

PTEN 和 FasL 蛋白在小细胞肺癌组织中的表达及意义

黄学勤 李清泉

【摘要】 目的 探讨 PTEN(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten)抑癌蛋白、FasL (Fas ligand)蛋白在小细胞肺癌(SCLC)中的表达及两者的相互关系。方法 应用免疫组织化学法检测 42 例 SCLC 组织及 16 例肺良性病变组织 PTEN 蛋白、FasL 蛋白的表达。结果 42 例 SCLC 组织 PTEN 蛋白的表达缺失率 73.8% 显著高于 16 例肺良性病变组织缺失率 0%($P < 0.01$)。PTEN 的缺失率与临床 TNM 分期有密切关系($P < 0.01$) ,但与性别、年龄、细胞学亚型无明显关系($P > 0.05$)。42 例 SCLC 组织中 FasL 阳性表达率(50.0%)显著高于 16 例肺良性病变组织(12.5%)($P < 0.05$)。PTEN 表达缺失的 SCLC 组织 FasL 蛋白表达水平显著高于 PTEN 阳性的 SCLC 组织($P < 0.01$)。结论 PTEN 的缺失与部分 SCLC 的发生发展有关 ,SCLC 组织存在 FasL 表达上调 ,PTEN 抑癌蛋白丢失可能与 FasL 表达上调有关。

【关键词】 小细胞肺癌 抑癌基因 PTEN FasL 免疫组织化学技术 免疫逃逸

【中图分类号】 R734.2

Expression of phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN) and FasL proteins and their significance in human small cell lung cancer HUANG Xueqin , LI Qingquan. Respiratory Department , Renmin Hospital , Wuhan University , Wuhan , Hubei 430060 , P. R. China

Corresponding author : HUANG Xueqin

【Abstract】 Objective To investigate the expression of phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten(PTEN) and FasL proteins and their correlation in human small cell lung cancer(SCLC). **Methods** Expression of PTEN and FasL proteins was examined in forty-two paraffin-embedded SCLC samples and sixteen pulmonary benign disease tissues by SP immunohistochemical technique. **Results** Loss rate of PTEN protein in 42 SCLC tissues (73.8%) was significantly higher than that in 16 pulmonary benign disease tissues (0%)($P < 0.01$). The loss of PTEN protein was related to TNM stages ($P < 0.01$) , but not to cellular subtype and sex and age of patients ($P > 0.05$). FasL expression rate in 42 SCLC tissues (50.0%) was remarkably higher than that in 16 pulmonary benign disease tissues (12.5%)($P < 0.05$). The expression level of FasL in PTEN-positive SCLC tissues was significantly lower than that in PTEN-negative SCLC tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** Loss of PTEN expression may play a role in the occurrence and development of SCLC. There is an up-regulated expression of FasL protein in SCLC. The deletion of PTEN protein may be related to the high expression of FasL protein.

【Key words】 Small cell lung cancer(SCLC) Tumor suppressor gene Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten(PTEN) Fas ligand(FasL) Immunohistochemical technique Immune escape

PTEN (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten)基因是具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因 ,定位于 10q23^[1]。FasL 是 Fas 的配体 ,两者的交联及信号转导有诱导凋亡、维持机体自身稳定等重要作用。近年来发现某些肿瘤 FasL 表达上调 ,在肿瘤局部营造免疫豁免而逃避免疫系统的攻击 ,

使肿瘤进展。有学者认为 PTEN 蛋白可抑制 FasL 蛋白的表达^[2] ,但国内外尚无两者关系的实验研究。本研究旨在对小细胞肺癌(SCLC)中 PTEN 蛋白的表达、缺失与临床特征的关系 ,以及 PTEN 蛋白与 FasL 蛋白表达的关系进行探讨。

材料和方法

1.1 材料 收集我院 1997 年 1 月 ~ 2002 年 12 月病理科保存的 SCLC 标本 42 例 ,男性 34 例 ,女性 8 例 ,年

龄 37 ~ 71 岁(平均 56.7 岁)。留取标本前均未接受化疗、放疗或免疫治疗。42 例 SCLC 中, I 期 5 例, II 期 8 例, III + IV 期 29 例; 燕麦细胞癌 18 例, 中间型细胞癌 11 例, 复合型小细胞癌 13 例。选取同期肺良性病变 16 例作为对照, 其中肺大泡 4 例, 炎性假瘤 2 例, 结核球 3 例, 支气管扩张 7 例。作 4 μm 厚连续切片。所有标本都有明确的病理学诊断。

1.2 试剂 鼠抗人 PTEN 单克隆抗体和鼠抗人 FasL 单克隆抗体购于美国 Neomarker 公司, SP 试剂盒购于北京中山生物技术公司。

1.3 方法 采用免疫组化 SP 法检测 PTEN、FasL 蛋白的表达。PTEN 单克隆抗体工作浓度为 1: 50, FasL 单克隆抗体工作浓度为 1: 10。抗原修复采用柠檬酸煮沸热修复。所有操作均按说明书进行。

1.4 结果判断标准 PTEN 结果判断以细胞质中出现棕黄色并高于背景且无特异染色为阳性细胞, 随机选择 4 个高倍视野, 以阳性细胞数 ≥ 10% 为阳性, < 10% 为阴性^[3]。

FasL 结果判断以细胞膜上或细胞质中出现棕黄色并高于背景且无特异染色为阳性细胞, 随机选择 4 个高倍视野, 以阳性细胞数 ≥ 10% 为阳性, < 10% 为阴性^[4]。所有 SCLC 染色后的 FasL 标本均在同等条件下经 HPIAS-1000 图像分析系统进行光密度测定, 所得平均光密度作为该标本 FasL 蛋白的表达水平。

1.5 统计学处理 采用 χ^2 检验、*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 42 例 SCLC 组织及 16 例肺良性病变组织中 PTEN 的表达 PTEN 阳性染色部位在细胞浆, 图 1 为 PTEN 阳性染色的 SCLC 组织; 图 2 为 PTEN 阳性染色的肺良性病变组织。42 例 SCLC 标本中 11 例呈 PTEN 阳性染色, 阳性率 26.2%; 16 例肺良性病变全部呈阳性表达, 阳性率 100%, 两者比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。临床 TNM 分期愈晚的 SCLC 组织阳性率愈低 ($P < 0.01$), I 期与 II 期、I 期与 III + IV 期、I + II 期与 III + IV 期比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 但 II 期与 III + IV 期比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。PTEN 的缺失与细胞学类型、年龄、性别无明显关系 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 42 例 SCLC 组织及 16 例肺良性病变组织中 FasL 的表达 FasL 蛋白主要表达在细胞膜上, 少量表达在细胞质中, 图 3 为 FasL 阳性染色的 SCLC 标本。42 例 SCLC 中 FasL 阳性率 (50.0% 21/42) 显著高于肺良性

病变组织 (12.5% 2/16) ($P < 0.05$)。

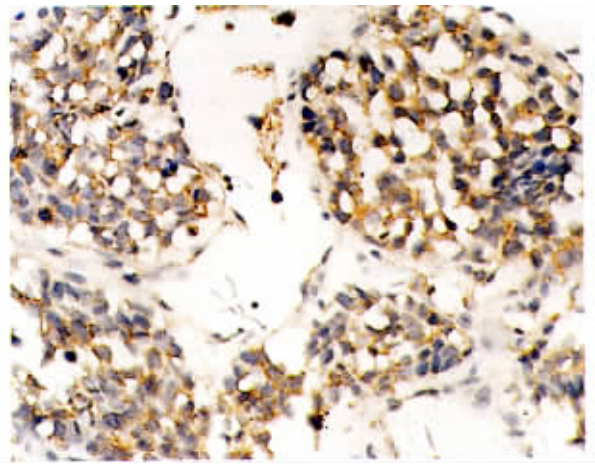


图 1 PTEN 在 SCLC 组织中的表达 S-P × 200

Fig 1 The expression of PTEN in SCLC tissue S-P method × 200

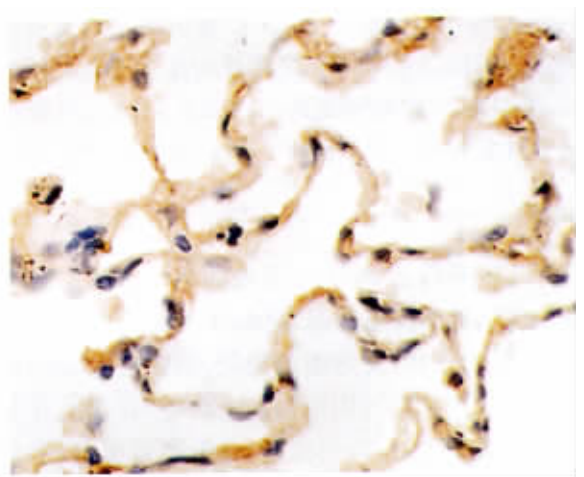


图 2 PTEN 在肺良性病变组织中的表达 S-P × 400

Fig 2 The expression of PTEN in benign pulmonary disease tissue S-P method × 400

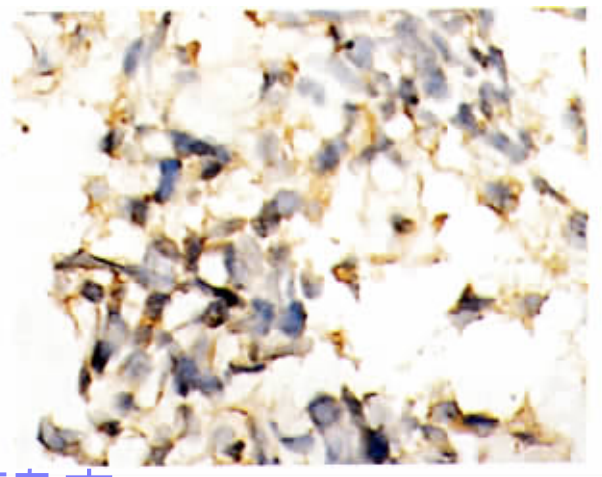


图 3 FasL 在 SCLC 组织中的表达 S-P × 400

Fig 3 The expression of FasL in SCLC tissue S-P method × 400

表 1 PTEN 表达与 SCLC 临床生理病理特征的关系

Tab 1 Relationship between PTEN expression and clinical pathophysiological characteristics of SCLC

| Characteristic | n | PTEN expression | | P value |
|-------------------------------|----|-----------------|----|---------|
| | | + | - | |
| Sex | | | | |
| Male | 34 | 9 | 25 | >0.05 |
| Female | 8 | 2 | 6 | |
| Age(year) | | | | |
| ≤50 | 19 | 6 | 13 | >0.05 |
| >50 | 23 | 5 | 18 | |
| TNM stage | | | | |
| I | 5 | 4 | 1 | <0.01 |
| II | 8 | 3 | 5 | |
| III + IV | 29 | 4 | 25 | |
| Histological subtype | | | | |
| Oat cell carcinoma | 18 | 4 | 14 | >0.05 |
| Intermediate cell carcinoma | 11 | 2 | 9 | |
| Combined small cell carcinoma | 13 | 5 | 8 | |

2.3 PTEN 表达与 FasL 表达的关系 11 例 PTEN 阳性表达的 SCLC 组织中 FasL 蛋白的平均光密度为 5.842 ± 2.786 , 31 例 PTEN 阴性表达的 SCLC 组织中 FasL 蛋白的平均光密度为 8.435 ± 2.639 , 两者比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

PTEN 基因是 1997 年发现的第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 定位于 10q23, 具有抑制细胞粘附、细胞迁移, 促进细胞分化、细胞衰老和细胞凋亡等多种生理功能并阻断细胞生长于 G_1 期。在多种肿瘤如恶性胶质瘤、前列腺癌、恶性黑色素瘤、子宫内膜癌中均有突变、缺失, 胚系突变易患 Cowden 病、Bannayan-zonana 综合征^[5,6]。有研究者认为 PTEN 与 p53 相比具有更多的功能, 可能成为更有前景的治疗靶点^[7]。

目前关于 PTEN 的研究多集中在基因水平, 对 PTEN 蛋白水平的表达、与肿瘤进程的关系以及与其它基因的相互作用研究较少。我们采用免疫组化的方法直接检测 PTEN 蛋白的表达, 结果显示 42 例 SCLC 组织中 PTEN 蛋白表达的缺失率为 73.8%, 16 例肺良性病变组织中 PTEN 蛋白全部阳性表达, 两者有显著性差异, 提示 PTEN 的缺失可能与 SCLC 的发生有关。Yokomizo 等^[8]发现 18% 的 SCLC 细胞株和 10% 的原发 SCLC 有 PTEN 基因的点突变、小片段缺失、杂合性缺失。我们检测到的 PTEN 蛋白水平的缺失率高于基因水平, 提示: ①PTEN 蛋白的表达存在转录、翻译或翻译后水平的调控。Ebert 等^[9]在 TGF- β_1 转基因鼠胰腺腺组织中发现 PTEN mRNA 减少, 认为 PTEN 受 TGF-

β_1 调控; ②可能在 SCLC 组织中 10q23 区域存在尚未发现的突变、缺失。因此, 在 SCLC 中关于 PTEN 蛋白的表达还有许多问题需要进一步研究。

PTEN 通过对脂质第二信使 PIP3 (1, 3, 5-三磷酸肌醇) 的去磷酸化作用影响 PI3k/PKB/Akt 信号通道抑制干细胞的分化, 通过对斑点粘附激酶 (FAK) 的去磷酸化作用影响整合素介导的粘附过程, 抑制肿瘤细胞的浸润。Hahn 等^[10]认为 PTEN 在晚期肿瘤及转移瘤中有较高的突变率。Hwang 等^[7]在 PTEN -/- 的鼠黑色素瘤 B16F10 细胞株中导入 PTEN, 证实 PTEN 蛋白能降低基质金属蛋白酶 (MMPs)、胰岛素样生长因子 (IGFs)、血管内皮生长因子 (VEGF) 的分泌, 并且外源性 PTEN 能抑制 B16F10 转染肿瘤的生长, 认为 PTEN 的缺失与肿瘤血管形成、肿瘤的生长及癌细胞的转移有关。Cheney 等^[11]将野生型 PTEN 转染入 PTEN 突变的胶质母细胞瘤, 结果肿瘤的生长速度减慢, 认为 PTEN 的缺失与胶质母细胞瘤的细胞分化、发展、转移有关。我们分析了 PTEN 蛋白的缺失与 SCLC 临床病理特征的关系, 发现 PTEN 蛋白的缺失与 SCLC 细胞学类型、性别、年龄无明显关系, 而临床分期愈晚的 SCLC 组织 PTEN 蛋白的缺失率愈高。综上所述, 我们推测在 SCLC 中 PTEN 蛋白丢失的程度与肿瘤的进展成正相关。

早期认为 FasL 仅限于淋巴组织和某些免疫豁免组织, 是 T 淋巴细胞杀伤靶细胞的机制之一。近期研究认为某些肿瘤组织也有 Fas/FasL 表达异常, 肿瘤细胞表达 FasL, 通过凋亡机制杀伤表达 Fas 的 T 淋巴细胞^[12], 即免疫逃逸。我们的研究也证实在 SCLC 组织中存在 FasL 的表达上调。表达于 SCLC 癌细胞上的

FasL 通过与免疫细胞表面的 Fas 结合而导致免疫细胞凋亡,有利于癌细胞的免疫逃逸,使肺癌进展。

为了分析 PTEN 蛋白与 FasL 蛋白表达的关系,我们在研究中采用图像分析法测定 SCLC 组织中 FasL 蛋白的相对含量,发现 PTEN 蛋白缺失的 SCLC 组织中 FasL 蛋白的表达水平明显高于 PTEN 蛋白阳性的 SCLC 组织。Penninger 等^[2]认为 PTEN 通过 PI3k/PKB/Akt、Erk/MAPK 途径抑制 FasL 的表达,认为 PTEN 蛋白对 FasL 蛋白表达有抑制作用,FasL 蛋白的表达受基因水平调控,PTEN 的调控可能是其机制之一,但目前尚无相关实验研究。在 SCLC 中,PTEN 抑癌蛋白丢失后失去对 FasL 基因的负性抑制而使 FasL 蛋白表达上调,异常表达的 FasL 蛋白与肿瘤浸润性淋巴细胞表面的配体结合而使其凋亡,导致 SCLC 癌细胞免疫逃逸。

综上所述,PTEN 抑癌蛋白的缺失与部分 SCLC 的发生、发展、转移有关。FasL 表达上调与 PTEN 抑癌蛋白丢失有关,并可诱导免疫逃逸,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997 275(5308): 1943-1947.
- 2 Penninger JM, Woodgett J. Stem cells. PTEN--coupling tumor suppression to stem cells? *Science* 2001 294(5549): 2116-2118.
- 3 Torres J, Navarro S, Roglá I, et al. Heterogeneous lack of expression of the tumour suppressor PTEN protein in human neoplastic tissues. *Eur J Cancer* 2001 37(1): 114-121.

- 4 Yang RR, Zhou Y. Relationship between the expression of Fas and FasL and apoptosis and its significance. *Cancer* 2002 21(1): 101-102. [杨仁荣,周燕.肺癌组织中 Fas、FasL 表达与凋亡的关系及其意义. *癌症* 2002 21(1): 101-102.]
- 5 Tamura M, Gu J, Takino T, et al. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* 1999 59(2): 442-449.
- 6 Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 1999 91(22): 1922-1932.
- 7 Hwang PH, Yi HK, Kim DS, et al. Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Cancer Lett* 2001 172(1): 83-91.
- 8 Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H, et al. PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 1998 17(4): 475-479.
- 9 Ebert MP, Fei G, Schandl L, et al. Reduced PTEN expression in the pancreas overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Br J Cancer* 2002 86(2): 257-262.
- 10 Hahn M, Wieland I, Koufaki ON, et al. Genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in human brain metastases. *Clin Cancer Res* 1999 5(9): 2431-2437.
- 11 Cheney IW, Johnson DE, Vaillancourt MT, et al. Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer. *Cancer Res* 1998 58(11): 2331-2334.
- 12 Pluygers E, Sadowska A, Chyczewski L, et al. The impact of immune responses on lung cancer and the development of new treatment modalities. *Lung Cancer* 2001 34(Suppl 2): S71-S77.

(收稿 2003-07-22 修回 2003-12-05)

(本文编辑 李蓓兰)

· 消息 ·

《癌症》杂志独立网站正式开通暨征订启事

《癌症》现已正式开通了独立网站,网址: <http://www.cjcsysu.cn>。可供读者快速浏览到《癌症》最新一期和以往各期(将逐步补充以往期次)发表的论文。不久,读者还可在 MEDLINE 网页实时点击浏览到《癌症》全文,也可在《癌症》网页直接进入 MEDLINE 检索。为了进一步提高杂志在国内外的影响,编辑部致力增加刊发篇幅,缩短发表周期,提高出版质量,争取《癌症》杂志早日加入 SCI。

《癌症》杂志遵循基础与临床相结合、普及与提高相结合的办刊宗旨,以质为本,与时俱进。开设有精英荟萃、快速报道、基础研究、临床研究、述评、专题研究、技术与方法、综述、个案报告、简讯等栏目。读者对象为从事肿瘤防治研究的医、教、研工作者及相关学科的学者,以及医学院的研究生、博士生等。欢迎广大读者浏览《癌症》网站,并欢迎广大读者订阅和投稿。读者可在全国邮局订阅,也可汇款到本刊订购(免邮寄费)。地址: 510060 广州市东风东路 651 号中山大学肿瘤防治中心《癌症》编辑部。电话/传真: 020-87343336。E-mail: cjc@sicsysu.cn 或 cjcgz@gzsums.edu.cn。

中国肺癌杂志
www.lungca.org