

免疫荧光法检测 FSHR 与 GnRHR 在胃癌组织中的分布及其共定位研究

马玉涛,石文娜,李晓林,周连泉,王世军,庞泰斌

(山东省德州市人民医院消化科,山东 德州 253014)

摘要:目的 研究卵泡刺激素受体与促性腺激素释放激素受体在胃癌组织中的定位、分布及共存性。方法 选取我院胃肠外科经手术和病理证实的 48 例胃癌患者的病理组织石蜡包块标本,采用免疫荧光双标记定位方法检测胃癌标本中 FSHR 及 GnRHR 的定位及分布。结果 FSHR 和 GnRHR 在胃癌组织细胞胞浆中均有分布,免疫荧光反应阳性物质分布于细胞质,细胞核呈阴性反应,二者分布模式相同。结论 FSHR 与 GnRHR 在胃癌组织中分布具有共存性,提示其可能对胃癌的病理发生机制具有重要的影响。

关键词:卵泡刺激素受体;促性腺激素释放激素受体;免疫荧光;胃癌

中图分类号:R329;R735.2

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.23.022

文章编号:1006-1959(2018)23-0079-03

Study on the Distribution and Co-localization of FSHR and GnRHR in Gastric Cancer Tissues by Immunofluorescence Assay

MA Yu-tao, SHI Wen-na, LI Xiao-lin, ZHOU Lian-quan, WANG Shi-jun, PANG Tai-bin

(Department of Gastroenterology, Dezhou People's Hospital, Dezhou 253014, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) and gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) colocalization with at the gastric cancer. Methods Using the immunity fluorescence double mark localization method to examine in 48 example stomach cancer specimen FSHR and the GnRHR localization and the distribution. Results FSHR and GnRHR organize in the cell cytoplasm at the stomach cancer to have the distribution, the immunity fluorescence responded the masculine material distributes in the cytoplasm, the cell nucleus assumes the negative reaction, the two distributed pattern is same. Conclusion FSHR and GnRHR organize the distribution at the stomach cancer to have the coexistence, it is suggested that it may have an important effect on the pathogenesis of gastric cancer.

Key words: Follicle-stimulating hormone receptor; Gonadotropin releasing hormone receptor; Immune fluorescence; Gastric cancer

卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)是由腺垂体分泌的性激素,属于 G 蛋白偶联受体超家族的跨膜糖蛋白,通过与其受体卵泡刺激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)结合后具有促进排卵和精子的生成作用。FSHR 是一种跨膜糖蛋白,属于 G 蛋白偶联受体家族成员,近年实验研究表明,FSHR 存在于人和动物睾丸的支持细胞或卵巢颗粒细胞中,通过与 FSH 特异性结合来调节雄性青春期生精细胞的启动、成年期生精过程的维持及雌性卵细胞各阶段的发育^[1]。FSHR 在多种肿瘤新生血管内皮细胞表面呈高表达,提示 FSHR 可能是一种潜在的肿瘤标志物。而作为卵泡刺激素上游激素的促性腺激素释放激素(GnRH),通过其受体(GnRHR)调控着 FSH 的分泌,我们近期实验研究

中发现 FSH 及其受体也存在于胃癌组织中^[2],但作为其上游激素的 GnRH 是否存在于胃癌组织中以及 GnRH 对胃癌组织中存在的 FSH 的分泌调节影响是自分泌还是旁分泌,目前尚未有形态学依据。为此,我们对 FSHR、GnRHR 在胃癌组织中的分布及其是否存在共定位关系进行了实验分析研究,为探讨胃癌发生发展的病理机制提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2015 年 1 月~2018 年 1 月山东省德州市人民医院胃肠外科经手术和病理证实的 48 例胃癌患者的病理组织石蜡包块标本,年龄 41~77 岁,平均年龄(49.00±4.72)岁,性别不限。参考世界卫生组织(WHO)消化系统肿瘤(胃癌)分类,其中高分化 18 例,中分化 7 例,低分化 23 例。所有患者均为第 1 次手术,且术前未接受任何形式的放疗和化疗。并选 48 例癌旁组织作为对照。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 试剂 FITC 山羊抗小鼠及 TRITC 山羊抗兔抗体均为北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司提供。

基金项目:山东省卫生科技发展计划资助项目(编号:2017WSA14036)

作者简介:马玉涛(1981.12-),男,山东德州人,硕士,主治医师,研究方向:消化道早癌内镜下诊治、消化系统疾病诊治及研究

通讯作者:石文娜(1988.10-),女,山东德州人,硕士,医师,消化系统疾病诊治及研究

兔抗 FSHR 抗体为上海酶联生物科技有限公司提供(货号:ML 120641;规格 0.3 mg/ml),羊抗兔 GnRHR 抗体为空军军医大学黄威权教授提供(规格:0.5 mg/ml)。丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物(BAS)及(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APES)(规格:100 ml/瓶;货号:KH550)购自博士德生物工程公司(分装规格:100 ml/瓶)。选用荧光试剂原料为异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)与四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)。

1.2.2 仪器 电热恒温培养箱(DNP-9162)购于上海精宏实验设备有限公司;恒温水浴锅(HWS12)购于上海一恒科技有限公司;石蜡切片机(SYD-S2010)沈阳誉德电子仪器有限公司;显微镜(BX43)、摄像装置(Moticam Pro 252)及成像软件系统(Motic Images PFSus 2.0)均购于奥林巴斯公司。

1.3 实验方法

1.3.1 切片制备 载玻片采用挂胶片,由有经验的同一名技师进行完整切片,切片厚度均为 5 μm 。

1.3.2 免疫荧光定位及双标步骤 所有实验标本均按以下程序处理:①烤片:70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱烤片约 3 h 后原位放置 2 h。②组织脱蜡和水化:二甲苯连续脱蜡(I a I b II a II b)各 10 min;无水乙醇、95%乙醇、75%乙醇梯度脱二甲苯各 6 min,后分别用蒸馏水冲洗;③修复抗原:将配制好的 EDTA 修复液在微波炉上加热,沸腾后将脱苯的组织切片放入高压锅中,上气开始记时 2 min,关闭微波炉,冷却至室温;④血清封闭:取出切片蒸馏水冲洗后擦干,滴加 3% H_2O_2 ,湿盒内常温下静置 20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净,封闭内源性过氧化物酶;滴加正常羊血清,湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min;⑤一抗孵育:等体积 Survivin 与 Ki67 工作液混合,甩去切片上清液,滴加混合一抗,湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;⑥二抗孵育:分别滴加 TRITC 标记二抗工作液(FSHR/GnRHR 抗体):次日晨 8 时将湿盒取出并恢复至室温,将 TRITC 标记山羊抗兔 IgG 以 1:100 稀释,滴加至切片上,湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;再滴加 FITC 标记二抗工作液(FSHR/GnRHR 抗体):玻片由湿盒取出抛去水滴自然晾干 20 min,将 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 分别以 1:100/1:150 稀释后滴加至标本上,再次湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 连续冲洗 3 次,每次约 3 min;⑦封片:自然晾干后用甘油配制的封片剂封片,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

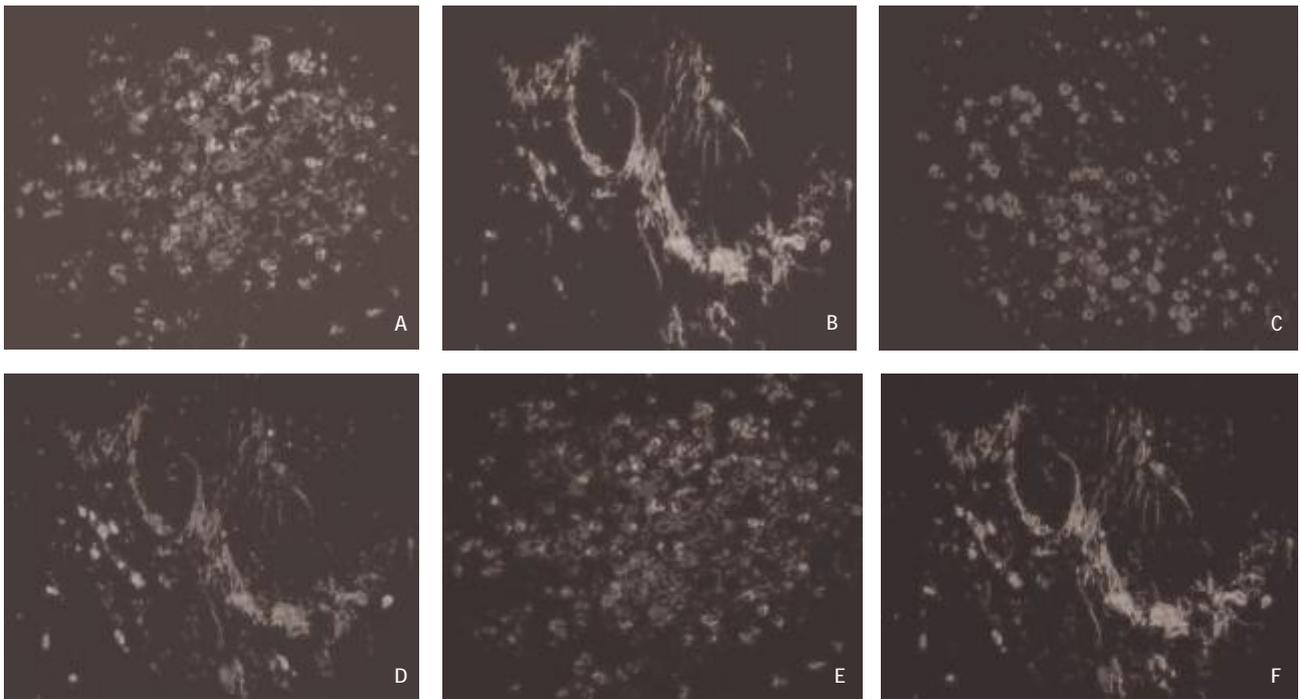
1.3.3 激光扫描共聚焦显微技术 利用激光扫描共聚焦显微镜分别观察免疫标记/双标记荧光染色结果并采集图片,具体选择参数参考如下:Laser Power:15 MW;Scanning Strength:30%;Stage Speed:2.0 mm/s;Iris:5.1;Gain:1083;Blev: -1;Z step:0.2;FITC 的激光激发波长在 480~495 nm 之间,TRITC 的激光激发波长在 543~575 nm 之间,保持上述信号在最佳实验条件下使双标图像在同一平面上准确排列。每张切片选取 3 个有代表性的区域,分别采集到红色、绿色、红/绿色叠加(或黄色)荧光照片。

2 结果

FSHR、GnRHR 在胃癌组织中的表达主要定位于胞浆、细胞核均未见免疫荧光反应阳性物质存在。绿色免疫荧光反应物质表示存在 FSHR(见图 A、图 B);红色免疫荧光反应物质表示存在 GnRHR(见图 C、图 D);一些癌组织细胞浆既呈绿色荧光反应(FSHR 阳性)又呈红色荧光反应(GnRHR 阳性),呈黄色或红绿相间荧光表示同时存在 FSHR 和 GnRHR(见图 E、图 F)。

3 讨论

20 世纪 70 年代美国学者 Folkman 提出肿瘤生长是血管依赖性的观点后,人们对下丘脑-垂体-靶腺轴激素的分布及功能进行了多学科宽领域的研究,尤其是 GnRH 及 GnRHR、FSH 及 FSHR、黄体生成素(LH)及其受体(LHR)等。研究显示 FSHR 不仅存在于卵巢癌细胞中,而且在肺癌、前列腺癌、胃癌等肿瘤中亦有分布表达,并可能参与了血管内皮生长因子(VEGF)等因子介导的肿瘤血管生成过程^[4]。Radu A 等^[9]分别采用免疫组织化学、蛋白质印迹法和原位杂交等方法检测了 FSHR 在 11 种类型 1336 例人肿瘤标本中的表达情况,结果发现其在前列腺癌、膀胱癌和肾癌等多种肿瘤均表达阳性。并且检测发现 FSHR 主要表达于距肿瘤边界约 10 mm 内的新生血管的内皮细胞中,而此范围外的正常组织和细胞上均不表达 FSHR。此外,良性病变组织如风湿性关节炎、慢性胰腺炎、普通外伤和克罗恩病等病变中均未检测到 FSHR 的表达^[4]。以上结论提示临床上 FSHR 的分布可作为肿瘤界定范围的依据^[9]。同时可以看出 FSHR 能有效区分肿瘤组织和正常组织包括炎症组织的特性,显示出其作为肿瘤体内显像剂和靶向肿瘤新生血管的潜在治疗价值。FSHR 由胞外区、胞内区及跨膜区三部分构成,FSH 与 FSHR 的胞外区相结合从而发挥作用。研究表明,FSH 可以促



注:图 A、图 B 胃癌 FSHR 荧光标记像,FSHR 阳性细胞呈灶性分布,定位于癌组织细胞的胞质和胞膜,阳性物质呈绿色荧光(FITC)×400;图 C、图 D 胃癌荧光标记像,GnRHR 阳性细胞呈灶性分布,定位于癌组织细胞的胞质和胞膜,阳性物质呈红色荧光(FITC)×400;图 E、图 F 胃癌 FSHR 与 GnRHR 荧光标记像,一些癌组织细胞既呈 GnRHR 阳性又呈 FSHR 阳性,均定位于部分癌组织细胞的胞质和胞膜,阳性物质呈黄色或红绿相间荧光(FITC)×400

图 1 FSHR、GnRHR 在胃癌组织中的表达

进卵巢癌细胞的增殖侵袭及转移,抑制卵巢癌细胞的凋亡,促进卵巢上皮癌移植瘤生长,并且 FSH 与肿瘤血管的生成密切相关^[6]。FSHR 与肿瘤血管生成的相关性,使其成为抗肿瘤血管生成治疗及肿瘤诊断的潜在的新靶点。

GnRH 最重要的生理功能是作为生殖系统的一种关键性神经调节物质,它由下丘脑神经内分泌细胞合成,以脉冲方式分泌,经下丘脑-垂体-门脉循环进入垂体前叶,并特异地与垂体促性腺细胞膜上的高亲和力受体结合,刺激 FSH 和 LH 的合成与释放,进而通过血液循环调节性腺类固醇激素的产生和配子发生。但随着研究的深入,人们发现 GnRH 及 GnRHR 不仅仅局限于下丘脑-垂体-靶腺轴之内,而且还广泛存在于下丘脑-垂体-靶腺轴之外的一些器官组织,如胎盘、乳腺、前列腺等,并对其生理功能具有调节作用。在乳腺、前列腺、卵巢、胰腺^[7]和肝发生的肿瘤细胞上也有 GnRHR 存在,并证明 GnRH 在某些肿瘤细胞能够作为自分泌调节因子,调控肿瘤细胞的生长和分化,如肝细胞癌具有自分泌 GnRH 的功能^[8]。GnRH 及 GnRHR 在多种肿瘤细胞系均有表达,并且调节多种细胞的功能,而且很可能是通过自分泌机制来调节癌细胞分化,其机制可

能是 GnRHR 数目的调节可使之与不同的 G 蛋白耦联,从而诱发多种信号转导途径继而产生多种生理功能。万美珍^[9]等通过免疫组织化学的方法发现胃癌癌细胞表达 GnRHR 说明胃癌癌细胞能分泌 GnRH 及其受体,并且随着肿瘤分化程度的升高 GnRHR 表达率明显增加,同时发现高、中分化程度的胃癌细胞 GnRHR 的染色强度明显高于低分化胃癌细胞,这表明 GnRHR 主要参与调节肿瘤细胞的增生与分化,高表达的 GnRHR 能抑制肿瘤细胞增生,促进其凋亡,这为肿瘤治疗提供了新的思路。以上观点说明 GnRH 能以旁分泌/自分泌的机制局部调节多肽类激素的分泌和类固醇激素的产生,并且多种内源性因素如 GnRH 自身、类固醇激素、激活素和抑制素等影响着 GnRHR 的转录水平和受体数量。GnRHR 在胃癌组织中表达与肿瘤转移、TNM 分期及患者预后有关。不同分化程度的胃癌组织中 GnRHR 及 EGFR 表达成一定的负相关,GnRHR 通过调控 EGFR 在胃癌的发生发展、分化及侵袭转移中发挥作用。实验中我们观察到 GnRHR 的免疫荧光信号分布不同,表明其在不同病理类型的胃癌组种种分布表达有差异的,形态学的证据说明 GnRHR 对胃癌的发生、发展、分化及侵袭转移过程中是有影

响的。

本实验采用免疫荧光化学双标记定位方法首次发现胃癌组织 GnRHR 免疫反应阳性的细胞同样呈 FSHR 免疫反应阳性。但是有少量细胞 GnRHR 免疫荧光反应阳性的呈 FSHR 免疫反应阴性。此我们推测,由胃癌组织细胞产生的 GnRH 也可能通过自分泌和旁分泌途径调节 FSH 的分泌,进而调控胃癌组织细胞的病理生理功能。这个问题还有待进一步研究证实。在实验结果中出现的 GnRHR 免疫反应阳性的细胞中只有部分细胞呈 FSHR 免疫荧光反应阳性的现象可能是由于第一抗体敏感性不同,或可能胃癌组织本身存在 FSHR 和 GnRHR 表达部位上的差异,以及癌组织病理类型有关。

综上所述,胃癌的发生发展与 FSH 及 GnRH 有一定的联系,且 FSH 可能是在 GnRH 与其受体结合后发挥作用的,胃癌组织中 FSH 的合成和释放可能也受 GnRH 以自分泌和旁分泌的方式进行调节。但目前尚不能得出肯定结论。至于机理或其传导途径如何需进一步的功能实验研究加以证实。

参考文献:

[1]Desai SS,Achrekar SK,Paranjape SR,et al.Association of allelic combinations of FSHR gene polymorphisms with ovarian re-

sponse[J].Reprod BioMedicine Online,2013,27(4):400-406.

[2]雷媛媛,马玉涛,周连泉,等.卵泡刺激素及其受体在胃窦癌的表达及免疫荧光定位[J].解剖科学进展,2016,22(1):13-15.

[3]Radu A,Pichon C,Camparo P,et al.Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels [J].N Engl J Med,2010,363(17):1621-1630.

[4]Gartrell BA,Tsao CK,Galsky MD.The follicle-stimulating hormone receptor: a novel target in genitourinary malignancies [J].Urol Oncol,2013,31(8):1403-1407.

[5]朱晨,杨润琳,杨敏.卵泡刺激素受体及其靶向药物的研究进展[J].肿瘤,2014,34(9):863-867.

[6]刘涛,任精华,伍钢.卵泡刺激素与肿瘤血管生成[J].国际肿瘤学杂志,2011,38(8):572-574.

[7]Grundker C,Ernst J,Reutter MD,et al.Effective targeted chemotherapy using AEZS-108 (AN-152) for LRHR receptor-positive pancreatic cancers[J].Oncol Rep,2011,26(3):629-635.

[8]袁彪,张金山,张远强,等.阿拉瑞林对 GnRH 受体阳性肝癌细胞 Fas/FasL 基因表达的影响[J].第三军医大学学报,2003,25(12):1065-1068.

[9]万美珍,周林艳,岳灵萍.GnRHR 和 Fas/FasL 在胃癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 肿瘤防治研究,2012,39(11):1382-1384.

收稿日期:2018-9-1;修回日期:2018-9-12

编辑/肖婷婷