

大肠癌组织中 cFLIP_L mRNA 的表达及临床意义

沈宏亮¹, 丁尔迅^{1*}, 李松明², 王皓³, 仇明¹, 王强²

(1. 第二军医大学长征医院微创外科, 上海 200003; 2. 长征医院普通外科; 3. 长征医院实验诊断科, 解放军临床免疫中心)

[摘要] **目的:**观察大肠癌组织中 cFLIP_LmRNA 的表达,探讨其与大肠癌生物学行为及临床预后的相关性。**方法:**应用半定量 RT-PCR 方法观察 86 例大肠癌组织及癌旁组织中 cFLIP_L mRNA 的表达水平;免疫组化法测定大肠癌组织中 CEA 和 P53 蛋白的表达;微粒子酶联免疫荧光法(MEIA)检测大肠癌患者术前血浆 CEA、CA19-9 水平。以 86 例大肠癌组织 cFLIP_L mRNA 的表达均值为界限,将大肠癌组织 cFLIP_LmRNA 表达分为高表达、低表达,比较各临床、病理因素下大肠癌组织 cFLIP_L mRNA 的高表达率,比较高、低表达患者术后 5 年生存率的差异。**结果:**大肠癌组织中 cFLIP_LmRNA 表达均值明显高于癌旁组织(0.59±0.10 vs 0.36±0.10, $P<0.05$);86 例大肠癌患者中高表达 56 例,高表达率为 65.1%。cFLIP_L mRNA 高表达率在 Dukes B、C、D 期患者中依次增高,分别为 55.3%、67.5%、100% ($P<0.05$);cFLIP_L 高表达患者术后 5 年累计生存率明显低于低表达患者(41.1% vs 56.7%, $P<0.05$)。大肠癌组织 cFLIP_L 高表达率在除临床 Dukes 分期外的其他不同临床、病理指标下无显著差异。**结论:**cFLIP_L 表达可能与大肠癌患者临床分期及术后预后有一定相关性;检测大肠癌组织 cFLIP_L 表达水平将有助于全面掌握患者病情、指导治疗并判断预后。

[关键词] 结直肠肿瘤;cFLIP_L;逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R 735.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0154-04

Expression of cellular FLICE-like inhibitory protein long form mRNA in colon cancer and its clinical significance

SHEN Hong-liang¹, DING Er-xun^{1*}, LI Song-ming², WANG Hao³, QIU Ming¹, WANG Qiang² (1. Department of Minimally Invasive Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of General Surgery, Changzheng Hospital; 3. Department of Diagnosis, Changzheng Hospital, Center of Clinical Immunology of PLA)

[ABSTRACT] **Objective:**To observe the expression of cellular FLICE-like inhibitory protein long form (cFLIP_L) mRNA in colon cancer and to assess its relationship with the biological behavior and prognosis of colon cancer. **Methods:** Expression of cFLIP_L mRNA was examined in 86 colon cancer samples and their corresponding normal tissues by semi-quantitative RT-PCR technique. Expression of CEA and P53 in the colon cancer samples was assayed by SABC immunohistochemistry staining. The plasma levels of CEA and CA19-9 were determined by microparticle enzyme-linked immunoassay (MEIA) before operation. Colon cancer tissues were divided into cFLIP_L mRNA high expression group and low expression group based on the average value of all the 86 patients. The relationship between the high expression of cFLIP_L mRNA and the different clinical features and pathological characters was determined. We also compared the 5-year accumulative survival rates of the 2 groups. **Results:** The expression of cFLIP_L mRNA in the colon cancer tissues was significantly higher than that in the matched normal tissues (0.59±0.10 vs 0.36±0.10, $P<0.05$). Fifty-six (65.1%) patients out of 86 had high expression of cFLIP_L mRNA. The cFLIP_L mRNA high expression rates in Dukes B, C and D stage patients had an increasing tendency, being 55.3%, 67.5% and 100%, respectively ($P<0.05$). The postoperative 5-year accumulative survival rate in cFLIP_L mRNA high expression group was lower than that in the low expression group (41.1% vs 56.7%, $P<0.05$). There was no significant correlation between cFLIP_L mRNA high expression and clinical features/pathological characters other than Dukes stages in the present cohort. **Conclusion:** cFLIP_L may be related to the clinical staging and prognosis of colon cancer. Detection of cFLIP_L mRNA expression in colon cancer tissues can help to fully understand the overall condition of patients, guide treatment, and predict prognosis.

[KEY WORDS] colorectal neoplasms; cFLIP_L; reverse transcriptase polymerase chain reaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2):154-157]

细胞 FLICE 抑制蛋白(cFLIP)基因是近年来发现的抗凋亡基因, cFLIP 蛋白能抑制 Fas 等死亡受体介导的凋亡, 包括短 cFLIP(cFLIP_S)和长 cFLIP(cFLIP_L)两种形式^[1]。肿瘤细胞表达 cFLIP 蛋白逃避 T 淋巴细胞介导的机体免疫监督^[2]。前期研

[基金项目] 国家自然科学基金(39900143)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China(39900143)。

[作者简介] 沈宏亮, 博士, 讲师、主治医师。

E-mail: shenhongliang@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: eding@public7.sta.net.cn

究^[3]已证实大肠癌细胞及组织中均表达 cFLIP_L 蛋白,然而其与肿瘤临床病理因素的相关性及对临床预后的影响目前尚不清楚。本研究应用半定量 RT-PCR 法检测了大肠癌及相应癌旁正常组织中 cFLIP_L mRNA 的表达水平,探讨其与大肠癌患者临床病理因素的相关性及对临床预后的影响。

1 材料和方法

1.1 临床资料 1999年4月至2000年12月间手术治疗的86例大肠癌患者,男51例,女35例,平均年龄(62.1±8.3)岁。所有标本均经病理确诊。标本置液氮中保存,4%甲醛溶液固定并石蜡包埋。按文献^[4]标准,确定大肠癌相关临床、病理特征;按Dukes分期标准^[5]进行大肠癌分期。所有临床特征(包括性别、年龄、肿瘤部位、有无肠梗阻、术前血浆CEA和CA19-9水平等)均通过分析病历收集,病理特征(包括肿瘤直径、大体类型、Dukes分期、肿瘤肠管浸润范围、是否存在淋巴结转移、有无远处转移、肿瘤分化程度、组织学类型、肿瘤P53及CEA表达阳性与否等)则通过分析病理报告和相关实验获得。86例术后均随访6~7年,分析患者的术后生存状况,统计累计生存率。

1.2 cFLIP_L mRNA 半定量 RT-PCR 检测 Qia-gen 试剂(德国)提取大肠癌及配对癌旁正常组织总RNA,每例取总RNA 500 ng,用MMLV逆转录酶(日本宝生物)进行逆转录,合成cDNA。PCR扩增cFLIP_L,同时扩增β-actin作为内参照,每个标本至少重复3次。94℃ 3 min 预变性后开始循环:94℃ 45 s,58℃ 45 s,72℃ 60 s,共32个循环,最后于72℃ 延伸5 min。cFLIP_L引物序列:5'-GCT GAA GTC ATC CAT CAG CT-3' (正义),5'-CAT ACT GAG ATG CAA GAA TT-3' (反义);β-actin引物序列:5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC-3' (正义),5'-CTG CAF CCT GTC GGC AAT GCC AG-3' (反义)。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳分离,并在凝胶成像系统中采用美国Image PC alpha 9 图像分析软件对结果进行图像分析,计算每个样本所测得的cFLIP_L与β-actin条带的相对光密度值。结果分析:以cFLIP_L mRNA表达的相对光密度值均值为界限,将大肠癌患者分为cFLIP_L mRNA高表达和低表达患者,计算高表达率。

1.3 大肠癌组织 CEA、P53 蛋白表达及术前血浆 CEA、CA19-9 的检测 采用链菌素-过氧化物酶(SABC)免疫组化染色法对86例大肠癌组织进行染色,操作按SABC试剂盒(武汉博士德)说明书进行。

一抗为小鼠抗CEA和p53 IgG单克隆抗体(武汉博士德)。用已知CEA和p53阳性切片作阳性对照,阴性对照用PBS缓冲液代替一抗。结果判定:细胞质染色为阳性,阳性细胞占肿瘤细胞的20%以上为阳性,小于20%为阴性。采用微粒子酶联免疫荧光法(MEIA),应用AxSYM全自动酶免疫分析仪(美国雅培公司)测定术前血浆CEA和CA19-9浓度,操作按说明书常规进行。

1.4 统计学处理 不同临床、病理特征下肿瘤组织cFLIP_L mRNA高表达率的比较采用Abacus Concepts公司StatView 4.5统计软件进行 χ^2 检验;cFLIP_L高、低表达患者术后累计生存率的比较采用Kaplan-Meier法;Log-rank法分析组间差异。

2 结果

2.1 大肠癌和配对癌旁正常组织中 cFLIP_L mRNA 的表达 如图1所见,大肠癌及配对癌旁正常组织均表达cFLIP_L,86例大肠癌组织中,cFLIP_L mRNA表达的相对光密度值范围为0.32~0.82,均值0.59±0.10;而癌旁组织中的分布范围为0.12~0.65,均值0.36±0.10。大肠癌组织cFLIP_L mRNA表达均值明显高于癌旁组织($P<0.05$)。但由于癌组织与癌旁组织cFLIP_L mRNA表达的相对光密度值范围部分重叠,少数癌组织cFLIP_L mRNA相对光密度值可略低于癌旁组织,如图1中33号标本。

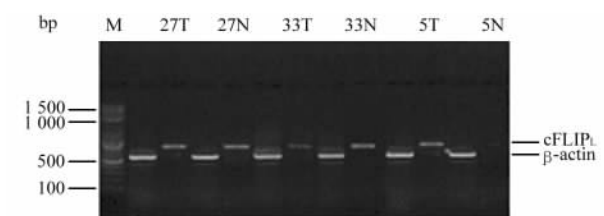


图1 大肠癌组织及癌旁正常组织中 cFLIP_L mRNA 的表达

Fig 1 cFLIP_L mRNA expression in colon cancer tissue and peritumoral normal tissue

M: DNA markers; N: Peritumoral normal tissue; T: Tumor tissue; 27, 33, 5: Specimen number

以cFLIP_L mRNA表达均值0.59为界,将大肠癌组织cFLIP_L mRNA表达分为高表达和低表达,本组86例大肠癌患者中有56例患者高表达,高表达率为65.1%。

2.2 大肠癌组织 CEA、P53 蛋白的表达及术前血浆 CEA、CA19-9 浓度的测定 86例大肠癌组织中CEA蛋白表达阳性79例,阴性7例,阳性率为

91.9%;P53蛋白表达阳性51例,阴性35例,阳性率为59.3%。86例患者中术前CEA血浆浓度高于正常34例,处于正常范围52例,异常增高率39.5%;CA19-9血浆浓度高于正常50例,处于正常范围36例,异常增高率41.9%。

2.3 cFLIP_L mRNA表达与患者临床、病理因素及术后5年生存率 如表1所示,肿瘤组织cFLIP_L mRNA高表达率在患者不同性别、年龄大于或小于65岁、不同肿瘤部位、有无肠梗阻、不同术前血浆CEA、CA19-9浓度间无显著差异。

表1 不同临床指标下cFLIP_L mRNA的表达

Tab 1 cFLIP_L mRNA expression under different clinical condition

Index	N	cFLIP _L mRNA(H) [n(%)]	P
Gender			>0.05
Male	51	30(56)	
Female	35	26(59.3)	
Ages			>0.05
≤65 year	42	30(61.8)	
>65 year	44	26(60)	
Location of tumors			>0.05
Colon	52	34 (57.9)	
Rectum	34	22(57.6)	
Bowel obstruction			>0.05
Present	30	21(50)	
Absent	56	35(58.3)	
CEA(ρ _B /ng·ml ⁻¹)			>0.05
≤5	52	36(56.5)	
>5	34	20(58.6)	
CA19-9 (ρ _B /ng·ml ⁻¹)			>0.05
≤40	50	35 (70)	
>40	36	21(58.3)	

cFLIP_L mRNA(H):cFLIP_L mRNA high expression

如表2所示,cFLIP_L mRNA高表达率在Dukes B、C、D期患者cFLIP_L依次增高,分别为55.3%(21/38)、67.5%(27/40)、100%(8/8,P<0.05);而在不同其他指标下(肿瘤大小、大体类型、肠管内浸润、分化程度、组织学分型、有无淋巴结及远处转移以及肿瘤组织CEA、P53蛋白表达与否)无显著差异。

cFLIP_L mRNA高、低表达患者术后5年累计生存率分别为41.1%(23/56)、56.7%(17/30),两者差异有统计学意义(P<0.05,图2)。

3 讨论

cFLIP是Irmeler等^[1]1997年首先发现并克隆出来的凋亡信号转导抑制蛋白,包括cFLIP_S和cFLIP_L两种形式。cFLIP_L结构与caspase 8相似,包括2个DED(death effector domains)和1个caspase

表2 不同病理特征下cFLIP_L mRNA的表达

Tab 2 Different pathological features and cFLIP_L mRNA expression

Index	N	cFLIP _L mRNA(H) [n(%)]	P
Diameter of tumors			>0.05
≤6 cm	66	50(56.8)	
>6 cm	20	6(62.5)	
Types of tumors			>0.05
Infiltrating type	11	8(60)	
Ulceration type	41	28(62.5)	
Lump type	34	20(50)	
Dukes classification			<0.05
B	38	21(55.3)	
C	40	27(67.5)	
D	8	8(100)	
Infiltration of intestinal wall			>0.05
>1/2 circumference	22	13(59.1)	
≤1/2 circumference	64	43(56.7)	
Lymph node metastasis			>0.05
Present	46	30(60)	
Absent	40	26(56.3)	
Remote metastasis			>0.05
Present	15	12(66.7)	
Absent	71	44(57.1)	
Tumor cell differentiation			>0.05
Well differentiated	7	2(40)	
Poorly differentiated	69	47(57.1)	
Undifferentiated	10	7(80)	
Histological types			>0.05
Adenocarcinoma	76	49(60)	
Mucinous adenocarcinoma	10	7(56.3)	
Immunohistological results of P53			>0.05
(+)	51	31(60.8)	
(-)	35	25(71.4)	
Immunohistological results of CEA			>0.05
(+)	79	53(67.1)	
(-)	7	3(42.9)	

cFLIP_L mRNA(H):cFLIP_L mRNA high expression

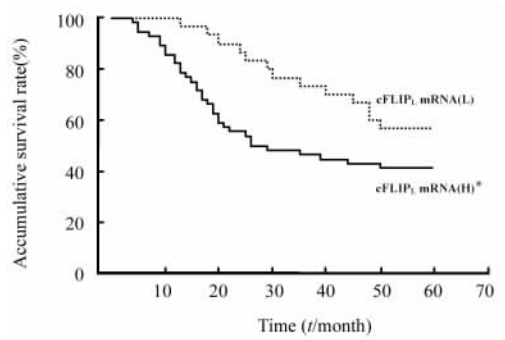


图2 cFLIP_L mRNA高表达、低表达患者5年累积生存率比较

Fig 2 Relationship between cFLIP_L mRNA expression and 5-year accumulative survival rate of patients

cFLIP_L mRNA(H):cFLIP_L mRNA high expression; cFLIP_L mRNA(L):cFLIP_L mRNA low expression. * P<0.05 vs cFLIP_L mRNA(L)

相似区;而 cFLIP_S 只有 2 个 DED。cFLIP_L 和 cFLIP_S 都能同 FADD 和 FLICE 结合,强效抑制 Fas、TRAMP、TRAIL-R(DR-4)和 TNF-R1 等死亡受体诱导的细胞凋亡。已有研究证实 cFLIP 在恶性黑色素瘤、结肠癌、肺小细胞癌、子宫内膜癌、胃癌、前列腺癌等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 cFLIP 不表达或低表达。

Ryu 等^[6] 研究发现大肠癌细胞可通过表达 cFLIP_L 逃避 T 淋巴细胞介导的机体免疫监督。研究^[7-8] 发现,用 siRNA 技术抑制大肠癌细胞的 cFLIP_L 表达可增强化疗药物诱导凋亡的作用,而与 p53 基因表达状态无相关性。亦有研究^[9] 认为 cFLIP_L 的表达量与 P53 的积累呈负相关,cFLIP_L 抗凋亡作用受肿瘤细胞 P53 表达状态的影响。本研究结果表明 cFLIP_L mRNA 高表达率在 P53 蛋白不同表达状态的大肠癌组织间无显著差异,提示 cFLIP_L 抗凋亡作用与 p53 基因表达状态无关,与文献^[7-8] 报道一致。

CEA 酸性糖蛋白是结直肠癌的特异肿瘤标志物。大肠癌患者术前 CEA 蛋白血浆浓度异常增高,常提示患者术后预后不佳^[10]。CA19-9 是表达在分子量黏蛋白糖类位点的单涎酸神经节苷脂,不具有器官特异性,在多种腺癌中均高表达。大肠癌患者术前 CA19-9 蛋白血浆浓度异常增高,提示患者术后肝外转移可能性大,预后欠佳^[11]。cFLIP 表达水平与 CEA、CA19-9 表达的相关性研究国内外尚未见报道。本研究结果表明,cFLIP_L mRNA 高表达率在术前血浆 CEA 不同浓度及大肠癌组织中 CEA 表达不同程度下无显著差异;cFLIP_L mRNA 高表达率在不同术前血浆 CA19-9 浓度下亦无显著差异。这提示 cFLIP_L 表达与 CEA、CA19-9 表达状态可能相关性不大。

cFLIP 表达与大肠癌患者临床、病理指标的相关性及其对患者临床预后的影响目前仍有争议。已有研究表明,甲状腺癌^[12]、子宫内膜癌^[13]和肝癌^[14]组织 cFLIP 高表达可能提示患者预后较差,子宫内膜癌^[13]和肝癌^[14]组织 cFLIP 表达与临床分期及浸润范围等指标有关。亦有研究^[15]表明恶性胶质瘤 cFLIP 表达程度与预后无明显相关。本研究发现癌旁组织中 cFLIP_L mRNA 表达显著低于癌组织($P < 0.05$);大肠癌 cFLIP_L 高表达率随 Dukes 分期明显增高,Dukes D 期明显高于 C 期和 B 期,但与其他临床、病理因素(年龄、性别、肿瘤大小、大体类型、肠管内浸润、分化程度、组织学分型和远处转移等)未见明显相关。结果还表明大肠癌 cFLIP_L 高表达患者预后明显不佳,术后 5 年累计生存率明显低于低表达患者($P < 0.05$),与

甲状腺癌、子宫内膜癌及肝癌组织类似。

综上所述,本研究结果表明 cFLIP_L mRNA 表达可能与大肠癌患者临床 Dukes 分期及术后预后有一定相关性,对大肠癌组织 cFLIP_L 表达水平进行检测将有助于全面掌握病情、指导治疗及判断预后。

[参考文献]

- [1] Irmiler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP[J]. Nature,1997, 388: 190-195.
- [2] Medema J P, de Jong J, van Hall T, et al. Immune escape of tumors *in vivo* by expression of cellular FLICE-inhibitory protein[J]. J Exp Med,1999,190: 1033-1038.
- [3] 高文超,王元和,李 莉,等. cFLIP mRNA 在大肠癌细胞中的表达及其与 Fas 抗原表达的相关性[J]. 第二军医大学学报, 2002,23:35-37.
- [4] 吴阶平,裘法祖 主编. 黄家驹外科学·中册[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社,2000:1131-1140.
- [5] Dukes C E. The classification of cancer of the rectum[J]. J Pathol Bacteriol,1932,35:323-332.
- [6] Ryu B K, Lee M G, Chi S G, et al. Increased expression of cFLIP_L in colonic adenocarcinoma[J]. J Pathol,2001,194: 15-19.
- [7] Galligan L, Longley D B, McEwan M, et al. Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP[J]. Mol Cancer Ther, 2005,4: 2026-2036.
- [8] Longley D B, Wilson T R, McEwan M, et al. c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death[J]. Oncogene, 2006, 25:838-848.
- [9] Mezzanzanica D, Ballardore E, Turatti F, et al. CD95-mediated apoptosis is impaired at receptor level by cellular FLICE inhibitory protein (long form) in wild-type p53 human ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2004,10:5202-5214.
- [10] Boonpipattanapong T, Chewatanakornkul S. Preoperative carcinoembryonic antigen and albumin in predicting survival in patients with colon and rectal carcinomas[J]. J Clin Gastroenterol, 2006,40: 592-595.
- [11] Sasaki A, Kawano K, Inomata M, et al. Value of serum carbohydrate antigen 19-9 for predicting extrahepatic metastasis in patients with liver metastasis from colorectal carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52: 1814-1819.
- [12] Mitsiades C S, Poulaki V, Fanourakis G, et al. Fas signaling in thyroid carcinomas is diverted from apoptosis to proliferation [J]. Clin Cancer Res,2006,12: 3705-3712.
- [13] Chen H X, Liu Y J, Zhou X D, et al. Expression of cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein is associated with malignant potential in endometrial carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer,2005,15:663-670.
- [14] Schuchmann M, Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, et al. Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95- and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy[J]. Oncol Rep, 2006,15:227-230.
- [15] Pudukall V K, Sampath D, Bruner J M, et al. TRAIL-induced apoptosis in gliomas is enhanced by Akt-inhibition and is independent of JNK activation[J]. Apoptosis,2005,10:233-243.

[收稿日期] 2006-10-24

[修回日期] 2007-01-16

[本文编辑] 贾泽军