

## 食管癌变进程中成纤维细胞的表型变化\*

徐志彬,袁丽,郑秀丽,王士杰,吴明利<sup>△</sup>

(河北医科大学第四医院内镜科,石家庄 050011)

**[摘要]** 目的 研究在食管正常上皮历经癌前病变发展到食管鳞状细胞癌的过程中,食管间质中的成纤维细胞的  $\alpha$ -SMA 表型变化。方法 免疫组化法分析 20 例正常食管组织、80 例食管癌前病变组织及 50 例食管癌组织标本中食管间质成纤维细胞  $\alpha$ -SMA 的表达,细胞培养 3 种食管间质成纤维细胞,纯化后行细胞免疫染色,RT-PCR 法检测三种食管间质成纤维细胞  $\alpha$ -SMA 的表达。结果 免疫组化结果显示, $\alpha$ -SMA 在正常食管、食管癌前病变和食管癌组织间质成纤维细胞中的表达具有明显差异;RT-PCR 法显示,3 种食管间质成纤维细胞在 mRNA  $\alpha$ -SMA 的表达量上具有明显差异。结论 食管间质成纤维细胞随癌变进展会逐步发生活化,食管癌相关纤维母细胞可能是由正常的食管成纤维细胞发展至不典型增生纤维细胞,再逐步恶变发展而来。

**[关键词]** 食管肿瘤;间质细胞;间质成纤维细胞;癌变;表型

**[中图分类号]** R735.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)27-3777-03

## Change of phenotype of stromal fibroblasts in esophageal carcinogenesis\*

Xu Zhibin, Yuan Li, Zheng Xiuli, Wang Shijie, Wu Mingli<sup>△</sup>

(Department of Endoscopy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expressions of  $\alpha$ -SMA in different esophageal stromal fibroblasts in esophageal carcinogenesis. **Methods** IHC method was used to detect the expression of  $\alpha$ -SMA protein in stromal fibroblasts of twenty normal esophageal tissues, eighty precancerous lesions and fifty esophageal carcinomas respectively. Three kinds of esophageal stromal fibroblasts were cultured primarily and cells immunohistochemical staining was carried out after being purified. Expression of  $\alpha$ -SMA was detected by RT-PCR. **Results** IHC results showed that  $\alpha$ -SMA expressions in normal, precancerous and cancerous lesions were of significant differences. RT-PCR results showed that  $\alpha$ -SMA expressions were different significantly among three kinds of fibroblasts. **Conclusion** Esophageal stromal fibroblasts were activated with carcinogenesis. AFs was possibly the origin of CAFs.

**[Key words]** esophageal neoplasms; stromal cells; stromal fibroblast; carcinogenesis; phenotype

虽然肿瘤的发生发展是由自身的基因结构及其表达的改变而导致的,但是肿瘤所处的间质微环境在肿瘤的发展中起着举足轻重的作用,亦不能被忽视。成纤维细胞是肿瘤基质中最重要、最主要的细胞成分,活化后获得平滑肌表型的成纤维细胞被称为癌相关纤维母细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)。学者们对多种实体肿瘤中的 CAFs 进行了研究,包括其免疫表型及生物学特性及功能,以及其与癌细胞的相互作用机制。本实验重点研究正常的食管间质成纤维细胞、食管不典型增生纤维细胞以食管及癌相关纤维母细胞的形态特点及其免疫表型的变化,探讨不典型增生间质成纤维细胞是否为处于正常成纤维细胞与癌相关纤维母细胞之间的过渡阶段。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 根据 2008 年 WHO 食管上皮性肿瘤诊断分类标准,选取河北省肿瘤医院 2010~2012 年的食管癌前期病变标本 80 例,同时 50 例食管癌组织标本蜡块和 20 例贲门癌标本的阴性上残作为研究对象。150 例入选,其中男 84 例,年龄 50~76 岁,平均(58.0±5.5)岁;女 66 例,年龄 48~75 岁,平均(62.0±6.5)岁。随机抽取 3 组患者各 5 例行细胞培养。试剂:CK 鼠抗人细胞单克隆抗体, Vimentin 鼠抗人单克隆抗体,  $\alpha$ -SMA 鼠抗人单克隆抗体,浓度为 1:50,以上产品均由北京西雅金桥生物技术有限公司提供。RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone),D-Hanks 液,胰蛋白酶粉(美国 Sigma 公司),胶原酶 II(美国 Gibco 公司),基因及内参  $\beta$ -actin 的引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成;

RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司),M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司),Oligo(dT)15/10 mmol/L dNTPs/RNase-inhibitor(日本 Toyobo 公司),Matrigel Basement Membrane Matrix(美国 BD 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 一步法免疫组化染色** 阳性对照选择阳性的人癌组织切片,阴性对照选择 PBS 液。

**1.2.2 细胞培养** 将组织转移入培养瓶,于 37℃ 恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱中进行消化,显微镜下窥见独立的细胞即终止消化,一般正常组织消化约为 70 min,癌前病变组织消化约为 90 min,癌组织消化约为 100 min,细胞收集→过滤→离心→洗涤→离心→制备细胞悬液→计数→接种后,再向培养瓶中置入胰蛋白酶-EDTA 混合液,消化 1 min 后,用吸管轻轻吹打瓶底,收集细胞,制备细胞悬液,接种培养。将制作好的细胞爬片固定于载玻片上,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min, PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min,10% 牛血清封闭 30 min,加  $\alpha$ -SMA 一抗,37℃ 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加二抗,孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,5 min, DAB 显色,室温反应 10 min,水洗 1 min,2 次,苏木素复染 1 min,水洗 10 min,95% 乙醇脱水,封片。用已知阳性细胞爬片做阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)液代替一抗做阴性对照。细胞质中出现棕黄色颗粒即可判定为染色阳性。

**1.2.3 RT-PCR** 提取总的 RNA:长满细胞的 75 mL 培养瓶弃去培养基后用 PBS 液洗 2 次,再加 1 mL Trizol 裂解液裂解细胞,将裂解细胞液移入 Ep 管中,室温条件下静置 5 min 后加

\* 基金项目:河北省卫生计生学科学重点课题计划(20160656)。

作者简介:徐志彬(1976-),副主任医师,博士,主要从事食管癌早

△ 通讯作者, E-mail: xzblxh@sina.com。

入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温下静置 2~3 min, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min, 溶液层析为 3 层, 将最上层的无色液体含移至另一 EP 管中, 加入等量异丙醇后颠倒混匀; 经冰浴 15 min, 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min 后弃去上清液, 加 75% 乙醇 1 mL 振荡混匀后, 在 4 °C 下 7 500 r/min 离心 5 min 弃上清液, 室温下于空气中干燥 5 min, 加入 20~30  $\mu$ L 无 RNA 酶水, 紫外分光光度仪测定 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值, 1.8~2.0 较好。逆转录体系: 总 RNA 1  $\mu$ g, Oligo (dT) 15Primer 1  $\mu$ L, 5 $\times$  Reaction buffer 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, Ribolock RNase inhibitor 1  $\mu$ L, M-MLV 逆转录酶 1  $\mu$ L。将以上试剂依次加入 200  $\mu$ L 的 PCR 管中, 补足无 RNase 水, 总体积 12  $\mu$ L, 将上述试剂混匀, 置于 PCR 仪上, 42 °C 孵育 60 min, 70 °C 孵育 5 min, 终止反应。引物序列全选自 Pubmed 基因库, 引物序列是由上海英骏生物有限公司合成、设计并合成, 经 GenBank 核实。Alpha-SMA、Vimentin 及内参  $\beta$ -actin 的引物序列和 PCR 扩增产物长度见表 1。

**1.3 判定标准**  $\alpha$ -SMA 阳性判断标准: 按照王立峰等<sup>[6]</sup>的标准, 以间质成纤维细胞胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 观察 5 个具有代表性的高倍视野 ( $\times 400$ ), 根据阳性范围: 无明显阳性细胞为 (-), 局灶阳性者判定为 (+), 弥漫阳性者判定为 (++) , 为便于统计, 将 (+) 和 (++) 合并为阳性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计数资料以率或百分比表示, 均数的比较用  $t$  检验, 率的比较用  $\chi^2$  检验, 以  $\alpha=0.05$  为检验水准,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

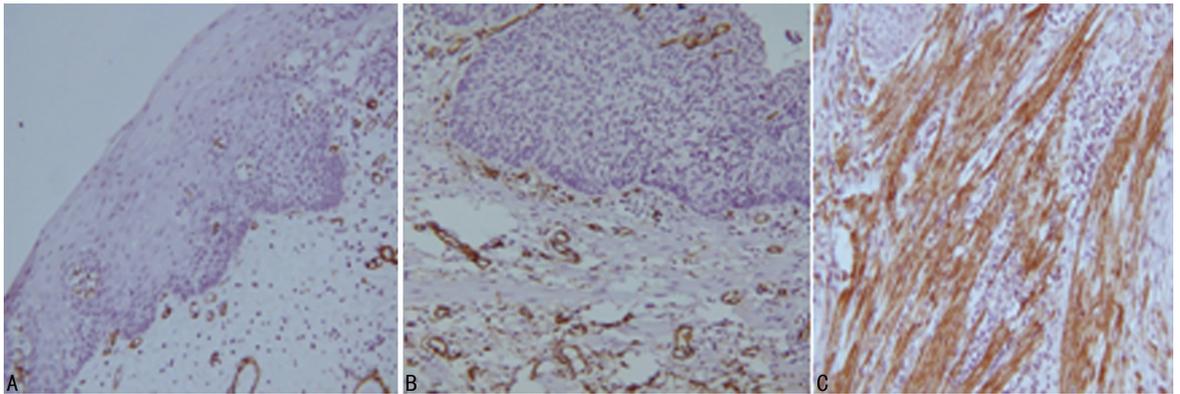
### 2.1 食管癌变过程中间质成纤维细胞的 $\alpha$ -SMA 表达情况

SMA 在正常食管间质成纤维细胞中基本不表达 (0/20), 可表达于平滑肌细胞和血管平滑肌细胞; 癌前病变组、癌组的表达率分别为 26% (21/80)、76% (38/50); 阳性的食管间质成纤维细胞多呈梭形或条带样, 多分布于癌前病变或癌团周围间质中, 在进展期癌组织中可见条索状成纤维细胞包裹癌巢。本组结果显示, 间质成纤维细胞  $\alpha$ -SMA 的阳性表达率随着食管癌变进展呈逐渐上升趋势, 组间阳性表达率差异有统计学意义, 与正常组比较, 食管癌前病变组和食管癌组差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。见图 1。

表 1 引物序列和 PCR 扩增产物长度

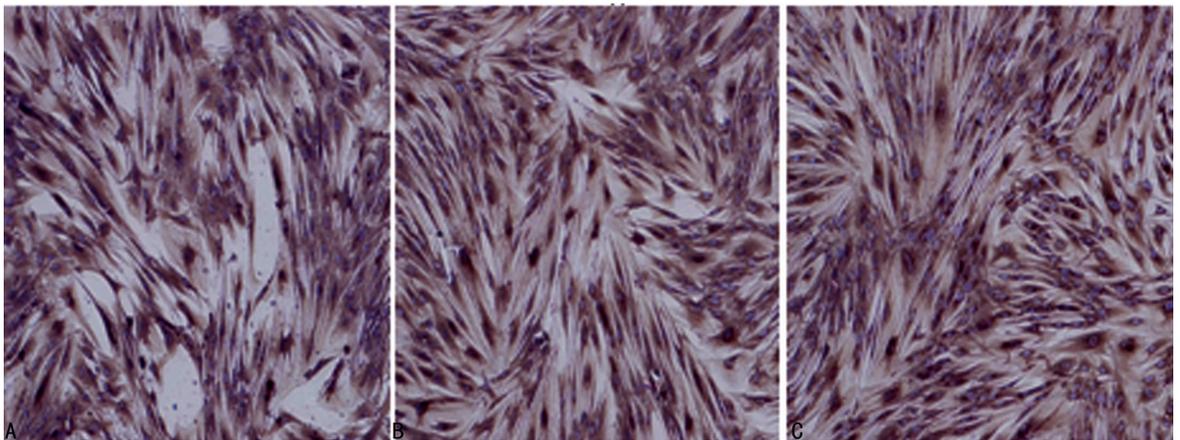
引物	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
$\beta$ -actin	上游: 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3'	619
	下游: 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAG-3'	
$\alpha$ -SMA	上游: 5'-AGGAAGGACCTCTATGCTAAACAAT-3'	309
	下游: 5'-AACACATAGGTAACGAGTCAGAGC-3'	
Vimentin	上游: 5'-GGGACCTCTACGAGGAGGAG-3'	200
	下游: 5'-CGCATTTGTCAACATCCTGTGTC-3'	

**2.2 细胞免疫染色结果** 食管正常成纤维细胞 (NFs) 中  $\alpha$ -SMA 染色为阴性, 食管不典型增生纤维细胞 (AFs) 和食管 CAFs 细胞质中可见  $\alpha$ -SMA 的阳性染色。而 Vimentin 在 3 种食管间质成纤维细胞中均为阳性表达, CK 在 3 种食管间质成纤维细胞中均为阴性表达 (图 2~4)。



A:  $\alpha$ -SMA 在正常组织成纤维细胞的阴性表达; B:  $\alpha$ -SMA 在上皮内瘤变组织中成纤维细胞的阳性表达; C:  $\alpha$ -SMA 在食管癌组织中的阳性表达。

图 1  $\alpha$ -SMA 在食管癌变过程中间质成纤维细胞的表达 (IHC,  $\times 200$ )



A: Vimentin 在 NFs 的阳性表达; B: Vimentin 在 AFs 的阳性表达; C: Vimentin 在 CAFs 的阳性表达。

图 2 Vimentin 在三种食管间质成纤维细胞的表达 (IHC,  $\times 100$ )

目前本单位获得了国家高通量基因测序 NIPT 临床试点资质, 将加大该技术的规范应用, 同时也会加强临床应用的研究, 以得出更科学的临床数据。

综上所述, 本研究中有 7 例孕妇因唐氏筛查检测结果为临界中风险进而选择 NIPT, 最终确诊胎儿为染色体数目异常。此类孕妇若按之前的产前诊断指导方案极有可能漏诊, 若等患儿出生时才发现异常, 不仅会给这些家庭带来巨大的精神和经济压力, 更会给社会造成巨大的负担。因此, 本课题组认为, NIPT 可做为唐氏筛查临界风险孕妇的有效补充检测手段。

#### 参考文献

- [1] Weisz B, Pandya P, Chitty L, et al. Practical issues drawn from the implementation of the integrated test for Down syndrome screening into routine clinical practice [J]. *BJOG*, 2007, 114(4): 493-497.
- [2] 边旭明, 戚庆炜. 染色体异常产前筛查和诊断工作任重而道远[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2010, 26(12): 889-891.
- [3] 张晓青, 韩小亚, 孙达成, 等. 常州地区 2005~2009 年孕中期产前筛查结果分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(10): 1258-1260, 1263.
- [4] Shaw SW, Hsiao CH, Chen CY, et al. Noninvasive prenatal testing for whole fetal chromosomal aneuploidies: a multicenter prospective cohort trial in Taiwan[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2014, 35(1): 13-17.
- [5] 王挺, 文萍, 李琼, 等. 产前血清学筛查 MoM 低值和临界风险在染色体异常诊断中的应用[J]. *江苏医药*, 2013, 39(16): 1942-1944.
- [6] 向萍霞, 刘翎, 冷培, 等. 游离胎儿 DNA 高通量基因测序

技术在产前筛查的临床应用[J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(10): 777-780.

- [7] 马京梅, 潘虹, 付杰, 等. 高危孕妇外周血胎儿游离核酸无创性产前检测的前瞻性研究[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(11): 849-852.
- [8] Gil MM, Quezada MS, Revello R, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(3): 249-266.
- [9] Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(17): 1589-1597.
- [10] Zhang H, Gao Y, Jiang F, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146, 958 pregnancies [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(5): 530-538.
- [11] Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis [J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35(8): 725-734.
- [12] Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. CARE Study Group. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening [J]. *New Eng J Med*, 2014, 370: 799-808.
- [13] 许争峰, 徐倩君, 曹荔, 等. 中晚孕期 18 三体综合征胎儿的超声特征[J]. *现代妇产科进展*, 2008, 17(9): 647-650.

(收稿日期: 2016-02-22 修回日期: 2016-04-26)

(上接第 3779 页)

胞  $\alpha$ -SMA 的表型获得与转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 密切相关, TGF- $\beta$ 1 能下调纤维细胞 CD34 的表达, 促进  $\alpha$ -SMA 的表达, 诱导 CD34 细胞凋亡可能是其机制之一, 而 TGF- $\beta$ 1 是可以由肿瘤细胞和癌旁纤维母细胞大量分泌的<sup>[7-9]</sup>。

肿瘤的发生机制目前尚不完全清楚, 普遍认为, 在癌变过程中上皮细胞的基因突变是主动的, 间质反应只是被动地做出应答。以往有研究将已经发生了癌前病变的口腔上皮组织去掉, 将其黏膜下层结缔组织与正常的口腔上皮组织贴合后发现, 正常的口腔上皮会发生异型性改变, 可见间质成纤维细胞在肿瘤的发生中扮演的不仅是被动的角色, 本研究中间质成纤维细胞在癌前病变时即可发生活化的现象也恰恰证实了这一观点。由此可见食管癌变进程中中间质成纤维细胞的表型变化具有非常重要的意义。

#### 参考文献

- [1] Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment [J]. *Trends Genet*, 2009, 25(1): 30-38.
- [2] 王瑞芬, 黄坊, 孙和国, 等.  $\alpha$ -SMA 和 MMP-9 在乳腺癌中的表达及意义[J]. *诊断病理学杂志*, 2013, 20(2): 91-93, 96.
- [3] 李青, 纪捷, 张静敏, 等. 宫颈鳞状上皮内瘤变及鳞状细胞癌中间质细胞 CD34、 $\alpha$ -SMA 的表达及意义[J]. *临床与*

实验病理学杂志, 2007, 23(6): 669-672.

- [4] 王瑞芬, 王正彩, 王健, 等. 胃癌间质中肿瘤相关纤维母细胞 CD34 和 SMA 的表达及意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2007, 23(4): 412-415.
- [5] Catalano V, Turdo A, Di Franco S, et al. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(6B): 522-532.
- [6] Xue Z, Wu X, Chen X, et al. Mesenchymal stem cells promote epithelial to mesenchymal transition and metastasis in gastric cancer through paracrine cues and close physical contact [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(4): 618-627.
- [7] 肖光, 熊小亮, 罗达亚, 等. 非小细胞肺癌中 TGF- $\beta$ 1 与肿瘤相关纤维母细胞  $\alpha$ -SMA 及 CD34 表达的相关性和意义[J]. *广东医学*, 2011, 32(14): 1866-1869.
- [8] 莫立根, 罗元, 党阳, 等. TGF- $\beta$ 1、CD34 和  $\alpha$ -SMA 在鼻咽癌中的表达及其意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(2): 185-188.
- [9] 王立峰, 王瑞芬, 郝兆星, 等. 胃癌中肿瘤相关纤维母细胞蛋白表达改变及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(20): 2263-2267.
- [10] 崔晓梅, 章魁华. 癌前病变结缔组织对正常粘膜上皮的作用[J]. *中华口腔医学杂志*, 1992, 27(5): 266-269.

(收稿日期: 2016-03-11 修回日期: 2016-05-26)