

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00106

乳腺癌组织 CAS 蛋白的表达及其与细胞增殖和凋亡的关系

徐 军^{1*}, 胡 勇¹, 王 健¹, 王星星¹, 章太平¹, 余宏宇²

1. 解放军 105 医院病理科, 合肥 230031

2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

[摘要] **目的** 分析乳腺癌组织 CAS 蛋白的表达水平与细胞增殖、凋亡指数及患者临床指标的关系。**方法** 收集普通导管增生 20 例、异型导管增生 20 例、导管原位癌 10 例、浸润性导管癌 53 例、正常乳腺组织 14 例的标本, 用免疫组织化学方法观察标本组织中 CAS 蛋白的表达, 用 ki-67 标记细胞增殖指数, 用 TUNEL 法测定凋亡指数, 并进行相关统计学分析。

结果 CAS 在正常乳腺、普通导管增生、异型导管增生、导管原位癌、浸润性导管癌中的阳性率逐渐升高, 分别为 14.3% (2/14)、25.0% (0/20)、40.0% (8/20)、60.0% (6/10)、75.5% (40/53), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 29.382, P = 0.000$); CAS 的表达与乳腺浸润性导管癌患者的年龄、肿瘤大小、肿瘤分期无关, 与肿瘤的组织学分级、核分裂像、淋巴结转移有关 ($P < 0.01, P < 0.05$); CAS 评分与细胞增殖指数呈正相关 ($r = 0.439, P = 0.003$), 而与凋亡指数无相关性 ($r = 0.248, P = 0.083$)。

结论 乳腺癌组织中, CAS 的表达和细胞增殖指数间具有一定的相关性。

[关键词] 乳腺肿瘤; 细胞凋亡易感蛋白质; 免疫组织化学; 细胞凋亡

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0106-03

CAS protein expression in invasive breast ductal carcinoma and its relationship with cell proliferation and apoptosis

XU Jun^{1*}, HU Yong¹, WANG Jian¹, WANG Xing-xing¹, ZHANG Tai-ping¹, YU Hong-yu²

1. Department of Pathology, No. 105 Hospital of PLA, Hefei 230031, Anhui, China

2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To analyze the relationship of CAS protein expression with proliferative index, apoptosis index and clinical parameters in breast cancer tissues. **Methods** Immunohistochemistry for CAS expression, ki-67 (proliferative index) and TUNEL (apoptosis index) were examined in 20 usual ductal hyperplasia (UDH), 20 atypical ductal hyperplasia (ADH), 10 ductal carcinoma *in situ* (DCIS), 53 invasive ductal carcinoma (IDC) and 14 normal breast tissues. **Results** CAS expression increased in order in the normal breast tissues, UDH, ADH, DCIS and IDC, with the positive rates of CAS protein being 14.3% (2/14), 25.0% (0/20), 40.0% (8/20), 60.0% (6/10), and 75.5% (40/53), respectively ($\chi^2 = 29.382, P = 0.000$). CAS protein expression was correlated with histological grade, mitotic activity, and lymph node metastasis of IDC ($P < 0.01, P < 0.05$), and not with patient age, tumor volume or grade. CAS protein expression was positively correlated with ki-67 index ($r = 0.439, P = 0.003$), and not with the apoptosis index ($r = 0.248, P = 0.083$). **Conclusion** CAS protein expression is associated with cell proliferation index in breast cancer tissues.

[Key words] breast neoplasms; cellular apoptosis susceptibility protein; immunohistochemistry; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):106-108]

细胞凋亡易感 (cellular apoptosis susceptibility, CAS) 基因位于染色体的 20q13 区域, 与酵母染色体分离基因 (CSE1/L) 同源, 可以促进由多种化疗药物诱导的细胞凋亡^[1], 在人类多种肿瘤细胞系和实体瘤组织中表达明显增强^[2-4]。细胞的增殖和凋亡调节异常与肿瘤发生发展密切相关, 但 CAS 在乳腺癌中的表达情况研究较少, 在乳腺癌组织中, CAS 是否参与了细胞增殖和凋亡的调节还不清楚。本研究用免疫组化方法观察乳腺增生性病变和乳腺癌组织中

CAS 蛋白的表达, 探讨 CAS 的临床病理意义, 用 ki-67 标记细胞增殖指数, 用 TUNEL 法测定凋亡指数, 研究 CAS 蛋白与细胞增殖和凋亡的关系。

1 材料和方法

1.1 标本 选取 2007 年 1 月至 2010 年 1 月在解放军 105 医院确诊为女性乳腺浸润性导管癌的根治切除手术标本的存档蜡块 53 例, 患者中位年龄 51 (33~76) 岁, 术前均未接受

[收稿日期] 2011-06-20 **[接受日期]** 2011-08-15

[作者简介] 徐 军, 硕士, 主治医师。

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0551-2163253, E-mail: doctorxujun@yahoo.com.cn

化疗和放疗;另择同期普通导管增生(UDH)20例[中位年龄38(26~56)岁]、异型导管增生(ADH)20例[中位年龄43(31~60)岁]、导管原位癌(DCIS)10例[中位年龄49(32~70)岁]、正常乳腺组织14例。全部标本均经10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μm厚连续切片。

1.2 免疫组织化学法检测组织中 CAS 蛋白的表达 兔抗人 CAS 多克隆抗体购自美国 Biotech 公司,即用型鼠抗人 ki-67 单克隆抗体和 EliVision™ plus 试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。预先采用柠檬酸高温高压抗原修复,CAS 抗体工作浓度 1:400,分别按试剂盒说明设立阳性对照、阴性对照和空白对照。

1.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 TUNEL 原位检测试剂盒购自 KeyGen 公司(Cat: KGA7032),采用 BIOTIN 标记 POD 法;石蜡切片脱蜡至水,加蛋白酶 K 在 37℃ 反应 30 min,加新鲜配制的末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)反应液[45 μl 标记缓冲液、1 μl Biotin-11-dUTP、4 μl TdT],反应 60 min 后加连接辣根过氧化酶的链霉亲和素(streptavidin-HRP)避光反应 30 min,DAB 显色,苏木素复染。

1.4 结果判定 CAS 蛋白以胞质出现棕黄色颗粒为阳性,每一例分别按阳性细胞数和阳性强度进行半定量计分,阳性细胞数 0% 为 0 分,<10% 为 1 分,10%~50% 为 2 分,51%~80% 为 3 分,>80% 为 4 分;阳性强度根据染色结果分为弱阳性(1 分)、中等阳性(2 分)、强阳性(3 分),两者相乘得出总分值(0~12),分值 0~1 为一,分值 2~6 为+,分值 8~12 为++。ki-67 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性,凋亡细胞判定根据细胞核和(或)核膜染成棕黄色颗粒,并且结合组织学特点。随机计数 10 个高倍镜视野(×400),每个视野计数 100 个细胞,共计数 1 000 个肿瘤细胞,ki-67 染色阳性细胞和凋亡细胞所占百分比作为增殖指数和凋亡指数。

1.5 统计学处理 所有数据均用 SPSS 13.0 软件处理,CAS 蛋白与乳腺癌临床病理特征的关系采用 χ^2 检验,CAS 表达评分与增殖指数、凋亡指数之间的关系采用 Spearman 等级资料相关分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 乳腺良恶性病变中 CAS 蛋白的表达 CAS 在胞质中呈弥漫、均质阳性表达,在 14 例正常乳腺、20 例普通导管增生、20 例异型导管增生、10 例导管原位癌、53 例浸润性导管癌中的阳性率逐渐增高,分别为 14.3% (2/14)、25.0% (5/20)、40.0% (8/20)、60.0% (6/10)、75.5% (40/53),差异有统计学意义($\chi^2=29.382, P=0.000$,表 1)。

2.2 CAS 蛋白与乳腺癌临床病理特征的关系 如表 2 所示,CAS 蛋白的表达与浸润性导管癌患者的年龄、肿瘤大小、肿瘤分期无关,与组织学分级、核分裂像、淋巴结转移有关($P<0.01, P<0.05$)。

2.3 CAS 蛋白与细胞增殖和凋亡指数之间的关系 Spearman 等级相关分析结果表明,CAS 评分与 ki-67 指数呈正相关($r=0.439, P=0.003$),CAS 阴性组、弱阳性组、强阳性组的 ki-67 指数分别为 14.63±1.17、30.77±3.22、44.85±5.57。CAS 评分与凋亡指数无相关性($r=0.248,$

$P=0.083$),CAS 阴性组、弱阳性组、强阳性组的凋亡指数分别为 1.65±0.17、1.89±0.32、2.07±0.52。

表 1 正常乳腺、乳腺增生性病变及乳腺癌中 CAS 蛋白的表达

分组	N	CAS			n
		-	+	++	
正常乳腺	14	12	2	0	
普通导管增生	20	15	4	1	
异型导管增生	20	12	4	4	
导管原位癌	10	4	2	4	
浸润性导管癌	53	13	19	21	

CAS: 细胞凋亡易感基因

表 2 CAS 蛋白与浸润性导管癌临床病理特征的关系

临床参数	N	CAS			χ^2	P
		-	+	++		
年龄(岁)					0.390	0.823
≤50	28	6	10	12		
>50	25	7	9	9		
肿瘤直径 d/cm					3.127	0.537
<2	6	2	3	1		
2~5	44	10	16	18		
>5	3	1	0	2		
淋巴结转移					6.934	0.031
阴性	23	9	9	5		
阳性	30	4	10	16		
TNM 分期					4.068	0.131
I+II	39	9	17	13		
III+V	14	4	2	8		
组织学分级					24.030	0.000
I	11	4	7	0		
II	24	8	10	6		
III	18	1	2	15		
核分裂像(/10HPF)					18.739	0.001
0~5	13	7	6	0		
6~10	22	5	9	8		
>11	18	1	4	13		

CAS: 细胞凋亡易感基因

3 讨论

CAS 编码蛋白是一种核转运因子,参与了细胞凋亡与细胞增殖^[5]。在正常细胞中,CAS 的功能像个闸门,决定细胞是增殖还是凋亡,正常状态下发生凋亡的组织(前列腺和乳腺)CAS 可以部分表达。CAS 过度表达或缺失都可诱发肿瘤的形成,在肿瘤发病机制中发挥重要的作用^[6-8]。我们观察到 CAS 同核分裂像、ki-67 指数正相关,并且随着组织学分级的升高,CAS 蛋白表达和 ki-67 指数也越高,证实了 CAS 在细胞增殖中起着重要的作用。CAS 在正常乳腺、普通导管增生、异型导管增生、导管原位癌、浸润性导管癌中的阳性率逐渐升高,并且随着乳腺癌组织学分级的升高,CAS 的表达逐渐增强,说明 CAS 在乳腺导管上皮病变的发生、发展、增殖过

程中起着重要作用。

由于细胞周期与凋亡途径是相互关联的,增生和凋亡的调节失衡常导致细胞的恶性转化。研究发现,CAS过表达可增强IFN- γ 诱导的细胞凋亡^[9]。由干扰素- γ 和多柔比星联合处理的HepG2细胞TNF- α 、CAS、Bax和Bad的水平上调,从而大大增强细胞凋亡^[10]。最近研究发现CAS、Hsp70、PHAPI三者可以共同作用,加速Apaf-1核苷酸变换,阻止非活性Apaf-1/cytochrome C的聚集,在细胞凋亡过程中扮演了十分重要的调控角色,另外CAS的RNAi敲除实验也证明了其在细胞凋亡中的作用^[11]。我们的实验结果表明,在乳腺癌组织中,虽然随着CAS评分增加,凋亡指数呈逐渐升高趋势,但无统计学意义,CAS与ki-67指数呈正相关,说明在乳腺癌发生、发展过程中,CAS可能主要起到促进细胞增殖的作用。CAS表达与细胞凋亡无直接关系,可能原因是:(1)CAS本身与肿瘤细胞凋亡指数无明显相关性,但可能通过调节其他凋亡调控蛋白促进细胞凋亡。Peiró等^[12]观察到子宫内膜癌中CAS与凋亡调节蛋白Caspase-3和Bax显著正相关,说明CAS不仅参与TNF受体介导的凋亡途径,也可能与Caspase-3和Bax相关参与线粒体凋亡途径;(2)乳腺癌中CAS诱导细胞凋亡的作用还可能受到凋亡抑制因子如Bcl-2的拮抗,在子宫内膜癌中CAS蛋白的表达与Bcl-2显著负相关^[12],上述假设在乳腺癌中是否成立还需进一步实验证实。

乳腺癌的淋巴结转移情况是影响乳腺癌患者预后的主要因素,本实验观察到CAS的表达与淋巴结转移有关,有淋巴结转移组CAS的表达高于无淋巴结转移组。Liao等^[1]发现CAS可通过增加癌细胞基质金属蛋白酶2(MMP2)的分泌从而增强肿瘤的侵袭性,与肿瘤浸润、转移有关,将CAS视为预测肿瘤转移的标记物。Tsao等^[4]证实CAS的过表达可以促进结直肠癌细胞分泌CEA和cathepsin D,从而促进肿瘤转移,免疫组化证实结直肠癌转移灶中癌细胞CAS强表达。Tung等^[13]观察到癌转移灶中CAS定位于纤维间质和腺腔内,并且有转移的患者血清CAS水平高于无转移者;有学者提出结直肠癌患者血清CAS蛋白水平可以作为预测肿瘤淋巴结转移的分子标志^[14]。我们的研究结果与上述研究一致,有淋巴结转移的乳腺癌CAS表达水平高于无淋巴结转移者,说明CAS不仅与乳腺癌的发生、发展、增殖有关,还可能成为预测乳腺癌淋巴结转移、预后的分子标志。但探讨CAS对乳腺癌预后的意义还需积累更多的临床随访资料。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Liao C F, Luo S F, Shen T Y, Lin C H, Chien J T, Du S Y, et al. CSE1L/CAS, a microtubule-associated protein, inhibits taxol (paclitaxel)-induced apoptosis but enhances cancer cell apoptosis induced by various chemotherapeutic drugs[J]. *BMB Rep*, 2008,41:210-216.

[2] Shiraki K, Fujikawa K, Sugimoto K, Ito T, Yamanaka T, Suzuki

M, et al. Cellular apoptosis susceptibility protein and proliferation in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2006,18:77-81.

[3] Liao C F, Luo S F, Li L T, Lin C Y, Chen Y C, Jiang M C. CSE1L/CAS, the cellular apoptosis susceptibility protein, enhances invasion and metastasis but not proliferation of cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008,27:15.

[4] Tsao T Y, Tsai C S, Tung J N, Chen S L, Yue C H, Liao C F, et al. Function of CSE1L/CAS in the secretion of HT-29 human colorectal cells and its expression in human colon[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009,327(1-2):163-170.

[5] Cook A, Fernandez E, Lindner D, Ebert J, Schlenstedt G, Conti E. The structure of the nuclear export receptor CSE1 in its cytosolic state reveals a closed conformation incompatible with cargobinding[J]. *Mol Cell*, 2005,18:355-367.

[6] Ginestier C, Cervera N, Finetti P, Esteyries S, Esterni B, Adelaide J, et al. Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2006,12:4533-4544.

[7] Ewings K E, Ryan K M. Hzf and hCAS/CSE1L: making the right choice in p53-mediated tumour suppression[J]. *Cell Res*, 2007,17:829-831.

[8] Brustmann H. Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study[J]. *Gynecol Oncol*, 2004,92:268-276.

[9] Jiang M C, Lin T L, Lee T L, Huang H T, Lin C L, Liao C F. IRF-1-mediated CAS expression enhances interferon-gamma-induced apoptosis of HT-29 colon adenocarcinoma cells[J]. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2001,4:353-358.

[10] Jiang M C, Luo S F, Li L T, Lin C C, Du S Y, Lin C Y, et al. Synergic CSE1L/CAS, TNFR1, and p53 apoptotic pathways in combined interferon gamma/adriamycin-induced apoptosis of HepG2 hepatoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007,26:91-99.

[11] Kim H E, Jiang X, Du F, Wang X. PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1[J]. *Mol Cell*, 2008,30:239-247.

[12] Peiró G, Diebold J, Baretton C B, Kimmig R, Löhns U. Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2001,20:359-367.

[13] Tung M C, Tsai C S, Tung J N, Tsao T Y, Chen H C, Yeh K T, et al. Higher prevalence of secretory CSE1L/CAS in sera of patients with metastatic cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009,18:1570-1577.

[14] Stella Tsai C S, Chen H C, Tung J N, Tsou S S, Tsao T Y, Liao C F, et al. Serum cellular apoptosis susceptibility protein is a potential prognostic marker for metastatic colorectal cancer[J]. *Am J Pathol*, 2010,176:1619-1628.

[本文编辑] 周燕娟,孙岩