

非小细胞肺癌中 caspase-3、survivin 和 k-ras 的表达及其意义

李承慧 胡冰 王晓秋 季楚舒 何义富

【摘要】 背景与目的 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的预后与众多因素有关,凋亡相关基因在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用,但其在 NSCLC 中作为生物预后因素的意义还不明确。本研究的目的是探讨凋亡相关基因 caspase-3、survivin、k-ras 在 NSCLC 中的表达与不同临床病理特征和预后的关系,并探讨三者 NSCLC 发生过程中可能存在的相关性。方法 采用免疫组化 SP 二步法检测 91 例石蜡标本癌组织和癌旁正常组织中 caspase-3、survivin、k-ras 蛋白的阳性表达。结果 Caspase-3 在癌组织中阳性表达率低于癌旁正常组织,survivin、k-ras 在癌组织阳性表达高于癌旁正常组织,均具有统计学差异 ($P < 0.05$)。Caspase-3 阳性表达与年龄、病理类型、TNM 分期、淋巴结状态、分化程度有关($P < 0.05$),而与病灶大小、有无吸烟史等无关($P > 0.05$);survivin 阳性表达与年龄、TNM 分期、分化程度、淋巴结状态有关($P < 0.05$),而与病理类型、病灶大小、有无吸烟史等无关($P > 0.05$);k-ras 阳性表达与病理类型、吸烟有关($P < 0.05$),与年龄、TNM 分期、淋巴结状态、分化程度、病灶大小等均无关($P > 0.05$)。Caspase-3 与 survivin 的阳性表达呈负相关 ($r = -0.662$, $P < 0.001$)。Cox 多因素分析 survivin、caspase-3、TNM 分期、病理类型、分化程度 5 个因素具有独立预后价值($P < 0.05$)。结论 Survivin 和 k-ras 在 NSCLC 中高表达,而 caspase-3 在 NSCLC 中低表达,可能在肿瘤细胞凋亡过程中起着重要的作用;Caspase-3 低表达,survivin 高表达可作为术后 NSCLC 预后不良的独立性因素;K-ras 与 NSCLC 预后的关系需要进一步研究。

【关键词】 肺肿瘤 凋亡 免疫组化 预后

【中图分类号】 R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2008.01.020

Expression and clinical significance of caspase-3, survivin and k-ras in non-small cell lung cancer LI Chenghui*, HU Bing, WANG Xiaoqi, JI Chushu, HE Yifu. * Department of Oncology, Affiliated Anqing Hospital of Anhui Medical university, Anqing, Anhui 246000, China

Corresponding author: LI Chenghui, E-mail: lchui001@163.com.cn

【Abstract】 Background and objective The prognosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) is related to many factors. Apoptosis-related genes play an important role in occurrence and development of tumors. The significance of apoptosis as a biological and prognostic factor has not been clearly established in NSCLC. The aim of the study is to evaluate the relationship between expression of caspase-3, survivin, k-ras protein and the relationship between the expression of above proteins in NSCLC and their clinicopathological characteristics and prognostic significance and their potential relevance existing in NSCLC. Methods Caspase-3, survivin, k-ras protein expression were detected in NSCLC tissues and normal lung tissues adjacent to carcinomas Archival formalin fixed, paraffin embedded specimens from 91 patients who had undergone radical surgery by streptavidin-peroxidase immunohistochemistry. Results The positive rate of caspase-3 was significantly lower in NSCLC than in normal lung tissues adjacent to carcinomas; The positive rate of survivin, k-ras was significantly higher in NSCLC than in normal lung tissues adjacent to carcinomas ($P < 0.05$). The positive rate of caspase-3 was related to the age, histological type, TNM stage, lymph node metastasia and differentiation ($P < 0.05$), but not related to tumor size, smoke ($P > 0.05$); the positive rate of survivin was related to the age, TNM stage, lymph node metastasia and differentiation ($P < 0.05$), but not related to histologic type, tumor size, smoke ($P > 0.05$); the positive rate of k-ras was related to the histologic type and smoke ($P < 0.05$), but not related the age, TNM stage, lymph node metastasia, differentiation, tumor size ($P > 0.05$). Expression of caspase-3 was negatively correlated with survivin ($r = -0.662$, $P < 0.001$). The multivariate analysis

with Cox hazard model, survivin, caspase-3, histologic type, differentiation, TNM stage could be indicators for the prognosis of patients with NSCLC ($P < 0.05$). Conclusion There are over-expressions of survivin, k-ras protein in NSCLC and both are significantly higher than those in the normal tissue. However, caspase-3 presents the reverse result; Higher expression of survivin, lower expression of caspase-3 might be the adverse prognostic index for survival in resected NSCLC patients, which indicate they might act synergistically in apoptosis of NSCLC; the relationship between the expression of k-ras and the prognosis of NSCLC is still not clear.

【Key words】 Lung neoplasms Apoptosis Immunohistochemistry Prognosis

近年来研究表明,肿瘤的发生、发展、转移及防治与细胞凋亡的异常密切相关。本研究通过检测 NSCLC 中凋亡相关基因 caspase-3、survivin 和 k-ras 蛋白表达水平与不同临床病理资料和预后的关系,以及三者在 NSCLC 发生过程中可能存在的相关性,为 NSCLC 的预测及抗肿瘤治疗提供新的理论和临床依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料 选择 1999 年 7 月 1 日至 2005 年 7 月 1 日在安徽省立医院胸外科行根治性肺癌手术切除后的存档病理标本 91 例,标本取材部位为癌组织,以距癌旁正常组织 5 cm 以上。在 91 例 NSCLC 患者中:男性 77 例,女性 14 例;中位年龄 62 岁(范围 39~78 岁);鳞癌 49 例,腺癌 42 例;高分化 13 例,中分化 48 例,低分化 30 例;<5 cm 者 45 例,≥5 cm 者 46 例;有吸烟史 65 例,且吸烟指数 400 年支以上,无吸烟史 26 例;IB 期 45 例,II 期 21 例,III 期 25 例;伴有淋巴结转移有 39 例,无淋巴结转移 52 例。病例筛选标准:① 所选病例手术前未接受任何治疗;② 所选病例至少接受 4 周期术后辅助化疗;③ 所选病例死亡的直接原因与肿瘤进展有关;④ 所选病例必须完成随访。

1.2 检测方法 兔抗人 Survivin、RasP21、Caspase-3 多克隆抗体均选自既用型,均购自博士德生物工程有限公司。二步法免疫组化(PV6000)检测试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。采用免疫组化 SP 二步法,石蜡切片脱蜡水化,根据每种抗体要求,对组织抗原进行相应修复,每张切片滴加 100 μ L 正常山羊血清,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,甩去多余液体;分别滴加 100 μ L 兔抗人 survivin、caspase-3、RasP21 多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,室温复温 30 min, PBS 液洗 3 次,对照组用 PBS 代替一抗;滴加 100 μ L 通用型 IgG 抗体 (Fab 段)-HRP 多聚体,室温孵育 20 分钟, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;每张切片加 100L 新鲜配置 DAB 溶液显色,显微镜下显示最合适阳性结果时,自来水终止显色;苏木素复染 1 min,流水冲洗 10 min,脱水,中性树胶封片,显微镜下观察。免疫组化染色以细胞中出现棕黄色颗粒为阳

性细胞,k-ras、caspase-3 蛋白表达均以胞浆内出现弥漫的棕黄色颗粒为主;survivin 在胞浆和胞核均出现弥漫的棕黄色颗粒。采用单盲阅片,每张切片于高倍镜下随机取 10 个不同视野,各计数 100 个左右肿瘤细胞或癌旁组织细胞,分别计数其中染色阳性细胞数,再计算阳性细胞数总和,除以 1000 即得阳性细胞比例。结果进行半定量分析:阳性细胞占 ≤10% 为-,阳性细胞占 11%~20% 为+,阳性细胞占 21%~50% 为++,阳性细胞占 ≥51% 为+++。

1.3 生存期评估 所有患者进行回顾性电话随访,生存期从手术之日起计算,终止日期为死亡日或末次随访日,截止随访日期为 2007 年 4 月 1 日,中位随访时间 29 个月。

1.4 统计分析 临床及实验数据输入计算机,全部数据采用 SPSS11.0 软件包进行统计分析。Caspase-3、survivin、k-ras 蛋白阳性率采用 χ^2 检验;预后的单因素分析主要采用 Kaplan-meier 曲线,应用 log-rank 检验;预后的多因素分析采用 Cox 比例风险模型;相关分析采用 spearman 等级相关分析方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Caspase-3、survivin、k-ras 在癌组织和癌旁组织中表达情况(表 1) Caspase-3 在癌组织和癌旁正常组织中均有表达,其中在癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁正常组织($\chi^2=14.768, P=0.001$)(图 1,2);Survivin 在癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常组织 ($\chi^2=14.850, P=0.001$)(图 3,4);K-ras 在癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常组织($\chi^2=14.850, P=0.001$)(图 5,6)。

2.2 Caspase-3、survivin、k-ras 三者蛋白阳性表达之间相关性 Caspase-3 癌组织中阳性而 survivin 阴性的有 43 例,survivin 阳性而 caspase-3 阴性有 37 例,两者呈负相关($r=-0.662, P < 0.001$)(图 7,8);Caspase-3 癌组织中阳性而 k-ras 阴性的有 14 例,k-ras 阳性而 caspase-3 阴性有 28 例,两者无相关性($r=-0.130, P=0.219$);K-ras 癌组织中阳性而 survivin 阴性的有 43 例,survivin 阳性而 k-

表 1 Caspase-3、survivin 及 k-ras 在肺癌组织及癌旁正常组织中的表达情况

Tab1 Expression of caspase-3、survivin、k-ras in NSCLC and normal lung tissues adjacent to carcinomas

Group	Carcinomas	Normal	χ^2	P value
caspase-3				
-	39	16	14.768	0.001
+	23	40		
++ / +++	29	35		
survivin				
-	45	70	14.850	0.001
+	38	18		
++ / +++	8	3		
k-ras				
-	25	34	11.409	0.003
+	19	32		
++ / +++	47	25		

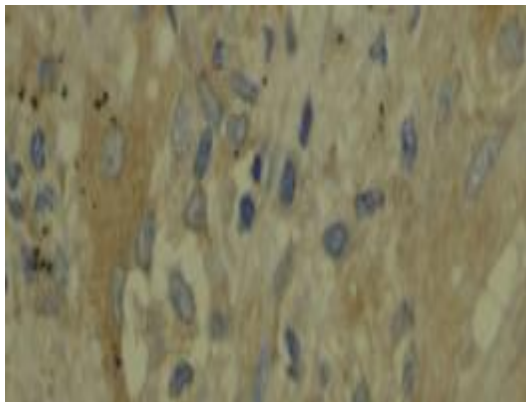


图 1 Caspase-3 在癌旁组织中的表达(SP 法,原始放大倍数×400)

Fig1 Expression of caspase-3 in tissues adjacent to carcinoma (SP method, original magnification ×400)

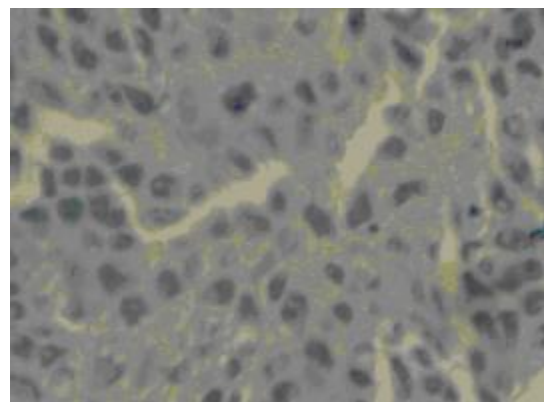


图 2 Caspase-3 在癌组织中的表达(SP 法,原始放大倍数×400)

Fig 2 Expression of caspase-3 in carcinoma (SP method, original magnification ×400)

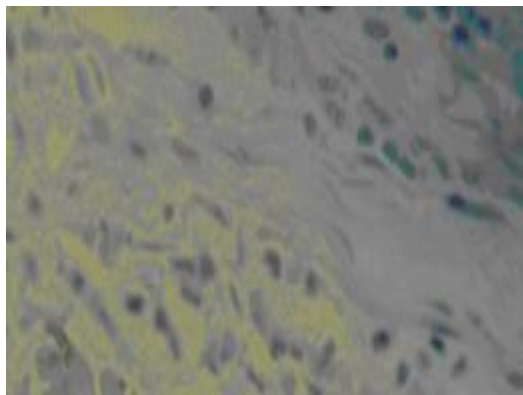


图 3 Survivin 在癌旁组织中的表达(SP 法,原始放大倍数×400)

Fig 3 Expression of survivin in tissues adjacent to carcinoma (SP method, original magnification ×400)

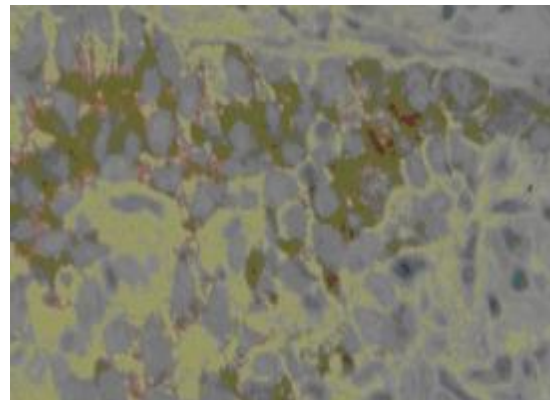


图 4 Survivin 在癌组织中的表达(SP 法,原始放大倍数×400)

Fig 4 Expression of survivin in carcinoma (SP method, original magnification ×400)

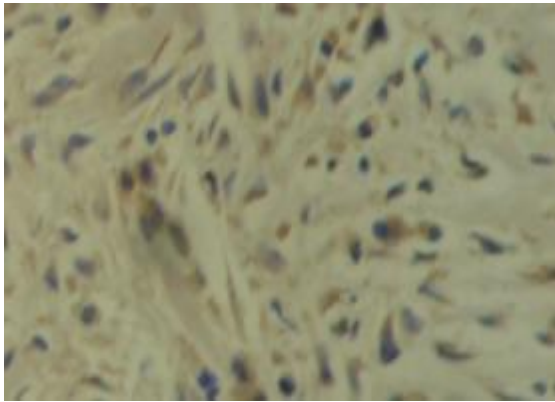


图 5 K-ras 在癌旁组织中的表达(SP 法,原始放大倍数×400)
Fig 5 Expression of k-ras in tissues adjacent to carcinomas (SP method, original magnification ×400)

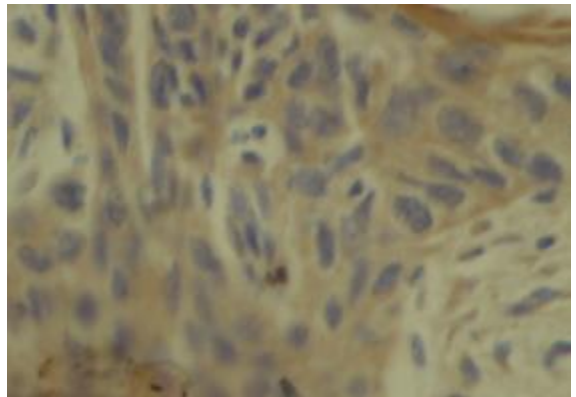


图 6 K-ras 在癌组织中的表达(SP 法,原始放大倍数×400)
Fig 6 Expression of k-ras in carcinoma (SP method, original magnification ×400)

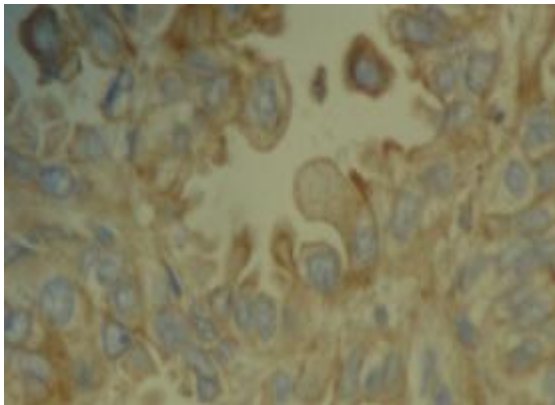


图 7 Caspase-3 在肺腺癌中的表达 (SP 法,原始放大倍数×400)
Fig 7 Expression of caspase-3 in adenocarcinoma (SP method, original magnification ×400)

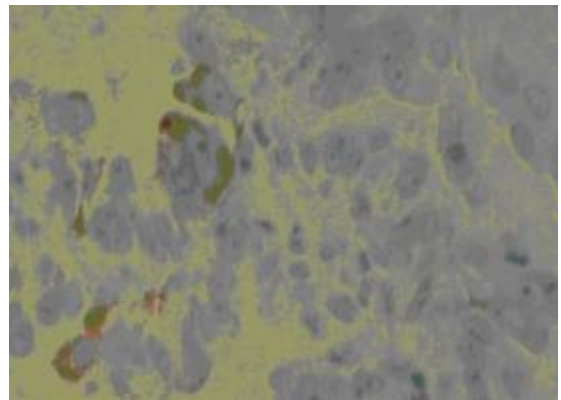


图 8 Survivin 在肺腺癌中的表达(SP 法,原始放大倍数×400)
Fig 8 Expression of survivin in adenocarcinoma (SP method, original magnification ×400)

ras 阴性有 32 例,两者无相关性($r=0.085, P=0.421$)。

2.3 NSCLC 中 caspase-3、survivin、k-ras 蛋白表达与各临床指标的关系(表 2) Caspase-3 阳性表达与年龄、病理类型、TNM 分期、淋巴结状态、分化程度有关; Survivin 阳性表达与年龄、TNM 分期、分化程度、淋巴结状态有关;K-ras 阳性表达与病理类型有关,腺癌阳

性表达率比鳞癌高,并且在吸烟者中,腺癌阳性表达率也比鳞癌高。

2.4 Caspase-3、survivin 和 k-ras 蛋白表达水平与预后的关系(图 9~11) Kaplan-meier 生存分析显示 Caspase-3 阳性表达越高预后越好($P=0.0221$); survivin 阳性表达越高预后越差($P=0.0013$); k-ras 的阳性表达

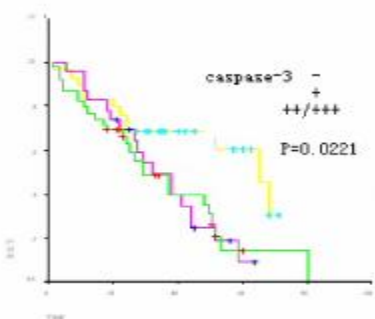


图 9 Caspase-3 阳性与阴性生存曲线
Fig 9 Survival curve of caspase-3 positive and negative

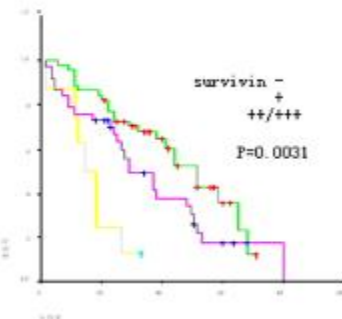


图 10 Survivin 阳性与阴性生存曲线
Fig 10 Survival curve of survivin positive and negative

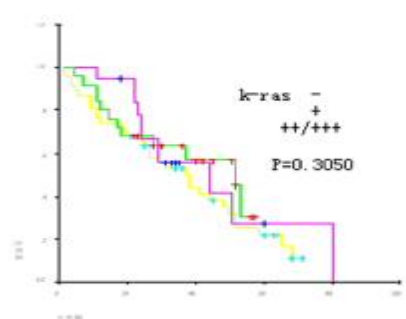


图 11 K-ras 阳性与阴性生存曲线
Fig 11 Survival curve of k-ras positive and negative

表 2 NSCLC 中 caspase-3、survivin 和 k-ras 蛋白的表达与各临床指标的关系

Tab 2 The relationship between caspase-3, survivin and k-ras expression and clinicopathologic parameters in NSCLC

Clinicopathologic parameter	n	Caspase-3			Survivin			K-ras		
		Positive (%)	χ^2	P	Positive (%)	χ^2	P	Positive (%)	χ^2	P
Age										
≤60 岁	40	16 (40.00)			27 (67.50)			30 (75.00)		
>60 岁	51	36 (70.59)	8.565	0.003	19 (37.25)	8.204	0.004	36 (70.59)	0.219	0.640
Histology										
Squamo-	49	33 (67.35)			21 (42.86)			31 (63.27)		
Adeno-	42	19 (45.24)	4.514	0.034	25 (59.52)	2.513	0.113	35 (83.33)	4.571	0.033
Tumor size(cm)										
<5	45	28 (62.22)			25 (55.56)			33 (73.33)		
≥5	46	24 (52.17)	0.938	0.333	21 (45.65)	0.893	0.345	33 (71.74)	0.029	0.865
TNM stage										
IB	45	33 (73.33)			17 (37.78)			33 (73.33)		
II	21	10 (47.62)	10.16	0.006	11 (52.38)	7.566	0.023	17 (80.95)	1.675	0.433
III	25	9 (40.74)	18 (72.00)			16 (64.00)				
Lymph node status										
No	39	15 (38.46)			26 (66.67)			27 (69.23)		
Yes	52	37 (71.15)	9.726	0.002	20 (38.46)	7.092	0.008	39 (75.00)	0.372	0.542
Differentiation										
poor	30	11 (36.67)			21 (70.00)			22 (73.33)		
Middle-well	61	41 (67.21)	7.662	0.006	25 (40.98)	6.773	0.009	44 (72.13)	0.015	0.904
Smoking										
Yes	65	39 (60.00)			31 (47.69)			46 (70.77)		
No	26	13 (50.00)	0.758	0.384	15 (57.69)	0.743	0.389	20 (76.92)	0.353	0.553
Histology in smoking										
Squamo-	39	25 (64.10)			17 (43.59)			24 (61.54)		
Adeno-	26	14 (53.85)	0.684	0.408	14 (53.85)	0.658	0.417	22 (84.62)	3.954	0.047

与预后无关(P=0.3050)。

2.5 多因素 Cox 模型逐步回归分析(表 3) 结果显示 10 个因素中 survivin、caspase-3、TNM 分期、病理分

型、分化程度 5 个因素可以对 NSCLC 患者预后产生影响,其中 survivin 低表达、caspase-3 高表达、分期较低、鳞癌、高分化预后相对较好。

表 3 Cox 回归多因素分析

Tab 3 Cox regression multivariate analysis of median survival time (MST) of NSCLC patients

Variables	df	B	SE	wald	P	RR	95%CI for RR
survivin	1	0.623	0.297	4.402	0.036	1.865	1.042~3.338
TNM stage	1	0.939	0.193	23.708	0.000	2.558	1.753~3.734
Histology	1	0.877	0.290	9.139	0.003	2.404	1.361~4.246
Differentiation	1	-0.796	0.328	5.899	0.015	0.451	0.237~0.857
caspase-3	1	0.531	0.267	3.971	0.046	1.701	1.009~2.869

3 讨论

肺癌是对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。目前肺癌治疗的一个不能令人满意的现状是多数患者在治疗后仍有复发和转移,即使手术切除,手术后患者体内仍会有亚临床转移灶的存在,即使行辅助化疗,由于肿瘤细胞的凋亡过程受到抑制,仍然难以避免肿瘤复发。近年来研究表明,肿瘤的发生、发展、转移及防治与细胞凋亡的异常密切相关。肿瘤过快、过多的生长是由于肿瘤细胞过少的死亡和过多繁殖的结果。许多研究表明,射线、某些药物等均可诱导和影响细胞凋亡,临床上应用的放疗、化疗、热疗的目的也主要是引发细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤的作用。肿瘤细胞对凋亡的耐受是多药耐药(Multidrug resistance, MDR)的一个新的机制。不同的肿瘤细胞对化疗的敏感性差异,主要是因各种肿瘤细胞对凋亡的阈值不同,肿瘤细胞对化疗耐药的实质是药物不能活化其凋亡途径,而促凋亡基因的缺失或抗凋亡基因的过度表达都将导致肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性。Survivin 是新近发现的一种凋亡抑制蛋白,其组织分布具有明显的细胞选择性,与另一凋亡促进基因 caspase-3 的分布显著不同,多数研究提示两者呈负相关性,对 NSCLC 的预后起着不同的作用。K-ras 基因是与 NSCLC 密切相关的一种凋亡相关基因,吸烟是肺腺癌 k-ras 基因突变的一个重要因素,ras 蛋白过度表达能抑制药物和放疗诱导的凋亡,还能影响吉非替尼的疗效。

目前众多的资料表明正常组织中 caspase-3 的表达高于癌组织^[2-4]。本研究通过免疫组化方法检测 NSCLC 中 caspase-3 的阳性表达率为 57.14%,癌旁正常组织为 82.42%,具有统计学差异。其中阳性表达率与病理类型、淋巴结转移、年龄、分期、分化程度有关($P<0.05$),而且许多资料显示 caspase-3 阳性表达率高的患者生存期明显长于低表达患者^[2-4]。本研究显示 caspase-3 与预后有关,阳性患者中位生存期明显长于阴性患者($P=0.0221$),进一步证实 caspase-3 是 NSCLC 预后保护因素,增强 caspase-3 的表达能降低术后复发及转移,延长生存期。国内外研究均表明 survivin 在正常组织中表达很低或不表达,而在病理情况下表达于大多数恶性肿瘤,在肺癌中表达率很高,提示 survivin 在 NSCLC 的发生中可能具有重要作用。与组织类型、淋巴结转移、分期、分化程度、年龄等因素的相关性,目前众说纷纭,意见不统一。本研究显示 survivin 在 NSCLC 中阳性表达率为 50.55%,癌旁正常组

织阳性表达率为 23.08%,两者差异具有统计学意义($P<0.001$);与组织类型、病灶大小、吸烟等无明显相关性,与年龄、分期、淋巴结转移、分化程度、预后有明显相关性($P<0.05$);其结果与 Akyurek N 等^[9]的研究结果基本相符,在他们研究中显示 Survivin 阳性表达率为 64%,与淋巴结转移、分期、预后具有显著性差异($P<0.05$),是预后不良的独立因素。Survivin 在 NSCLC 的发生、发展及预后起着很重要作用。虽然目前对 survivin 和 caspase-3 对 NSCLC 预后的相关性未达到统一意见,从理论上讲 survivin 凋亡抑制因子应是预后不良因素;而 caspase-3 凋亡促进因子应是预后的保护因素。本研究提示 survivin 低表达,中位生存期越长;Caspase-3 高表达,中位生存期越长,而且目前大多数资料均支持以上结论^[3,5,6]。

肺癌中 k-ras 基因点突变主要发生在 NSCLC,有 20%~30%存在 k-ras 基因突变,而小细胞肺癌中极少见,其中以 k-ras 基因中第 12 密码子点突变率最高。k-ras 基因突变与肿瘤分期有显著的联系,分期越晚,突变率发生越高,中位生存期与突变有关,Cox 多变量分析示 k-ras 基因突变在肺癌中有更高危险性^[7]。国外有研究显示 k-ras 基因突变仅发生在吸烟者中,表明吸烟和 k-ras 基因突变有明显相关;吸烟的腺癌患者发生 k-ras 基因突变与非吸烟有差异,表明吸烟是肺腺癌 k-ras 基因突变的一个重要因素^[8]。本研究通过免疫组化方法检测 k-ras 基因表达的 P21 蛋白的阳性率为 72.53%,癌旁正常组织阳性率为 62.64%,两者 k-ras 的表达无统计学差异($P=0.154$),但根据阳性表达率强弱不同的比较具有统计学差异($P=0.003$),其中腺癌的阳性率比鳞癌高($P=0.033$),吸烟组中腺癌的阳性率比鳞癌高($P=0.047$),也证实了吸烟是肺腺癌 k-ras 基因突变的一个重要因素的结论。有研究表明现在正在吸烟和以往曾吸烟但现在已经戒烟的患者比较,k-ras 基因突变率相似,提示吸烟所致肺癌 k-ras 基因突变可能是肺癌发生过程中的早期事件,与预后没有相关性^[9,10]。目前对 k-ras 与预后的相关性尚未达到共识。本研究显示 k-ras 基因阳性表达率与分期、淋巴结转移、年龄、分化程度、预后等均无统计学意义。K-ras 基因点突变和基因扩增均能导致 P21 蛋白的过量表达,因此对于本研究的阴性结果需要更大样本的资料进行基因测序和 P21ras 蛋白定量检测来进一步研究。NSCLC 术后标本通过联合检测 caspase-3 和 survivin 的表达可以对患者预后进行预测,同时还可能预测化疗的疗效。

