

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.06.13

大鼠肺鳞癌 caspase-3 基因表达水平与其细胞增殖关系的研究

陈洪雷 刁路明 陈福春 刘绚 张玉霞 叶波 刘铭球

【摘要】 目的 探讨 caspase-3 在大鼠肺鳞癌变转化过程中的表达及其与细胞增殖的关系。方法 Wistar 大鼠 60 只,其中 50 只用化学致癌物 3-甲基胆蒎(MCA)及二乙基亚硝胺(DEN)碘油溶液于左肺叶支气管灌注诱发大鼠肺鳞状细胞癌,10 只作为对照。应用免疫组织化学 S-P 法检测促凋亡基因 caspase-3 和增殖细胞核抗原(PCNA)在癌变过程中的表达。结果 34 例大鼠肺鳞癌中 15 例(44.12%)有 caspase-3 的阳性表达,阳性系数为 1.38 ± 0.95 ,均显著低于对照组大鼠支气管粘膜上皮细胞($P=0.007, P<0.01$)和癌前病变($P<0.05, P<0.05$)。对照组大鼠支气管粘膜上皮区、实验组大鼠癌前病变区与肺癌区 PCNA 的平均增殖指数(PCNA-LI)分别为 $14.10 \pm 5.02, 28.13 \pm 8.72, 41.88 \pm 14.24$,两两比较,差异均有显著性($P<0.05$)。Caspase-3 与 PCNA-LI 呈显著负相关($r = -0.7306, P<0.01$)。结论 Caspase-3 失表达促进了肿瘤细胞的生长,可能在大鼠肺鳞癌的发生发展中起着重要的作用。联合检测 caspase-3 和 PCNA 蛋白可作为肺鳞癌变的主要参考指标。

【关键词】 肺肿瘤 大鼠 免疫组织化学 Caspase-3 PCNA

【中图分类号】 R734.2

The relationship between caspase-3 expression and cell proliferation in rat lung squamous cell carcinoma CHEN Honglei*, DIAO Luming, CHEN Fuchun, LIU Xuan, ZHANG Yuxia, YE Bo, LIU Mingqiu. * Department of Pathology, Medical College, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, P. R. China

【Abstract】 Objective To analyse the relationship between caspase-3 expression and cell proliferation, and to find molecular-biology markers to adjust canceration during rat lung squamous cell carcinogenesis. **Methods** The 3-methylcholanthrene(MCA) and diethylnitrosamine(DEN) were used to induce lung squamous cell carcinoma by intra-left lobar-bronchial instillation in 50 Wistar rats, and 10 normal rats as controls. Expression of caspase-3 and PCNA were evaluated by immunohistochemistry(IHC). **Results** Caspase-3 protein positive rate was 44.12% in 34 rat lung squamous cell carcinomas, and positive coefficient value was 1.38 ± 0.95 , which were significantly lower than that of normal bronchial epithelium($P=0.007, P<0.01$) and premalignant lesions($P<0.05, P<0.05$). The mean PCNA-labeling indexes(PCNA-LI) of normal rat bronchial epithelium, premalignant lesions and lung cancer were $14.10 \pm 5.02, 28.13 \pm 8.72$ and 41.88 ± 14.24 ($P<0.05$), respectively. There was a negative correlation between caspase-3 and PCNA-LI($r = -0.7306, P<0.01$). **Conclusion** Loss expression of caspase-3 may promote tumor cell growth, and it may be important in rat lung squamous cell carcinogenesis. Detection of caspase-3 and PCNA proteins can be regarded as major markers in the diagnosis of lung canceration.

【Key words】 Lung neoplasms Rat Immunohistochemistry Caspase-3 PCNA

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China(to LIU Mingqiu)(No. 39870305).

Caspase-3 也称为 Yama 或 apopain,是 ICE-3(in-

terleukin-1 β -converting enzyme-3)亚家族的重要成员,也是调控细胞凋亡的重要因子。它一般以 23 000 的无活性前体存在于细胞质中,当细胞进入凋亡时才被激活。它可以针对任何刺激使细胞发生凋亡,并且可以促进 ICE 家族的其它成员一起促使细胞凋亡^[1]。怎样通过激活的 caspase 酶系统或活化死亡受体启动

本研究受国家自然科学基金(39870305)和浙江省温岭市中医院协作课题资助

作者单位:430071 武汉大学医学院病理教研室(陈洪雷、刁路明、刘绚、张玉霞、叶波、刘铭球)浙江省温岭市中医院胸外科(陈福春)



caspase 系统促进肿瘤细胞的凋亡,这是值得研究的问题。在我室 1980 年建立的动物肺癌模型^[2]的基础上,应用免疫组织化学 S-P 法检测促凋亡基因 caspase-3 和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白在癌变过程中的表达,以探讨上述基因表达与肺癌发生、发展的关系及其相互作用机制。

1 材料和方法

1.1 大鼠肺鳞癌模型的建立及动物处理

Wistar 大鼠 60 只(购于湖北省实验动物中心),雌雄兼有,体重为 150~180 g,分为实验组和对照组。采用“左肺叶支气管内灌注致癌质碘油溶液^[2]”的方法建立大鼠肺癌模型,稍加改良,原来用硫喷妥钠作为灌注前的基础麻醉药,现改用氯胺酮,因前者可引起大鼠咽喉部分泌大量的粘液,增加了灌注难度,而后者效果很好。于灌注致癌质 3-甲基胆蒎(MCA)和二乙基亚硝胺(DEN)的碘油溶液(实验组,50 只)和碘油(对照组,10 只)后的第 15、30、60、90、120 天分批各处死实验组动物 8~12 只和对照组动物 2 只。取病变组织,10% 中性福尔马林缓冲液固定,制备石蜡标本。

1.2 试剂

致癌剂 MCA 和 DEN 为美国 Sigma 公司产品。兔多克隆抗体 caspase-3 浓缩型,工作浓度为 1:50 和鼠单克隆抗体 PCNA 即用型均为美国 Santa Cruz 生物技术公司产品。链霉素抗生素-过氧化物酶免疫组化超敏试剂盒(UltraSensitive™S-P Kit)均购自北京中山生物技术公司。

1.3 免疫组化染色及结果判断

采用 S-P 法,步骤严格按照说明书进行,用 PBS 代替一抗作空白对照,用已知阳性片作阳性对照。DAB 显色,苏木素复染。

Caspase-3 以细胞胞浆内出现棕黄色颗粒散在或弥漫片状分布为染色阳性。按 caspase-3 染色强弱及阳性细胞数两个方面计算 caspase-3 综合记分^[3]: a. 染色强度(0=无,1=弱,2=中,3=强); b. 阳性细胞数(0=无阳性细胞,1=阳性细胞数<25%,2=阳性细胞数 25%~50%,3=阳性细胞数>50%)。a、b 相加的综合记分即为 caspase-3 阳性系数。用 caspase-3 阳性系数大小来表示 caspase-3 的表达高低:a+b 得分为 0~1 则阳性系数为 0;a+b 为 2 则阳性系数为 1;a+b 为 3 则阳性系数为 2;a+b 为 4~5 则阳性系数为 3;a+b 为 6 则阳性系数为 4。综合记分<2 为阴性表达,≥2 分为阳性表达。

PCNA 阳性计数选择标记效果好、阳性细胞分布均匀的区域,以目镜测微网为观察单位,在 400× 视野下计数网格中的阳性细胞数,每例计数 10 个网格,取

其均值以百分数表示,作为细胞增殖指数(PCNA-labeling index, PCNA-LI)。<25% 属低增殖指数,≥25% 属高增殖指数。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数差异显著性用 SNK(*q*) 检验,PCNA-LI 和 caspase-3 的表达值之间作直线相关回归分析。率的比较用 χ^2 检验和四格表的精确概率法。

2 结果

2.1 大鼠肺鳞癌癌变过程中的病理形态学改变

光镜下发现实验组共有 34 只大鼠诱发了肺鳞癌,16 只处于癌前病变(包括鳞状化生和不典型增生)阶段。其癌变过程中可见支气管粘膜上皮增生、过度增生、鳞状化生、不典型增生、原位癌、早期癌、浸润癌几个阶段。早期处死动物肺组织多为癌前病变及原位癌,晚期多为浸润癌。对照组大鼠除部分有间质性肺炎表现外,未发现明显的增生性或肿瘤性病变。

2.2 Caspase-3 蛋白表达

Caspase-3 蛋白表达阳性主要定位于细胞的胞浆,呈散在或弥漫分布(图 1、2)。10 例对照组大鼠支气管粘膜上皮细胞中 9 例(90.00%)有 caspase-3 的阳性表达,阳性系数为 3.10 ± 0.99 ;16 例癌前病变中 12 例(75.00%)有 caspase-3 的阳性表达,阳性系数为 2.25 ± 1.13 ;34 例大鼠肺鳞癌中 15 例(44.12%)有 caspase-3 的阳性表达,阳性系数为 1.38 ± 0.95 ,与对照组大鼠支气管粘膜上皮细胞相比,阳性表达率和阳性系数均有显著性差异($P = 0.007$; $q = 5.86$, $P < 0.01$),且与癌前病变相比阳性表达率和阳性系数的差异也有显著性($\chi^2 = 4.18$, $P < 0.05$; $q = 3.52$, $P < 0.05$)。

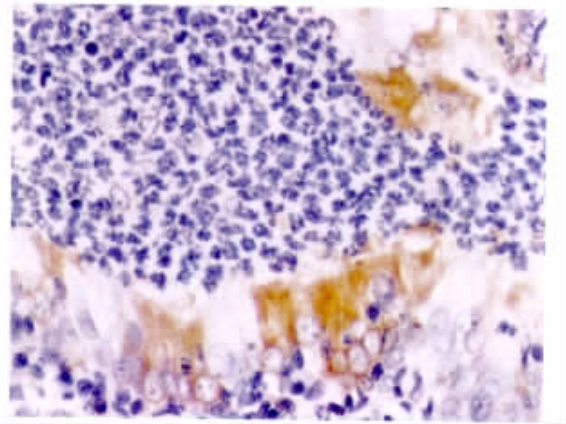


图 1 Caspase-3 蛋白在大鼠支气管粘膜上皮增生中表达 S-P×200
Fig 1 Caspase-3 protein expression in rat bronchial epithelium hyperplasia S-P×200

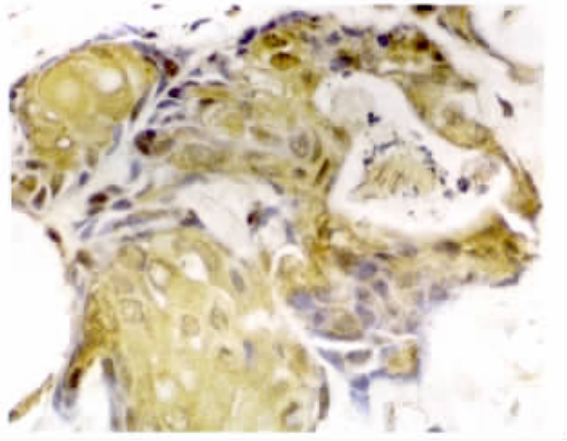


图 2 Caspase-3 蛋白在大鼠肺浸润癌中强阳性表达 S-P×200

Fig 2 Strongly positive expression of caspase-3 protein in rat lung invasive carcinoma S-P×200

2.3 PCNA 蛋白表达 PCNA 蛋白的阳性表达位于细胞核内,阳性细胞散在分布于上皮或癌巢各层,尤以基底细胞层较多(图 3、4)。对照组大鼠支气管粘膜上皮区、实验组大鼠癌前病变区与肺癌区的 PCNA-LI 分别为: 14.10 ± 5.02 、 28.13 ± 8.72 、 41.88 ± 14.24 。后两者均属高增殖指数,其间差异有显著性($q = 3.97, P < 0.01$);对照组大鼠支气管粘膜上皮细胞区为低增殖指数,分别与后两者比较差异均有显著性($q = 3.05, P < 0.05$; $q = 6.78, P < 0.01$)。

2.4 Caspase-3 和 PCNA-LI 的关系 在 34 例大鼠肺鳞癌中, caspase-3 与 PCNA-LI 呈显著负相关($r = -0.7306, P < 0.01$)。对数据进行回归分析,以 caspase-3 阳性系数值为自变量 X, PCNA-LI 为应变量 Y, caspase-3 阳性系数值每变化 1 个单位, PCNA-LI 则变化 3.4326 个单位($P < 0.01$)。

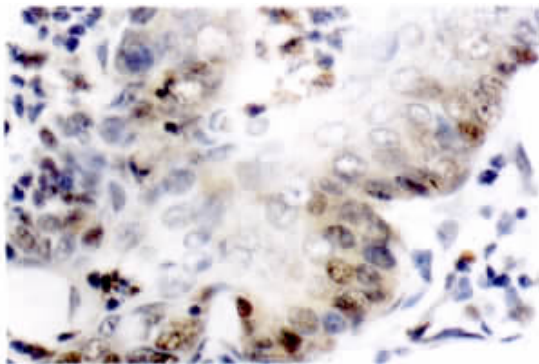


图 3 PCNA 蛋白在大鼠肺原位癌少数肿瘤细胞中呈阳性表达 S-P×400

Fig 3 Positive expression of PCNA protein in a few tumor cells of rat lung carcinoma in situ S-P×400

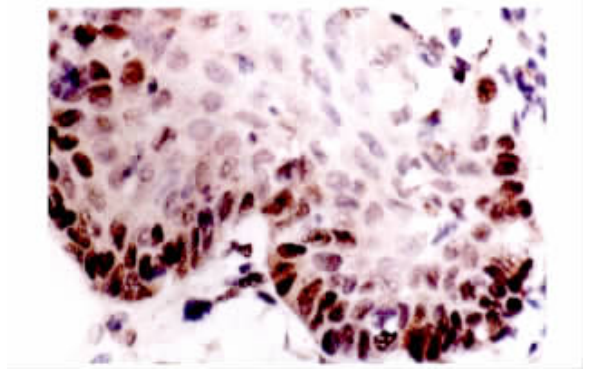


图 4 PCNA 蛋白在大鼠肺早期癌中阳性表达 S-P×400

Fig 4 Positive expression of PCNA protein in rat lung early-stage carcinoma S-P×400

3 讨论

细胞增殖与凋亡是机体维持自身稳定的基础。大量的研究表明,恶性肿瘤无限增殖与肿瘤细胞凋亡减少和/或分裂增加有关,肿瘤细胞通过复杂的分子机制下调凋亡相关基因,从而赋予肿瘤恶性增殖的生物学特性。现已发现 14 种以上 caspase 家族成员,其中至少三分之二的 caspases 与细胞凋亡相关并参与多种与凋亡有关的机体生理性或病理性过程^[4]。Caspase-3 是 caspase 家族中最重要的成员,大多数触发细胞凋亡的因素,最终均需要通过 caspase-3 介导的信号传导途径导致细胞凋亡^[5]。

本组研究表明,在 34 例大鼠肺鳞癌中, caspase-3 的阳性表达仅为 44.12% (15/34),而在对照组大鼠支气管粘膜上皮细胞中 90.00% (9/10) 的有 caspase-3 的表达,因此推测 caspase-3 参与了正常支气管粘膜上皮细胞的发育以及转化细胞凋亡过程的调节。肺鳞癌与癌前病变相比, caspase-3 阳性表达率和评分均值的差异均有显著性,表明 caspase-3 失表达抑制了肿瘤细胞的凋亡,促进了肿瘤细胞的生长,在大鼠肺鳞癌的发生发展中可能起重要的作用,也提示在肿瘤组织中可能有抑制 caspase-3 的蛋白存在。如最近发现的人体细胞凋亡抑制蛋白(human inhibitor of apoptosis protein, hIAP)家族成员的生存蛋白(survivin)能直接抑制 caspase-3 的活化,而且在肿瘤组织中有过表达^[6]。

恶性肿瘤细胞的生物学特性是异常增殖和永生性,增殖细胞核抗原(PCNA)是评价细胞增殖的重要指标,在细胞的 G₁ 晚期表达增加,在 S 期达高峰,然后下降。PCNA 作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子,不仅在 DNA 复制中起到关键作用,而且来自细胞内外的增殖信号都必须经过 PCNA 的参与,才能引发 DNA 的合成。众多研究表明,PCNA 在几乎所有肿瘤组织中均

有高表达^[7]。本研究中正常组织有 PCNA 蛋白的表达,阳性细胞位于支气管粘膜上皮增殖能力强的基底部分,其他部位少见。随癌变程度加重,PCNA-LI 明显上升,提示处于 DNA 合成期的细胞增多。本实验中癌前病变、肺鳞癌与对照组相比,PCNA-LI 的差异具有显著性,说明癌前病变在细胞增殖过程的分子水平表达方面已显现出与癌细胞相似的特征。PCNA-LI 是了解肺鳞癌恶性进展的重要指标,与文献报道一致^[8]。Volm 等^[9]对 150 例 NSCLC 生存时间的研究中,PCNA 阳性表达患者的生存时间显著短于 PCNA 阴性表达的患者,表明 PCNA 是 NSCLC 患者临床结局最重要的预后因子之一。

在本研究中,随着病变的恶性进展,caspase-3 蛋白表达水平降低而 PCNA-LI 却相应增高,caspase-3 阳性系数值每变化 1 个单位,PCNA-LI 则变化 3.432 6 个单位,且二者呈显著负相关。这提示 caspase-3 基因的表达对 PCNA-LI 有一定的影响,二者之间可能以负反馈调节参与大鼠肺鳞癌的发生发展,但具体机制需待进一步深入研究。联合检测 caspase-3 和 PCNA 蛋白可作为肺鳞癌癌变的主要参考指标。

参 考 文 献

1 Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibi-

tion of the ICE/CED3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1996, 376(1): 37-43.

- 2 田鸿生,刘铭球,高文琴,等.建立动物肺癌模型的方法学研究:肺叶支气管内灌注致癌质碘油液诱发大白鼠肺癌的新方法. *肿瘤防治研究*, 1982, 9(1): 2-4.
- 3 Iseki K, Tatsuata M, Uehara H, et al. Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 α -hydroxyvitamin D₃ and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rat. *Int J Cancer*, 1999, 81(5): 730-733.
- 4 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, 281(5381): 1305-1308.
- 5 Depraetere V, Golstein P. Dismantling in cell death: molecular mechanisms and relationship to caspase activation. *Scand J Immunol*, 1998, 47(6): 523-531.
- 6 LaCasse EC, Baird S, Komeluk RG, et al. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3247-3259.
- 7 Wiethege T, Voss B, Muller KM. p53 accumulation and proliferating cell nuclear antigen expression in human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1995, 122(2): 371-377.
- 8 Oyama T, Osaki T, Nose N, et al. Evaluations of p53 immunoreactivity, nucleolar organizer regions, and proliferating cell nuclear antigen in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res*, 2000, 20(1B): 505-510.
- 9 Volm M, Koomagi R. Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small-cell lung cancer for patient survival. *Br J Cancer*, 2000, 82(10): 1747-1754.

(收稿 2002-05-31 修回 2002-09-30)

(本文编辑 李蓓兰)