

【基础研究】

患者平均年龄(54.0 ± 2.3)岁,其中男 37 例,女 42 例;高分化癌 30 例,中低分化癌 49 例;肿瘤-淋巴结转移-远处转移(tumor-node-metastasis, TNM)分期^[1]: I ~ II 期 41 例, III ~ IV 期 38 例;有淋巴结转移 51 例,无淋巴结转移 28 例。

1.2 组织芯片制作 组织载玻片经过强硫酸浸泡,充分清洗并烘干,用多聚赖氨酸行防脱片处理,对每个组织标本进行石蜡切片,苏木精-伊红(hematoxylin-eosinstaining, HE)染色,观察切片,选取目标组织并在切片及其相应石蜡组织块(供体蜡块)上标记,莱卡石蜡空白蜡块(受体蜡块)与蜂蜡混合(比例为 1:1),制成 $2.2\text{ cm} \times 3.5\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$ 蜡块,用加拿大生产 CDX718 组织芯片仪打孔制成带孔空白蜡块,将蜡块放在 $39 \sim 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中软化后,用组织芯片仪从供体蜡块标记部位逐个取出直径 1 mm、高 4 mm 的组织柱,推入空白蜡块预先设计的相应孔内,这样在空白蜡块上制作完成了 68 个组织芯片,为防止染色过程中脱片,每例标本上样 4 个点,分别安插在空白蜡块 1 和 2 中,对蜡块进行连续切片,裱于防脱片处理的载玻片上。

1.3 免疫组织化学方法检测 Caspase-3 和 Maspin 表达 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(streptavidin-peroxidase, S-P)法分别检测 Caspase-3 和 Maspin 的表达。鼠抗人 Caspase-3 及鼠抗人 Maspin 为美国 Maxim 公司产品, S-P 试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。主要免疫组织化学步骤:石蜡包埋,组织切片厚 $4\text{ }\mu\text{m}$,常规脱蜡至水,用体积分数 3% 过氧化氢在室温下作用 10 min,阻断内源性过氧化物酶;充分水洗, pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中高压锅处理 10 min 后,室温冷却;非免疫羊血清封闭 10 min 后,加入即用型鼠单抗 Caspase-3 和 Maspin 4 冰箱过夜,再加入生物素化羊抗鼠 IgG 和 S-P 复合物。以二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)液显色,苏木精复染,常规脱水,透明,封片。用磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。

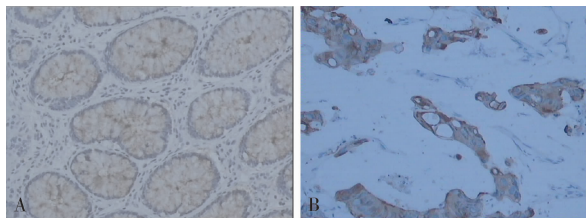
1.4 结果判断 Caspase-3 蛋白阳性产物位于细胞质, Maspin 蛋白阳性表达主要位于细胞质,少数有细胞核表达。阳性判断标准为出现明确棕黄色颗粒。结果判定采用 Fromowitz 综合评分法:染色强度评分:无染色为 0 分,淡黄色颗粒为 1 分,浅棕黄色颗粒为 2 分,出现大量深棕黄色颗粒为 3 分;阳性细胞数评分:每张切片随机观察 10 个高倍视野,记数 100 个细胞中染色阳性细胞数, $<5\%$ 为 0 分, $5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分。染色强度评分与阳性细胞数评

分之和 <2 分为阴性(-), $2 \sim 3$ 分为弱阳性(+), $4 \sim 5$ 分为中度阳性(++), $6 \sim 7$ 分为强阳性(+++), $++ \sim +++$ 均为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

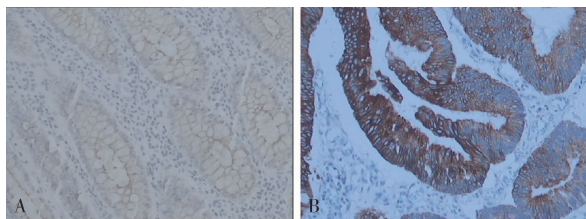
2.1 Caspase-3 和 Maspin 在结肠正常黏膜组织、结肠黏液腺癌组织中的表达 结果见图 1、2。Caspase-3 在结肠正常黏膜组织、结肠黏液腺癌组织中阳性率分别为 $65.62\% (21/32)$ 、 $46.83\% (37/79)$, Maspin 在结肠正常黏膜组织、结肠黏液腺癌组织中阳性率分别为 $59.37\% (19/32)$ 、 $45.57\% (36/79)$; Caspase-3 和 Maspin 在结肠正常黏膜组织中的表达明显高于结肠黏液腺癌组织中的表达,差异有统计学意义($\chi^2 = 13.94, 8.48, P < 0.01$)。



A:结肠正常黏膜组织;B:结肠黏液腺癌组织。

图 1 Caspase-3 在结肠正常黏膜和结肠黏液腺癌中的表达 (SP, $\times 200$)

Fig. 1 Expression of Caspase-3 in normal colonic mucosa and colonic mucinous adenocarcinoma tissue (SP, $\times 200$)



A:结肠正常黏膜组织;B:结肠黏液腺癌组织。

图 2 Maspin 在结肠正常黏膜和结肠黏液腺癌中的表达 (SP, $\times 200$)

Fig. 2 Expression of Maspin in normal colonic mucosa and colonic mucinous adenocarcinoma tissue (SP, $\times 200$)

2.2 结肠黏液腺癌中 Caspase-3 和 Maspin 表达与临床特征关系 结果见表 1。Caspase-3 在结肠黏液腺癌中表达与肿瘤分化程度、临床分期及淋巴结转移有关($P < 0.05, P < 0.01$);与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤浸润深度无明显相关($P > 0.05$)。Maspin 在结肠黏液腺癌中的表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移有关($P < 0.01$);与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤浸润深度及临床分期无明显相关($P > 0.05$)。

表 1 Caspase-3 和 Maspin 在结肠黏液腺癌中的表达与临床特征的关系

Tab. 1 Corelationship of expression of Caspase-3 and Maspin in colonic mucinous adenocarcinoma with clinical feature

临床病理参数	n	Caspase-3 阳性	χ^2	P	Maspin 阳性	χ^2	P
性别							
男	37	17(45.95)	0.022	>0.05	16(43.24)	0.152	>0.05
女	42	20(47.62)			20(47.62)		
年龄							
<40 岁	45	21(46.67)	2.035	>0.05	21(46.67)	0.051	>0.05
≥40 岁	34	16(47.06)			15(44.12)		
肿瘤大小							
<3.5 cm	38	18(47.37)	0.008	>0.05	17(44.74)	0.020	>0.05
≥3.5 cm	41	19(46.34)			19(46.34)		
浸润深度							
黏膜肌层	31	14(45.16)	0.057	>0.05	14(45.16)	0.003	>0.05
浆膜	48	23(47.92)			22(45.83)		
分化程度							
高分化	30	19(63.33)	5.290	<0.05	19(63.33)	6.150	<0.01
中低分化	49	18(36.73)			17(34.69)		
淋巴结转移							
未转移	28	18(64.29)	5.670	<0.05	18(64.29)	6.130	<0.01
转移	51	19(37.25)			18(35.29)		
TNM 分期							
I + II 期	41	26(63.41)	11.450	<0.01	20(48.78)	0.354	>0.05
III + IV 期	38	11(28.94)			16(42.11)		

3 讨论

Caspase-3 是 Caspase 家族最重要的凋亡执行者,在细胞凋亡早期阶段被激活,可裂解相应细胞质、细胞核底物,最终导致细胞凋亡^[2-4]。大量研究证实 Caspase-3 是介导细胞凋亡的核心蛋白^[5-7],其活化后直接参与切割多种结构蛋白和功能蛋白,导致细胞以凋亡的方式解体,所以 Caspase-3 能较好地反映细胞凋亡程度。夏钰弘等^[8]发现 Caspase-3 在肝细胞癌组织中表达明显低于正常肝组织及癌旁肝组织,随着肝细胞癌临床分期的增加其表达显著降低,提示 Caspase-3 在肝细胞癌组织中凋亡率降低,从而促进肿瘤的生长发展。本研究结果显示,Caspase-3 的阳性表达率随结肠黏液腺癌分化程度降低其表达率减低,提示 Caspase-3 表达降低可能与结肠黏液腺癌形成和进展有关。结肠黏液腺癌中 Caspase-3 阳性表达率与结肠黏液腺癌临床分期、淋巴结转移相关,临床分期越晚,Caspase-3 阳性率越低,有淋巴结转移者 Caspase-3 阳性率越低,说明其表达越低,结肠黏液腺癌的侵袭、转移能力越强。本研究还显示,与结肠正常组织相比,在结肠黏液腺癌组织中 Caspase-3 蛋白阳性率明显降低,这表明 Caspase-3 参与了和凋亡有关的细胞变化过程,可能

成为评估结肠黏液腺癌预后的参考因子。

研究发现,Maspin 是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员,能够抑制肿瘤细胞生长,诱导其凋亡,在人体的许多器官(如前列腺、甲状腺、乳腺等)检测到 Maspin 有着高水平的表达^[9-10],而在相应的肿瘤细胞中表达下调或失表达。提示 Maspin 表达可能与抑制肿瘤进展有一定相关性。齐淑轶等^[11]观察到肺小细胞癌淋巴结阳性、肿瘤分化差及临床分期晚的患者,其 Maspin 表达阳性率均显著降低。本研究发现 Maspin 蛋白的表达水平随组织分化程度的降低而减低,提示 Maspin 表达下调在结肠黏液腺癌中可能具有恶性转化能力。实验同时显示 Maspin 表达与结肠黏液腺癌的浸润深度、临床分期无关,与淋巴结转移有关,有淋巴结转移者呈相对低表达状态,表明 Maspin 表达下调可能促进了肿瘤的发生、发展及转移。

参考文献:

[1] 徐从高,张茂宏,杨兴季,等. 癌-肿瘤学原理和实践(美)[M]. 5 版. 济南:山东科学技术出版社,2001:1097.

[2] 阚雄文,张松柏,谢伟伟,等. 微小 RNA-100 在胃癌患者血浆中的表达及临床意义[J]. 新乡医学院学报,2013,30(5):384-386.

[3] 苏云洁,李熙鸿,杨欣,等. 脓毒症大鼠大脑皮质含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 表达的意义[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(8):632-634.

[4] 廖志,张勇,罗红权,等. 妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇所产新生儿脐动脉血清诱导 A549 细胞凋亡的机制研究[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(2):98-100.

[5] 刘晓坤,张晓宇,王赞,等. 米诺环素对大鼠视神经挫伤后视网膜 Caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展,2013,33(12):1132-1135.

[6] 赵岩松,赵堪兴,王晓莉,等. 低氧预适应对缺血再灌注损伤大鼠视网膜促红细胞生成素及活性 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 眼科新进展,2013,33(1):5-8.

[7] 范姗姗,曹永亮,王晓莉,等. MSC 移植对视网膜缺血-再灌注损伤后神经节细胞中 HIF-1 α 及 Caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展,2012,32(7):613-616.

[8] 夏钰弘,周倩,常艳华,等. 肝细胞肝癌组织中 NF- κ B 和 Caspase-3 的表达及其意义[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(3):26-29.

[9] Friedrich M G,Toma M I,Petri S,*et al.* Expression of Maspin in non-muscle invasive bladder carcinoma:correlation with tumor angiogenesis and prognosis[J]. *Eur Urol*,2004,45(6):737-743.

[10] 倪江涛,石海鹏,易永芬. RNA 干扰 Maspin 基因对胃癌细胞株 MKN-28 凋亡的影响[J]. 肿瘤,2010,30(7):571-576.

[11] 齐淑轶,蔡勇,邓莅菲,等. Maspin 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药,2012,52(3):9-11.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)