

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2003.01.13

FLIP 在非小细胞肺癌中的表达及其与细胞凋亡的关系

曹勇 李清泉 钟立厚 王爱玲

【摘要】 目的 研究 FLIP 在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达并观察其与细胞凋亡的关系。方法 采用免疫组化技术检测 FLIP 在 48 例 NSCLC 和 16 例肺良性病变组织中的表达,并应用 TUNEL 技术检测 48 例 NSCLC 的凋亡情况。结果 肺癌组织中 FLIP 的表达率为 83.33% (40/48),明显高于肺良性病变组织(25.00%) ($P < 0.01$)。FLIP 的表达水平与 TNM 分期及淋巴结转移有密切关系,但与肿瘤组织学分型、分化程度无明显关系。FLIP 在肺癌组织中的表达水平与癌细胞凋亡指数(AI)未见明显相关性($r = -0.211, P > 0.05$)。结论 FLIP 的过量表达在 NSCLC 的发生发展中起重要作用,但与细胞凋亡无明显关系。

【关键词】 非小细胞肺癌 FLIP 细胞凋亡 免疫组化技术 TUNEL 技术

【中图分类号】 R734.2

Expression of FLIP and its correlation with apoptosis in non-small cell lung cancer CAO Yong, LI Qingquan, ZHONG Lihou, WANG Ailing. Respiratory Department, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430061, P. R. China

【Abstract】 **Objective** To investigate the relation between FLIP expression and apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** FLIP expression was examined in forty-eight paraffin-embedded NSCLC samples and 16 benign pulmonary disease tissues by immunohistochemistry method. Apoptosis of NSCLC cells was detected by TUNEL technique. **Results** The positive rate of FLIP expression in NSCLC was 83.33% (40/48), which was significantly higher than that in benign pulmonary disease tissues ($P < 0.01$). The expression level of FLIP was closely related to TNM stages and lymph node involvement, but not to histological classification and cell differentiation. No correlation was observed between the expression of FLIP and apoptosis index of tumor cells ($r = -0.211, P > 0.05$). **Conclusion** Overexpression of FLIP may be involved in the progression of NSCLC, but its expression may not be related to cell apoptosis in NSCLC.

【Key words】 NSCLC FLIP Apoptosis Immunohistochemistry TUNEL

Caspase 是近年来细胞凋亡分子生物学研究的重要发现。研究表明 caspase-8 较 caspase-3、caspase-6^[1] 及 caspase-9^[2] 与 NSCLC 的关系更为密切,其失活与肺癌的发生发展、耐药性产生均有一定关系。因此,针对 caspase-8 及其抑制物的研究越来越受到关注。FLIP (FLICE-inhibitory proteins) 为 caspase-8 的抑制物,可阻滞 Fas、TNFR、TRAILR、DR3 等介导的凋亡^[3]。研究表明 FLIP 的过量表达与恶性黑色素瘤^[4]、Kaposi 肉瘤^[5]、非何杰金氏淋巴瘤^[6]、大肠癌^[7] 等多种肿瘤的发生发展有关。基于以上研究进展,本实验采用免疫组化和原位细胞凋亡染色技术,观察肺癌组织中 FLIP 的表达与细胞凋亡的关系,以探讨 FLIP 在 NSCLC 发生发展中的可能作用。

1 材料和方法

作者单位:430061 武汉大学人民医院呼吸内科

1.1 材料来源 48 例 NSCLC 及 16 例肺良性病变石蜡组织切片均取自武汉大学人民医院 1996 ~ 2000 年接受手术治疗的患者。患者术前均未行放、化疗,术后均有明确的病理学诊断。肺癌患者中男 35 例,女 13 例;年龄 32 ~ 78 岁,平均 56.3 岁;鳞癌 21 例,腺癌 20 例,大细胞癌 7 例;未、低分化癌 16 例,中分化癌 18 例,高分化癌 14 例;根据 UICC 1997 年修订的肺癌分期标准: 期 16 例, 期 20 例, + 期 12 例;N₀ 17 例,N₁₋₃ 31 例。肺良性病变组包括:肺大泡 4 例,炎性假瘤 2 例,支气管扩张 7 例,肺结核球 3 例。

1.2 试剂 第一抗体兔抗人 FLIP_{S/L} 多克隆抗体(H-202)购于美国 Santa Cruz 公司。SP 免疫组化试剂盒购于福州迈新生物技术公司。TUNEL 检测试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。

1.3 方法 免疫组化检测采用微波处理抗原;FLIP_{S/L} 抗体(1:125),27 °C 孵育 1 h。其余均参照说明书进行。TUNEL 检测参照产品说明书进行。以上所

有样本均设有阴性对照。

1.4 结果判定 FLIP 染色为棕黄色颗粒,定位于细胞浆内。每张玻片随机选取 5 个视野,参照 Ryu 等^[7]的方法,阳性细胞数 < 5% 为阴性, 5% 为阳性。结果半定量法,所有阳性片均置于 10 ×40 倍镜下,随机选取 5 个视野,经 HPIAS-1000 图像分析系统分析,计算出平均阳性单位 pu (positive unit)。pu = (G - G_{max}) / G_{max} ×100, G、G_{max} 分别为待测结构和背景的平均灰度, G_{max} 为系统预设 255。并按下列关系算出各标本阳性染色度,阳性染色度 = pu ×阳性面积百分比。

凋亡指数(AI)的测定:以细胞核内出现棕褐色颗粒为阳性染色,即为凋亡细胞。每张切片计数 500 个癌细胞,其中凋亡细胞占细胞总数的百分数为 AI 值。

1.5 统计分析 χ^2 检验、方差分析及 Spearman 等级相关检验均借助 SPSS10.0 软件完成。

2 结果

2.1 肺癌组织与肺良性组织中 FLIP 阳性率的比较

FLIP 蛋白呈棕黄色颗粒,定位于细胞浆内。由图 1、2 可见,肺癌组织中 FLIP 染色阳性细胞成团分布,而周围组织无 DAB 染色;良性组织中阳性染色细胞染色浅且散在分布(图 3)。肺癌组织中 FLIP 阳性率为 83.33% (40/48),肺良性组织中阳性率为 25.00% (4/16),两者有显著性差异($\chi^2 = 19.006, P < 0.01$)。

2.2 FLIP 染色强度与 NSCLC 临床病理特征的关系(表 1) FLIP 在 48 例肺癌组织中的平均染色强度为 16.454 ±8.974。FLIP 的染色强度与 NSCLC 的组织学分类、细胞分化无明显关系。但 FLIP 染色强度随肺癌分期增高而增高,并且有淋巴结转移的肺癌组织 FLIP 染色强度明显高于无淋巴结转移的肺癌组织($P < 0.01$)。

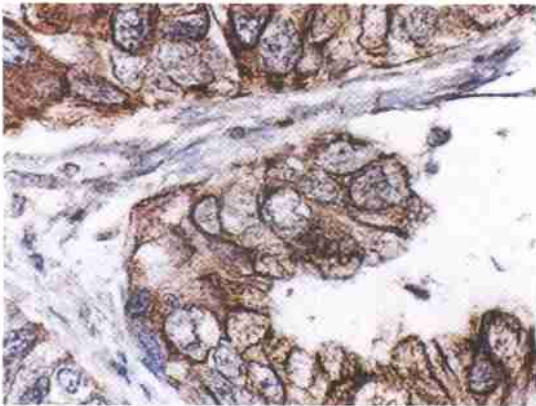


图 1 FLIP 在肺腺癌组织中高表达 S-P ×400

Fig 1 The high expression of FLIP in pulmonary adenocarcinoma S-P method ×400

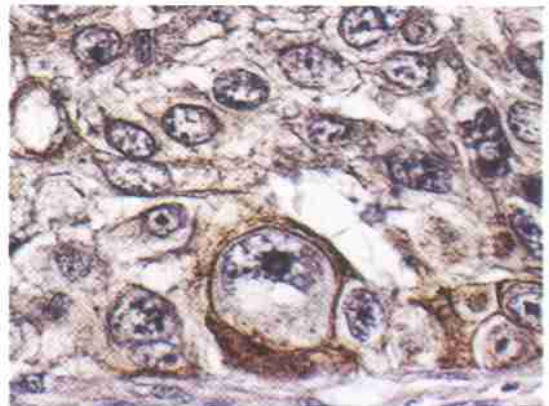


图 2 FLIP 在大细胞肺癌组织中的表达 S-P ×400

Fig 2 The high expression of FLIP in large cell lung cancer S-P method ×400

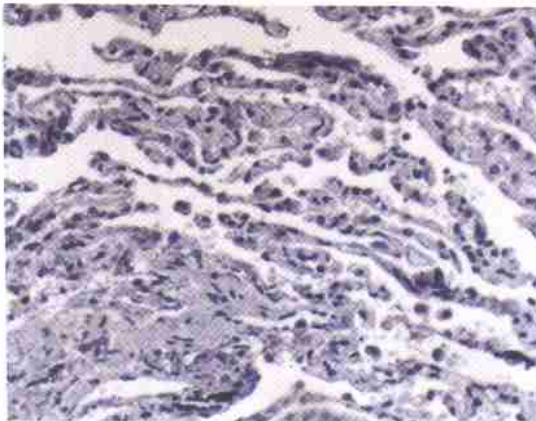


图 3 FLIP 在肺良性病变组织中低表达 S-P ×200

Fig 3 The low expression of FLIP in benign lesion tissues S-P method ×200

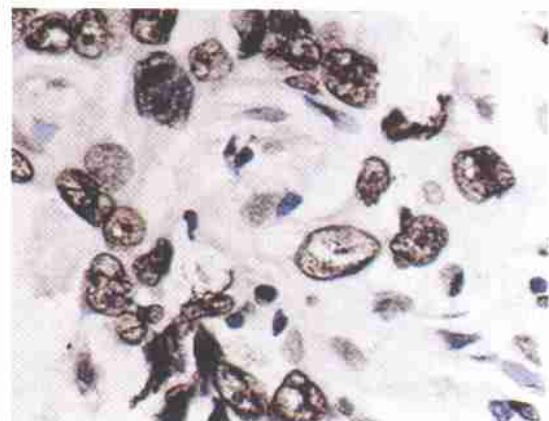


图 4 肺腺癌组织中 TUNEL 染色阳性细胞 ×400

Fig 4 Positively stained apoptotic adenocarcinoma cells TUNEL ×400

2.3 FLIP 与癌细胞凋亡的关系 48 例 NSCLC 组织中均可测到凋亡细胞的存在(图 4), AI 值 6.412 ± 2.010 。由表 1 可见, AI 值虽有随肿瘤分期升高、细胞

分化降低而升高的趋势,但无明显的意义(P 均 > 0.05)。采用 Spearman 等级相关检验, FLIP 染色强弱与 AI 无明显相关性($r = -0.211, P > 0.05$)。

表 1 FLIP、AI 与 NSCLC 临床病理特征的关系

Tab 1 Correlation of FLIP and AI with clinical pathophysiological characteristics of NSCLC

Characteristic	n	FLIP			Apoptosis	
		Expression	F	P	AI (%)	P
Histological classification						
Squamous cell carcinoma	21	17.095 ±8.384	F = 1.171	P > 0.05	6.321 ±1.741	P > 0.05
Adenocarcinoma	20	17.466 ±9.372			6.260 ±2.372	
Large cell lung cancer	7	11.641 ±7.945			7.117 ±1.400	
P-TNM stage						
-	16	10.786 ±7.124	F = 8.723	P < 0.01	6.226 ±1.368	P > 0.05
+	20	16.882 ±7.843	q = 3.267	P < 0.05	6.266 ±2.422	
+	12	23.299 ±7.871	q = 3.867	P < 0.01	6.902 ±1.891	
Cell differentiation						
Well	14	16.398 ±10.517	F = 0.406	P > 0.05	5.684 ±1.857	P > 0.05
Moderate	18	17.816 ±7.107			6.667 ±1.790	
Non + poor	16	14.971 ±9.151			6.761 ±2.201	
Lymph node status						
N0	17	10.601 ±6.950	t = 3.824	P < 0.01	6.488 ±1.689	P > 0.05
N1 ~ 3	31	19.664 ±8.314			6.370 ±2.165	

3 讨论

1997 年, Irmiler 等^[3]在研究恶性黑色素瘤时发现, 肿瘤细胞内有一种结构类似 caspase-8, 但不具备酶活性的蛋白高表达。它具有 2 个死亡效应区(DED), 因而可竞争性地与 FADD 或 caspase-8 上的 DED 结合, 阻断死亡信号复合体(DISC)形成, 从而抑制凋亡。该蛋白即是 FLIP。FLIP 基因定位于人染色体 2q33。其蛋白形式有 2 种: 长链 FLIP_L 和短链 FLIP_S。但两种蛋白谁的作用强, 目前尚无定论。本实验所采用的抗体 FLIP_{S/L} 主要针对这两种蛋白形式的共同肽链结构, 目的是避免检验中有所偏颇。但从理论上讲, 蛋白的阳性率会较单一的形式要高。

FLIP 的过量表达在肿瘤的发生中起重要作用。有报道 FLIP 在恶性黑色素瘤^[4]、Kaposi 肉瘤^[5]、非何杰金氏淋巴瘤^[6]、大肠癌^[7]等肿瘤中过量表达。Bullani 等^[4]发现 29 例恶性黑色素瘤中 FLIP 表达率为 83%, 明显高于良性病变的 3%。Ryu 等^[7]检测到 52 例大肠腺癌中 FLIP 阳性率为 78.8%, 明显高于良性息肉及癌旁组织。我们采用免疫组化技术检测到 48 例肺癌组织中 FLIP 阳性率为 83.33% (40/48), 肺良性组织中为 25.00% (4/16), 肺癌组织的表达显著高于良性病变($P < 0.01$)。由以上研究可以推论, FLIP 的过量表达与多种肿瘤的发生有关。这可能是细胞癌

变中的重要环节, 即细胞内染色体异常改变, 使 FLIP 基因激活并过度转录表达, FLIP 蛋白增多则进一步促进细胞恶化。

我们进一步检测了 FLIP 与 NSCLC 临床病理特征的关系, 并引入图像分析技术, 进行半定量分析。实验发现 FLIP 在不同类型及不同分化程度的 NSCLC 中的表达无显著差异($P > 0.05$)。但 FLIP 染色强度随肺癌分期增高而增高, + 期为 23.299 ± 7.871 , 期为 16.882 ± 7.843 , 期为 10.786 ± 7.124 。同时, 有淋巴结转移的肺癌组织 FLIP 染色强度明显高于无淋巴结转移的肺癌组织($P < 0.01$)。因而推论 FLIP 在肺癌进展中发挥着重要作用。在 Kaposi 肉瘤中 vFLIP 随肿瘤分期增高而增多, 但 Ryu 发现 FLIP 与大肠腺癌分级分期均无关。FLIP 在肿瘤组织中的表达可能存在组织差异性或者其它调节机制, 其不同肿瘤组织中的凋亡作用有待探讨。

为了进一步研究 FLIP 在 NSCLC 中的凋亡抑制作用, 我们分析了染色强度与凋亡指数之间的相关性, 发现两者间无明显相关性。Frese 等^[8]通过流式细胞术检测细胞凋亡的同时, 用 Western blot 技术检测 FLIP, 对 6 个 NSCLC 细胞系进行检测, 认为 FLIP 在 TRAIL 诱导的细胞凋亡中抗凋亡作用不大。本实验从另一方面证实 FLIP 与肺癌细胞凋亡无明显关系。肺癌的发生发展是一个多基因多步骤的过程, 其中的

凋亡调控由多种基因参与,FLIP 对凋亡的作用可能是多个基因的同时作用或顺序作用。

综上所述,FLIP 在肺癌的发生发展中扮演着重要角色,但其具体作用机制仍有待探讨。

参 考 文 献

- 1 Tormaner-Napankangas U, Soini Y, Kahlos K, et al. Expression of caspase-3, -6 and -8 and their relation to apoptosis in non-small cell lung carcinoma. *Int J Cancer*, 2001, 93(2) 192-198.
- 2 Ferreira CG, Span SW, Peters G, et al. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCFH460. *Cancer Res*, 2000, 60(24) 7133-7141.
- 3 Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997, 388(6638) 190-195.
- 4 Bullani RR, Huard B, Viard-Leveugle I, et al. Selective expression of

- FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(2) 360-364.
- 5 Sturzl M, Hohenadl C, Zietz C, et al. Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(20) 1725-1733.
- 6 Irisarri M, Plumas J, Bonnefoix T, et al. Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line. *Leukemia*, 2000, 14(12) 2149-2158.
- 7 Ryu BK, Lee MG, Chi SG, et al. Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma. *J Pathol*, 2001, 194(1) 15-19.
- 8 Frese S, Brunner T, Gugger M, et al. Enhancement of Apo2L/TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines by chemotherapeutic agents without correlation to the expression level of cellular protease caspase-8 inhibitory protein. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(1) 168-174.

(收稿:2002-06-20 修回:2002-09-09)
(本文编辑 李蓓兰)

短篇报道

气管肿瘤环形切除成形术三例

寇仁业 邹志强 袁耒 许世宁 麻彬 尹立国 孙桂武 宁继顺

【中图分类号】 R734.2

气管肿瘤不易早期诊断,常在气道发生梗阻时才被发现。我们自 2000 年 10 月以来共治疗 3 例,现总结报告如下。

临床资料 全组 3 例,均为男性;年龄 16~56 岁。主要症状有刺激性咳嗽 2 例,咳痰带血和咯血各 1 例,吸气性呼吸困难和喘鸣各 1 例。自出现症状至确诊最短 1 个月,最长 2 年,平均 6 个月。2 例被误诊为喘息性支气管炎。胸部 X 线片均未发现肿瘤,全部行气管 CT 及纤维支气管镜检查发现病变。3 例均行痰细胞学检查,其中 2 例查见癌细胞。肿瘤均位于胸段气管,长度为 2.0~3.5 cm。肿瘤阻塞气管腔一半以上者 2 例,口径最小为 0.5 cm。全部行气管袖式切除对端吻合术。术后病理诊断为鳞状细胞癌 2 例,腺样囊性癌 1 例。1 例患者于术后 6 个月因脑转移死亡;余 2 例现仍健在,其中 1 例已生存 19 个月。

讨论 原发性气管癌临床较少见,约占同期恶性肿瘤总数的 0.05%^[1]。早期

无特异性症状,在气管病变未超过管腔截面 75%时常不会出现阻塞症状,常规 X 线检查不易发现^[2]。本病极易误诊为哮喘或支气管感染等,早期误诊率可达 72.9%^[3]。误诊原因主要为医师对本病认识不足或过多考虑常见呼吸道疾病而忽略了本病。我们认为提高临床医师的诊断水平是获得早期诊断、早期治疗的关键。CT 及纤维支气管镜检查是诊断气管肿瘤的重要手段。对临床上反复出现呼吸困难或喘鸣音,经用解痉药治疗无效的患者,应及早行纤维支气管镜或气管 CT 检查,以明确诊断。

胸段气管肿瘤行气管环形切除对端吻合术是首选的外科治疗术式,一般经右胸入路。本组 3 例均行此术式,效果良好。也可采用胸骨正中切口。我们体会恰当的麻醉方法、合理的手术操作是手术成功的关键。手术中必须注意:切忌广泛游离,以切除距肿瘤上下缘各不超过 1 cm 为宜;吻合时气管上下端对齐,不可重叠缝合;打结时头颈前倾 15~20°,确保无

张力吻合;线结在管腔外;胸膜片或心包片盖盖吻合部;术后头颈部前倾 15°,颈颌式固定 3~4 周。

术前需嘱患者练习头颈前倾位进食、咳嗽及咯痰等^[4]。术后要加强呼吸道管理,早期主要问题是咳痰困难,除给予促进痰液稀释的药物外,气管内吸痰是最积极有效的方法,必要时还可在纤维支气管镜下吸痰。

参 考 文 献

- 1 韩俊庆,田世禹,徐东华,等.原发性气管癌 44 例临床分析. *中华胸心血管外科杂志*, 1998, 14(3) 164.
- 2 张海清,朱哲俊,周晓明,等.原发性气管癌 5 例报告. *中华肿瘤杂志*, 1995, 17(3) 358.
- 3 柳伟明,洪顺飞,薄维娜.原发性气管癌误诊原因分析. *医师进修杂志*, 1996, 19(8) 47.
- 4 苏应衡主编.实用胸部外科手术学. 济南:山东科学技术出版社, 1996, 537.

(收稿:2002-10-25 修回:2002-12-23)
(本文编辑 李蓓兰)