, Henry JA, May FEB, et al. Expression of the antimetastatic

gene nm 23 in human breast cancer an association with good prognosis [J]. J Natl Cancer Inst, 1991, 83: 281-283

- [3] Flores VA, Andal S, Myklebust O, et al. Levels of nm 23 messenger RNA in metastatic malignant melanoma: inverse correlation to disease progression[J]. Cancer Res, 1992, 52: 6088-6090
- [4] T Sato, M Terai, R Yasuda, et al. Combination of monocyte-derived dendritic cells and activated T cells which express CD40 ligand: a new approach to cancer immunotherapy[J]. Cancer Immunol Immunotherapy, 2004, 53(1): 53-61
- [5] PT Lee, PG Holt, and ASM McWilliam. Ontogeny of rat pulmonary alveolar macrophage function: evidence for a selective deficiency in interleukin-10 and nitric oxide production by newborn alveolar macrophages[J]. Cytokine, 2001, 15(1): 53-57
- [6] Wright-Brown V, McClain KL, Talpaz M, et al. Physiology and pathophysiology of dendritic cells[J]. Hum Pathol, 1997, 28(5): 563-579

(正文请见第 24 页)

nm23 和 S-100 蛋白在 B16 黑色素瘤模型鼠的表达和意义

王忠成

(哈尔滨医科大学大庆校区解剖学教研室 163319)

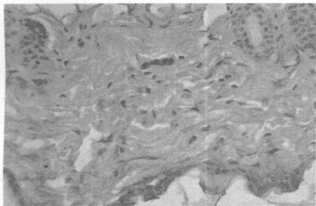


图 1 对照组皮肤 Nm23 免疫组化染色 x132

Figure 1. Skin of Nm23 dyed by Immunohistochemical method in control group x132

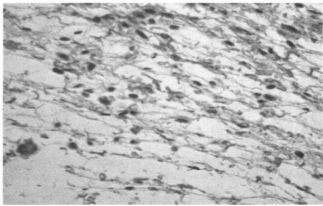


图 2 早期组皮肤 Nm23 免疫组化染色 x132

Figure 2. Skin of Nm23 dyed by Immunohistochemical method in early group x132

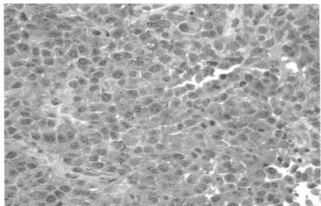


图 3 晚期组皮肤 Nm23 免疫组化染色 x132

Figure 3. Skin of Nm23 dyed by Immunohistochemical method in late group x132

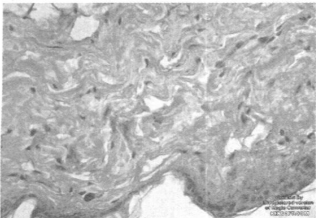


图 4 对照组皮肤 S-100 蛋白免疫组化染色 x132

Figure 4. Skin of S-100 Proteins dyed by immunohistochemical method in control group x132

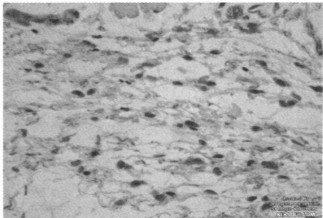


图 5 早期组皮肤 S-100 蛋白免疫组化染色 x132

Figure 5. Skin of S-100 Proteins dyed by immunohistochemical method in early group x132

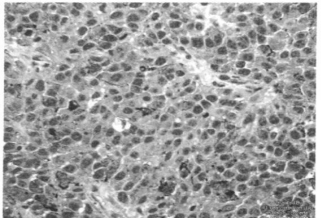


图 6 晚期组皮肤 S-100 蛋白免疫组化染色 x132

Figure 6. Skin of S-100 Proteins dyed by immunohistochemical method in late group x132

(正文请见第 26 页)

595nm 激光对兔耳瘢痕成纤维细胞增殖活性的影响

滕雯 郝立君 任丽虹 肖志波 王敏 李芍华

(哈尔滨医科大学附属第二医院激光美容中心 黑龙江 哈尔滨 150086)

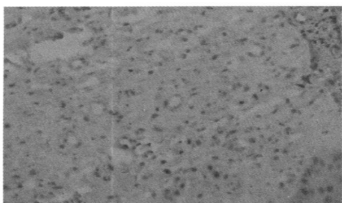


图 1、上皮化后 4 周对照组瘢痕 PCNA 表达 (免疫组化×400 倍)

Figure1. PCNA expression of hypertrophic scar 4 weeks after re-epithelization in the control group by immunohistochemical (IHC) method(×400)

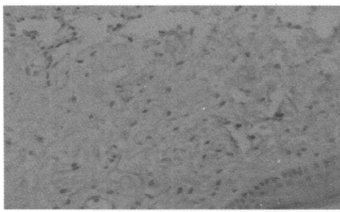


图 2、上皮化后 4 周激光治疗组瘢痕 PCNA 表达 (免疫组化×400 倍)

Figure2. PCNA expression of hypertrophic scar 4 weeks after re-epithelization in the laser treatment group by IHC method(×400)