

食管鳞癌组织中的神经纤维分布

同李平¹ 袁世发^{1,2} 丰帆¹ 杨建军¹ 张洪伟[△]

(1 第四军医大学附属西京消化病医院消化一科, 肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710015;

2 河北省武警总队医院普外科 河北 石家庄 050018)

摘要 目的 探讨食管鳞癌组织中神经纤维的分布情况。方法 应用免疫组化 ABC 法, 探查手术切除的食管鳞癌组织里 S100 及 GAP-43 阳性神经纤维的分布情况, 并分析其与患者临床病理参数的关系。结果 相对于正常组织, 食管鳞癌组织中存在相当数量的 S100 及 GAP-43 阳性神经纤维(束)不规则地分布于肿瘤细胞之间, 且 S100 阳性纤维密度大于 GAP-43 阳性纤维密度。统计分析显示肿瘤组织中纤维密度与患者的肿瘤大小、淋巴结转移相关。结论 食管鳞癌组织中确实存在神经纤维分布, 并对肿瘤发展起一定作用。

关键词 食管鳞癌 神经纤维 GAP-43 免疫组化

中图分类号 R735.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 14-2635-04

Nerve Fiber Distribution in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

TONG Li-ping¹, YUAN Shi-fa^{1,2}, FENG Fan¹, YANG Jian-jun¹, ZHANG Hong-wei[△]

(1 Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital of Digestive Diseases, State Key Laboratory of Cancer Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2 Department of General Surgery, Hospital of Hebei Province Corps of Chinese Armed Police Force, Shijiazhuang, 050018, China.)

ABSTRACT Objective: The aim of this study was to investigate the arrangement and pathological significance of immunoreactive nerve fibers in the tumor mass of human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** Frozen sections were processed for immunohistochemistry staining to detect the distribution of the intratumoral nerves visualized by antibodies against S100 and growth associated protein 43 (GAP-43). **Results:** The microscopic observations revealed plenty of S100 positive fibers and relatively minor GAP-43 positive fibers in the intratumoral zone. The statistical analysis demonstrated a significantly association between the two kinds of nerve fiber and grade of tumor invasion. **Conclusion:** Our results indicated a novel concept that nerve fibers were really existed in the tumoral area and some of them were regenerated. In addition, the distribution of nerve fibers was correlated with the depth of tumor invasion.

Key words: ESCC; Nerve fiber; GAP-43; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification (CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 14-2635-04

前言

近年来研究表明神经肽、神经营养因子等均参与肿瘤细胞的生物学行为^[1], 也有研究发现肿瘤组织内分布有一定数量的神经纤维^[2-4]。我课题组前期发现在胃癌组织中分布有 SP 阳性肽能神经纤维分布于肿瘤细胞之间, 并可见大量磷酸化 ERK1/2 免疫阳性反应的神经纤维, 呈束状或串珠状走行^[5,6], 说明了癌组织中的神经纤维呈增生状态。在此基础上, 我们分别利用泛神经标志物 S100 及再生神经标志物 GAP-43 研究了食管鳞癌组织中的神经纤维分布情况。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂

小鼠抗人 S100 单克隆抗体、兔抗人 GAP-43 多克隆抗体

及二抗分别购自 Epitomics、Abcam 和 Sigma 公司。其余试剂由本实验室自备。

1.2 标本及处理

收集 2009 年 1 月至 5 月在我科行食管鳞癌根治手术切除全层标本 29 例, 男性 24 例、女性 5 例。年龄 37-73 岁, 平均年龄 52 岁。病理诊断 低分化 3 例, 中分化 12 例, 高分化 14 例。手术切除癌组织离体 5 min 内于癌组织边缘切取约 1 cm×1 cm 大小癌组织立即置于 4% 多聚甲醛溶液, 4℃ 固定 24 h 后置于 20% 蔗糖溶液 6-8 h 至沉底。OCT 包埋后恒冷冰冻切片 (Leica CM1800) 连续切片, 片厚 12 μm, -20℃ 冰箱保存。

1.3 免疫组化 ABC 步骤

癌组织冰冻切片于 80% 甲醇中配制的 0.3% H₂O₂ 室温作用 15 分钟, 0.01 M 的 PBS (pH 7.4) 缓冲液漂洗, 5 min×3 次。正常山羊血清室温封闭 30 min。倾去血清, 勿洗, 滴加一抗后 4℃ 孵育过夜。依次加入二抗和三抗, 37℃ 各作用 30 min。DAB 显色, 苏木素复染, 封片。显微镜下观察并拍片, 图片分析软件 Image Pro Plus 6.0 分析。参照 GÜRALP O. CEYHAN et al^[7] 的方法, 计算平均神经纤维密度 (/mm²), 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。按照水平将 GAP-43 阳性纤维表达分为低表达组 (+) 和高表达组 (++)。

作者简介 同李平 (1984), 男, 硕士, 医师。主要研究方向 消化道肿瘤的发生发展及转移机制研究。电话 13891934332,

E-mail xiaotong926@126.com

△通讯作者 张洪伟, 博士生导师, E-mail zhanghw@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-02-10 接受日期 2011-03-03)

1.4 统计分析

采用 SPSS16.0 进行统计分析。对于计量资料应用 Student's T 检验或单因素方差分析；对于计数资料采用 Wilcoxon 秩和检验或者 Fisher 精确概率法。P<0.05 则具有统计学差异。

2 结果

2.1 食管鳞癌组织内可见再生神经纤维分布

正常组织中可见 GAP-43 阳性神经纤维平行分布于胃壁的粘膜下层和平滑肌层(图 1A、B),粗细均匀,形状规则。而在食管鳞癌组织中,S100 和 GAP-43 阳性神经纤维的量明显多于对应正常组织,而且 S100 阳性纤维多于 GAP-43 阳性纤维(图 1CD、EF 表 1),这些神经纤维有的分布于肿瘤细胞间,有的位于血管旁,还可见直径较大的神经纤维束(图 1 箭头所示)。

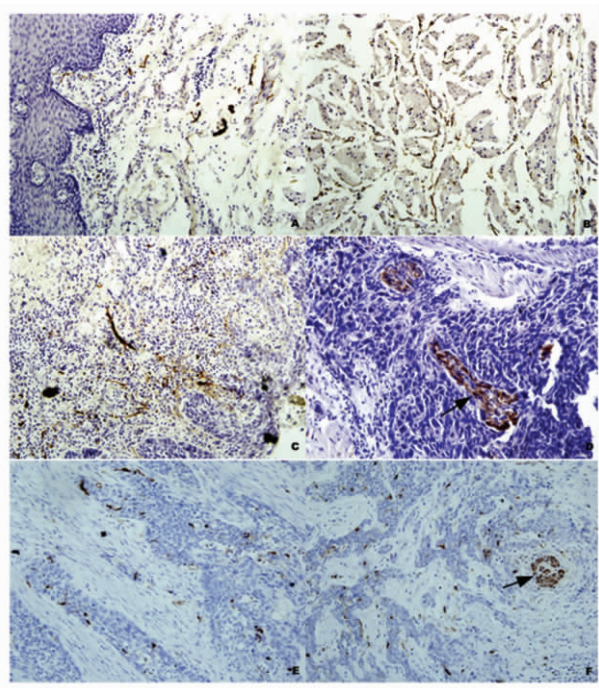


图 1 食管鳞癌中的免疫阳性神经纤维分布(200×)。A 和 B 分别表示 GAP-43 阳性纤维在正常食管粘膜下和肌层的表达 C、D 以及 E、F 分别显示的是食管鳞癌组织中的 GAP-43 阳性神经纤维和 S100 阳性神经纤维。箭头表示的是阳性神经纤维束

Fig.1 Distribution of immunoreactive nerve fibers in ESCC (200×). In normal esophageal epithelium, regularly arranged GAP-43 positive fibers can be found in submucosa (A) and lamina muscularis (B). In ESCC, however, GAP-43 (C, D) and S100 (E, F) positive nerves were spreading irregularly at all orientations. Arrowhead displayed positive nerve bundles

2.2 食管鳞癌组织内再生神经纤维密度与临床病理参数的关系

如表 2 所示,食管鳞癌组织中 GAP-43 阳性再生神经纤维密度与肿瘤大小和有无淋巴结转移有关,当肿瘤大小≥ 5× 5 cm² 或者有淋巴结转移时,GAP-43 阳性纤维密度则高,统计学显示有显著意义。但是,其他临床病理参数如患者一般情况、症状有无、肿瘤部位、分化程度及 UICC 临床分期均显示无统计学差异。

表 1 平均神经纤维密度比较(病例数 N=22)

Table 1 Comparison of mean nerve density (N=22)		
Group	Mean Nerve Density	P value
S100 (Cancer)	0.51± 0.09	
GAP-43 (Cancer)	0.38± 0.07	0.000
GAP-43 (Normal)	0.33± 0.05	0.016

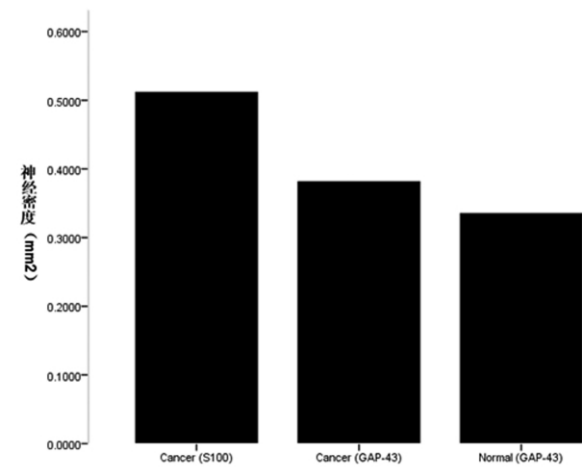


图 2 平均神经纤维密度比较(病例数 N=22)

Fig. 2 Comparison of mean nerve density (N=22)

3 讨论

胃肠道有两套神经系统支配,即植物神经系统(交感神经和副交感神经)以及肠内神经系统(粘膜下神经丛和肌间神经丛)。正常情况下,这些丰富的神经系统共同调节胃肠道运动、分泌及免疫功能。当机体出现病理损害如炎症、肿瘤时,它们也会做出相应改变来适应新环境^[8]。在胰腺癌和乳腺癌中,神经浸润(PNI)已是不争的事实,同时越来越多的神经营养因子和神经递质与肿瘤生物学行为的关系也逐渐被人们所认识^[9]。这些都提示我们神经系统可能参与了肿瘤的发生发展。

科学界过去一直认为癌组织无神经支配^[10],但近年来国外研究者利用电镜证实了在膀胱癌^[2]、黑色素瘤^[3]等确实存在神经纤维分布。国内吕双红、刘少君等^[4]通过免疫组化方法,检查外科手术取得的肿瘤标本中 10 种神经肽免疫反应性神经纤维的分布情况及其与肿瘤细胞的关系,结果发现食管鳞癌组织中存在相当数量的 GAL、SP、NPY 等多种神经肽免疫反应神经纤维走行于肿瘤细胞之间,神经纤维及其上的膨体与肿瘤细胞紧密接触,有些神经末梢甚至环绕单个肿瘤细胞。Gustavo E. Ayala et al^[11]也发现,前列腺癌及其癌前病变组织中的神经密度高于对应的正常组织,而且调节轴突导向家族中的重要分子 semaphorin 4F (S4F) 可能参与了此调节机制。本研究也发现,食管鳞癌组织内确实存在分支多、细小的免疫反应阳性神经纤维穿行于癌细胞间。在癌巢内神经分布紊乱,无明显的层次,明显不同于正常的食管壁组织神经生长规则分布于粘膜下和平滑肌层的结构特点,提示这些神经纤维的存在可能对食管鳞癌细胞的某些生物学特性起调控作用。我们前期的体外实验也证实,SP 通过与其受体 NK-1R 结合可以激活 MAPK 信号转导通

路，引起Ca²⁺内流增加，导致癌细胞增殖能力提高；相反，NK1-R拮抗剂却通过抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡发挥抗肿瘤作用^[5,12]。食管鳞癌细胞是否也存在这种现象,还需要进一步实验证实。

表 2 GAP-43 阳性神经纤维密度与临床病理参数的关系
Table 2 Correlation between mean density of GAP-43 positive nerves and pathological parameters

Parameters	N	GAP-43			P value
		-	+	++	
Total	29	7	11	11	
Gender					
Male	24	5	10	9	0.758
Female	5	2	1	2	
Age					
<60	18	5	6	7	0.877
≥ 60	11	2	5	4	
Pain					
Yes	18	5	8	5	0.256
No	11	2	3	6	
Dysphagia					
<1m	12	5	3	4	0.283
≥ 1m	17	2	8	7	
Site					
Upper	7	1	2	4	0.084
Middle	10	1	4	5	
Low	12	5	5	2	
Size					
<5× 5 cm ²	18	6	8	4	0.039
≥ 5× 5 cm ²	11	1	3	7	
Differentiation					
Well	14	4	6	4	0.352
Moderate & Poor	15	3	5	7	
pT stage					
T1 & T2	13	3	6	4	0.714
T3 & T4	16	4	5	7	
pN stage					
N0	16	6	6	4	0.049
N1 & N2	13	1	5	7	
pTNM stage					
I & II	21	6	9	6	0.118
III&IV	8	1	2	5	

GAP-43 (Growth Associated Protein-43) , 又名 B-50、F1、PP46、神经调素,是 80 年代初由 Skene 等人首先在兔再生的外周神经中获得的^[13],它是一种神经元特异性蛋白,被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子,广泛分布于大脑、小脑、脊髓、背根节以及自主神经系统的神经元内,无论是发育期、成熟期或损伤后修复期的神经元,均有 GAP-43 的特异性表达,而成神经元不表达,因此被广泛应用于神经的标记与神经再生的研究^[14]。我们的研究发现 GAP-43 阳性神经纤维的量明显少

于 S100 阳性纤维,提示在癌组织中的神经纤维至少有一部分是损伤后再生的。神经受损后,神经远端发生一系列的细胞和分子生物学变化(Wallerian 变性),包括轴突及其髓鞘的清除和施万细胞的增殖。这些未分化的施万细胞在基底膜管内形成 Bü ngner 带,并产生多种神经趋化因子和营养因子如 NGF、p75NTR 等,而这些分子能够引导及促进神经的再生^[15]。另外,本实验发现食管鳞癌组织内的 GAP-43 阳性神经纤维的多少与肿瘤大小及淋巴结转移有关,提示肿瘤体积增加或出现淋巴结转移可能会激活机体的神经-免疫-内分泌系统,该系统中某些因素(如 NGF 与 Semaphorins 水平的失衡^[16])会刺激神经纤维再生。

因此我们不难假设,肿瘤的生长可能会诱导神经纤维向肿瘤组织的生长,神经细胞本身或诱导癌细胞分泌某些细胞因子,进而影响肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡等过程,或者通过调控肿瘤组织内血管、淋巴管生成过程,从而对肿瘤的发生、发展和转移进行调控。这一神经系统和肿瘤之间相互作用的过程被德国科学家 Frank Entschladen 称为 neoneurogenesis 或 neuro-neoplastic 突触^[17,18]。另外,疼痛是许多晚期癌症患者出现的症状,提示我们肿瘤发展到一定程度时会产生神经浸润或者分泌一些介导神经性疼痛的细胞因子例如 P 物质^[19],因而引起患者的疼痛。如果我们确实证明了此类病人的癌组织周围有明显的神经纤维再生并循肿瘤边界长入癌组织并发挥相应的生物学作用如分泌疼痛介质,对于我们了解肿瘤的发生发展及癌性痛的机制和治疗将会有很大的推动。

参考文献(References)

- [1] Krü ttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias [J]. Brain Pathol, 2006 Oct; 16 (4): 304-310
- [2] Peter Seifert, Michael Benedic, Peter Effert. Nerve fibers in tumors of the human urinary bladder [J]. Virchows Arch, (2002) 440:291-297
- [3] Peter Seifert and Manfred Spitznas. Axons in Human Choroidal Melanoma Suggest the Participation of Nerves in the Control of These Tumors [J]. AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY MAY, 2002,133(5): 711-713
- [4] 吕双红,周岩,阙海萍,刘少君.食管鳞癌组织中的肽能神经支配研究[J].解剖学报,2002,33(3):249-253
Lv Shuang-hong, Zhou Yan, Que Hai-ping, Liu Shao-jun. PEP-TIDERGIC INNERVATION IN HUMAN ESOPHAGEAL CARCINOMA [J]. ACTA ANATOMICA SINICA, 2002, 33 (3): 249-253
- [5] Zhang Hongwei, Wang Weizhong, Song Junfeng, Li Kaizong. Distribution and roles of nerve fiber containing Substance P in gastric carcinoma [J]. China Journal of Modern Medicine, 2005, 15 (24): 3692-3696
- [6] 张洪伟,王为忠,宋俊峰等.人胃癌组织内神经纤维发生可塑性改变的研究[J].中国癌症杂志,2007,17(3):261-264
- [7] Zhang Heng-wei, Wang Wei-zhong, Song Jun-feng, et al. Plasticity changes of nerve fiber distributing in human gastric cancer [J]. China Oncology, 2007, 17(3): 261-264
- [7] Gü ralp O. Ceyhan, Frank Bergmann, Mustafa Kadihasanoglu, et al. Pancreatic Neuropathy and Neuropathic Pain-A Comprehensive Pathomorphological Study of 546 Cases [J]. Gastroenterology, 2009, 136: 177-186
- [8] Jackie D. Wood. Enteric nervous system neuropathy: repair and restoration [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2011, 27:000-000. DOI: 10.1097/MOG.0b013e328342a6ea
- [9] Lang K, Drell TL, Lindecke A, et al. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs [J]. Int J Cancer, 2004,112(2):231-238
- [10] Willis RA Pam. Pathology of Tumors [M]. 3rd ed. London: Butterworths, 1960: 127-147
- [11] Gustavo E. Ayala, Hong Dai, Michael Powell, et al. Cancer-Related Axonogenesis and Neurogenesis in Prostate Cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008,14(23): 7593-7603
- [12] Fan Feng, Jianjun Yang, Liping Tong et al. Substance P immuno-reactive nerve fibers are related to gastric cancer differentiation status and could promote proliferation and migration of gastric cancer cells [J]. Cell Biol Int, 2010,22[Epub ahead of print]
- [13] Skene JHP. Axonal growth associated proteins [J]. Annu RevNeurosci, 1989, 12: 127
- [14] Benowitz L.I, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity [J]. Trends Neurosci, 1997(20): 84-91
- [15] 江顺军,陶 笙.周围神经趋化性再生的研究进展[J].中华临床医学杂志,2007,8(3) 43-44
Jiang Shuan-jun, Tao Sheng. Progress in chemotactic regeneration of peripheral nerves [J]. Chinese Journal of Clinical Practical Medicine, 2007, 8(3): 43-44
- [16] Ayal Ben-Zvi, Zohar Yagil, Yamit Hagalili et al. Semaphorin 3A and neurotrophins: a balance between apoptosis and survival signaling in embryonic DRG neurons [J]. Journal of Neurochemistry, 2006, 96, 585-597
- [17] Frank Entschladen, Daniel Palm, Kerstin Lang, et al. Neoneurogenesis: Tumors may initiate their own innervation by the release of neurotrophic factors in analogy to lymphangiogenesis and neoangiogenesis[J]. Medical Hypotheses, 2006, 67, 33-35
- [18] Frank Entschladen, Daniel Palm, Bernd Niggemann, Kurt S. Zaenker. The cancer's nervous tooth: Considering the neuronal crosstalk within tumors[J]. Seminars in Cancer Biology, 2008,18: 171-175
- [19] Hyo-Jeong Lee, et al. Substance P and beta-endorphin mediate electro-acupuncture induced analgesia in mouse cancer pain model [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28(1): 102