

· 论 著 ·

## 癌胚抗原受体在非消化器官的表达及意义\*

赵会民<sup>1</sup>, 张 森<sup>2</sup>, 高 枫<sup>2△</sup>

(广西医科大学第一附属医院: 1. 西院急诊科, 南宁 530007; 2. 肛肠外科, 南宁 530021)

**摘要:**目的 研究癌胚抗原受体在肺、脑、骨、卵巢等组织中的表达及意义。方法 以雌性 BALB/c 小鼠 20 只为研究对象, 以免疫组化的方法检测肺、脑、骨、卵巢等器官组织中的癌胚抗原受体表达情况, 并探讨其肿瘤学意义。结果 癌胚抗原受体在血管膜上皮和脉络丛上皮细胞的细胞膜, 卵母细胞、卵泡细胞、细支气管黏膜上皮细胞和肺泡细胞的细胞质, 骨细胞、部分脑灰质细胞和胶质细胞的细胞核与细胞质中呈阳性表达, 而在卵巢结缔组织细胞、脑白质细胞中呈阴性表达。不同阳性细胞的表达强度差异有统计学意义( $\chi^2 = 64.8, P < 0.01$ ), 以骨细胞和脑灰质细胞表达强度较高。结论 癌胚抗原受体在肺、脑、骨、卵巢等组织中呈差异性表达, 可能与癌胚抗原高表达肿瘤的远处转移有关。

**关键词:** 癌胚抗原; 动物; 免疫组织化学

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)09-0833-02

## Expression of carcinoembryonic antigen receptor in non-digestive organs\*

Zhao Huimin<sup>1</sup>, Zhang Sen<sup>2</sup>, Gao Feng<sup>2△</sup>

(1. Department of Emergency, West Branch, Nanning, Guangxi 530007, China; 2. Department of Colorectal Surgery, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China.)

**Abstract: Objective** To explore the expression of carcinoembryonic antigen receptors (CEAR) in non-digestive organs. **Methods** All specimens were from 20 female BALB/c mice including lung, brain, bone, ovary, etc. Immunohistochemistry methods were used respectively to detect CEAR in those tissues. **Results** CEAR was found in membrane of ependymal cells and choroid epithelial cells, in cytoplasm of respiratory bronchiole epithelial cells, alveolar cells, oocytes and follicular cells, also in cytoplasm and nuclei of osteocytes, neurons and neuroglial cells in grey matter, while not in connective tissue cells in ovary or neurons and neuroglial cells in white matter. There were significant differences in the CEAR's expression intensity ( $\chi^2 = 64.8, P < 0.01$ ). The richest CEAR was found in the oocytes and some neurons or neuroglial cells in grey matter. **Conclusion** There are significant differences in the expression of CEAR in lung, brain, bone and ovary, according to the different tissue and cells, which maybe take an important role in metastasis for those tumors with high CEA expression.

**Key words:** carcinoembryonic antigen; animal; immunohistochemistry

癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 血清水平显著升高常被认为是结肠癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤的复发和转移的预警指标, 预后更差, 但具体作用机制尚不清楚<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着癌胚抗原受体 (carcinoembryonic antigen receptor, CEAR) 结构与功能研究的逐步深入, CEA/CEAR 的肿瘤学意义再次引起关注<sup>[4]</sup>。但现有研究多局限于肝脏或库普弗细胞<sup>[5-6]</sup>, CEAR 在其他器官组织的表达尚未见确切报道。本文以免疫组化的方法, 研究 CEAR 在肺、脑、骨、卵巢等器官中的表达情况, 并探讨其肿瘤学意义。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 选择健康雌性 BALB/c 鼠 20 只, 清洁级, 8~10 周龄, 体质量 20~25 g, 平均 22 g, 由广西医科大学动物实验中心提供, 合格证号: SCXK 桂 2003-0003。将实验鼠颈椎脱臼处死, 消毒后解剖, 提取肺、脑、骨、卵巢等组织, 置入 10% 甲醛水溶液中固定以制备石蜡切片。主要试剂: 兔抗 CEA 长链多克隆抗体为美国 Millipore 公司产品, 鼠兔通用型第二抗体为上海长岛生物技术有限公司产品, DAB-HCl 显色试剂盒为北京中杉金桥生物公司产品。

**1.2 方法**

**1.2.1 免疫组化方法** 标本常规脱水, 石蜡包埋, 每例切 2 片 (随机设为研究片和对照片), 切片厚度 4  $\mu\text{m}$ , 进行免疫组化二步法染色, 主要步骤: 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; 置入枸橼酸水溶液 (0.01 mol/L, pH 6.0) 中进行抗原热修复 10 min; 用 0.3% 甲醇过氧化氢液封闭 15 min; 10% 山羊血清封闭 15 min; 研究片滴加第一抗体 (兔抗 CEA 长链多克隆抗体, 1:200 稀释), 对照组加等量 PBS 液, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜; 滴加生物素标记的第二抗体 (Supervision<sup>TM</sup>, 原液), 室温孵育 10 min; 加新鲜配制的 DAB 显色约 3 min, 苏木精轻微复染 1 min; 梯度乙醇脱水、透明、封片。

**1.2.2 结果判定方法** CEAR 阳性定位于细胞核或细胞质。采用半定量积分法判断阳性表达强度, 每例切片随机选择 5 个高倍视野 ( $\times 400$ ), 同类组织细胞中阳性细胞小于或等于 5% 为 0 分, >5%~25% 为 1 分, >25%~50% 为 2 分, >50%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分; 阳性强度呈淡黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。阳性细胞百分率和阳性强度两项积分相乘, 所得数值作为最终分级依据: 0 分为阴性 (-),  $\geq 1$  分为阳性 (+), 其中 1~4 分为 +, >4~8 分为 ++, >8 分为 +++。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS13.0 软件包, 以 Kruskal-Wallis

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560150); 广西教育厅科研资助项目 (200911LX50); 广西研究生创新计划资助项目 (2009105981002D33)。△ 通讯作者, Tel: (0771)5356529; E-mail: gaofeng0771@163.com。

检验和 Mann-Whitney 检验分别进行成组设计的多样本及两样本的比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

CEAR 在室管膜上皮和脉络丛上皮细胞的细胞膜,卵母细胞、卵泡细胞、细支气管黏膜上皮细胞和肺泡细胞的细胞质,骨细胞、部分脑灰质细胞和胶质细胞的细胞核与细胞质中呈阳性表达,而在卵巢结缔组织细胞、脑白质细胞中呈阴性表达(封 2 图 1~4)。在所有阳性组织细胞中,表达强度差异有统计学意义( $\chi^2 = 64.8, P < 0.01$ ),见表 1。其中脑灰质细胞和胶质细胞以及骨细胞表达强度较高。

表 1 CEAR 在阳性细胞中表达强度比较(全部样本比较)

细胞名称	n	+(n)	++(n)	+++ (n)	平均秩次
肺泡上皮细胞	20	15	4	1	50.3
细支气管黏膜上皮细胞	20	8	8	4	79.8
脑灰质细胞	20	1	4	15	128.7
室管膜上皮细胞	20	16	3	1	47.1
脉络丛上皮细胞	20	15	4	1	50.3
骨细胞	20	3	12	5	98.1
卵泡细胞	20	4	13	3	90.1
卵母细胞	20	1	16	3	99.6

## 3 讨 论

CEAR 本质为异构型核糖蛋白 M(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M, hnRNP),属 hnRNP 家族。有研究表明 hnRNP 与 mRNA 前体的剪切、加工、运输,甚至转录调控密切相关,部分家族成员如 A18、B1、C1/C2、K 参与了 DNA 损伤修复, A18、B1、K、P2、L 参与了肿瘤相关基因如 p53 等的表达调控,但特定种类的 hnRNP 是否对某些系列的 mRNA 有特异性的加工作用,目前还不很清楚<sup>[7-8]</sup>。美国学者 2007 年报道 hnRNP 直接参与了成纤维细胞生长因子受体 2 的外显子的识别、剪切和拼接,提示 hnRNP 对成纤维细胞的生长调控有一定作用<sup>[9]</sup>。新近有学者用双向电泳和蛋白印迹法在 HeLa 细胞中检测到微量 hnRNP,但对其生物学意义尚未做进一步研究<sup>[10]</sup>。

与此同时,人们对 hnRNP 作为 CEAR 的角色更感兴趣。研究表明,在体外培养的巨噬细胞中有 hnRNP 的两种同工型蛋白,即 P80(CEARL)和 P76(CEARS),主要分布在细胞核,用弗波脂诱导后大量向细胞膜转移,给予 CEA 刺激下可以使肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)等细胞因子分泌显著上调,且这种效应可被 CEAR 抗体阻断<sup>[5-6]</sup>。目前还不清楚巨噬细胞表面 hnRNP 介导的这些效应是否是基于 hnRNP 对特异性 mRNA 的加工机制,但足以表明 hnRNP 与 CEA 有十分密切的关系,类似情况在 hnRNPs 家族其他成员尚未见到。

本研究发现在肺、脑、骨、卵巢组织的特定细胞中 CEAR 表达为阳性,与文献报道 CEA 高表达肿瘤(以结肠癌为典型)远处转移易发生在肝,其次为肺、脑、骨、卵巢等器官相符<sup>[11-12]</sup>。在稍早的研究中,还发现胃肠黏膜上皮细胞、肝细胞、库普弗细胞、胰岛细胞内有较丰富的 CEAR 表达<sup>[13]</sup>,而这些部位的肿瘤一般都有 CEA 高表达(如结肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌等)。然而,从理论上讲 CEAR 作为 hnRNPs 家族成员应

该在体内有广泛分布,所以本研究推测:CEAR 在不同组织中的差异性表达可能与 CEA 高表达肿瘤的发生和转移有关。可能的作用机制是随血液循环进入远处器官组织的脱落癌细胞,由于其细胞膜上的 CEA 分子与靶器官细胞膜上的 CEAR 结合或黏附,增加局部滞留机会,或同时诱发一系列细胞化学反应造成局部微环境改变而逃避免疫杀伤,最终形成肿瘤远处转移。主要证据有:(1)CEA 分子可以增加癌细胞间的黏附<sup>[6]</sup>;(2)CEA 分子通过结合巨噬细胞表面 CEAR 可以诱发免疫耐受<sup>[14]</sup>;(3)阅片中发现脑皮质的浅层(分子层和外颗粒层)CEAR 表达强度微弱,而皮质与白质交接处最强(封 2 图 2),与临床多数脑转移瘤位于大脑皮质下层相符<sup>[15]</sup>;(4)临床上结肠癌肝转移灶以多发为主,是单发的 5 倍以上<sup>[12]</sup>,可能基于肝实质细胞的广泛易感性,与 CEAR 在肝内的广泛表达相一致。但也有研究结果与此不符或有冲突,认为库普弗细胞表面 CEAR 与 CEA 结合可以诱发 TNF- $\alpha$  等升高,导致癌细胞被杀伤或吞噬<sup>[5-6]</sup>。

由于本研究使用普通光学显微镜观察结果,在细胞质染色的条件下,难以判明细胞膜是否染色;且使用单一免疫组化染色和苏木素染色,尚不能区分某些需特殊染色才能区分的神经细胞;关于 CEAR 在不同组织中的差异性表达与 CEA 高表达肿瘤的发生和转移相关的结论,虽然基于广泛临床证据和科学推理,但仍需要发掘更有力的直接证据。

## 参考文献:

- [1] Ryo T, Syoichi F, Mitsuyoshi O, et al. Preoperative Serum Carcinoembryonic antigen level as a predictive factor of recurrence after curative resection of colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(12):3433-3439.
- [2] Arrieta O, Saavedra-Perez D, Kuri R, et al. Brain metastasis development and poor survival associated with carcinoembryonic antigen (CEA) level in advanced non-small cell lung cancer: a prospective analysis[J]. *BMC Cancer*, 2009 (9):119-124.
- [3] 马虎, 柏玉举, 李宁, 等. 联合检测血清 VEGF、CA125 和 CEA 对 41 例中晚期肺癌患者三维适形放疗疗效评估价值[J]. *重庆医学*, 2010, 39(4):430-431.
- [4] 赵会民, 张森, 高枫. 癌胚抗原受体: 结直肠癌肝转移研究新动向[J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(10):1072-1075.
- [5] Bajenova O, Stolper E, Gapon S, et al. Surface expression of heterogeneous nuclear RNA binding protein M4 on Kupffer cell relates to its function as a carcinoembryonic antigen receptor[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 291(1):228-241.
- [6] Arons CB, Bajenova O, Andrews C, et al. Carcinoembryonic antigen-stimulated THP-1 macrophages activate endothelial cells and increase cell-cell adhesion of colorectal cancer cells[J]. *Clin Exp Metastas*, 2007, 24(3):201-209.
- [7] Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, et al. hnRNP proteins and splicing control[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007 (623):123-147.
- [8] Haley B, Paunesku T, Protic M, et al. Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionising radiation and their involvement in DNA damage repair[J]. *Int J Radiat Biol*, 2009, 85(8):643-655. (下转第 837 页)

Ang II 是 RAS 系统的主要活性肽,它能促进左心室肥厚的形成<sup>[5]</sup>。现已证实它在 T1F 中发挥重要作用。给大鼠持续静脉输入 Ang II,可诱导肾小管萎缩,肾间质表达  $\alpha$ -SMA,胞外基质积聚<sup>[6]</sup>;也有研究发现,Ang II 可时间依赖性地增加 HK2 细胞  $\alpha$ -SMA 的表达,导致转分化的发生<sup>[7]</sup>。

近来发现 Ang-(1-7)是一种具有抗纤维化的细胞因子,其可通过抑制细胞增殖及细胞外基质积聚而发挥其抗纤维化作用。研究证实 Ang-(1-7)可抑制 Ang II 诱导的心肌肥大和间质纤维化,从而改善心肌重塑,并且可同时降低血浆中 TGF- $\beta_1$  的水平<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta_1$  能影响 NRK52E 的凋亡与增殖,导致肾纤维化的发生<sup>[9]</sup>。越来越多的研究表明,MAPK 家族成员所主导的信号通路是将细胞外生物信号转入核内,是引起细胞核生物反应的重要途径。其中以 ERK1/2 与细胞增殖反应的关系最为密切。Su 等<sup>[10]</sup>发现 Ang-(1-7)可抑制 Ang II 诱导的 P38MAPK、ERK1/2、JNK 等的磷酸化,进而减少肾近端小管细胞增殖及细胞外基质(ECM)的分泌而发挥其抑制肾纤维化的作用。

但 Ang-(1-7)能否抑制 Ang II 诱导的体外培养的 TEMT 呢?并且这一作用是通过什么途径实现的呢?TEMT 表现为细胞失去极性,失去上皮细胞标志物 E-cadherin 及表达肌成纤维细胞的标志物  $\alpha$ -SMA。本研究结果显示,在 Ang II 中同时加入 Ang-(1-7)96 h 后,Ang-(1-7)可抑制 Ang II 诱导的 NRK52E  $\alpha$ -SMA 表达增加( $P < 0.05$ ),减少 Ang II 对 E-cadherin 的表达抑制( $P < 0.05$ ),提示 Ang-(1-7)可以抑制 Ang II 诱导的 TEMT;本实验还发现,培养 72、96 h 后,Ang II 组 P-ERK1/2 的表达明显高于对照组( $P < 0.05$ );在 Ang II 中同时加入 Ang-(1-7)96 h 后,与 Ang II 组比较,P-ERK1/2 的表达明显减少( $P < 0.05$ ),提示 ERK1/2 信号通路在 Ang-(1-7)抑制转分化过程中有重要作用。

总之,本研究结果表明,Ang-(1-7)作为 Ang II 的内源性拮抗因子,可以从蛋白水平抑制 Ang II 诱导的 TEMT,并且这一作用是通过 ERK1/2 信号通路来实现的,提示 Ang-(1-7)作为 T1F 的负性调节因子,可能用于肾纤维化的治疗,从而为临床肾纤维化的防治提供新的思路和治疗靶点。

#### 参考文献:

[1] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis

(上接第 834 页)

- [9] Hovhannisyan RH, Carstens RP. Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons[J]. J Biol Chem, 2007, 282(50):36265-36274.
- [10] Hung CJ, Lee YJ, Chen DH, et al. Proteomic analysis of methylarginine-containing proteins in HeLa cells by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting with a methylarginine-specific antibody[J]. Protein J, 2009, 28(3/4):139-147.
- [11] Ettore S, Guglielmo M, Stefano M, et al. Staging of colon cancer: whole-body MRI vs whole-body PET-CT-initial clinical experience[J]. Abdom Imaging, 2008, 33(6):676-688.

and therapeutics[J]. Kidney Int, 2006, 69(2):213-217.

- [2] Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis[J]. J Mol Med, 2004, 82(3):175-181.
- [3] Chevalier RL. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy[J]. Curr Opin Pediatr, 2006, 18(2):153-160.
- [4] Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12):2282-2287.
- [5] 张莉娜,袁艳荣,孙慧丽,等. Ang II、TGF- $\beta_1$ 、MMP-1 及 TIMP-1 与原发高血压左心室肥厚的相关性研究[J]. 山东医药, 2005, 45(28):7-8.
- [6] Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, et al. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension[J]. Hypertension, 1992, 19(5):464-474.
- [7] Chen L, Liu BC, Zhang XL, et al. Influence of connective tissue growth factor antisense oligonucleotide on angiotensin II-induced epithelial mesenchymal transition in HK2 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(8):1029.
- [8] Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7)[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(2):H736-742.
- [9] 任韫卓,郝军,史永红,等. TGF- $\beta_1$  激活 Smad 信号通路影响肾小管上皮细胞的增殖与凋亡[J]. 重庆医学, 2007, 36(20):2079-2081.
- [10] Su Z, Zimpelmann J, Barns KD. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells[J]. Kidney Int, 2006, 69(12):2212-2218.

(收稿日期:2010-09-10 修回日期:2010-11-10)

- [12] 方桦,王兴元,王金斤,等. 300 例结直肠癌肝转移患者临床预后分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(3):220-221.
- [13] 赵会民,张森,高枫. 癌胚抗原受体在消化系统各器官中的表达及意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2010, 13(8):608-611.
- [14] Jessup JM, Laguinge L, Lin S, et al. Carcinoembryonic antigen induction of IL-10 and IL-6 inhibits hepatic ischemic/reperfusion injury to colorectal carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2004, 111(3):332-337.
- [15] 黄泽林,周铁英,郭祥发,等. 脑转移瘤的 CT 诊断[J]. 医用放射技术杂志, 2006, 31(5):58-59.

(收稿日期:2010-10-10 修回日期:2010-11-10)