

# 早期胃印戒细胞癌内肿瘤干细胞分布的病理学研究

张建东<sup>1</sup>,周志华<sup>1</sup>,徐桂芳<sup>2</sup>,赵海滨<sup>1</sup>,赵玲娜<sup>1</sup>,单宝珍<sup>1</sup>

(1.无锡市解放军第101医院,江苏大学教学医院,江苏 无锡 214044;

2.南京大学医学院附属鼓楼医院,江苏 南京 210008)

**摘要:**[目的] 探讨早期胃印戒细胞癌内肿瘤干细胞的分布和定位。[方法] 采用组织化学和免疫组织化学染色技术,检测47例早期胃印戒细胞癌的黏液分泌特点、分化增殖特性和干细胞标志物的表达。[结果] 早期胃印戒细胞癌具有特征性的“分层结构”;浅表层为典型印戒细胞,第二层为低分化癌细胞,少数病例(4例)含第三层癌细胞,呈泡沫样。浅表层及第三层癌细胞具有黏液分泌功能,主要表达MUC5AC和MUC6,而不表达干细胞标志物。第二层癌细胞无黏液分泌功能,不表达分化标志物,Sox2、musashi-1、hTERT干细胞标记阳性,Ki-67阳性率为28.6%±4.3%。[结论] 早期胃印戒细胞癌的肿瘤干细胞定位于分层结构的第二层,可能与肿瘤的早期进展有关。

**关键词:**胃印戒细胞癌;干细胞;分层结构;免疫组化

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2012)04-0316-05

## A Pathological Study of the Distribution of Cancer Stem Cells in Early Gastric Signet-Ring Cell Carcinoma

ZHANG Jian-dong<sup>1</sup>,ZHOU Zhi-hua<sup>1</sup>,XU Gui-fang<sup>2</sup>,et al.

(1.101 Hospital of Wuxi,Wuxi 214044,China; 2.Nanjing Drum Tower Hospital,The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School,Nanjing 210008,China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the distribution and location of cancer stem cells in early gastric signet-ring cell carcinoma (SRCC). [Methods] The characteristics of mucus secretion, differentiation and proliferation, and stem cell markers expression in 47 cases with early gastric SRCC were detected by histochemical and immunohistochemical staining. [Results] Early gastric SRCC was characterized by a layered structure including three layers: superficial layer, containing typical signet-ring cells; the second layer, containing poorly-differentiated cancer cells; the third layer in few cases (4 cases) containing foamy cells. Most cells in the superficial layer and the third layer with mucus secretion, main expression of MUC5AC and MUC6, and stem cell markers were all negative expression. The second layer without mucus secretion, the differentiation markers were all negative expression, whereas the stem cell markers of Sox2, musashi-1, hTERT were positive, and the positive rate of Ki-67 was 28.6%±4.3%. [Conclusion] Cancer stem cells of early gastric SRCC are located at the second layer of the layered structure, and they might relate to cancer early progression.

**Key words:** gastric signet-ring cell carcinoma; stem cells; layered structure; immunohistochemistry

印戒细胞癌是胃癌常见的病理类型,其发生发展机制尚不清楚,患者经确诊时多处于中晚期,预后较差。近年来,肿瘤干细胞学说的兴起为我们重新认识此类胃癌的发生演进机制提供了新的视角。该学说认为,肿瘤内存在少数具有干细胞特性的肿瘤细胞,即肿瘤干细胞,具有极强的成瘤能力,是启动肿

瘤发生发展的“种子细胞”<sup>[1]</sup>。Takaishi等<sup>[2]</sup>在数个胃癌细胞系发现CD44与癌细胞的成瘤能力密切相关,并初步证实CD44阳性的癌细胞群体内存在肿瘤干细胞,但该研究所用材料均为细胞系,所获结论只适用于非印戒细胞类型的胃癌,在人胃印戒细胞癌组织内是否存在肿瘤干细胞仍不清楚。

以往研究发现<sup>[3,4]</sup>,早期胃印戒细胞癌可在黏膜内形成一类特殊而有序的组织形态-分层结构(layer-

收稿日期:2011-07-22;修回日期:2011-12-20

基金项目:国家自然科学基金(81000964)

通讯作者:周志华,E-mail:zhzhou97@163.com

ered structure),该结构由两层或三层细胞组成,其中靠近黏膜表面的浅表层癌细胞体积大,胞质丰富,胞核偏于一侧,呈典型的印戒样;浅表层下方的第二层癌细胞体积小,核/浆比大,增殖活跃;部分病例在上述两层结构的深部可见第三层结构,该层癌细胞体积大,似泡沫细胞。由于第二层癌细胞在形态上具有低分化的特点,我们推测印戒细胞癌的肿瘤干细胞可能位于该细胞层。本研究拟考察分层结构中上述低分化癌细胞的增殖特性以及干细胞标志物的表达情况,初步探讨其在肿瘤侵袭中的作用及胃印戒细胞癌发生发展机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 资料收集

回顾我院 1988~2010 年胃癌根治标本,共确认 47 例早期印戒细胞癌标本作为研究对象, $T_{1a}$  期 25 例, $T_{1b}$  期 22 例。对所有标本的存档蜡块连续切片(厚  $3\mu\text{m}$ ),进行苏木素-伊红(HE)染色、AB-PAS 染色及免疫组化染色。

### 1.2 AB-PAS 染色

AB-PAS 染色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司,染色按产品说明书操作。步骤如下:石蜡切片脱蜡至水;滴加醋酸分化液作用 2min 后倾去;滴加 AB 染色液(奥辛蓝, pH2.5)染色 10min;醋酸分化液作用 2min,再用流水冲洗 5min;滴加高碘酸作用 10min,蒸馏水冲洗;滴加 Schiff(雪夫)试剂染色 15min 后倾去;滴加偏重亚硫酸钠作用 1min;流水冲洗 10min;苏木素复染细胞核,脱水、透明并封片。

### 1.3 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学染色检测癌细胞分化状况和干细胞标志物的表达情况。癌细胞分化状况标志物包括:MUC5AC、MUC6、Cdx2、MUC2、Syn。MUC5AC 表达于胃小凹、峡部和腺颈部的黏液细胞(福州迈新公司,工作液,定位于细胞质)<sup>[5-7]</sup>,MUC6 表达于胃腺颈部的黏液细胞和基底部的幽门腺上皮(上海长岛公司,浓缩液,稀释度 1:50,定位于细胞质)<sup>[6,7]</sup>;MUC5AC 和 MUC6 常用来作为胃上皮分化的标志物;Cdx2 表达于肠吸收细胞和杯状细胞(上海长岛公司,稀释度 1:50,定位于细胞核)<sup>[8]</sup>,而 MUC2 则表达于肠杯状细胞(上海长岛公司,工作液,定位于于

胞质),Cdx2 和 MUC2 为肠上皮分化的标志物,在正常胃上皮不表达;Syn 为神经内分泌细胞的标志物(上海长岛公司,工作液,定位于细胞质)。癌细胞的胃上皮或肠上皮分化检测采用免疫组化双染标记,即在切片中同时标记 MUC5AC 和 MUC6,Cdx2 和 MUC2。操作按产品说明书进行,并根据文献<sup>[9]</sup>略有改变,步骤简述如下:石蜡切片脱蜡至水;柠檬酸缓冲液(pH6.0)95℃修复 10min,保温 10min;3% $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育后血清封闭 10min;而后采用 SP 法先标记第一个抗原,显色系统为 BCIP/NBT 或 DAB,阳性部位呈蓝黑色或棕黄色;随后再次进行抗原修复(方法同前),目的为暴露第二个抗原,同时灭活前一次染色时残留抗体的免疫活性,而后仍采用 SP 法染色标记第二个抗原,显色底物为 AEC 或 Fast Red,阳性部位均呈红色。此外,对 Syn 表达的免疫组化检测采用 Envision 二步法,显色系统为 HRP/DAB。

干细胞标志物包括:Sox2、musashi-1、hTERT、CD133 和 CD44。Sox2 是一类核转录因子,表达于胚胎的全能干细胞及多潜能细胞(Abcam 公司,1:50,定位于细胞膜);musashi-1 为一类 RNA 结合蛋白,维持干细胞处于未分化状态,被认为是神经干细胞和胃肠道干/祖细胞的标志物(SantaCruz 公司,浓缩液,稀释度 1:100,定位于细胞核)<sup>[10,11]</sup>;hTERT 是人端粒酶的催化亚单位(北京中杉公司,稀释度 1:100,定位于细胞核),较特异地表达于胚胎干细胞和肿瘤干细胞<sup>[12]</sup>;CD44(北京中杉公司,工作液,定位于细胞膜)和 CD133(Abcam 公司,1:50,定位于细胞膜)是多种肿瘤干细胞的标志物<sup>[13]</sup>。染色采用 Envision 二步法,显色系统为 HRP/DAB。

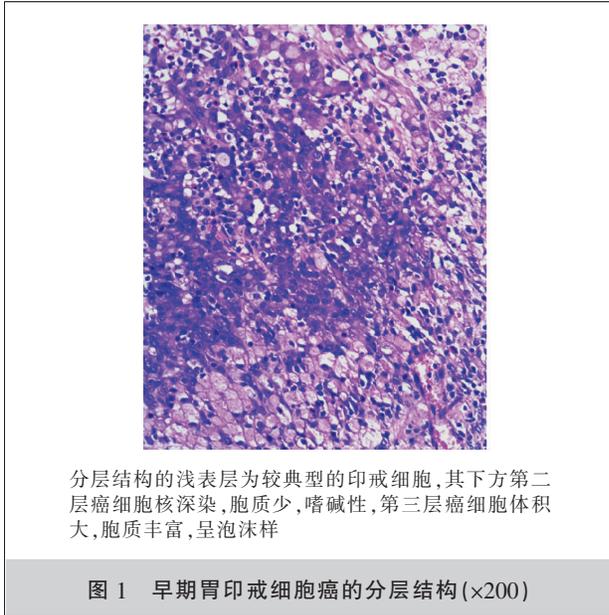
另取连续切片单独标记 Ki-67(福州迈新公司,工作液,定位于细胞核),并对不同区域癌细胞 Ki-67 阳性细胞比例进行比较。每个区域随机选取 5 个视野,计数 Ki-67 表达阳性的癌细胞数,除以上述 5 个视野内癌细胞总数,即为 Ki-67 阳性率。

## 2 结果

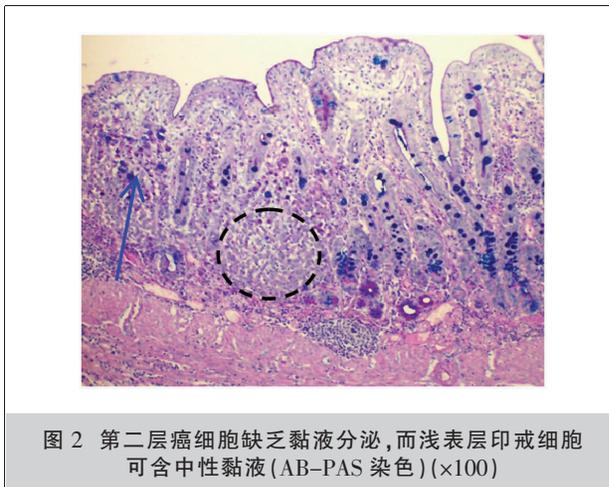
### 2.1 早期胃印戒细胞癌分层结构的组织病理学及黏液组织化学染色特点

组织学观察显示, $T_{1a}$  期病例均可见分层结构(21 例为两层结构,4 例为三层结构); $T_{1b}$  期病例中

18例见分层结构(均为两层结构),而且分层结构所处区域癌细胞均局限于黏膜内,而在癌细胞浸润至黏膜下层的区域,分层结构不明显或消失。分层结构的浅表层为典型的印戒细胞,呈弥散排列,细胞体积大,胞质丰富,胞核偏位;第二层癌细胞体积小,胞核深染,可见核仁,同时胞质较少,可呈嗜碱性;少数病例中见到的第三层癌细胞体积大,可呈镶嵌样,胞质泡沫样,核可位于中央。见图1。



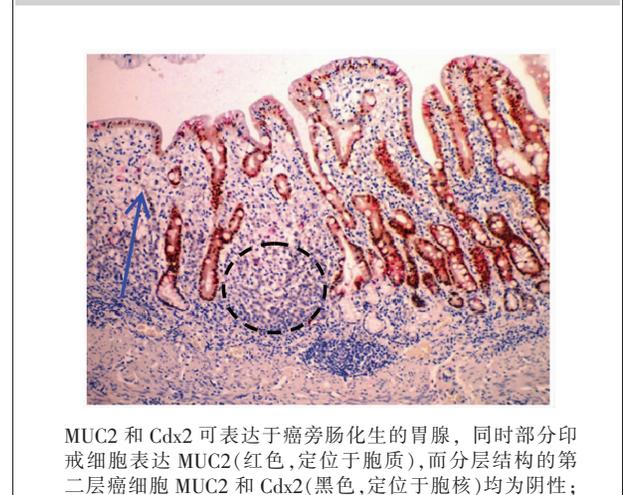
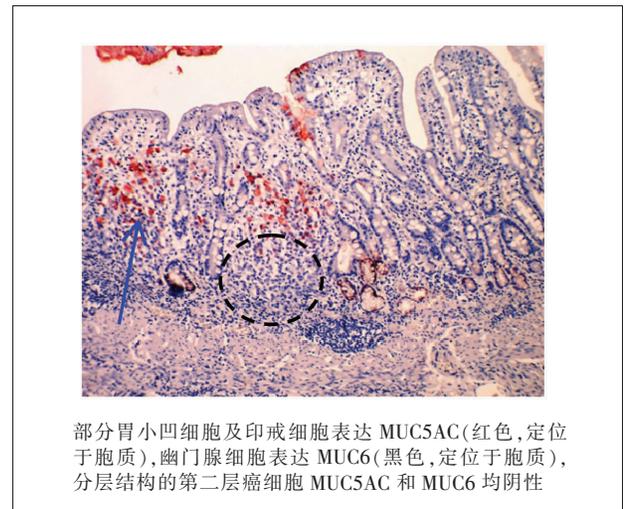
AB-PAS 染色结果显示,浅表层典型的印戒细胞其胞质内含丰富的中性黏液,少数细胞含混合性黏液或酸性黏液(出现在 $T_{II}$ 期病例);第二层癌细胞一般不含黏液,少数含少量中性黏液;第三层的泡沫样癌细胞的胞质含中性黏液。见图2。

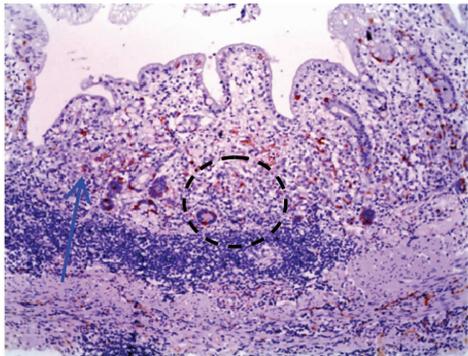


## 2.2 分层结构中癌细胞的分化特点及增殖特性

免疫组织化学染色显示,浅表层典型的印戒细胞主要表达 MUC5AC, MUC6 呈阴性,少数可表达 MUC2、Cdx2 或 Syn; 第二层癌细胞 MUC5AC、MUC6、Cdx2、MUC2 表达均为阴性。图3、4。Syn 表达于少数癌细胞,呈弱阳性。图5。4例具有三层分层结构的病例中,前两层癌细胞的分化表型同上,而第三层泡沫细胞样癌细胞微弱表达 MUC6。

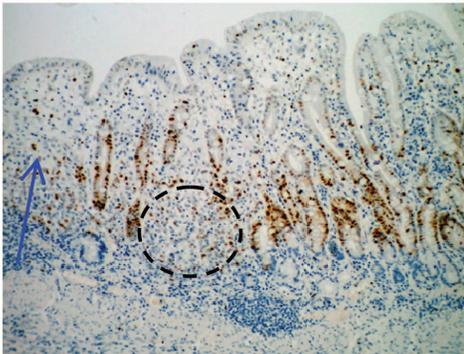
Ki-67 标记显示,分层结构中第二层的低分化癌细胞增殖活跃, Ki-67 阳性率为  $28.6\% \pm 4.3\%$ , 显著高于浅表层的典型印戒细胞 ( $6.1\% \pm 1.4\%$ ,  $P < 0.05$ )。图6。具有三层分层结构的病例中,第三层癌细胞 Ki-67 均阴性。





部分细胞 Syn 阳性, 主要位于浅表层, 分层结构的第二层癌细胞 Syn 多为阴性

图 5 分层结构内 Syn 表达( $\times 100$ )



分层结构的第二层癌细胞增殖较活跃, 而浅表层印戒细胞 Ki-67 阳性率较低。

图 6 分层结构内 Ki-67 表达( $\times 100$ )

### 2.3 分层结构中低分化癌细胞的干细胞标志物表达

浅表层的典型印戒细胞及第三层癌细胞所有干细胞标志物均为阴性; 第二层癌细胞中, CD44、CD133 呈阴性表达, 而 Sox2、hTERT、musashi-1 均为阳性, 定位于细胞核(图 7)。

## 3 讨论

我们对早期胃印戒细胞癌特征性分层结构的研究表明, 该结构的第二层的癌细胞具有如下特点: ①形态原始(体积小、核/浆比大、可见核仁), AB-PAS 染色显示癌细胞缺乏黏液分泌功能; ②癌细胞不表达胃上皮或肠上皮的分化标志物, 也缺乏神经内分泌细胞的分化表型, 这不同于正常或肠化的胃腺上皮,

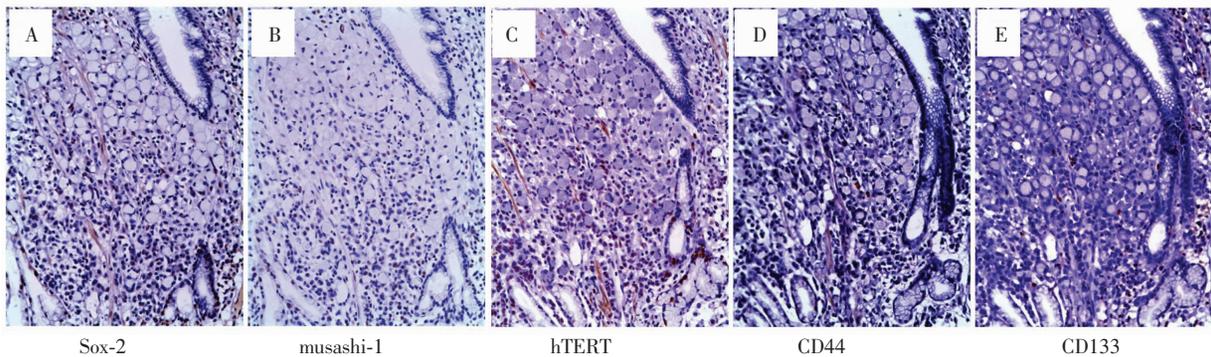
显示此类癌细胞分化程度较低; ③癌细胞表达某些干细胞标志物, 如 Sox2、musashi-1 和 hTERT, 表明其具有干细胞的某些表型。因此, 我们认为胃印戒细胞癌内的肿瘤干细胞位于分层结构的第二层。

我们对分层结构内癌细胞分化表型的观察还发现, 癌细胞尤其是浅表层的典型印戒细胞主要表达胃小凹上皮的分化标志物 MUC5AC, 少部分可表达肠型上皮标志物 Cdx2、MUC2 或神经内分泌细胞的分化标志物 Syn, 而第三层癌细胞可表达 MUC6。因此, 早期胃印戒细胞癌的分层结构具有多向分化的特点。以往研究证实胃印戒细胞癌为单克隆起源<sup>[14]</sup>, 故推测此类胃癌应起源于具有多向分化潜能的干细胞(肿瘤干细胞)。而在分层结构内, 浅表层和第三层的癌细胞多处于静止状态, 只有第二层的癌细胞增殖较活跃, 认为分层结构的第二层应为“生发层”, 是其它两层癌细胞的起源部位, 这也提示具有多向分化潜能的肿瘤干细胞位于该层。

一般认为<sup>[15,16]</sup>, 正常干细胞或肿瘤干细胞是慢周期细胞, 多处于静止状态。本研究发现分层结构内第二层癌细胞增殖较为活跃, Ki-67 标记显示该层癌细胞阳性率较高, 但仍不到 30%, 因此我们认为该层仍有较多癌细胞可能处于 G<sub>0</sub> 期, 这些细胞中可能富集了肿瘤干细胞。

目前尚缺乏有关胃印戒细胞癌肿瘤干细胞的特异性标志物。我们考察了两个常用的肿瘤干细胞标志物 CD44 和 CD133 在分层结构中的表达情况, 结果发现两者均为阴性, 故在胃印戒细胞癌, 本研究不支持 CD44 和 CD133 可作为肿瘤干细胞标志物的观点。最近 Takaishi 等证实 CD133 无法用来分离鉴定胃癌干细胞, 而以往研究也发现早期胃印戒细胞癌不表达 CD44<sup>[17]</sup>。

此外应注意到, 在仅含两层细胞的分层结构中, 第二层的低分化癌细胞层位于肿瘤浸润的最前沿, 并随着肿瘤的演进向黏膜肌层浸润; 而在具有三层细胞的分层结构中, 第二层的低分化癌细胞可进一步扩展, 取代第三层癌细胞成为肿瘤浸润的最前端。所以, 第二层的低分化癌细胞与印戒细胞癌的早期进展有密切关系。既往研究曾提出“侵袭性肿瘤干细胞”的概念, 指出肿瘤干细胞在肿瘤侵袭、转移和复发过程中所扮演了核心角色<sup>[18]</sup>。本研究从形态学角度初步印证了上述观点。同时, 我们发现分层结构内



Sox2, musashi-1, hTERT 阳性细胞主要位于分层结构的第二层, 浅表层的印戒细胞阴性表达 (A、B、C), 分层结构内的癌细胞 CD44、CD133 均为阴性表达 (D、E)

图7 分层结构内各干细胞标志物表达(×100)

处于浸润前沿的第二层癌细胞可失去圆形或多边形的上皮细胞形态,逐渐拉伸演变为梭形细胞,这种形态学改变作为“上皮-间质转化”的典型表现,是肿瘤细胞浸润和转移的一个重要步骤。Mani 等<sup>[19]</sup>发现,乳腺癌浸润边缘处于上皮-间质转化的癌细胞具有干细胞特性,是肿瘤干细胞,本研究结果与之相符。

综上所述,早期胃印戒细胞癌分层结构中第二层的低分化癌细胞具有干细胞特性,同时,该层癌细胞在印戒细胞癌的早期进展中发挥了重要作用。本研究为深入认识胃印戒细胞癌的发生和演进机制,并施行以肿瘤干细胞为靶标的治疗策略提供了新的病理形态学依据。

## 参考文献:

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414 (6859): 105-111.
- [2] Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 [J]. *Stem Cell*, 2009, 27 (5): 1006-1020.
- [3] Akamatsu T, Katsumaya T. Histochemical demonstration of mucins in the intramucosal laminated structure of human gastric signet ring cell carcinoma and its relation to submucosal invasion [J]. *Histochem J*, 1990, 22(8): 416-425.
- [4] Humar B, Fukuzawa R, Blair V, et al. Destabilized adhesion in the gastric Proliferative zone and c-Src kinase activation mark the development of early diffuse gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 280-289.
- [5] Reis CA, David L, Nielsen PA, et al. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody [J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(1): 112-121.
- [6] Reis CA, David L, Correa P, et al. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6) expression [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(5): 1003-1007.
- [7] Machado JC, Nogueira AM, Carneiro F, et al. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) [J]. *J Pathol*, 2000, 190(10): 437-443.

- [8] Silberg DG, Swain GP, Suh ER, et al. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(4): 961-971.
- [9] 虞有智, 林敏, 薛卫成, 等. 免疫组织化学三重染色技术 [J]. *中华病理学杂志*, 2005, 34(4): 244-245.
- [10] Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells [J]. *Dev Neurosci*, 2000, 22(1-2): 139-153.
- [11] Akasaka Y, Saikawa Y, Fujika K, et al. Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia [J]. *Histopathology*, 2005, 47(4): 348-356.
- [12] Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(7): 1020-1024.
- [13] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10): 755-768.
- [14] Humar B, Blair V, Charlton A, et al. E-Cadherin deficiency initiates gastric signet-ring cell carcinoma in mice and man [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 2050-2056.
- [15] Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells [J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1072-1078.
- [16] Holtz M, Forman SJ, Bhatia R. Growth factor stimulation reduces residual quiescent chronic myelogenous leukemia progenitors remaining after imatinib treatment [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1113-1120.
- [17] Ghaffarzadehgan K, Jafarzadeh M, Raziee HR, et al. Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(41): 6376-6381.
- [18] 卞修武. 肿瘤干细胞生物学特性及其在肿瘤侵袭和血管新生中的作用 [J]. *中华病理学杂志*, 2009, 38(8): 505-509.
- [19] Mani S, Guo WJ, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704-715.