

· 专题报道 ·

AMACR、34 E12 双重免疫组化标记在前列腺癌诊断中的应用

邢继章,徐丹枫*,郑军华,任吉忠,刘玉杉,闵志廉

(第二军医大学长征医院泌尿外科,解放军泌尿外科中心,上海 200003)

[摘要] 目的:通过与-甲酰辅酶A消旋酶(AMACR)、34 E12 抗体单独免疫组化染色效果对比,评估 AMACR/34 E12 混合双重免疫组化标记对前列腺癌(PCa)的诊断价值。方法:31 例前列腺标本,包括 PCa 18 例、良性前列腺增生(BPH) 10 例和正常前列腺标本 3 例;4 μm 连续切片,分别行 AMACR、34 E12 抗体单独免疫组化标记以及 AMACR/34 E12 双重免疫组化标记,比较单独及双重标记结果。结果:所有 PCa 标本中 34 E12 单独及双重免疫组化标记均为阴性,而在 BPH 和正常前列腺中均为阳性。PCa 中 AMACR 单独免疫组化标记的阳性率为 88.9%,而在双重免疫组化标记中 AMACR 阳性率为 94.4%。单独应用 AMACR 免疫组化标记和双重免疫组化标记对诊断 PCa 无显著差异。结论:应用 AMACR/34 E12 双重免疫组化标记对诊断 PCa 具有一定的临床意义,当标本量少以及病变部位细小局限时尤为重要。

[关键词] 前列腺肿瘤;诊断;免疫组织化学;-甲酰辅酶A消旋酶;34 E12

[中图分类号] R 737.25 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)11-1178-03

Combined immunohistochemical staining of 34 E12 and -methylacyl-coenzyme A racemase in diagnosis of prostatic carcinoma

XING Ji-zhang, XU Dan-feng*, ZHENG Jun-hua, REN Ji-zhong, LIU Yu-shan, MIN Zhi-lian (Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Urology Center of PLA, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] Objective: To assess the diagnostic value of combined staining of 34 E12 and -methylacyl-coenzyme A racemase (34 E12/AMACR) by comparing it with the values of 34 E12 and AMACR staining separately. Methods: Totally 31 prostate specimens (4 μm thickness), including 18 prostate cancer (PCa) specimens, 10 benign prostatic hyperplasia (BPH) specimens, and 3 normal prostate specimens, were subjected to 34 E12 and AMACR staining separately and a combined staining of both. The results of the 3 staining methods were compared. Results: The results of 34 E12 single staining and combined staining were negative in all 18 PCa specimens and were positive in all BPH and normal specimens. Single AMACR staining was positive in 88.9% PCa specimens. In the combined staining 94.4% PCa specimens were positively for AMACR. There was an excellent agreement between the AMACR staining profiles in the combined staining and in single AMACR staining. Conclusion: Combined 34 E12/AMACR staining possesses certain diagnostic value for PCa, especially when the sample size is small and the lesions are limited or small.

[KEY WORDS] prostate cancer; diagnosis; immunohistochemistry; -methylacyl-coenzyme A racemase; 34 E12

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1178-1180]

前列腺癌(PCa)是一种常见的恶性肿瘤。近年来,临床常应用血清前列腺特异性抗原(PSA)进行筛选检查,并对可疑病例进行前列腺穿刺活检。由于穿刺组织细小,有时仅依据 H-E 染色不能准确诊断,因此,敏感免疫组化标记分析在 PCa 的诊断中扮演了重要角色。34 E12 是前列腺基底细胞层的特异性标记物,其在 PCa 细胞的免疫组化中染色阴性^[1-3]。有研究^[4]表明另一种 PCa 的标记物-甲酰辅酶 A 消旋酶(-methylacyl-coenzyme A racemase, AMACR)在 82%~100% PCa 中过度表达。本研究分别对前列腺标本切片做 AMACR、34 E12 免疫组化标记和 AMACR/34 E12 双重免疫组化标记,并对染色结果进行比较,以评价双重免疫组化标记在 PCa 中的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2004 年 4 月到 2005 年 10 月病理确诊为 PCa 的患者 18 例,年龄 49~75 岁,平均(66.23 ± 13.12)岁;其中前列腺癌根治性切除标本 6 例,前列腺电切标本 3 例,前列腺穿刺活检标本 9 例;Gleason 评分小于 7 分 6 例,7 分及以上 12 例。同期 BPH 标本 10 例,正常前列腺标本 3 例。

1.2 试剂 AMACR(兔单克隆抗体,抗体诊断公司),34 E12(鼠单克隆抗体,DAKO 公司),EnVision 试剂即用型(DAKO 公司),3,3'-二氨基联苯胺盐酸

[作者简介] 邢继章,博士生。E-mail: jz_zhangg@sohu.com

* Corresponding author. E-mail: dfxu66@163.com

盐(DAB, Sigma 公司), EnVision[®] HRP 试剂(DAKO 公司), Streptavidin-A KP(Zymed 公司)。

1.3 免疫组化染色 所有标本 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋。4 μ m 连续切片 4 张, 分别做 H-E、AMACR、34 E12 及 AMACR/34 E12 免疫组化标记。用已购阳性切片作阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.1 AMACR、34 E12 单独免疫组化标记 采用 EnVision 法, 按公司试剂说明书方法操作。

1.3.2 AMACR/34 E12 双重免疫组化标记 石蜡切片常规脱蜡至水, PBS 洗 3 min \times 3; 抗原修复, 98 $^{\circ}$ C, 20 min, 室温中冷却 20 min, 加普通血清封闭, PBS 洗 3 min \times 3; 0.3% H₂O₂ 室温 20 min, PBS 洗 3 min \times 3; 加 AMACR (1:30) 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 min \times 3; 加 EnVision[®] HRP 试剂, 37 $^{\circ}$ C, 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; 0.04% AEC + 0.03% H₂O₂ 显色 8 min, PBS 洗 3 min \times 3; 加 20% 蛋清孵育抑制内源性生物素, PBS 洗 3 min \times 3; 加 34 E12 (1:50), 37 $^{\circ}$ C, 2 h, PBS 洗 3 min \times 3; 加生物素化羊抗兔 IgG (1:200), 37 $^{\circ}$ C, 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; 加 Streptavidin-A KP (1:200), 37 $^{\circ}$ C, 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; 0.02 mol/L, pH 9.0 TBS 洗 20 min, NBT/BCIP 显色 30~120 min, 蒸馏水洗 5 min; 核固红衬染 5 min, 水洗, 常规树脂胶封片。

1.3.3 结果判定 单独标记时, AMACR 染色阳性结果判断标准: 400 倍镜下随机观察 10 个视野, 以胞质中清晰出现 AMACR 棕黄色颗粒表达的细胞

数占细胞总数的比例作为判断标准。分 4 级, (-): 无染色细胞; (+): 阳性细胞数 < 10%; (++) : 阳性细胞数 10%~50%; (+++) : 阳性细胞数 > 50%。(++) 和 (+++) 界定为组织中 AMACR 表达阳性^[5]。34 E12 染色阳性的颗粒定位于基底细胞胞质。双重免疫组化标记时, 细胞 AMACR 表达阳性的结果表现为胞质内点状红褐色颗粒, 34 E12 阳性标记为紫蓝色, 背景呈淡红色。组织中阳性表达判定标准同上。

1.4 统计学处理 采用 χ^2 检验和秩和检验, SPSS 11.0 统计软件, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

单独、双重 34 E12 染色在所有 18 例 PCa 标本均为阳性(图 1A); 在 BPH 和正常前列腺标本中均为阳性。两种方法 AMACR 染色在所有 BPH 和正常前列腺标本中均为阴性。在 PCa 标本中, 应用 AMACR 单独免疫组化标记方法, 阴性 2 例, 均为前列腺穿刺活检标本; 阳性 16 例(图 1B), 敏感度为 88.9%。应用 AMACR/34 E12 双重免疫组化标记, AMACR 表达阴性 1 例, 为前列腺电切标本; 阳性 17 例(图 1C), 敏感度为 94.4%。应用 χ^2 检验两种方法 AMACR 诊断 PCa 的敏感度无显著差别 ($\chi^2 = 0.364, P = 0.546$); 手术方式与 AMACR 表达之间无显著相关。应用秩和检验分析两种染色结果, 均未发现 AMACR 染色与 Gleason 评分间存在相关 ($Z = -1.633, P = 0.102$)。

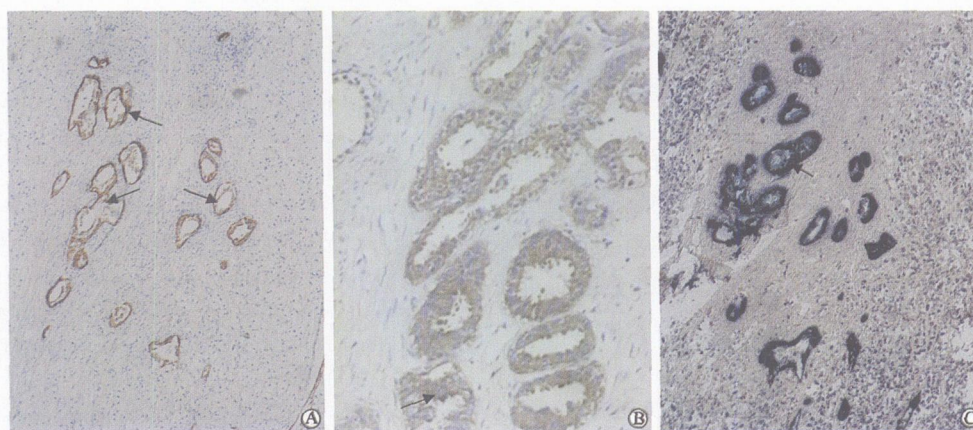


图 1 前列腺标本免疫组化染色: 34 E12 (A, $\times 40$), AMACR (B, $\times 100$), AMACR/34 E12 (C, $\times 40$)

Fig 1 Immunohistochemical staining of prostate specimens with 34 E12 (A, $\times 40$), AMACR (B, $\times 100$) and a AMACR/34 E12 cocktail (C, $\times 40$) (En Vision)

A: The residual benign prostate tissues were positive for 34 E12 staining, with brown granules in the cytoplasm (arrow). B: The prostate cancer tissues were positive of AMACR staining, with brown granules in the cytoplasm (arrow); but AMACR staining was negative in the benign prostate tissues (upper left). C: The prostate cancer tissues showed brown cytoplasmic staining of AMACR (red-brown granules), whereas the benign prostate tissues were positive for 34 E12 staining, with dark-blue granules in the cytoplasm and pink background

3 讨论

PCa 的诊断目前仍应用传统的组织学方法,包括观察组织结构,细胞核形态以及是否缺少基底细胞等^[6]。1984年,Gown等^[1]报道高分子量细胞角蛋白(主要为单克隆抗体 34 E12)是前列腺基底细胞层敏感的特异性标记物,其在良性前列腺组织中染色阳性,在 PCa 细胞中染色阴性。随后大量研究^[2,3]证实了 34 E12 免疫组化标记染色对诊断前列腺良恶性疾病具有一定的临床意义。但是,有报道显示 12%~21%的前列腺增生腺体、约 23%的前列腺萎缩腺体、50%的非典型性腺瘤样增生(AAH)腺体^[7],也可能出现基底细胞染色阴性。因此,34 E12 染色阴性并非 PCa 特异性表现。有研究发现^[5] PCa 基因 P504s(AMACR)在 PCa 中染色阳性,但是在 5%~21%前列腺增生腺体和最高达 18%的 AAH^[8]中表达也阳性。这说明单独应用 AMACR 染色不能准确诊断 PCa。

单独及双重免疫组化标记发现 AMACR 在 BPH 和正常前列腺中表达阴性,在 PCa 中的阳性表达率分别为 88.9%和 94.4%,与文献报道^[7]的 82%~100%一致。应用单独免疫组化染色和双重免疫组化染色时,PCa 中分别有 2 例和 1 例标本 AMACR 阴性表达,单纯应用该指标即会发生漏诊,因此,两者联合应用可明显提高 PCa 的诊断正确率。也有研究显示^[9,10] AMACR 与 34 E12 的联合应用有助于明确诊断前列腺穿刺标本中高分化微量 PCa 组织。

在临床实际工作中,单独应用 AMACR 和 34 E12 染色诊断 PCa 会受到一些限制。对于可疑病例常规行经直肠前列腺穿刺活检,活检标本一般较小,尤其微小 PCa(局限的, < 1 mm)的病变可能仅出现在 1~2 张切片上,再次切片时可能病变部位已经消失,不能获得对比结果。且有时因穿刺损伤,使得前列腺组织细胞形态发生变化,增加了诊断难度。因此,在同一张切片上应用混合免疫组化标记具有一定的临床应用价值。

本研究结果表明,AMACR/34 E12 双重免疫组化标记与各自单独免疫组化标记相比,染色结果基本相同、稳定,能够准确反映病变部位,无交叉干扰反应,且与手术方式无关,对前列腺穿刺活检标本也具有较好的诊断作用。因此,应用 AMACR/34 E12 双

重免疫组化标记对 PCa 具有一定的诊断价值,尤其在只有个别切片的个别切面上有癌细胞时双标具有一定的优势。本实验中未发现 AMACR 染色与 Gleason 评分之间有关,与文献报道^[11]一致。这说明其可能不能判断前列腺癌的临床分期和病理分级。

[参考文献]

- [1] Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. : Distribution of filament proteins in normal human tissues[J]. *Am J Pathol*, 1984, 114:309-321.
- [2] Helpap B, Kollermann J, Oehler U. Limiting the diagnosis of atypical small glandular proliferations in needle biopsies of the prostate by the use of immunohistochemistry[J]. *J Pathol*, 2001, 193: 350-353.
- [3] Kahane H, Sharp JW, Shuman GB, et al. Utilization of high molecular weight cytokeratin on prostate needle biopsies in an independent laboratory[J]. *Urology*, 1995, 45:981-986.
- [4] Jiang Z, Wu CL, Woda BA, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker[J]. *Histopathology*, 2004, 45:218-225.
- [5] Xu J, Stolk JA, Zhang X, et al. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray[J]. *Cancer Res*, 2000, 60:1677-1682.
- [6] Epstein JI. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy[J]. *Hum Pathol*, 1995, 26:223-229.
- [7] Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, et al. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies[J]. *Am J Surg Pathol*, 2002, 26:1588-1596.
- [8] Yang XJ, Tretiakova MS, Sengupta E, et al. Florid basal cell hyperplasia of the prostate: a histological, ultrastructural, and immunohistochemical analysis[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34:462-470.
- [9] Jiang Z, Li C, Fischer A, et al. Using an AMACR (P504S)/34 E12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens[J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 123: 231-236.
- [10] Hameed O, Sublett J, Humphrey PA. Immunohistochemical stains for p63 and alpha-methylacyl-CoA racemase, versus a cocktail comprising both, in the diagnosis of prostatic carcinoma: a comparison of the immunohistochemical staining of 430 foci in radical prostatectomy and needle biopsy tissues[J]. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29: 579-587.
- [11] Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, et al. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer[J]. *JAMA*, 2002, 287:1662-1670.

[收稿日期] 2006-03-30

[修回日期] 2006-11-02

[本文编辑] 贾泽军