

p63和 Calponin 蛋白在犬乳腺肿瘤中的表达及意义

姚华¹ 林德贵¹ 乔富强² 田克恭³ 遇秀玲³ 胡冬梅³

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 北京农学院 科技产业集团, 北京 102206;
3. 农业部兽医诊断中心, 北京 100094)

摘要 为便于确定肿瘤的组织学来源,推测其在兽医临床诊断中的鉴别意义,研究 p63 和 Calponin 蛋白在 20 例犬乳腺肿瘤(canine mammary tumor, CMT)病例中的表达,采用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC) SP 染色方法和光学显微镜观察进行确诊。结果表明,鼠抗人单克隆抗体 p63 和 Calponin 可用于犬乳腺肿瘤病例中肌上皮的表达研究,在乳头状瘤、混合瘤及腺肌上皮瘤等犬良性乳腺肿瘤组织中 p63 与 Calponin 表达为阳性或强阳性;在乳头状癌、浸润性导管癌等恶性肿瘤组织中 p63 与 Calponin 蛋白表现为阴性或局灶阳性。选择 p63 与 Calponin 作为犬乳腺肿瘤组织基底和腺肌上皮细胞的标记物有一定的敏感性和特异性,对良、恶性乳腺肿瘤组织、乳腺肿瘤或癌旁组织的来源和临床诊断等具有鉴别和指导作用。

关键词 犬乳腺肿瘤(CMT); p63; Calponin; 免疫组织化学(IHC)

中图分类号 R 730.45; S 851.4

文章编号 1007-4333(2006)03-0031-05

文献标识码 A

Expression and significance of p63 and Calponin proteins in canine mammary tumors

Yao Hua¹, Lin Degui¹, Qiao Fuqiang², Tian Kegong³, Yu Xiuling³, Hu Dongmei³

(1. College of Veterinary and Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Technology and Industry Group, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

3. National Veterinary Diagnostic Center, Beijing 100094, China)

Abstract In order to confirm the histological source of the tumor tissue and presume the significance in differential diagnosis, 20 cases of canine mammary tumor were used to investigate the expression of p63 and Calponin proteins by immunohistochemical SP method and observed by the light microscope. Results showed that the monoclonal mouse anti-human p63 and Calponin antibodies could be used to evaluate the expression of myoepithelial cells in canine mammary tumor. In benign mammary tumors, such as the papillary tumor, mixed tumor and adenomyoepithelioma, the myoepithelial cells were showed strong immunoreactivities with the p63 and Calponin proteins, and unimmunoreactivities or partially immunoreactivities with them in malignant tumor tissues of the papillary carcinoma and infiltrating ductal carcinoma. The two antibodies of p63 and Calponin were proved that they presented an excellent sensitivity and specificity for basal and myoepithelial cell being markers. They formed a good tool in clinical diagnosis and in processing the histological resources of the benign and malignant mammary tumor tissues, the tumor and the tissue around the carcinoma.

Key words Canine Mammary Tumor (CMT); p63; Calponin; Immunohistochemistry (IHC)

乳腺肿瘤是母犬最为常见的肿瘤之一,其组织发生学十分复杂,主要表现为上皮和基底细胞分化增殖的特征性变化。采用病理组织学诊断,对细胞

的形态学特征进行描述常常很难鉴别肌上皮、某些梭形乳腺上皮细胞、肌纤维母细胞、血管平滑肌细胞和某些胞质透亮的癌细胞成分^[1],因此,需要借助

收稿日期: 2006-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471275)

作者简介: 姚华,博士研究生, E-mail: vetyao@sina.com; 林德贵,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事动物肿瘤和皮肤疾病研究, E-mail: csama@sina.com

免疫组织化学的方法,选用适当的标记物来识别病变中肌上皮细胞是否存在,从而对乳腺肿瘤病例进行定性确诊。

p63 作为 p53 基因家族成员之一,可表达于多种器官的基底细胞,在犬的正常乳腺组织中只表达于肌上皮细胞^[2],而在肌纤维母细胞、血管平滑肌细胞中不表达^[1],是鉴别乳腺原位癌与浸润性癌的首选抗体。平滑肌特异蛋白 Calponin,可表达于腺肌上皮细胞^[3],是犬单纯乳腺癌上皮细胞分化的主要标记物之一^[4]。目前,p63 和 Calponin 2 种蛋白广泛应用于人类乳腺疾病的鉴别诊断中^[5],对临床治疗以及预后有一定判断作用。有学者曾分别进行过 p63 和 Calponin 在犬乳腺病例中表达的回顾性研究,证实其可作为犬乳腺组织良性损伤的标志物,表达于乳腺组织的基底或肌上皮细胞^[2-4]。在国内,犬乳腺肿瘤的病理诊断仅建立在初步组织学分类基础之上,尚未能够从免疫组织化学水平上对肿瘤的组织学来源进行确诊,不可避免地影响了临床兽医的诊断水平以及临床医生对疾病治疗和预后的判断指导。因此,本试验选用 p63 和 Calponin 2 种鼠抗人单克隆抗体,旨在研究其在犬乳腺肿瘤病例中表达的敏感性和特异性,有利于动物良、恶性肿瘤的鉴别诊断。

1 材料

1.1 肿瘤组织来源

采用中国农业大学动物医院经临床症状观察、病理组织学检查确定为乳腺肿瘤病例的 20 例患犬作为研究对象,手术摘除其肿瘤组织进行研究。所有患犬全部为自然发生病例。

1.2 单克隆抗体

选择 2 种鼠抗人单克隆抗体 p63 和 Calponin,购自中杉金桥生物技术公司(ZM-0406,ZM-0362)。抗原修复液、二抗和三抗、DAB 显色试剂盒选用中杉金桥生物技术公司产品,EDTA 修复液(ALF-906),通用 SP 试剂盒(SP-9000),DAB 试剂盒(ZLF-9032)。

2 方法

2.1 病理学诊断方法

外科手术摘除的乳腺肿瘤,去除脂肪组织后用福尔马林溶液进行固定,经脱水程序、包埋后切成 3 μm 的薄片,裱片、烘片、标记。常规 H. E. 染色用于

病理学诊断分类。

2.2 免疫组织化学检测程序

肿瘤组织经固定、脱水、包埋、切片之后,裱在挂有丙酮的组化玻片上,进行编号标记,置 37 ℃ 温箱孵育过夜。免疫组化检测程序是:

- 1) 100 ℃ 高温烤片 1 h、运行自动脱蜡程序对组织片进行脱蜡,3 % (体积分数) H₂O₂ 封闭 20 min;
- 2) 在修复盒中加入 EDTA 抗原修复液,微波大火加热 5 min 至沸腾,然后放入经过脱蜡的组化片,中火加热保持 20 min;
- 3) 从微波炉中取出修复盒,室温下冷却 20 ~ 30 min;
- 4) 从修复盒中取出组化片,蒸馏水洗 3 次,每次 5 min;
- 5) 在组织玻片上加入正常羊血清覆盖组织后放入湿盒中,37 ℃ 温箱孵育 20 min;
- 5) 甩去组织玻片上正常羊血清,滴加 p63 或 Calponin 单抗覆盖组织,4 ℃ 冰箱过夜;
- 6) 取出玻片,PBS 液洗 3 次 ×5 min,加入二抗维持 20 min;
- 7) PBS 液洗 3 次 ×5 min,加三抗维持 20 min;
- 8) PBS 液洗 3 次 ×5 min,使用 DAB 试剂盒显色 7 min,自来水冲洗终止;
- 9) 苏木素复染,常规透明,中性树胶封片。

对照片:本实验采用阴性和阳性 2 种对照,1) 阴性对照分别采用 PBS 代替一抗(p63 和 Calponin)和二抗(辣根过氧化物酶)进行对照;2) 阳性采用人乳腺肿瘤 p63 和 Calponin 阳性病例进行对照。

2.3 结果观察

使用 Olympus 光学显微镜对病理组织切片和组织化学染片进行组织细胞学观察并记录。

3 结果与分析

由表 1 可见:乳腺肿瘤患犬以德国牧羊犬(8 例)为主,占患犬总数的 40%;发病年龄集中在 10 ~ 13 岁,以 10 岁居多(5 例),占发病总数的 25%;平均发病年龄为 9.3 岁。本试验收集到的病例多为恶性肿瘤,浸润性导管癌 7 例,占全部患犬的 35%。

3.1 p63 的表达

绝大多数病例几乎所有肌上皮细胞核 p63 阳性表达,阳性细胞围绕腺泡上皮或导管上皮形成一层大致均匀间隔的点状线结构(图 1-1,2),p63 阳性表达的细胞核呈现棕色或棕黄色,散在分布,串珠状排

列。所有病例中 p63 阳性表达率为 45 % ,且阳性表达以良性肿瘤组织为主,在浸润性导管癌、乳头状癌、腺肌上皮癌以及肉瘤样癌等组织中均为阴性表达。化生性癌中表达为局灶阳性(图1-3)或全阴性。

表1 p63 和 Calponin 在犬乳腺肿瘤中的表达

Table 1 Expression of p63 and Calponin in canine mammary tumors

序号	品种	年龄/岁	病理学诊断	p63	Calponin
1	德国牧羊犬	10	乳头状癌	-	-
2	杂犬	10	浸润性导管癌	+	-
3	英国可卡犬	11	浸润性导管癌	-	-
4	京叭犬	6	浸润性导管癌	-	-
5	德国牧羊犬	1	化生性癌	+	-
6	德国牧羊犬	10	导管乳头状瘤	+	+++
7	西施犬	10	肉瘤样癌	-	-
8	德国牧羊犬	4	浸润性导管癌	-	-
9	贵妇犬	11	导管内癌	+	-
10	博美犬	13	浸润性导管癌	-	-
11	吉娃娃犬	11	浸润性导管癌	-	-
12	德国牧羊犬	7	化生性癌	+	+
13	杂犬	8	混合瘤	++	+++
14	德国牧羊犬	13	化生性癌	-	+
15	京叭犬	8	腺肌上皮瘤	++	++
16	德国牧羊犬	9	乳头状癌	-	-
17	德国牧羊犬	10	浸润性导管癌	-	+
18	日本狐狸犬	13	鳞状细胞癌	+	-
19	西施犬	9	腺肌上皮癌	-	-
20	西施犬	12	乳头状瘤	++	++

注:p63 阳性细胞数 < 5 % 为 -, 5 % ~ 25 % 为 +, 25 % ~ 50 % 为 ++, > 50 % 为 +++; Calponin 阳性范围 < 5 % 为 -, 5 % ~ 25 % 为 +, 25 % ~ 50 % 为 ++, > 50 % 为 +++。

3.2 Calponin 的表达

Calponin 在浸润性导管癌、乳头状癌、腺肌上皮癌等组织中均为阴性表达,癌旁组织中围绕腺上皮或导管形成一层扁平的镶边状结构(图1-4,5),阳性组织细胞浆显示棕色,呈不规则的圆形或环状排列(图1-6)。

4 讨论

腺癌和混合瘤是犬乳腺肿瘤的常见类型,犬复合腺瘤和混合瘤的组织学特征病变是出现有不同分化程度的上皮细胞、骨细胞、软骨细胞以及脂

肪^[6-9];因此,肌上皮细胞在乳腺良恶性疾病鉴别诊断中有重要作用,但在病理切片上有时难以识别。选用适宜的标记物协助识别肌上皮细胞是临床诊断和判断预后的主要方法。

p63 是 p53 基因家族一员,定位于 3q27 ~ 3q29,其结合域与 p53 基因有高度同源性^[10],其核抗原的免疫反应性具有一定优势,不受胞浆是否破碎的影响,阳性信号强,背景清晰易于辨认。p63 在胚胎外胚层发育中起重要作用,缺乏 p63 基因小鼠有明显发育缺陷,如毛囊、牙齿、乳腺或唾腺缺失,表皮细胞分层紊乱^[11]等。免疫组化结果显示,p63 蛋白在正常乳腺肌上皮、导管原位癌和小叶原位癌癌巢周围肌上皮、腺肌上皮细胞瘤及腺样囊性癌的细胞核中均可表达,与文献报道较为一致^[12-13]。p63 与正常的腺上皮、肌纤维母细胞及血管反应呈阴性,与肿瘤细胞的反应阳性率可达 55 %;在化生性癌中有局灶阳性表达,可能是癌细胞有基底或肌上皮细胞分化的倾向^[14]所致。本实验中,p63 在犬乳腺肿瘤组织中表达的敏感性和特异性较高,能够获得与人类肿瘤组织相似的结果,可作为兽医临床鉴别诊断犬乳腺肿瘤良恶性的主要标志物之一。

Calponin 标记肌上皮细胞呈胞浆阳性,在腺肌上皮瘤中敏感性较高,特异性较差,与肌纤维母细胞和血管的反应可达 76 % ~ 90 %,与肿瘤细胞的反应偶尔呈散在阳性,与正常的腺上皮没有反应。实验表明,浸润性癌中 Calponin 的阳性表达率为 14.28 %,在混合瘤、腺肌上皮瘤和乳头状瘤等良性肿瘤中的阳性表达率高达 100 %;因此,我们认为 Calponin 标记良性肿瘤肌上皮成分较为敏感和特异。

p63 和 Calponin 均能敏感地标记癌旁正常的乳腺组织、乳腺增生及增生性病变中的肌上皮细胞,显示连续性围绕;在导管原位癌、小叶原位癌癌巢周围,肌上皮数目减少呈间断或不连续环状;乳腺浸润性癌癌巢周围,肌上皮基本消失或无肌上皮围绕,与文献报道一致^[15]。暗示了从正常乳腺腺体、良性增生腺体到原位癌和浸润性癌腺体,肌上皮减少、消失是逐渐发展的过程。p63 和 Calponin 表达强度在正常腺体周围肌上皮最强,良性肿瘤次之,恶性肿瘤最弱,提示 p63 和 Calponin 的表达可能与肿瘤的分化程度有关。同时,导管外围肌上皮细胞增生,p63 阳性表达是良性病变的特征,但不能作为排除恶性病变的依据,应结合病理组织学切片的形态学观察、基底膜染色等多方面情况对疾病定性进行确切判断。

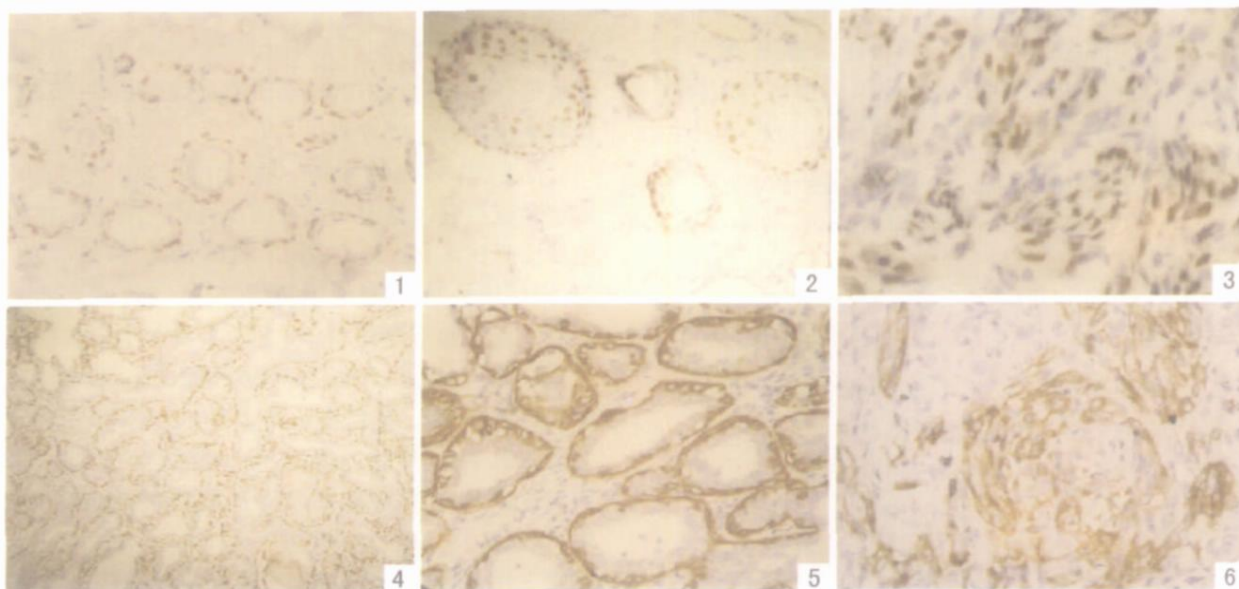


图1 p63和Calponin蛋白在犬乳腺肿瘤组织中的表达

Fig. 1 Expression of p63 and Calponin proteins in canine mammary tumor tissues

1. p63 阳性(×40):肌上皮细胞阳性显示串珠状排列,内层基底细胞显示阴性。
2. p63 阳性(×40):肌上皮成分增加,阳性细胞增多,内层基底细胞减少。
3. p63 阳性(×100):肌上皮细胞呈局灶阳性,阴性和阳性细胞互相环绕,腺肌上皮细胞同时增多。
4. Calponin 阳性(×40):癌旁组织正常的肌上皮100%表达,与其余细胞界限清楚。
5. Calponin 阳性(×200):图4的放大。
6. Calponin 阳性(×200):局灶阳性。

5 结论

本试验收集20例兽医临床自然发生的犬乳腺肿瘤病例进行p63和Calponin 2种蛋白的免疫组织化学研究,证实在免疫组化诊断中使用鼠抗人单克隆抗体是可行的,能够获得与人类乳腺肿瘤相似的免疫组化结果。p63和Calponin作为犬乳腺肿瘤基底和腺肌上皮细胞的标志物具有高度的敏感性和特异性。由于犬与人类相似的生活环境和饮食情况、相似的组织学变化,使得自然发生的犬乳腺肿瘤病例成为人类乳腺肿瘤疾病研究中最好的动物模型,因此,在兽医临床上对患犬乳腺肿瘤组织进行病理诊断、分类、免疫组化检测,制定相近的标准动物模型对于人类乳腺肿瘤的研究、治疗和预后均有重要的理论和实践指导意义。

本实验病理和组化结果是由北京军区总医院病理科丁华野教授诊断的,在此谨致谢意。

参 考 文 献

[1] Werling R W, Hwang H, Yaziji H, et al. Immunohisto-

chemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions[J]. *Am J Surg Pathol*, 2003, 27(1):82-90

[2] Gama A, Alves A, Gartner F, et al. p63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues [J]. *Vet Pathol*, 2003, 40:412-420

[3] de los Monteros A E, Millán M Y, Ordás J, et al. Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium[J]. *Vet Pathol*, 2002, 39: 247-256

[4] de las Mulas J M, Reymundo C, de los Monteros A E, et al. Calponin expression and myoepithelial cell differentiation in canine, feline and human mammary simple carcinomas[J]. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2004, 2(1): 24-35

[5] 梁建芳. 肌上皮细胞标志物p63、-SMA和Calponin在乳腺良恶性疾病中的表达及意义[J]. *山西医科大学学报*, 2005, 36(5):555-558

[6] Moulton J E. Tumors of the mammary gland [C]. *Tumors in Domestic Animals 3rd Berkeley, CA: University of California Press*, 1990:518-553

[7] Destexhe E, Lespagnard L, Degeyter M, et al. Im-

- munohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors[J]. *Vet Pathol*, 1993, 30:146-154
- [8] Gartner F, Gerald M, Cassali G, et al. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed tumours: putative evidence for a common histogenesis[J]. *Vet J*, 1999, 158:39-47
- [9] Vos J H, Van den Ingh T S, Misdorp W, et al. Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and α -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: Benign mammary tumors and duct ectasias[J]. *Vet Q*, 1993, 14:89-95
- [10] Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi M G, et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast [J]. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25: 1054-1060
- [11] Rajal B S, Ming Z, Michele L, et al. Comparison of the basal cell specific markers, 34 E12 and p63, in the diagnosis of prostate cancer [J]. *Am J Surg Pathol*, 2002, 26: 1161-1168
- [12] Papotti M, Eusebi V, Gugliotta P, et al. Immunohistochemical analysis of benign and malignant papillary lesions of the breast [J]. *Am J Surg Pathol*, 1983, 7: 451-461
- [13] Tannishtha R, Sean J, Michael F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414 (3): 105-111
- [14] 朗志强, 魏兵, 步宏. 肌上皮标记在乳腺良、恶性疾病鉴别诊断中的研究进展 [J]. *华西医学*, 2005, 20 (2): 391-392
- [15] Prasad M L, Hyjek E, Giri D D, et al. Double immunolabeling with cytokeratin and smooth muscle actin in confirming early invasive carcinoma of breast [J]. *Am J Surg*, 1999, 23: 176-181

www.cnki.net