

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.14.023

Caspase-3 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系

肖丽娜,周先荣,张青华

重钢总医院病理科,重庆 400081

摘要:目的 分析 Caspase-3 蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达情况及与肿瘤细胞凋亡的相关性。方法 选择 2013 年 3 月至 2018 年 3 月该院胸外科收治的 234 例 NSCLC 患者为研究对象。采用免疫组化法检测肿瘤组织中 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白的表达,并比较不同病理特征患者的表达情况,采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法检测细胞凋亡情况。结果 NSCLC 组织中 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白阳性表达率分别为 58.12%和 48.29%,在肿瘤组织中 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白的表达呈显著正相关($r=0.273, P=0.004$),但 Caspase-3 蛋白阳性表达在有淋巴结转移的肿瘤组织中表达较低,而 Bcl-2 蛋白阳性表达则在无淋巴结转移的肿瘤组织中表达较低, Caspase-3 蛋白免疫组化阳性结果评分与肿瘤细胞的凋亡指数呈显著正相关($r=0.749, P=0.000$)。结论 NSCLC 组织中 Caspase-3 蛋白阳性表达与肿瘤组织有无淋巴结转移密切相关,且免疫组化法检测结果评分与肿瘤细胞凋亡指数呈正相关,可能与 Bcl-2 蛋白共同参与肿瘤细胞的凋亡过程。

关键词:非小细胞肺癌; Caspase-3; Bcl-2; 细胞凋亡

中图法分类号:R734.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)14-2034-03

Expression of Caspase-3 protein and its correlation with tumor apoptosis in non-small cell lung cancer

XIAO Lina, ZHOU Xianrong, ZHANG Qinghua

Department of Pathology, General Hospital of Chonggang, Chongqing 400081, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Caspase-3 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with tumor apoptosis. **Methods** A total of 234 patients with NSCLC from March 2013 to March 2018 were collected as objects in this study. The expression of Caspase-3 protein and Bcl-2 protein in tissues were detected by Immunohistochemistry and compared the expression of these two indicators between different clinic pathological data of patients. Apoptosis index was detected by TUNEL. **Results** The positive expression of Caspase-3 protein and Bcl-2 protein in NSCLC tissues were 58.12% and 48.29% respectively. And they had a positive correlation in NSCLC tissues ($r=0.273, P=0.004$). However, Caspase-3 protein positive expression was lower in tumor tissues with lymph node metastasis, while Bcl-2 positive expression was lower in tumor tissues without lymph node metastasis. It had a positive correlation between Caspase-3 score and apoptosis index ($r=0.749, P=0.000$). **Conclusion** The expression of Caspase-3 protein related to the tumor which existed lymph node metastasis and degrees of differentiation. It also positively related to apoptosis and involved in the process of apoptosis with the Bcl-2 protein.

Key words: non-small cell lung cancer; Caspase-3; Bcl-2; apoptosis

肺癌为全球发病率最高的恶性肿瘤,大约 90% 的肺癌为非小细胞肺癌(NSCLC)^[1]。有研究报道超过一半的 NSCLC 患者为老年患者^[2]。NSCLC 确诊时,绝大多数的患者已经处于晚期^[3]。CAO 等^[4]发现细胞凋亡过程是多种因子的动态平衡调节过程,如促进凋亡的因子有 P53,抑制凋亡因子有 Bcl-2 蛋白。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶作为非常重要的信号传导通路,在细胞凋亡过程中起着重要的作用,尤其是 Caspase-3 蛋白,是细胞凋亡途径中最为重要的执行因子之一^[5]。本研究采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法和免疫组化法分别检测肿瘤细胞凋亡水平和凋亡相关蛋白

Caspase-3 蛋白的表达水平,并分析 Caspase-3 蛋白在肿瘤组织中表达的临床意义,探讨各凋亡因子与患者临床病理资料的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 3 月至 2018 年 3 月本院胸外科收治的 NSCLC 患者 234 例为研究对象,其中男 160 例,年龄 59~77 岁;女 74 例,年龄 61~76 岁。234 例患者中有吸烟史 120 例,无吸烟史 114 例。临床分期包括Ⅲ期 126 例,Ⅳ期 108 例。病理类型中,鳞癌、腺癌、腺鳞癌、大细胞癌、其他类型分别为 94、104、6、10、20 例。有淋巴结转移和无淋巴结转移的患者分别为 110、124 例。按照肿瘤部位分类,120

例患者为中央型,114 例患者为周围型。所有研究对象均自愿加入本研究,患者及家属均签署知情同意书,本研究经过本院伦理委员会批准后进行。

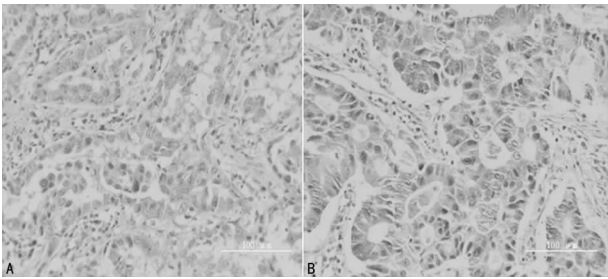
1.2 仪器与试剂 多功能 PCR 仪(C1000 Touch)购自美国 Bio-Rad 公司;小型凝胶电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司,台式高速冷冻离心机(AllegraX-22R)购自美国 Beckman 公司,高压蒸汽灭菌设备(HVE-50)购自日本 Hirayama 公司。主要试剂包括 DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司),兔抗人 Caspase-3 蛋白单抗(货号:AC033,上海善然生物科技有限公司),兔抗人 Bcl-2 蛋白单抗(货号:AF-0009,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),DAB 显色剂(货号:XY-MY-0075,上海烜雅生物科技有限公司),苏木素(货号:C0007,上海宝曼生物科技有限公司),Caspase-3 蛋白二抗(货号:9662P,上海北诺生物科技有限公司),Bcl-2 蛋白二抗(货号:YB-4563R,上海钰博生物科技有限公司),TUNEL POD TUNEL 过氧化物标记物试剂盒(货号:11772465001,上海妍琦生物科技有限公司)。

1.3 方法 (1)免疫组化染色:将癌组织进行石蜡包埋并切片,脱蜡水化后清洗切片。加入阻断液后封闭处理,分别加入 Caspase-3 蛋白一抗和 Bcl-2 蛋白一抗溶液,4℃ 孵育 24 h 后清洗,加入对应的二抗溶液孵育 30 min 后清洗,链霉菌抗菌药物蛋白-过氧化物酶溶液室温孵育 30 min 后再次清洗,DAB 显色剂进行显色处理后清洗,苏木素复染后封片,显微镜下观察。(2)免疫组化法检测结果评分^[6]:按照染色深浅度计分,无染色为 0 分,浅染色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕色为 3 分。(3)染色细胞阳性率评分:0 分表示没有阳性细胞,1 分表示低于 10% 的阳性细胞,2 分表示 10%~50% 的阳性细胞,3 分表示 50%~100% 的阳性细胞。(4)蛋白阴阳性表达判断,免疫组化检测结果与染色细胞阳性率评分结果相加得到数值 S,当 S<4,则为阴性表达,当 S≥4,则为阳性表达。(5)癌组织细胞凋亡检测:按照 TUNEL 试剂盒中的说明书,依次加入蛋白酶 K、混合液、POD、DAB、苏木素,脱水封片观察。(6)肿瘤细胞凋亡结果评定:光镜下细胞核显示为棕黄色,计数每 1 000 个肿瘤细胞中凋亡细胞的个数,凋亡指数=凋亡细胞个数/1 000×100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计数资料以例数或百分率表示,多组间比较采用 χ^2 检验,多组间中的两组间比较采用 Fisher 检验,采用 Pearson 相关进行相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化法检测 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达 在 NSCLC 患者的病理组织中,Caspase-3 蛋白的阳性表达率为 58.12%(136/234),Bcl-2 蛋白的阳性表达率为 48.29%(113/234)。见图 1。



注:A 为 Caspase-3 蛋白阳性表达;B 为 Bcl-2 蛋白阳性表达

图 1 NSCLC 组织中 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白阳性表达免疫组化图(×400)

2.2 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白在不同临床病理特征患者中的表达情况 Caspase-3 蛋白在有淋巴结转移的患者中阳性率较低,而 Bcl-2 蛋白则在无淋巴结转移的患者中阳性率较低,无淋巴结转移及有淋巴结转移的患者的 Caspase-3 蛋白及 Bcl-2 蛋白阳性率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白在不同临床病理特征患者中的表达情况[n(%)]

病理特征	n	Caspase-3 蛋白阳性	χ^2	Bcl-2 蛋白阳性	χ^2
性别			1.974		2.061
男	160	85(53.13)		83(51.88)	
女	74	51(68.92)		30(40.54)	
吸烟史			0.325		0.473
有	120	63(52.50)		52(43.33)	
无	114	73(64.04)		61(53.51)	
病理类型			7.583		7.396
鳞癌	94	62(65.97)		50(53.19)	
腺癌	104	65(62.50)		55(52.88)	
腺鳞癌	6	1(16.67)		1(16.67)	
大细胞癌	10	2(20.00)		2(20.00)	
其他	20	6(30.00)		5(25.00)	
肿瘤部位			0.226		0.514
中央型	120	67(55.83)		48(40.00)	
周围型	114	69(60.53)		65(57.02)	
淋巴结转移			5.752		21.931
有	110	50(45.45)		91(82.73)	
无	124	86(69.35)		22(17.74)	
临床分期			1.376		2.027
Ⅲ期	126	65(47.79)		64(50.79)	
Ⅳ期	108	71(52.21)		49(45.37)	

2.3 NSCLC 患者肿瘤组织中 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达的相关分析 Caspase-3 蛋白与 Bcl-2 蛋白在 NSCLC 患者肿瘤组织中的阳性表达呈正相关($r=0.273,P=0.004$)。见表 2。

表 2 NSCLC 患者肿瘤组织中 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达的相关性分析(n)

Bcl-2 蛋白	Caspase-3 蛋白		r	P
	+	-		
+	97	16	0.273	0.004
-	39	82		

2.4 Caspase-3 蛋白与肿瘤细胞凋亡的关系
Caspase-3 蛋白免疫组化检测结果评分与凋亡指数呈正相关($r=0.749, P=0.000$)。见表 3。

表 3 不同 Caspase-3 蛋白免疫组化检测结果评分的肿瘤细胞凋亡指数

Caspase-3 蛋白免疫组化检测结果评分(分)	凋亡指数($\bar{x}\pm s, \%$)
0	3.72±0.62
1~2	5.44±1.73
3~4	7.59±1.56
5~6	10.47±1.51

3 讨 论

当前我国的空气污染较为严重,加上吸烟等不良生活习惯的影响,导致肺癌发病率增加,其中又以 NSCLC 所占比例最高^[7]。近年,有报道称肿瘤细胞凋亡过程发生紊乱可能与肿瘤的产生密切相关,多种基因共同调控肿瘤细胞的凋亡过程,也决定了肿瘤细胞在体内的命运,如促凋亡基因、抑制凋亡基因及凋亡效应基因等^[8]。

Caspase-3 蛋白作为细胞凋亡途径中最为重要的执行因子之一,在被上游信号激活后产生级联效应,进而引发细胞凋亡活动。该基因的异常表达与多种癌症有关,如胃癌、肝癌、食管癌、胰腺癌、宫颈癌等^[9-13]。PARASHAR 等^[14]对 137 例肝癌患者的肿瘤组织进行免疫组化分析后,发现 Caspase-3 蛋白的表达水平与肝癌的分期显著相关,其表达水平较低时肝癌组织的恶性程度较高。XU 等^[15]发现在非癌症者的胃黏膜组织中 Caspase-3 蛋白呈强阳性表达,但是在胃癌组织中 Caspase-3 蛋白阳性表达率仅为 30.6%,提示 Caspase-3 蛋白表达的下调或抑制可能参与了胃癌的发生、发展过程。RAJAVEL 等^[16]在宫颈瘤组织中发现 Caspase-3 蛋白在无淋巴结转移的患者病理组织中存在较高的阳性表达,而在有淋巴结转移患者病理组织中较低表达,由此推测 Caspase-3 蛋白表达下调或抑制表达可能促进了宫颈癌的发生、发展过程。

Bcl-2 基因又称 B 细胞淋巴瘤基因、白血病-2 基因,是已知的众多抗凋亡基因中的一个原癌基因^[17]。ALAM 等^[18]发现目前体内肿瘤细胞的存活主要依赖于过表达抗凋亡 Bcl-2 基因家族蛋白来维持。LIU 等^[19]通过免疫组化法检测 NSCLC 患者的肿瘤病理组织,结果显示 Bcl-2 蛋白在病理组织中的阳性表达率为 43.68%,这与本研究中的结果相近。

本研究发现 Caspase-3 蛋白阳性表达在有淋巴结转移的肿瘤组织中表达较低,而 Bcl-2 蛋白阳性表达则在无淋巴结转移的肿瘤组织中表达较低,这与 MA 等^[20]的研究结果相吻合。且 Caspase-3 蛋白免疫组化阳性结果评分与凋亡指数呈正相关($r=0.749, P=0.000$),提示 Caspase-3 蛋白基因表达的下调或抑制

表达导致肿瘤细胞凋亡降低,这与肿瘤的发生、发展存在密切的关系。本研究同时还发现 Caspase-3 蛋白和 Bcl-2 蛋白在 NSCLC 患者肿瘤组织中的表达呈正相关($r=0.273, P=0.004$),这与 LI 等^[21]的研究结论一致。

综上所述,NSCLC 组织中 Caspase-3 蛋白阳性表达与肿瘤组织有淋巴结转移密切相关,且免疫组化检测结果评分与肿瘤细胞凋亡指数呈正相关,可能与 Bcl-2 蛋白共同参与肿瘤细胞的凋亡过程。

参考文献

[1] KHODADAD K, KHOSRAVI A, ESFAHANI-MONFARE D Z, et al. Comparing docetaxel plus cisolatin with paclitaxel plus carboplatin in chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer; a single institute study[J]. Iran J Pharm Res, 2014, 13(2): 575-581.

[2] OSMANI L, ASKIN F, GABRIELSON E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52(Pt 1): 103-109.

[3] POSTMUS P E, KERR K M, OUDKERK M, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC); ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2017, 28(suppl4): iv1-iv21.

[4] CAO P, LIU B, DU F, et al. Scutellarin suppresses proliferation and promotes apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells via AKT/mTOR/4EBP1 and STAT3 pathways[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(3): 492-500.

[5] LEE H J, LEE E K, SEO Y E, et al. Roles of Bcl-2 and Caspase-9 and -3 in CD30-induced human eosinophil apoptosis[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2017, 50(2): 145-152.

[6] KWON T, RHO J K, LEE J C, et al. An important role for peroxiredoxin II in survival of A549 lung cancer cells resistant to gefitinib[J]. Exp Mol Med, 2015, 47: e165.

[7] LIU G, PEI F, YANG F, et al. Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): E367.

[8] PAUL D, CHANUKUPPA V, REDDY P J, et al. Global proteomic profiling identifies etoposide chemoresistance markers in non-small cell lung carcinoma [J]. J Proteomics, 2016, 138: 95-105.

[9] AMPTOULACH S, LAZARIS A C, GIANNOPOULOU I, et al. Expression of Caspase-3 predicts prognosis in advanced noncardia gastric cancer[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 416.

[10] FORNARI F, POLLUTRI D, PATRIZI C, et al. In Hepatocellular Carcinoma miR-221 Modulates Sorafenib Resistance through Inhibition of Caspase-3-Mediated Apoptosis[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(14): 3953-3965.

[11] WANG X S, LUO K J, BELLA A E, (下转第 2041 页)

pgaC in Klebsiella pneumonia virulence and biofilm formation [J]. Microb Pathog, 2014, 77: 89-99.

[7] 魏丹丹, 万腊根, 刘洋. 强毒性血清型肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 重庆医学, 2016, 45(11): 1558-1560.

[8] GU D, DONG N, ZHENG Z, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(1): 37-46.

[9] 杜芳玲, 梅艳芳, 万腊根, 等. 高黏液型肺炎克雷伯菌荚膜血清分型及碳青霉烯类耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 278-285.

[10] 刘婧娴, 俞静, 刘瑛. 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药基因及流行病学研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(1): 91-95.

[11] LI W, SUN G, YU Y, et al. Increasing occurrence of antimicrobial resistant hypervirulent (hypermucoviscous) klebsiella pneumoniae isolates in China [J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(3): 225-232.

[12] TURFON J F, PERRY C, ELGOHARI S, et al. PCR characterization and typing of Klebsiella pneumoniae using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(6): 541-547.

[13] SHON A S, BAJWA R P, RUSSO T A. Hypervirulent (hypermu-Coviscous) Klebsiella pneumoniae; a new and dangerous Breed[J]. Virulence, 2013, 4(4): 107-118.

[14] PAN Y J, FANG H C, YANG H C, et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in Klebsiella pneumoniae serotype K57 and a new capsular serotype[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(30): 2231-2240.

[15] BRISSE S, FEVRE C, PASSET V, et al. Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization[J]. PLoS One, 2009, 4(4): e4982.

[16] 魏丹丹, 李喜红, 王莲慧, 等. 血液分离高黏液表型肺炎克雷伯菌的毒力基因检测及生物膜形成测定[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(5): 622-626.

[17] 田李均, 王晓丽, 肖淑珍, 等. 医院内高黏液性肺炎克雷伯菌的流行分布、毒力基因及临床特征分析[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(1): 43-48.

[18] ZHANG Y, ZHAO C, WANG Q, et al. High prevalence of hypervimlent Klebsiella pneumoniae infection in China: geographic distribution, clinical characteristics and antimicrobial resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(10): 6115-6120.

[19] 李莹莹, 明亮, 刘红春, 等. 2 型糖尿病并发颌面部感染来源的肺炎克雷伯菌的分子分型、耐药性及毒力研究[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(2): 136-139.

(收稿日期: 2019-01-22 修回日期: 2019-04-14)

(上接第 2036 页)

et al. Caspase-3 expression in metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma is prognostic of survival[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (15): 4414-4420.

[12] CHIU T L, SU C C. Tanshinone II A increases protein expression levels of PERK, ATF6, IRE1 α , CHOP, caspase-3 and caspase-12 in pancreatic cancer BxPC-3 cell-derived xenograft tumors[J]. Mol Med Rep, 2017, 15 (5): 3259-3263.

[13] MOU Z, XU X, DONG M, et al. MicroRNA-148b acts as a tumor suppressor in cervical cancer by inducing g1/s-phase cell cycle arrest and apoptosis in a caspase-3-dependent manner[J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 2809-2815.

[14] PARASHAR P, TRIPATHI C B, ARYA M, et al. A facile approach for fabricating CD44-targeted delivery of hyaluronic acid-functionalized PCL nanoparticles in urethane-induced lung cancer; Bcl-2, MMP-9, Caspase-9, and BAX as potential markers[J]. Drug Deliv Transl Res, 2019, 9(1): 37-52.

[15] XU P, CAI X, ZHANG W, et al. Flavonoids of Rosa roxburghii Tratt exhibit radioprotection and anti-apoptosis properties via the Bcl-2 (Ca²⁺)/Caspase-3/PARP-1 pathway[J]. Apoptosis, 2016, 21(10): 1125-1143.

[16] RAJAVEL T, PACKIYARAJ P, SURYANARAYANAN V, et al. β -Sitosterol targets Trx/Trx1 reductase to induce apoptosis in A549 cells via ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2071.

[17] SINGH V K, ARORA D, SATIJA N K, et al. Intracatinol synergistically enhances the anticancerous activity of cisplatin in human A549 cells via p38 MAPK/p53 signalling [J]. Apoptosis, 2017, 22(10): 1273-1286.

[18] ALAM M M, SOHONI S, KALAINAYAKAN S P, et al. Cyclopamine tartrate, an inhibitor of Hedgehog signaling, strongly interferes with mitochondrial function and suppresses aerobic respiration in lung cancer cells[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 150.

[19] LIU L, HUANG L, HE J, et al. PTEN inhibits non-small cell lung cancer cell growth by promoting G0/G1 arrest and cell apoptosis [J]. Oncol Lett, 2019, 17 (1): 1333-1340.

[20] MA L, WANG R, NAN Y, et al. Phloretin exhibits an anticancer effect and enhances the anticancer ability of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by regulating expression of apoptotic pathways and matrix metalloproteinases[J]. Int J Oncol, 2016, 48(2): 843-853.

[21] LI Q, LI J, LIU Y, et al. Anagliptin prevents apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by modulating NOX-4 signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1623-1631.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-04-02)