

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520141153503

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

人胰腺癌组织中 TRIP6 蛋白的表达及
临床意义

Expression and Clinical Significance of TRIP6 Protein
in Human Pancreatic Cancer

王 闪

指导教师姓名: 王 雯 教授

导师组成员: 王 雯 张晓兰

专业名称: 内科学 (消化内科方向)

论文提交日期: 2017 年 5 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席: 陈贻胜教授

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
英文缩略词表.....	4
第一章 绪论	
1.1 研究背景.....	5
1.2 研究目的和意义.....	9
第二章 TRIP6 蛋白在不同胰腺组织中的表达	
2.1 材料与方法.....	10
2.2 结果和分析.....	12
2.3 讨论.....	15
第三章 TRIP6 蛋白在不同分化程度胰腺癌组织中的表达	
3.1 材料与方法.....	17
3.2 结果和分析.....	20
3.3 讨论.....	23
第四章 结论与展望	27
参考文献	28
致 谢	33
综 述	34

Catalogue

Chinese Abstract.....	1
English Abstract.....	2
Abbreviation.....	4
Chapter 1 Introduction	
1.1 research background.....	5
1.2 objective and meaning of research.....	9
Chapter 2 Expression of TRIP6 protein in different pancreatic tissues	
2.1 materials and methods.....	10
2.2 results and analyses	12
2.3 discussion.....	15
Chapter 3 Expression of TRIP6 protein in pancreatic cancer of various differentiation	
3.1 materials and methods.....	17
3.2 results and analyses.....	20
3.3 discussion.....	23
Chapter 4 Conclusion and prospect.....	27
References.....	28
Acknowledgement.....	33
Review.....	34

摘 要

目的: 胰腺癌是一种早期确诊率低、预后差、病死率高的恶性疾病,其发病率在全球范围内呈逐年升高趋势,但其发病机制复杂,至今尚未完全阐明。因此,提高胰腺癌的早期诊断率势在必行。TRIP6 蛋白是一种多功能调节蛋白,属于 LIM 蛋白 Zyxin 家族,文献报道与多种恶性肿瘤发病相关。本研究通过观察及分析 TRIP6 蛋白在人正常胰腺、胰腺癌前疾病及胰腺癌组织中的表达差异性,探讨 TRIP6 与胰腺癌不同发病阶段及病理类型的相关性,为发掘胰腺癌早期筛查指标、预后指示因子及基因治疗新方法的探索提供一定的实验室依据。

方法: 收集 2009 年 10 月—2016 年 10 月福州总医院手术切除的胰腺组织 96 例。分为正常胰腺组织组(16 例)、胰腺囊腺瘤组(16 例)及胰腺癌组(64 例),其中胰腺癌组细分为高分化胰腺癌组(19 例)、中分化胰腺癌组(28 例)、低分化胰腺癌组(17 例)。采用免疫组织化学染色法检测各实验组中 TRIP6 蛋白的表达情况。运用 IPP (Image-Pro Plus 6.0) 专业图像分析软件对免疫组化结果量化,并进行统计学分析,探讨组间及组内 TRIP6 蛋白的差异性表达。

结果: 正常组与胰腺囊腺瘤组无或仅有少量阳性表达,高、中、低分化胰腺导管腺癌组均有较强阳性表达。1、胰腺癌组 TRIP6 蛋白表达高于胰腺囊腺瘤组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),且明显高于正常组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。2、正常组与胰腺囊腺瘤组 TRIP6 阳性表达无差异 ($P > 0.05$)。3、低分化胰腺癌组 TRIP6 蛋白表达高于中分化胰腺癌组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),且明显高于高分化胰腺癌组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);高分化胰腺癌组与中分化胰腺组 TRIP6 蛋白阳性表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。随着分化程度的降低,TRIP6 阳性表达率呈升高趋势。

结论: 在人胰腺癌组织中 TRIP6 蛋白表达量较正常胰腺组织及胰腺囊腺瘤组织明显升高,且其在不同分化程度胰腺癌组织中的表达,随肿瘤恶性程度的增加而升高。故 TRIP6 蛋白有望作为判断胰腺癌恶性程度及预后的指示因子,且为胰腺癌的基因靶向治疗新靶点的探索提供一定的实验室依据。

关键词: 胰腺癌; 胰腺; TRIP6 蛋白; 分化程度; 免疫组化

Abstract

Objective: Pancreatic cancer is a malignant disease which has low early diagnostic rate、 poor prognosis and high mortality rate .Its incidence in the worldwide scale is increasing year by year. But the pathogenesis of pancreatic cancer is complex so it has not been clarified clearly so far. Therefore, investigations into effective methods of pancreatic cancer diagnosis are imperative. Thyroid hormone receptor interactor 6 (TRIP6) , belonging to the Zyxin family of LIM proteins, is a multifunctional adaptor protein .It is reported that TRIP6 plays a role in various of cancer progression. To investigate the different expression of TRIP6 in different disease stages and pathological types of pancreatic cancer, we observed and analyzed the expressions of TRIP6 in normal pancreatic tissues、 pre-cancerous condition and pancreatic cancer tissues, providing experimental evidences for exploring early screening indexes、 prognostic indicators and prospecting gene therapies of pancreatic cancer.

Methods: Collected 96 cases of pancreatic tissues resected in Fuzhou general hospital from October 2009 to October 2016. Divided those cases into three groups: 16 cases of normal pancreatic tissues、 16 cases of pancreatic cystadenoma and 64 cases of pancreatic cancer tissues. Then further divided pancreatic cancer into the other three groups : 19 cases of high differentiated pancreatic adenocarcinoma、 28 cases of middle differentiated pancreatic adenocarcinoma、 17 cases of low differentiated pancreatic adenocarcinoma. We employed immunohistochemistry to detect the expressions of TRIP6 in each group. Finally, we quantified immunohistochemistry results using IPP (Image-Pro Plus 6.0) professional imaging analysis system , then made a statistical analysis , discussing the differential expressions of TRIP6 in the interior - group and inter - group .

Results : The expression of TRIP6 in normal pancreatic tissues and pancreatic cystadenoma is little and it is obvious in all pathological types of pancreatic cancer. 1、 The expression of TRIP6 is higher in pancreatic cancer than that in pancreatic cystadenoma ($P<0.05$) , and is much higher than that in normal pancreatic tissues ($P<0.01$) . 2、 There is no difference between normal pancreatic tissues and pancreatic cystadenoma($P>0.05$) . 3、 The expression level of TRIP6 in low

differentiated pancreatic cancer is higher than that in middle differentiated pancreatic cancer ($P < 0.05$), and is much higher than that in high differentiated pancreatic cancer ($P < 0.01$); There is no difference between high and middle differentiated pancreatic cancer ($P > 0.05$). The expression level of TRIP6 is increased with the decrease of pathological degree of pancreatic cancer.

Conclusion: The expression of TRIP6 is much higher in pancreatic carcinoma than that in normal pancreatic tissues and pancreatic cystadenoma, and it increases with the progression of malignant tumor. Therefore, TRIP6 is likely to be an indicator of estimating the level of malignancy and prognosis of pancreatic cancer, and our study provides experimental evidences for exploring prospected gene therapies.

Key words: pancreatic cancer; pancreas; TRIP6 protein; differentiated degree; immunohistochemistry

英文缩略词表

BMI	body mass index	体质指数
IPMN	intraductal papillary mucinous neoplasm	胰腺导管内乳头状黏液肿瘤
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia	胰腺导管上皮内瘤变
MCN	mucinous cystic neoplasms	黏液性囊性肿瘤
TRIP6	thyroid hormone receptor interactor 6	甲状腺激素受体相互作用蛋白 6
ZRP-1	Zyxin-related Protein 1	Zyxin 相关蛋白 1
POT1	protection of telomeres 1	端粒保护蛋白 1
TRF2	telomeric repeat binding factor-2	端粒重复序列结合因子 2
PTPL	protein tyrosine phosphatase	蛋白酪氨酸磷酸化酶
NHL	non-hodgkin's lymphoma	非霍奇金淋巴瘤
PNI	perineural invasiveness	神经浸润
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma	胰腺导管腺癌
NES	nuclear export signal	胞核输出信号
ADM	acinar to ductal metaplasia	腺泡向腺管化生

第一章 绪论

1.1 研究背景

1.1.1 胰腺癌病因及诊治现状

胰腺癌是一种常见的消化系恶性肿瘤，近年来其发病率较以往 10 年有逐年升高的趋势，且死亡率很高。在全球范围的肿瘤致死率中，胰腺癌所占比例为 4%。在欧洲人群主要的致死疾病中，胰腺癌占有一席之地。最新数据表明，无论地域、社会经济发展、年龄、性别如何，在未来 10 年中胰腺癌的发病率、死亡率将继续上升^[1]。尽管努力数十年，胰腺癌的 5 年生存率仍只为 5%，中位生存期<1 年。

胰腺癌的病因包括：遗传因素、个人因素、环境因素和疾病因素。

a 遗传因素

(1) 基因突变及基因多态性导致遗传易感性提高。例如 MSH2、MSH6、BRCA1、BRCA 2、PMS、MLH1、APC、CF TR、PM52 等基因突变诱发多种遗传综合征，如遗传性非息肉性结肠癌、囊性纤维病变、遗传性乳腺癌、家族性结直肠息肉综合征等，可增加肿瘤发病风险，易出现胰腺癌家族遗传。有家庭病史的病人比较容易出现胰腺癌，如一级亲属患病，其他家庭成员发病危险较普通人群高 2 倍，并随患病人数增加危险性升高。

(2) 表观遗传。表观遗传学改变非单个基因的改变，而是指基因组的改变，即不改变 DNA 序列，而是改变 DNA 构造，进而影响基因转录表达。表观遗传研究即是 DNA 构型的研究，包括组蛋白、甲基蛋白与 DNA 结合，DNA 甲基化，miRNAs 等非编码 RNAs 通过各种机制调控基因表达。不同研究已证明此过程发生在多数肿瘤发生过程中^[2]。Rachagani^[3]等发现 miRNAs 异常表达可引起细胞增殖、分化、凋亡改变，进而诱发胰腺癌。DNA 甲基转移酶、组蛋白去乙酰酶抑制剂等表观遗传学药物与细胞毒药物、靶向治疗相结合，有望延长胰腺癌病人生存期^[4]。

b 个人因素

最常见的风险因素是吸烟。有 12 例病例对照研究显示吸烟者患胰腺癌的风险是不吸烟者的 2 倍，而戒烟可降低此风险^[5]。约 25%的胰腺癌患者患病可归

因于吸烟^[6]。肥胖、体质指数(Body Mass Index, BMI)偏高的人,出现胰腺癌的机率也会增高。来自 12 项队列研究、1 项病例对照研究的一项数据分析显示, BMI>35 的人患胰腺癌的风险是 BMI18.9~24.9 的人的 1.55 倍^[7]。胰腺癌发病率也随年龄增长而升高, 40 岁以下发病较少, 60~65 岁为高发年龄, 70~80 岁为高峰期^[8]。此外, 男士、高脂饮食均是恶性肿瘤的高危因素。研究证实丰富的维生素 C 摄入、饮茶、服用阿司匹林等都可能具有抑癌作用。

c 环境因素

如空气污染、气候条件、危险职业暴露等。现代工业环境中的石棉、引擎废气、电磁场、甲醛、汽油、粉尘、人造玻璃纤维等物质可能增加胰腺癌发病。金属去污和干洗行业的从业者罹患胰腺癌风险显著增高, 可能与其使用氯烃溶剂有关。此外, 苯类化合物、萘胺、有机氯化物、有机溶剂也是恶性肿瘤的危险因子。

d 疾病因素

胰腺癌发病的危险因素之一是慢性胰腺炎。研究证明, 有慢性胰腺炎病史的患者胰腺癌发病率与无胰腺炎病史的患者胰腺癌发病率比较, 相对危险度为 14。其原因可能为反复出现的慢性炎症逐渐损坏正常的生物屏障, 长期刺激导致胰腺癌。此过程涉及的分子机制可能包括染色体不稳定性及 PRSS1、PRSS2、K-ras 等基因突变; 新发糖尿病患者罹患胰腺癌的风险比正常人和糖尿病病史多年的患者高; 各种胰腺癌前疾病如胰腺囊腺瘤、胰腺导管内乳头状黏液肿瘤 (intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)、胰腺导管上皮内瘤变 (pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN) 等均可能演变为胰腺癌; 日本有研究指出胰腺囊肿患者也是胰腺癌的易发人群, 胰腺囊肿患者发生恶性肿瘤的风险是无囊肿人群的 22.5 倍。

胰腺癌形成与大肠息肉癌变形成类似, 不是突然发生的, 而是有一个发展过程, 研究指可能长达 11 年左右。一般初始是胰管发生异常改变, 后逐渐演变为胰腺癌。

癌前疾病是恶性肿瘤的发展起始阶段, 有逐渐演变为恶性肿瘤的趋势, 是采取一定治疗手段、阻止病灶进一步恶变的最佳阶段。与胰腺癌相关的癌前疾病包括 PanIN、IPMN、黏液性囊性肿瘤 (mucinous cystic neoplasms, MCN) 等。PanIN 是近年提出的新术语, 被认为是胰腺恶性肿瘤发生的早期阶段, 演变大致过程为:

正常上皮 → PanIN-1A → PanIN-1B → PanIN-2 → PanIN-3 → PDAC。Brat^[9]等发现，从各级 PanINs 发展到胰腺恶性肿瘤需 1 年半到 10 年时间。

胰腺癌诊断方法包括血清学检查、腹部超声检查、CT 检查、MRI 检查、PET/CT 检查及新兴的超声内镜 EUS 检查。虽然其诊断方法多样，但胰腺癌早期诊断率仍很低。外科手术是胰腺癌的首选治疗方式，但多数患者就诊时已处胰腺癌晚期，手术切除率仅为 10%。此外靶向治疗、化疗、放疗、生物治疗均是可供选择的治疗方法。但胰腺癌患者预后仍极差，平均生存期短，确诊后其中位生存期小于 1 年，5 年生存率 < 5%。研究表明 2006—2010 年胰腺癌连续位居我国恶性肿瘤死亡前 10 位。

1.1.2 TRIP6 蛋白与肿瘤的相关性

甲状腺激素受体相互作用蛋白 6 (thyroid hormone receptor interactor 6, TRIP6) 又称为 Zyxin 相关蛋白 1 (Zyxin-related Protein 1, ZRP-1)，是属于 LIM 蛋白 Zyxin 家族的一种调节蛋白。TRIP6 蛋白最初作为与胞核甲状腺素受体相互作用蛋白被发现，后来作为一种局部粘附分子被认识。TRIP6 可作为一个平台募集大量各种分子，参与肌动蛋白细胞骨架重组、细胞粘附、细胞迁移、抗凋亡应答及转录调控等。它可参与 LPA2- Fas/CD95 介导的细胞迁移，此由 c-Src 介导的 Tyr-55 磷酸化调控；可通过与 MAGI-1b PDZ 支架蛋白作用，提高细胞侵袭性；TRIP6 还可调节 LPA2 受体介导的抗凋亡信号途径、对抗 Fas/CD95 引起的凋亡、调节 NF- κ B 信号通路^[10]。Samantha 等^[11]发现 TRIP6 通过影响端粒蛋白复合体的端粒保护蛋白 1 (protection of telomeres 1, POT1) 和端粒重复序列结合因子 2 (telomeric repeat binding factor-2, TRF2) 行端粒保护功能。尽管 TRIP6 蛋白的很多生理学功能尚未可知，但近年很多研究已表明，TRIP6 在肿瘤进展中发挥作用，可能成为新的治疗靶点。

TRIP6 可介导多种肿瘤细胞的迁移、侵袭与增殖能力，包括鼻咽癌^[12]、尤因氏肉瘤^[13]、口腔鳞状细胞癌^[14]、卵巢癌^[15]等。在鼻咽癌细胞株中，TRIP6 mRNA 水平及蛋白质水平较正常细胞均明显升高。使正常细胞中 TRIP6 过表达可提高细胞迁移能力，而使肿瘤细胞中 TRIP6 沉默可使其迁移能力降低超过 50%^[12]。在尤因氏肉瘤细胞株中，TRIP6 水平较正常细胞升高，沉默 TRIP6 后其迁移能力降低至原来的 80%，短期 72h 之内尤因氏肉瘤细胞增殖能力无明显变化，而 72h 之后其增殖能力明显降低，到 12d 时集落数目与大小可降低近 5 倍^[13]。包括 TRIP6

在内的 Zyxin 蛋白，在口腔鳞状细胞癌中通过上调 Rac1 和 Cdc42 水平发挥促进细胞迁移和侵袭功能^[14]。TRIP6 通过磷酸化作用可使卵巢肿瘤细胞迁移能力提高近一倍，蛋白酪氨酸磷酸化酶（protein tyrosine phosphatase, PTPL）可抑制此磷酸化作用，使含 TRIP6 的卵巢肿瘤细胞迁移能力降低至约原水平^[15]。

TRIP6 还与多种肿瘤如乳腺癌^[16]、胶质母细胞瘤^[17]、非霍奇金淋巴瘤 (non-hodgkin's lymphoma, NHL)^[18] 的治疗与预后相关。恶性肿瘤治疗失败的主要原因之一是肿瘤细胞的耐药性。TRIP6 表达水平在对紫杉醇耐药的乳腺癌细胞中上调，沉默 TRIP6 后其耐药性减低，肿瘤细胞数目明显减少^[16]。TRIP6 在胶质母细胞瘤中也有表达上调，且其水平升高与临床的预后不良存在剂量相关性，敲除 TRIP6 可阻碍胶质母细胞瘤或卵巢肿瘤的增殖^[17]。Miao 等^[18]还证明了 TRIP6 在侵袭性 NHL 中的表达水平高于惰性 NHL 中的表达水平，且 TRIP6 水平与 NHL 临床预后呈负相关，即 TRIP6 表达水平越高，患者生存期越低、且更易复发。

1.1.3 TRIP6 与胰腺癌关系的国内外研究现状

大量研究表明 TRIP6 与多种肿瘤发生及进展有关，这为 TRIP6 与胰腺癌的关系研究提供了丰富的理论依据与实验基础。本课题组既往研究已从细胞及动物实验水平验证胰腺癌组织 TRIP6 mRNA 水平及蛋白表达高于正常组织，其中伴神经浸润（perineural invasiveness, PNI）动物模型组 TRIP6 mRNA 水平及蛋白表达明显高于无 PNI 组^[19]。在不同生物学特性的人胰腺癌细胞株中 TRIP6 表达存在差异性，在具有高神经浸润能力的人胰腺癌 Capan-2 细胞株中表达强于低神经浸润能力的 Panc-1 细胞株；在胰腺癌伴 PNI 的动物模型中发现 TRIP6 确有表达，且在被肿瘤浸润的神经周围强表达；抑制 TRIP6 表达可显著降低肿瘤细胞的迁移及侵袭能力，进一步证实了 TRIP6 在胰腺恶性肿瘤发生或进展中起一定作用。

TRIP6 与胰腺癌发生及进展有密不可分的联系，但可能涉及的机制尚不明确。传统的肿瘤侵袭转移的分子机制和信号传导通路包括 JAK-STAT、MAPK、Wnt、Notch 等。细胞间粘附能力的改变也可能参与了肿瘤细胞的迁移，同细胞粘附相关的细胞通路众多，如 Integrin、ILK、FAK、PI3K/Akt 等。曾有研究证明 TRIP6 与 NHL 临床预后呈负相关。使用血清饥饿法同步化 NHL 细胞株 OCI-Ly8，使其周期停在 G1/S，后加入血清，对照组 8 小时后由 G1 期进入 S 期，TRIP6-siRNA 组 12 小时后仍 G1/S。由此可见，TRIP6 可能通过调控细胞周期促进细胞增殖^[20]。TRIP6 也可绑定并激活 E3 连接酶 TRAF6，正向调控 NF- κ B、JNK 信号通路，促进 LPA

导致的肿瘤相关炎症与肿瘤进展。TRIP6 通过阻止 A20、CYLD 与 TRAF6 结合，维持 E3 连接酶 TRAF6 活性，促进 LPA 激活 NF- κ B 信号。另一方面，TRAF6 可通过与 NF- κ B p65 结合及磷酸化调控 TRIP6。即 TRIP6 与 TRAF6 共同调控 LPA2 信号通路，从而导致凋亡抵抗和细胞侵袭^[21]。近年越来越多的研究表明，多种信号通路、基因、因子或蛋白如 Ras/ERK^[22、23]、PI3K/AKT^[24、25]、Notch^[26、27]、p27^[17、28]、c-Src^[29、30]、NF- κ B^[31、32]、MMPs^[24、33] 等均可能参与 TRIP6 促进胰腺癌发生进展过程。

1.2 研究目的和意义

胰腺癌发病隐匿，由于缺乏经济、有效、便捷的筛查手段，难以进行大规模筛查，通常诊断时病情已处于晚期，且目前仍缺乏确切有效的治疗方法，故胰腺癌患者平均生存期短、病死率高，预后差。因此发掘胰腺癌筛查及预后判断的指示因子、探索新的治疗方法或基因治疗靶点，从而提高胰腺癌诊断率及改善预后迫在眉睫。

基于本课题组的既往研究基础，我们拟进一步检测 TRIP6 蛋白在人胰腺癌组织中的表达水平，并分析其在不同分化程度胰腺癌组织中的表达差异，探讨 TRIP6 与胰腺癌发生进展的相关性。目的在于探索胰腺癌筛查新指标及治疗新靶点，以做到疾病早发现、早治疗，并改善预后。

第二章 TRIP6 蛋白在不同胰腺组织中的表达

2.1 材料与方法

2.1.1 组织标本

收集 2009 年 10 月—2016 年 10 月在福建省福州市福州总医院普外科住院患者手术切除胰腺癌组织蜡块标本 64 例,病理组织类型为胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)。所有病例入选标准:(1)术前未行辅助放疗化疗;(2)所有标本均经术后病理证实。另于福建省福州市福州总医院病理科收集 2009 年 10 月—2016 年 10 月期间,术后病理证实为癌前疾病胰腺囊腺瘤的蜡块标本 16 例及胰腺癌旁组织蜡块标本 16 例作为正常组。由两位或两位以上病理医师对所有实验标本进行病理诊断。

2.1.2 实验主要试剂

二甲苯	广东省广州市俱辉化工有限公司
不同浓度乙醇(100%、95%、80%、75%、50%、30%)	广东省广州市俱辉化工有限公司
胎牛血清	福建省福州市迈新公司
抗体稀释液	福建省福州市迈新公司
兔抗人 TRIP6 多克隆抗体	ab137478, 美国 Abcam 公司
第二代即用型免疫组化 EliVision TM plus 广谱试剂盒	福建省福州市迈新公司
DAB 显色剂试剂盒	福建省福州市迈新公司
苏木素	福建省福州市迈新公司
磷酸钠盐 PBS 缓冲液	上海依赫生物科技有限公司
3% 双氧水-甲醇溶液	上海依赫生物科技有限公司
柠檬酸钠抗原修复液	上海远慕生物科技有限公司

2.1.3 实验用具及主要设备

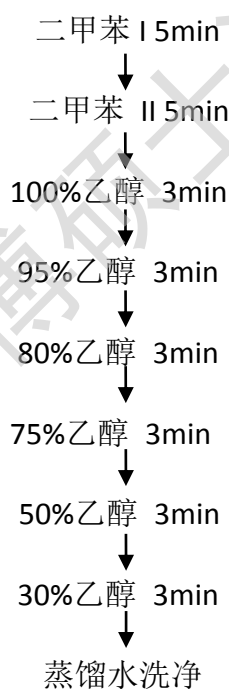
4℃冰箱	中国 Haier 公司
组织切片机	德国 Leitz 公司
玻片	福建省福州市迈新公司

玻片架	福建省福州市迈新公司
恒温烤箱	北京福意联医疗设备有限公司
移液器	上海精密仪器仪表有限公司
防水笔	福建省福州市迈新公司
封片机	西安金马医疗器械有限公司
显微镜及成像系统	日本 Olympus 公司

2.1.4 实验方法

①切片。蜡块冻存过夜后，切片机连续切片，厚度 4 μ m，载玻片捞片，晾干，放入玻片架中，65 $^{\circ}$ C 恒温箱过夜。

②脱蜡。切片上的石蜡会妨碍染色，所以在染色前需使用二甲苯、不同浓度乙醇对玻片行脱蜡处理。方法为把玻片依次放入到二甲苯、不同浓度乙醇中浸泡，后蒸馏水洗净。注意操作时手持玻片边缘，避免触及破坏组织。



③抗原修复。

在蜡块制作及切片过程中，化学试剂和热作用使抗原封闭、肽链扭曲，染色不能将其显示，故需进行抗原修复。方法为把组织玻片放入柠檬酸钠抗原修复液中，100 $^{\circ}$ C 高压水浴锅加热 15min，随后大约在 20-30min 内冷却至室温。

④玻片放入 3%双氧水-甲醇溶液，浸泡 10min，以阻断内源性过氧化物酶，减少非特异性染色。

⑤胎牛血清封闭 1 小时。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库