

本文引用:张剑虹,张飞,张晓丽,等. Caspase-3 和 Maspin 在结肠黏液腺癌中的表达[J]. 新乡医学院学报,2014, 31(11):899-901.

【基础研究】

Caspase-3 和 Maspin 在结肠黏液腺癌中的表达

张剑虹¹, 张飞², 张晓丽³, 刘君超¹, 刘博¹

(1. 河北北方学院附属第一医院病理科,河北 张家口 075000;2. 河北北方学院附属第一医院放疗科,河北 张家口 075000;3. 河北北方学院生命科学研究中心,河北 张家口 075000)

摘要: **目的** 探讨结肠黏液腺癌中 Caspase-3 和 Maspin 的表达及其与临床病理特征的相关性。**方法** 应用组织芯片技术及免疫组织化学方法检测 79 例结肠黏液腺癌组织和 32 例正常结肠黏膜中 Caspase-3 和 Maspin 的表达。**结果** Caspase-3 和 Maspin 在正常结肠黏膜组织中的阳性表达率高于结肠黏液腺癌组织,差异有统计学意义($P < 0.01$)。Caspase-3 阳性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性($P > 0.05$)。Maspin 阳性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性($P > 0.05$)。**结论** Caspase-3 和 Maspin 可能参与了结肠黏液腺癌的发生发展,可作为评估结肠黏液腺癌预后的指标。

关键词: 组织芯片;结肠黏液腺癌;Caspase-3;Maspin

中图分类号: R735.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)11-0899-03

Expression of Caspase-3 and Maspin in colonic mucinous adenocarcinoma

ZHANG Jian-hong¹, ZHANG Fei², ZHANG Xiao-li³, LIU Jun-chao¹, LIU Bo¹

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China; 2. Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China; 3. Research Center of Life Science, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Caspase-3 and Maspin in colonic mucinous adenocarcinoma and the correlation of their expression with clinicopathological features. **Methods** The expression of Caspase-3 and Maspin were detected in 32 cases of normal colon mucosa tissues and 79 cases of colonic mucinous adenocarcinoma by tissue chip and immunohistochemical methods. **Results** The positive expression rates of Caspase-3 and Maspin in colonic mucinous adenocarcinoma were significantly lower than those in normal colon mucosa tissue ($P < 0.01$). The positive expression rate of Caspase-3 in colonic mucinous adenocarcinoma was related to histological differentiation, lymph node metastasis and clinical stage ($P < 0.05$, $P < 0.01$); and was not related to sex, age, tumor size, depth of invasion of tumor ($P > 0.05$). The positive expression rate of Maspin was related to histological differentiation, lymph node metastasis ($P < 0.01$); and was not related to sex, age, tumor size, depth of invasion of tumor and clinical stage ($P > 0.05$). **Conclusion** Caspase-3 and Maspin may be involved in the occurrence and development of colonic mucinous adenocarcinoma. They can be used to evaluate prognosis for colonic mucinous adenocarcinoma.

Key words: tissue chip; colonic mucinous adenocarcinoma; Caspase-3; Maspin

结肠黏液腺癌是一种常见的消化道肿瘤,其发生是多种因子参与细胞增殖和凋亡异常的过程,凋亡异常在恶性肿瘤的发展中起重要作用。Caspase-3 是重要的凋亡执行因子, Maspin 在肿瘤的侵袭性生长中可诱导肿瘤细胞凋亡,细胞的凋亡失衡与 Caspase-3、Maspin 凋亡调节蛋白表达异常均有关

系。本研究利用免疫组织化学及组织芯片技术检测结肠黏液腺癌组织和正常结肠黏膜组织中 Caspase-3 和 Maspin 蛋白的表达,分析这 2 种蛋白与结肠黏液腺癌侵袭、转移及预后的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料 收集河北北方学院第一附属医院 2004 年 1 月至 2012 年 1 月存档蜡块,其中结肠黏液腺癌组织 79 例,正常结肠黏膜组织 32 例,所有蜡块全部切片,由 2 位高年资病理医师进行诊断复核,所有病例术前均未行放射治疗和化学治疗。结肠黏液腺癌

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 cm × 3.5 cm × 1.0 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 ~ 42 °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 μm,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。

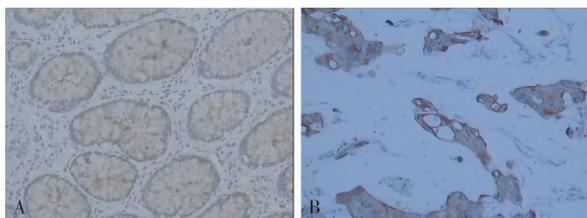
1.4 结果判断 Caspase-3 蛋白阳性产物位于细胞质, Maspin 蛋白阳性表达主要位于细胞质,少数有细胞核表达。阳性判断标准为出现明确棕黄色颗粒。结果判定采用 Fromowitz 综合评分法:染色强度评分:无染色为 0 分,淡黄色颗粒为 1 分,浅棕黄色颗粒为 2 分,出现大量深棕黄色颗粒为 3 分;阳性细胞数评分:每张切片随机观察 10 个高倍视野,记数 100 个细胞中染色阳性细胞数, < 5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分。染色强度评分与阳性细胞数评

分之和 < 2 分为阴性(-), 2 ~ 3 分为弱阳性(+), 4 ~ 5 分为中度阳性(++), 6 ~ 7 分为强阳性(+++), + ~ +++ 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

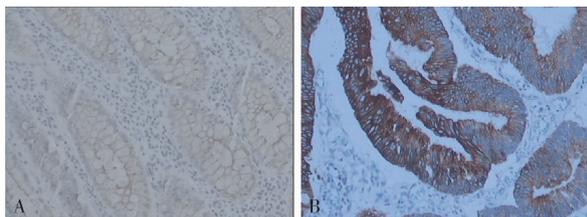
2.1 Caspase-3 和 Maspin 在结肠正常黏膜组织、结肠黏液腺癌组织中的表达 结果见图 1、2。Caspase-3 在结肠正常黏膜组织、结肠黏液腺癌组织中阳性率分别为 65.62% (21/32)、46.83% (37/79), Maspin 在结肠正常黏膜组织、结肠黏液腺癌组织中阳性率分别为 59.37% (19/32)、45.57% (36/79); Caspase-3 和 Maspin 在结肠正常黏膜组织中的表达明显高于结肠黏液腺癌组织中的表达, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.94、8.48, P < 0.01$)。



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, × 200)

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

Fig. 2 Expression of Maspin in normal colonic mucosa and colonic mucinous adenocarcinoma tissue (SP, × 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,谢雄伟,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.