

TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达及意义

罗玉贤,王凤安,闫庆辉,刘 津,张国建,蔡建辉,薛 平

Expression and Significance of TRAIL, NF- B and Caspase-3 in Colorectal Carcinoma

LUO Yu-xian, WANG Feng-an, YAN Qing-hui, LIU Jin, ZHANG Guo-jian, CAI Jian-hui, XUE Ping
Department of Gastroenteric Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang
050000, China (Present: Department of General Surgery, The First Hospital of Shijiazhuang)
Corresponding Author: WANG Feng-an

Abstract: **Objective** To study the expression and significance of TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), Caspase-3 and NF- B in colorectal carcinoma and investigate the effect of Caspase-3 and NF- B on the anti-tumor activity of TRAIL. **Methods** SP immunohistochemical technique was used to examine the expression of TRAIL, Caspase-3 and NF- B in 42 cases of colorectal carcinoma and the surrounding tissues of 5cm distance and 25 cases of normal colorectal mucosa. **Results** The expression of TRAIL and Caspase-3 was increased from colorectal carcinoma, surrounding tissues to normal colorectal mucosa while NF- B was opposite ($P < 0.05$). The expression of TRAIL and Caspase-3 was lower in moderate and poor differentiation degree than those in high differentiation degree, while NF- B was opposite ($P < 0.05$). The expression of TRAIL was significant correlated to those of NF- B and Caspase-3 ($P < 0.05$). **Conclusion** TRAIL, Caspase-3 and NF- B may be closely correlated to the occurrence and the development of colorectal carcinoma. Depress the expression of NF- B and inspire the expression of Caspase-3 may promote the sensitivity of anti-tumor effect of TRAIL.

Key words: TRAIL; NF- B; Caspase-3; Colorectal neoplas; Immunohistochemistry

摘要: **目的** 研究 TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达及意义,探讨 NF- B 和 Caspase-3 的表达对 TRAIL 抗癌作用的影响。**方法** 采用免疫组化 SP 法检测 42 例大肠癌及其癌旁 5cm 组织、25 例正常大肠粘膜组织中 TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 蛋白的表达水平。**结果** TRAIL 和 Caspase-3 在大肠癌、癌旁组织及正常大肠粘膜组织中的表达呈递增趋势,而 NF- B 的表达则与之相反 ($P < 0.05$); TRAIL 和 Caspase-3 在中、低分化癌中的表达明显低于高分化癌中的表达,而 NF- B 的表达则与之相反 ($P < 0.05$); TRAIL 与 NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达均显著相关 ($P < 0.05$)。**结论** TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 可能与大肠癌的发生、发展密切相关;抑制 NF- B 表达及促进 Caspase-3 的表达,有可能提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性。

关键词: TRAIL; NF- B; Caspase-3; 结直肠肿瘤; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2007)04-0256-03

0 引言

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体^[1] (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 是 Wiley 等发现的 TNF 家族的新成员,具有选择性诱导肿瘤细胞发生凋亡的作用。由于 TRAIL 独特的生物学特性而引起了广大学者的关注。但是随着研究的深入,人们发现许多肿瘤对 TRAIL 并不敏感。NF-

B 和 Caspase-3 是 TRAIL 诱导细胞凋亡通路中两个关键性的影响因子,我们通过它们在大肠癌中表达的研究来探讨提高肿瘤对 TRAIL 敏感性的可能途径。

1 材料与方法

1.1 材料

42 例大肠癌及距肿瘤边缘 5cm 癌旁组织取自河北医科大学第二医院 2002 ~ 2004 年间经手术切除的大肠癌组织标本并经 HE 染色病理证实,同时以 25 例外伤等原因所取大肠粘膜组织为正常对照。鼠抗人 TRAIL、NF- B 单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 Caspase-3 多克隆抗体购于美国

收稿日期:2006-03-31;修回日期:2006-11-15
基金项目:河北省科技攻关基金资助项目(2004014)
作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院胃肠外科(现工作单位:石家庄市第一医院普外二科)
通讯作者:王凤安
作者简介:罗玉贤(1972-),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤的临床及基础研究

NeoMarkers 公司;鼠及兔 SPN 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒购于美国 ZYMED 公司。

1.2 方法

采用免疫组化 SP 法染色,步骤严格按试剂盒说明操作。一抗工作浓度 TRAIL 为 1:50, NF- B 和 Caspase-3 均为 1:100。以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.3 结果判定

免疫组化根据染色反应的深度及阳性细胞的数量分别记分为 0~3 分,其中染色深度以多数细胞的呈色反应为准。浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分,不着色为 0 分。阳性细胞数 10% 为 0 分,11%~45% 为 1 分,46%~70% 为 2 分,>70% 为 3 分,并根据这两项指标的积分数分为 4 级,即阴性(-)为 0 分,弱阳性(+)为 2 分,阳性(++)为 3~4 分,强阳性(+++)为 5~6 分。采用 Olym-pus BX51 型光学显微镜观察并摄片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行²、校正²检验及 Fisher 确切概率法检验。

2 结果

2.1 TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌、癌旁 5cm 组织及正常大肠组织中的表达

TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 免疫阳性产物均为棕黄色,定位于胞浆或胞膜,而 NF- B 则定位于胞核,见图 1~3。TRAIL 和 Caspase-3 在大肠癌、癌旁组织及正常大肠粘膜组织中的表达呈递增趋势 ($P < 0.05$),而 NF- B 的表达则与之相反 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌、癌旁 5cm 组织及正常大肠组织中的表达

组别	例数	TRAIL		NF- B		Caspase-3	
		+(%)	P	+(%)	P	+(%)	P
大肠癌组织	42	10(23.8)	0.001	23(54.8)	0.015	20(47.6)	0.001
癌旁 5cm 组织	42	25(59.5)	0.037	12(28.6)	0.243	35(83.3)	0.525
正常大肠组织	25	21(84.0)	0.000	4(16.0)	0.002	23(92.0)	0.000

2.2 TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达及其与临床病理因素的关系

TRAIL 和 Caspase-3 在中、低分化癌中的表达明显低于高分化癌中的表达,而 NF- B 的表达则与之相反 ($P < 0.05$);TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 的表达与肿瘤的病理类型、淋巴结转移与否及 Duke s 分期等因素无关 ($P > 0.05$),见表 2。

2.3 TRAIL 与 NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中表达的关系

为探讨 TRAIL 对肿瘤细胞敏感性的可能影响因素,我们检验了以上 TRAIL 诱导凋亡通路中几个关键性的影响因子,统计分析表明,TRAIL 与 NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达均显著相关 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达及其与临床病理因素的关系

临床病理因素	例数	TRAIL		NF- B		Caspase-3	
		+	P	+	P	+	P
分化程度							
高分化	22	9	0.018	8	0.012	14	0.029
中、低分化	20	1		15		6	
大体类型							
肿块型	16	3	1.000	9	0.961	8	1.000
溃疡型	14	3	0.665	8	0.716	7	0.671
浸润型	12	4	0.418	6	0.743	5	0.662
组织类型							
管状、乳头状腺癌	28	8	0.538	16	1.000	13	1.000
粘液腺癌	9	1	1.000	5	1.000	4	1.000
印戒细胞癌	5	1	1.000	2	0.825	3	0.941
淋巴结转移							
无	26	9	0.191	16	0.108	16	0.139
有	16	1		4		14	
Duke s 分期							
A+B 期	24	8	0.191	14	0.108	15	0.139
C+D 期	18	2		6		15	

表 3 TRAIL、NF- B 和 Caspase-3 在大肠癌中表达的关系

项目	TRAIL		²	P	
	-	+			
NF- B	-	11	8	4.693	0.030
	+	21	2		
Caspase-3	-	20	2	3.975	0.047
	+	12	8		

3 讨论

TRAIL 属 TNF 超家族成员,被称为继 FasL、TNF 之后第三个死亡因子。TRAIL 仅诱导转化细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞发生凋亡,而使正常细胞逃逸其杀伤作用^[1]。虽然 TRAIL 可以诱导多数肿瘤细胞凋亡,而且对大多数正常细胞无影响,这一特殊的选择性使 TRAIL 有可能成为一种新的有效治疗肿瘤药物,但是不同的肿瘤甚至同一肿瘤不同的细胞系对 TRAIL 诱导的凋亡存在较大差异,这种区别不能完全用“诱骗受体”的调节进行解释^[2,3]。目前的研究表明,TRAIL 通过两条不同的信号通路调控凋亡,其一是通过 Caspase 通路传导凋亡信号,其二是通过活化 NF- B 进行基因诱导调控凋亡。Caspase-3^[4] 是 Caspase 通路中与细胞凋

亡关系最密切和必须的 Caspase 分子,具有剪切管家蛋白和 DNA 片段的功能。作为 TRAIL 调控凋亡另一重要途径的关键因子,NF- κ B 是一类广泛存在于细胞中的多显性核转录因子,与肿瘤细胞的生长、增殖和浸润、转移关系密切,还能调控肿瘤细胞的凋亡和免疫活性。NF- κ B 在被 TRAIL 激活的同时又可进一步拮抗细胞凋亡,对于维持生物体自身平衡和稳定有重要意义^[5]。

TRAIL 在大肠癌组织中的表达情况在一定程度上可以反映其生物学效能。本组研究中,TRAIL 在大肠癌、癌旁组织及正常大肠粘膜组织中的表达呈递增趋势,提示大肠癌发生过程中存在 TRAIL 的丢失,可能由此造成 TRAIL 与其死亡受体结合所诱导的凋亡减少,从而促进了大肠癌的发生、发展,提示 TRAIL 与大肠癌的发生发展有关。TRAIL 在不同分化程度的癌组织中表达有差异,中、低分化癌中的表达明显低于高分化癌中的表达。这表明 TRAIL 可能是肿瘤分化差的标志,肿瘤在其进展过程中存在某种免疫逃逸机制,通过下调 TRAIL 的表达而逃避其诱导的凋亡。

NF- κ B 在大肠癌中高表达且在中、低分化癌中的表达明显高于高分化癌中的表达,说明 NF- κ B 的表达强度影响肿瘤的恶性程度及发展趋势,可在一定程度上提示大肠癌的预后。Caspase-3 在大肠癌中的表达强度随组织分化程度增高而增强,表明 Caspase-3 在癌组织中通过促进癌细胞凋亡而使恶性程度降低;从另一个角度看,Caspase-3 是正常分化细胞所具有的,正常细胞向癌细胞转化的过程中易失去某些表型,因而有理由认为 Caspase-3 随着分化降低而表达减少,是肿瘤异常分化的结果。

TRAIL 的表达与 NF- κ B 和 Caspase-3 的表达有明显的相关性。进一步研究发现,TRAIL 低表达的大肠癌组织中存在 NF- κ B 表达的增高,说明 NF- κ B 在 TRAIL 诱导的凋亡通路中作用明显,并有可能是正常组织逃避 TRAIL 诱导凋亡的机制之一。TRAIL 阳性的大肠癌组织中 Caspase-3 表达也有一定程度的增高,提示 Caspase-3 的活化不完全取决于 TRAIL 的表达,可能是多种因素作用的结果。推测 TRAIL 不直接作用于 Caspase-3,需通过受体途径和(或)线粒体途径才能活化 Caspase-3,且 Caspase-3 处于 Caspase 级联反应的下游区,影响因

素众多。此外,Caspase-3 也受到一些凋亡抑制基因如 survivin 等的作用而失活。

由于许多肿瘤细胞株对 TRAIL 不敏感甚至耐药,单一的 TRAIL 治疗往往难以取得理想的疗效,许多作者^[6,7]采用联合化疗药等方法来提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性,虽有一定效果,但距临床应用还有较大差距。通过本次研究,我们发现,大肠癌中存在 NF- κ B 表达上调,Caspase-3 表达下调,而 TRAIL 在癌组织中表达有丢失,这几种因素的共同作用导致了 TRAIL 对肿瘤细胞诱导凋亡的耐受。作为 TRAIL 诱导细胞凋亡通路中两个关键性的影响因子,通过抑制 NF- κ B 的活性和提升 Caspase-3 的活性,有可能提高肿瘤细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性,从而起到抑制肿瘤细胞生长的作用。目前,我们正采用特异性单克隆抗体技术及相关凋亡实验作进一步深入研究,为 TRAIL 在临床应用提供可靠的实验基础。

(本文图见插图)

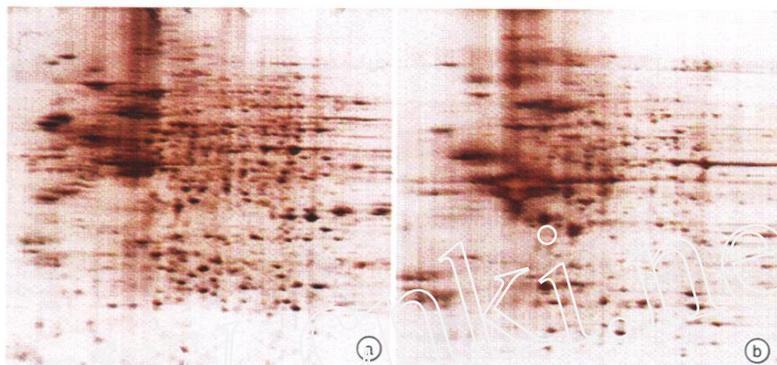
参考文献:

- [1] Kim Y, Seol DW. TRAIL, a mighty apoptosis inducer[J]. *Mol Cells*, 2003, 15(3): 283-293.
- [2] Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, et al. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2): 335-346.
- [3] Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, et al. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ*[J]. 2004, 11(8): 915-923.
- [4] Park HJ, Kim YJ, Leem K, et al. Coptis japonica root extract induces apoptosis through caspase3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells[J]. *Phytother Res*, 2005, 19(3): 189-192.
- [5] Charalambous MP, Maihofner C, Bhambra U, et al. Upregulation of cyclooxygenase-2 is accompanied by increased expression of nuclear factor-kappa B and I-kappa B kinase alpha in human colorectal cancer epithelial cells[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(10): 1598-1604.
- [6] 黄涛,吕刚,孙洁,等. TRAIL 联合阿霉素的体外抗肿瘤特性[J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(1): 56-58.
- [7] Toyota H, Kondo S, Kyo S, Mizuguchi J, et al. Enforced expression of a truncated form of Bax-alpha (tBax) driven by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter sensitizes tumor cells to chemotherapeutic agents or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(1): 99-105.

[编辑:刘红武]

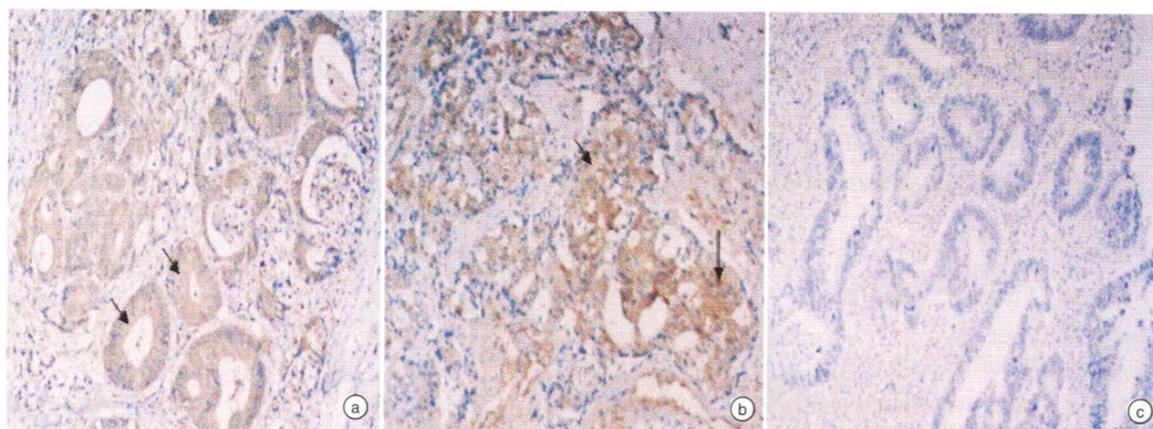
应用蛋白质组学方法研究大肠癌分化相关蛋白

(正文见 253 页)



a. 高分化腺癌组; b. 低分化腺癌组

图1 不同组织分化程度的大肠癌双向凝胶电泳图谱



a. 高分化腺癌; b. 低分化腺癌; c. 空白对照(箭头所示细胞浆中的棕色阳性信号)

图2 HSP27 在大肠高分化腺癌和低分化腺癌中的表达

TRAIL、NF- κ B 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达及意义

(正文见 256 页)

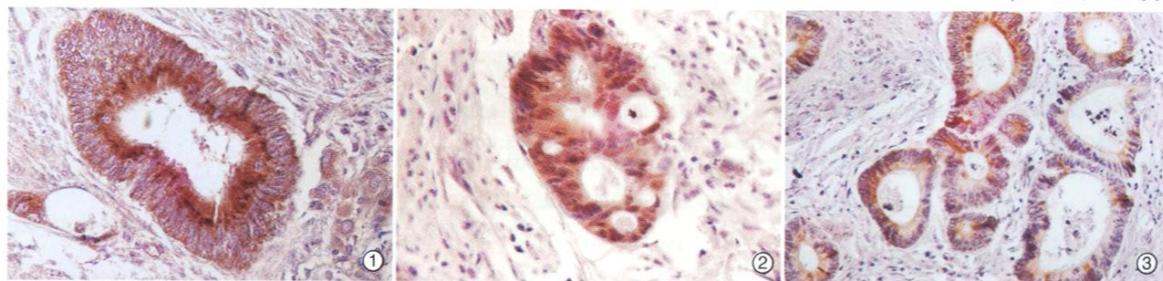


图1 TRAIL 在大肠癌中的表达 (SP \times 400)

图2 NF- κ B 在大肠癌中的表达 (SP \times 400)

图3 Caspase-3 在大肠癌中的表达 (SP \times 400)