

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00912

• 短篇论著 •

凋亡相关蛋白 FLIP、FADD 在结直肠癌中的表达及其与细胞凋亡、增殖的关系

Expression of apoptosis associated protein FLIP, FADD in colorectal cancer and its correlation with cell apoptosis and proliferation

郭宝文¹, 李琪佳^{2*}, 杨琳¹, 夏庆安¹, 张宝良¹, 王瑞海¹

- 1. 唐山工人医院肿瘤外科, 唐山 063000
- 2. 华北煤炭医学院实验中心, 唐山 063000

[摘要] **目的** 探讨 FLIP、FADD 蛋白在结直肠癌中的表达及其与结直肠癌细胞凋亡、增殖的关系。**方法** 应用免疫组化方法检测 FLIP、FADD 和 PCNA 蛋白在 60 例结直肠癌及 35 例结肠腺瘤中的表达并经图像分析系统测量 FLIP、FADD 和 PCNA 蛋白的平均光密度(D)值。TUNEL 法检测结直肠癌细胞凋亡并计算凋亡指数(AI),以 PCNA 阳性细胞所占细胞总数的百分比作为增殖指数(PI)。**结果** FLIP、PCNA 阳性物质在结直肠癌中表达高于结肠腺瘤($P < 0.05$),而 FADD 蛋白在结直肠癌中的表达低于结肠腺瘤($P < 0.05$);结直肠癌组细胞 AI 低于腺瘤组($P < 0.05$),而 PI 高于腺瘤组。FLIP 蛋白表达与细胞 AI 负相关($r = -0.856 0, P < 0.05$),与 PI 正相关($r = 0.821 4, P < 0.05$);FADD 蛋白表达与结直肠癌细胞 AI 正相关($r = 0.900 3, P < 0.05$),与 PI 负相关($r = -0.841 1, P < 0.05$)。**结论** FLIP 蛋白可能对结直肠癌细胞有抑制凋亡、促进增殖作用,而 FADD 则相反;FLIP 高表达和 FADD 低表达可能与结直肠癌的发生发展有关。

[关键词] 结直肠肿瘤; FLIP; FADD; 细胞凋亡; 细胞增殖

[中图分类号] R 735.34 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0912-02

结直肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,其发生发展与细胞增殖失控、分化异常及细胞凋亡失衡有关。研究发现, Fas 相关死亡域样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白(Fas-associated death domain like IL-1 beta converting enzyme inhibitory protein, FLIP)过表达能抑制 Fas、TNFR-1、DR3、TRAIL-R 等介导的细胞凋亡,从而使肿瘤细胞过度生长^[1-2];而 Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas associated protein with death domain, FADD)是 Fas 系统的一个信号连接蛋白,可将膜表面受体与胞质中细胞凋亡的终末酶联接起来,从而向胞内传递凋亡信号,介导细胞凋亡^[3]。本研究应用免疫组化方法检测结直肠癌及结肠腺瘤中 FLIP、FADD 的表达,分析其异常表达与结直肠癌细胞增殖和凋亡的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集唐山市工人医院 2008 年 1 月至 2009 年 1 月存档的结直肠癌组织共 60 例,男性 34 例,女性 26 例,年龄 34~82 岁,平均(58.4 \pm 10.5)岁。其中结直肠癌 36 例,直肠癌 24 例;高分化腺瘤 48 例,黏液腺瘤 9 例,小细胞癌 3 例。所有患者术前均未接受抗肿瘤治疗。同时收集结肠腺瘤标本 35 例,年龄 28~73 岁,平均(52.2 \pm 9.4)岁。取材时均选择肿瘤表面及切面呈灰白色外观区域并行 H-E 染色、免疫组化及细胞凋亡检测。

1.2 主要试剂 即用型增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)鼠抗人单克隆抗体、浓缩型 FLIP 兔

抗人多克隆抗体(1:100)、浓缩型 FADD 兔抗人多克隆抗体(1:100)、PV 超敏试剂盒(即用型)、TUNEL 试剂盒(即用型)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组化方法 石蜡组织 4~5 μ m 连续切片,采用免疫组化聚合酶两步法(PV 法)检测结直肠癌及大肠腺瘤中 FLIP、FADD 及 PCNA 的表达。TUNEL 法(用辣根酶结合卵白素取代荧光素结合抗体)检测结直肠癌及大肠腺瘤中细胞凋亡。对照:用已知阳性乳腺癌组织作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定及图像分析 FLIP、FADD 蛋白以胞质显示棕褐色颗粒为阳性细胞标志,PCNA 以胞核显示棕黄色颗粒为阳性细胞标志。每张切片随机选取 5 个高倍($\times 200$)视野,对其中一个具有代表意义阳性结果的视野中棕褐色颗粒进行标记,以此标准自动检测所有视野的阳性结果。经 CMIAS 真彩色医学图像分析系统(北京航空航天大学)对各组免疫组化结果进行光密度检测及分析。以参数平均光密度值(D 值)代表蛋白的颗粒密度^[4]。TUNEL 法显示的凋亡细胞呈棕褐色,核浓缩,边集,大小不等,呈半月形或碎裂成片。凋亡指数(AI)的计算:每张切片连续选取 5 个高倍($\times 200$)视野,计算平均凋亡细胞所占细胞总数的百分比;增殖指数(PI)的计算:每张切片连续选取 5 个高倍($\times 200$)视野,计算平均增殖细胞(PCNA 阳性)所占细胞总数的百分比。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,用 *t* 检验及直线相关分析进行数据处理。检验水平(α)为 0.05。

[收稿日期] 2010-03-23 **[接受日期]** 2010-06-30

[作者简介] 郭宝文,副主任医师. E-mail: guobaowen8@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0315-3725276, E-mail: qjl1222@hotmail.com

2 结果

2.1 FLIP、FADD、PCNA 蛋白在结直肠癌和大肠腺瘤中的表达

FLIP、FADD 阳性物质呈棕褐色颗粒位于细胞质(图 1A、1B),弥散分布。FLIP 在结直肠癌组的表达强度(0.611 9±

0.147 8)高于腺瘤组(0.490 1±0.178 0, $P<0.05$);而 FADD 蛋白的表达强度(0.561 5±0.161 4)在结直肠癌组低于腺瘤组(0.707 7±0.142 4, $P<0.05$)。PCNA 表达阳性信号位于细胞核(图 1C),表达强度在结直肠癌组(0.803 7±0.069 5)高于腺瘤组(0.359 0±0.100 9, $P<0.05$)。

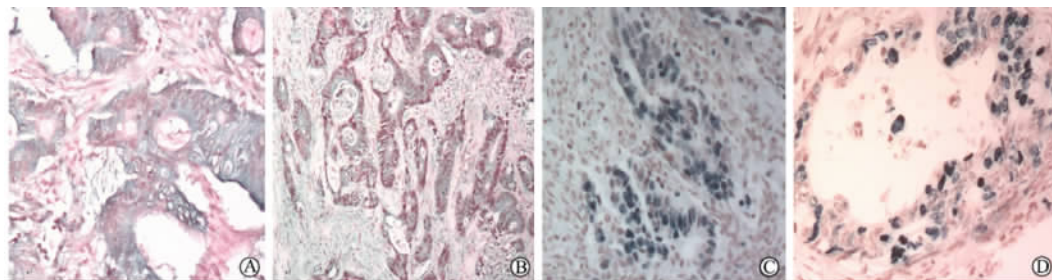


图 1 结直肠癌中 FLIP、FADD 和 PCNA 蛋白免疫组化染色及细胞凋亡检测结果

A: FLIP 蛋白阳性表达于细胞质(IHC, original magnification: ×200);B: FADD 蛋白阳性表达于细胞质(IHC, original magnification: ×100);C: PCNA 阳性表达于细胞核(IHC, original magnification: ×100);D: 结直肠癌中细胞凋亡(TUNEL, original magnification: ×100)

2.2 结直肠癌和结肠腺瘤细胞凋亡及增殖检测 本实验采用 TUNEL 法用辣根酶结合卵白素取代荧光素结合抗体,标记后的细胞在光镜下核呈棕黄色或棕褐色。结直肠癌中凋亡细胞弥漫分布,可见凋亡小体形成(图 1D)。而腺瘤细胞中也可见少量凋亡细胞。结直肠癌 AI[(20.57±7.26)%]低于腺瘤[(33.48±4.24)%, $t=-10.94$, $P<0.01$],PI[(30.49±7.61)%]高于腺瘤[(16.61±5.65)%, $t=9.37$, $P<0.01$]。

2.3 FLIP、FADD 的表达与结直肠癌细胞凋亡、增殖的关系 直线相关分析发现,FLIP 表达与 PI 正相关($r=0.821 4$, $P<0.05$),与 AI 负相关($r=-0.856 0$, $P<0.05$);FADD 表达与 PI 负相关($r=-0.841 1$, $P<0.05$),与 AI 正相关($r=0.900 3$, $P<0.05$)。表明 FLIP、FADD 的表达与结直肠癌细胞凋亡、增殖程度密切相关。但 FLIP 的阳性表达与 FADD 蛋白表达无相关关系($r=-0.045 9$, $P>0.05$)。

3 讨论

现已发现 FLIP 在多种人类肿瘤中均呈过表达状态,而对应的正常组织或良性病变中 FLIP 不表达或低水平表达^[5]。沈宏亮等^[6]报道结直肠癌 FLIP mRNA 高表达率随 Dukes 分期明显增高,而癌旁组织中 FLIP 表达明显低于癌组织。本研究结果显示,60 例结直肠癌标本中,FLIP 蛋白表达强度明显高于结肠腺瘤组织,推测 FLIP 蛋白的过量表达与结直肠癌的发生有关。

凋亡促进蛋白 FADD 是 Fas、TNFR1 和 DR3 凋亡信号途径中的必需蛋白,尤其在 Fas 凋亡信号转导过程中起着承上启下的关键作用。FADD 基因广泛存在于许多成年个体和胚胎的组织中,其在组织中表达异常与肿瘤的发生发展关系密切。本研究结果显示:FADD 蛋白在结直肠癌中的表达低于大肠腺瘤,表明其表达水平与肿瘤的良恶性有密切关系。

本实验对 60 例结直肠癌及 35 例大肠腺瘤标本进行了细胞凋亡及增殖检测,结果显示:结直肠癌组及腺瘤组均有细胞凋亡现象,结直肠癌组 AI 明显低于结肠腺瘤组,提示在结直肠癌及结肠腺瘤的发展过程中,虽然细胞凋亡是普遍存

在的,但却随着组织分化程度降低而减低;同时以 PCNA 作为增殖标记进行检测,发现结直肠癌中 PCNA 阳性表达明显高于大肠腺瘤,PI 明显高于结肠腺瘤组,说明 PCNA 的表达强度受肿瘤良恶性程度影响。相关分析发现,FLIP 的表达与 AI 负相关,与 PI 正相关;FADD 的表达与 AI 正相关,与 PI 负相关。这些结果提示 FADD 与 FLIP 的异常表达可能打破了细胞凋亡与细胞增殖的动态平衡,导致细胞凋亡受抑而表现出增殖优势,最终形成肿瘤。但是本研究发现 FADD 与 FLIP 的表达并无明显相关性,分析其原因,虽然 FADD 的表达规律与 FLIP 相反,但可能存在不同的作用途径,并不受同一个分子事件/环节的调控。

参考文献

- [1] Ryu B K, Lee M G, Chi S G, Kim Y W, Park J H. Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma[J]. J Pathol, 2001, 194: 15-19.
- [2] Dutton A, Young L S, Murray P G. The role of cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) in the pathogenesis and treatment of cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2006, 10: 27-35.
- [3] Tourneur L, Mistou S, Michiels F M, Devauchelle V, Renia L, Feunteun J, et al. Loss of FADD protein expression results in a biased Fas-signaling pathway and correlates with the development of tumoral status in thyroid follicular cells[J]. Oncogene, 2003, 22: 2795-2804.
- [4] 于萍,步宏,王华,赵高平,张景丽,周桥. 免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2003, 20: 288-290.
- [5] Nastiuk K L, Yoo K, Lo K, Su K, Yeung P, Kutaka J, et al. FLICE-like inhibitory protein blocks transforming growth factor beta 1-induced caspase activation and apoptosis in prostate epithelial cells[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6: 231-242.
- [6] 沈宏亮,丁尔迅,李松明,王皓,仇明,王强. 大肠癌组织中 cFLIP₁ mRNA 的表达及临床意义[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 154-157.
Shen H L, Ding E X, Li S M, Wang H, Qiu M, Wang Q. Expression of cellular FLICE-like inhibitory protein long form mRNA in colon cancer and its clinical significance[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28: 154-157.