

# 探讨 Secretagoin 在神经内分泌肿瘤中的表达及意义

林东亮 李玉军 邢晓明

作者单位:266003 青岛市,青岛大学医学院附属医院病理科

通讯作者:邢晓明, E-mail: edithxing@gmail.com

**【摘要】** 目的 探讨 Secretagoin 在神经内分泌肿瘤中的表达及临床意义。方法 采用免疫组织化学技术检测 49 例神经内分泌肿瘤组织中 Secretagoin、嗜铬素 A (chromogranin A, CgA)、突触素 (synaptophysin, Syn)、神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 的表达, 比较 Secretagoin 与其他三者表达的差异; 并比较 Secretagoin 在不同性别、年龄及分化情况的神经内分泌肿瘤中的表达差异。结果 在神经内分泌肿瘤组织中 Secretagoin、Syn、CgA、NSE 的阳性表达率分别为 95.92%、100.00%、46.94%、89.80%, 四者之间差异有统计学意义 ( $\chi^2=51.356, P<0.01$ ), Secretagoin 在不同性别、年龄及肿瘤分化情况中的表达差异均无统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ )。结论 在绝大多数神经内分泌肿瘤组织中 Secretagoin 呈阳性表达, 且表达敏感度要高于 CgA; Syn 是诊断神经内分泌肿瘤最敏感指标; Secretagoin 可以作为一个新的神经内分泌标记物用于临床神经内分泌肿瘤的诊断。

**【关键词】** Secretagoin; 神经内分泌; 肿瘤; 免疫组织化学

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.04.009

## The expression and significance of Secretagoin in neuroendocrinal tumors

LIN Dong-liang, LI Yu-jun, XING Xiao-ming. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China

**【Abstract】 Objective** To explore the expression and clinical significance of Secretagoin in neuroendocrinal tumors. **Methods** Immunohistochemistry was applied for detecting expression of Secretagoin, chromogranin A (CgA), synaptophysin (Syn) and neuron-specific enolase (NSE) in 49 cases of neuroendocrinal tumors. The difference between the expression of Secretagoin and that of the remaining indicators were compared. And different expression profile of Secretagoin between groups categorized by sex, age and differentiation degree were also compared. **Results** The positive expression rates of Secretagoin, CgA, Syn and NSE in neuroendocrinal tumors were 95.92%, 100.00%, 46.94% and 89.80% respectively, the differences among them were statistically significant ( $\chi^2=51.356, P<0.01$ ). Expression of Secretagoin was not correlated with the patient's sex, age and degree of differentiation ( $P$  all  $>0.05$ ). **Conclusion** Most cases of neuroendocrinal tumors are positive for Secretagoin and Secretagoin is more sensitive than CgA. Among the four indicators, Syn is the most sensitive one for diagnosis of neuroendocrinal tumors. Secretagoin can be seen as a novel neuroendocrinal marker in the clinical diagnosis of neuroendocrinal tumors.

**【Key words】** Secretagoin; Neuroendocrine; Tumors; Immuno-histochemistry

Secretagoin 是 2000 年由 Wagner 等<sup>[1]</sup>利用免疫筛选技术从人胰腺  $\beta$  细胞 cDNA 文库中筛选出来的基因, 该基因定位于染色体 6p22.1-22.3, 其转录产物经翻译后形成一种含 276 个氨基酸, 相对分子质量为  $32 \times 10^3$  的蛋白质, 该蛋白属钙离子结合蛋白, 正常情况下表达于人体各组织器官的神经内分泌细胞中。近年来, 研究<sup>[2]</sup>发现 Secretagoin 在神经内分泌肿瘤中呈高表达状态, 且与传统神经内分泌标记物嗜铬素 A (chromogranin A, CgA)、突触素 (synap-

tophysin, Syn)、神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 相同, 定位于肿瘤细胞的胞浆中, 可能是一种新型神经内分泌标记物。

神经内分泌肿瘤好发于消化道, 总体发病率低, 约占全部恶性肿瘤的 0.05%~0.2%, 占胃肠道恶性肿瘤的 0.4%~1.8%。在我国胃肠道神经内分泌肿瘤中, 以直肠神经内分泌肿瘤所占比例最高<sup>[3]</sup>, 而欧美国家胃肠道神经内分泌肿瘤则以阑尾类癌最为常见<sup>[4,5]</sup>。

CgA、Syn、NSE 均为经典神经内分泌标记物, 尤

其是 CgA, 因其广泛存在于神经内分泌细胞中, 其抗体能标记各种不同功能的神经内分泌细胞, 被认为是目前检测神经内分泌细胞特异性最高的标记物。然而, 由于其敏感性较差, 往往需要联合其他标记物进行神经内分泌肿瘤的诊断, 因此有必要开发更敏感的神经内分泌细胞标记物用于临床诊断。本文研究对 Secretagoin 标记物与传统神经内分泌标记物在诊断神经内分泌肿瘤方面的差异进行分析, 以期 Secretagoin 作为新型标记物应用于临床诊断提供实验基础。

## 1 资料和方法

**1.1 临床资料** 收集青岛大学医学院附属医院、青岛市立医院、青岛市中心医院及解放军 401 医院 2006 年 5 月-2009 年 12 月收治的 49 例神经内分泌肿瘤患者, 其中男 26 例, 女 23 例, 年龄 32~67 岁, 中位年龄 58 岁的组织标本(其中直肠 14 例, 胃 8 例, 肺 8 例, 畸胎瘤伴类癌 3 例, 回盲部、十二指肠、结肠、肾各 2 例, 食管、气管、外耳道、乳腺、纵膈、膀胱各 1 例及 2 例未知原发灶淋巴结内转移性神经内分泌肿瘤)。由于此类肿瘤大部分发生于胃肠道且全身各器官均能发生, 并没有统一的分级标准, 根据 2010 年中国胃肠胰神经内分泌肿瘤病理学诊断共识<sup>[6]</sup>将所有肿瘤分为: G1(低级别)35 例, G2(中高级别)10 例, G3(高级别)4 例。所有标本均经 40 g/L 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4  $\mu$ m 厚连续切片。所有神经内分泌肿瘤组织均经资深病理医师及免疫组化染色结果证实。

**1.2 试剂** 兔抗人 Secretagoin 多克隆抗体由浙江大学病理教研室馈赠, CgA、Syn 及 NSE 即用型一抗、PV-6000 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.3 检测方法** Secretagoin 免疫组织化学染色采用 PV-6000 法, 切片在 pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液中微波抗原修复, 一抗 1:400 稀释。CgA、Syn 及 NSE 免疫组织化学染色采用 PV-6000 法, 具体步骤严格按照试剂盒说明操作, DAB 显色。实验对照用已知阳性片(Secretagoin 胰岛组织), 见图 1; 阴性对照省略一抗, 以 PBS 代替。

**1.4 结果判断** Secretagoin、CgA、Syn、NSE 均以肿瘤细胞胞浆中出现棕黄色颗粒着色为阳性。结果评分参照以下方法。阳性细胞百分比评分: 0 分, 无阳性细胞; 1 分, 阳性细胞占 1%~10%; 2 分, 阳性细胞占 11%~50%; 3 分, 阳性细胞占 51%~80%; 4 分, 阳性细胞占 81%~100%。阳性细胞染色强度评分: 0

分, 阴性; 1 分, 弱阳性; 2 分, 中度阳性; 3 分, 强阳性。阳性细胞百分比评分与阳性细胞染色强度评分乘积即为免疫组化评分: 0 分为(-), 1~4 分为(+), 5~8 分为(++), 9~12 分为(+++)。

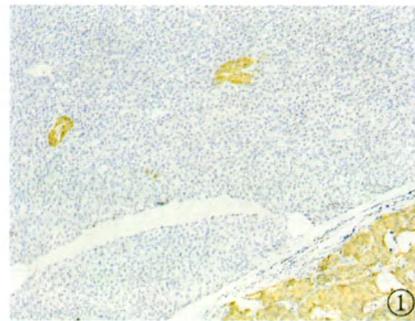


图 1 实验对照

注: 右下方为胰岛细胞瘤组织, 强表达 Secretagoin; 其余部分为瘤旁正常组织, 可见胰腺腺泡不表达 Secretagoin, 而中间灶状分布的胰岛强阳性

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 11.6 统计软件对数据进行处理, 四种标记物阳性表达率之间的比较采用 Friedman 秩和检验。Secretagoin 不同临床病例间的比较采用 Mann-Whitney U 及 Kruskal-Wallis 秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Secretagoin、Syn、CgA、NSE 四种标记物在神经内分泌肿瘤中的表达** 在神经内分泌肿瘤组织中, Secretagoin、Syn、CgA、NSE 的阳性表达率分别为 95.92%、100.00%、46.94% 和 89.80%, 四者之间表达差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 51.356, P < 0.01$ )。其中除 Secretagoin 与 NSE 之间表达无明显差异外, 其他各指标间表达两两比较, 差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 见表 1。

表 1 四种神经内分泌标记物在神经内分泌肿瘤中表达的比较

标记物	mi-mj 值	C 值	P 值
1:2	-22.5	$C_{0.05} = 19.13$	$< 0.05$
1:3	51.0	$C_{0.01} = 25.28$	$< 0.001$
1:4	1.5	$C_{0.001} = 32.58$	$> 0.05$
2:3	73.5		$< 0.001$
2:4	24.0		$< 0.05$
3:4	-49.5		$< 0.001$

注: 此表标记物中 1、2、3、4 分别代表 Secretagoin、Syn、CgA 及 NSE; mi-mj 值及 C 值根据 49 例患者的评分计算; |mi-mj| 与 C 值比较: |mi-mj|  $> C_{0.001}, P < 0.001, C_{0.05} < |mi-mj| < C_{0.01}, P < 0.05, |mi-mj| < C_{0.05}, P > 0.05$

**2.2 Secretagoin 在神经内分泌肿瘤中的表达**

Secretagoin 在大多数神经内分泌肿瘤中表达,见图 2~图 4。分析不同性别、年龄组及分化程度神经内分泌肿瘤组织中 Secretagoin 的表达情况,发现其之间

差异均无统计学意义,见表 2。

### 3 讨论

神经内分泌肿瘤是发生于摄取氨前体脱羧细胞 (APUD 细胞) 的恶性肿瘤。APUD 细胞分布甚广,因此神经内分泌肿瘤可发生于人体各个器官。本文研究中,直肠神经内分泌肿瘤占了相当大的比例 (28.57%), 与国内的报道<sup>[3]</sup>一致,与国外<sup>[4,5]</sup>不同。说明神经内分泌肿瘤的好发部位可能与入种有一定的关系,从而提示 APUD 细胞在不同人种体内分布可能具有一定差异;也可能由于环境及其他外在因素影响而导致肿瘤好发部位不同。

Secretagoin 阳性表达在细胞形态学上表现为神经内分泌细胞,其在细胞中的定位主要是位于胞浆中,但有些组织的细胞核中也可检测到该蛋白表达。以往研究<sup>[2]</sup>表明 Secretagoin 在绝大多数非神经内分泌肿瘤中不表达,而在大部分神经内分泌肿瘤中都有较好的表达,在消化道神经内分泌肿瘤及肺小细胞癌中与 CgA 的表达有明显差异。本文研究表明,绝大多数神经内分泌肿瘤组织中 Secretagoin 的表达良好,其表达程度明显高于 CgA。Syn、CgA 及 NSE 为目前经典的神经内分泌标记物。其中 CgA 免疫组织化学及血清学检测曾被认为是鉴定神经内分泌肿瘤的金标准<sup>[7-9]</sup>,但 CgA 在检测无神经内分泌颗粒或含神经内分泌颗粒少的神经内分泌肿瘤中的敏感性较差,如小细胞肺癌、垂体腺瘤、直肠癌和卵巢类癌<sup>[10-13]</sup>。本文研究中,CgA 在神经内分泌肿瘤中的表达率较低,在部分肿瘤仅为局灶的阳性表达,而 Secretagoin 在 95.92% 的神经内分泌肿瘤中呈弥漫强阳性表达,且在不同分化神经内分泌肿瘤中的表达差异均无统计学意义。Lai 等<sup>[2]</sup>研究发现,Secretagoin 在含有神经内分泌颗粒较少的小细胞肺癌中表达良好,结合本文的研究结果,认为 Secretagoin 的表达不受神经内分泌肿瘤分化程度影响,其检测神经内分泌肿瘤的敏感性要高于 CgA。本文研究中

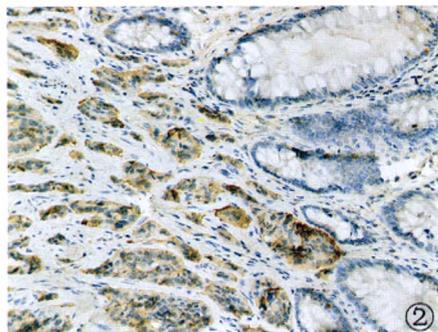


图 2 神经内分泌肿瘤细胞 Secretagoin 标记呈弥漫强阳性

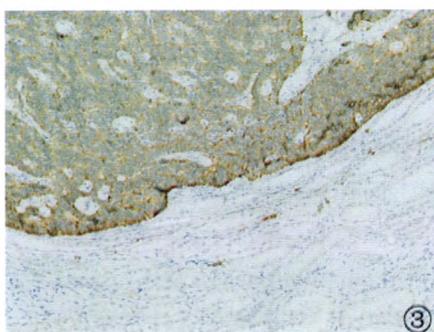


图 3 罕见的肾脏神经内分泌肿瘤

注:肿瘤细胞 Secretagoin 标记呈弥漫强阳性

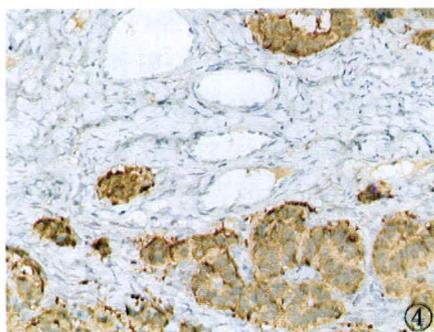


图 4 卵巢畸胎瘤合并类癌肿瘤细胞

注:卵巢畸胎瘤合并类癌肿瘤细胞 Secretagoin 标记呈弥漫强阳性。其间可见卵巢特有的间质及血管

表 2 Secretagoin 在不同临床特征神经内分泌肿瘤组织中的表达

临床特征	例数	Secretagoin 的表达				Z 值	$\chi^2$ 值	P 值	
		(-)	(+)	(++)	(+++)				
性别	男	26	1	5	7	13	-0.722	-	0.470
	女	23	1	3	5	14			
年龄	< 58	22	0	4	5	13	-0.590	-	0.555
	≥ 58	27	2	4	7	14			
肿瘤分化	G1	35	1	6	7	21	-	2.148	0.342
	G2	10	1	1	5	3			
	G3	4	0	1	0	3			

Syn 在神经内分泌肿瘤组织中的表达为 100.00%, 且大多表达强度较高, 因此 Syn 是诊断神经内分泌肿瘤比较好的标记物。但有研究<sup>[14]</sup>发现, Syn 和 CgA 在非小细胞肺癌(包括鳞癌、腺癌、腺鳞癌)阳性表达率分别为 22% 和 17.9%, 因此对神经内分泌肿瘤的诊断, Syn 及 CgA 并不是非常特异的标记物。NSE 是鉴别神经内分泌肿瘤的另一标记物, 其表达不依赖于神经内分泌颗粒, 尽管研究<sup>[15]</sup>表明 NSE 的诊断特异性较差, 但结合神经内分泌肿瘤典型的镜下形态, NSE 可以联合其他标记物用于神经内分泌肿瘤的诊断。本文研究的四种神经内分泌标记物中, Syn 的表达程度最高(100.00%), 其次为 Secretagoin(95.29%) 与 NSE(89.80%), CgA 的表达程度最低(46.94%)。Secretagoin 在神经内分泌肿瘤中并不是 100.00% 表达, 且其在神经内分泌肿瘤中的表达与患者年龄、性别及肿瘤的分化程度无关。

Birkenkamp-demtroder 等<sup>[16]</sup>研究表明, 在典型并伴有远处转移的神经内分泌肿瘤患者血浆中可检测到大量的 Secretagoin, 这可能是由于此类患者大都经过一定的治疗, 肿瘤细胞凋亡率增高, 在此过程中释放出大量的 Secretagoin, 而其他神经内分泌肿瘤患者血浆中检测不到 Secretagoin。由于其检测的下限为 6.5 pg/mL, 并不能说明在其他神经内分泌肿瘤患者血浆中无 Secretagoin 存在, 此方面还需进一步研究探讨。因此, 分析 Secretagoin 的血浆水平可能作为神经内分泌肿瘤早期诊断和治疗监测的工具。

综上所述, 由于免疫组织化学技术在神经内分泌肿瘤的诊断中起重要作用, 通过检测 Secretagoin 的表达给神经内分泌肿瘤的病理诊断提供了新的依据; 而随着对血浆中 Secretagoin 的进一步深入研究, 可能会对神经内分泌肿瘤的诊断具有一定的提示作用。

#### 4 参考文献

- 1 Wagner L, Oliyarnyk O, Gartner W, et al. Cloning and expression of secretagoin, a novel neuroendocrine and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *J Biol Chem*, 2000, 275: 24740-24751.
- 2 Lai M, Lü B, Xing X, et al. Secretagoin, a novel neuroendocrine marker, has a distinct expression pattern from chromogranin A. *Vir-*

*chows Arch*, 2006, 449: 402-409.

- 3 李建国, 杨志伟. 消化道类癌的国内外研究进展. *黑龙江医学*, 2003, 27: 182-183.
- 4 Orloff MJ. Carcinoid tumors of the rectum. *Cancer*, 1971, 28: 175-180.
- 5 Godwin JD 2nd. Carcinoid tumors. An analysis of 2837 cases. *Cancer*, 1975, 36: 560-569.
- 6 中国胃肠胰神经内分泌肿瘤病理专家组. 中国胃肠胰神经内分泌肿瘤病理学诊断共识. *中华病理学杂志*, 2011, 40: 257-262.
- 7 Scherübl H, Grabowski P. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1134-1149.
- 8 Weiler R, Fischer-colbrie R, Schmid KW, et al. Immunological studies on the occurrence and properties of chromogranin A and B and secretogranin in endocrine tumours. *Am J Surg Pathol*, 1988, 12: 877-884.
- 9 Wilson BS, Lloyd RV. Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. *Am J Pathol*, 1984, 115: 458-468.
- 10 Kimura N, Pilichowska M, Okamoto H, et al. Immunohistochemical expression of chromogranins A and B, prohormone convertases 2 and 3, and amidating enzyme in carcinoid tumours and pancreatic endocrine tumours. *Mod Pathol*, 2000, 13: 140-146.
- 11 Loy TS, Darkow CV, Quesenberry JT. Immunostaining of pulmonary neuroendocrine carcinomas. An immunohistochemical study with ultrastructural correlations. *Am J Surg Pathol*, 1995, 19: 173-182.
- 12 Mani S. Carcinoids of the rectum. *J Am Coll Surg*, 1994, 179: 231-248.
- 13 Schmid KW, Kroll M, Hittmair A, et al. Chromogranin A and B in adenomas of the pituitary. An immunohistochemical study of 42 cases. *Am J Surg Pathol*, 1991, 15: 1072-1077.
- 14 戴贇, 韩宝惠, 沈洁, 等. CgA 和 SYN 在非小细胞肺癌中的表达及与预后的关系. *上海交通大学学报(医学版)*, 2008, 28: 1101-1104.
- 15 Frank RE, Nobels, Dik J, Kwekkeboom, Willy Coopmans, et al. Chromogranin A as Serum Marker for Neuroendocrine Neoplasia; Comparison with Neuron-Specific Enolase and the  $\alpha$ -Subunit of Glycoprotein Hormones. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82: 2622-2628.
- 16 Birkenkamp-demtroder K, Wagner L, Brandt sorensen F, et al. Secretagoin is a novel marker for neuroendocrine differentiation. *Neuroendocrinology*, 2005, 82: 121-138.

(收稿日期: 2012-10-15)

(本文编辑: 张志成)

(上接第 249 页)

- 肿瘤防治杂志, 2001, 8: 175-176.
- 7 程凡菊, 崔乃强, 李忠廉. 以下消化道出血为首表现的多发性骨髓瘤. *临床误诊误治*, 2007, 20: 17.

- 8 Kyie RA, Rejkuma SV. Drug therapy: multiple myeloma. *N Engl J Med*, 2004, 351: 1860-1873.

(收稿日期: 2012-03-15)

(本文编辑: 陈淑莲)