临床研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0466-04

Dicer蛋白在非小细胞肺癌中表达及与癌细胞增殖的相互关系

章少中,向小勇,陈 力,葛明建
(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)组织中核酸内切酶 Dicer、增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigem,PCNA)蛋白的表达,探讨它们的相关性及临床意义。方法:应用免疫组织化学 SP 法,检测 Dicer 和 PCNA 在 57 例肺癌组织和 16 例癌旁正常肺组织表达情况,并结合肺癌的临床病理特征进行分析。结果:57 例 NSCLC Dicer 蛋白失表达率 50.9%,16 例癌旁正常肺组织中为 37.5%,二者差异无统计学意义($P>0.05$);Dicer 蛋白在肺腺癌失表达率为 66.7%,鳞癌中为 37.0%,二者差异有统计学意义($P<0.05$);Dicer 蛋白在高分化癌组(33.3%)失表达率低于低分化癌组(76.5%),二者差异有统计学意义($P<0.05$);而与 pTNM 分期、淋巴结转移以及年龄、性别无关($P>0.05$);NSCLC 癌组织中 Dicer 高表达和低表达的 PCNA 平均指数分别为(37.61±20.31)%、(48.32±25.34)%($P>0.05$)。结论:Dicer 蛋白失表达可能参与肺腺癌的发生发展过程,影响肺肿瘤细胞的分化方向,没有直接影响 PCNA 蛋白表达。

【关键词】Dicer;癌细胞增殖;非小细胞肺癌;免疫组化
【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-06-01

Expression of Dicer protein in non-small cell lung cancer and its correlation with cancerous cell proliferation

ZHANG Shao-zhong, et al
(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and significance of Dicer, PCNA protein in patients with non-small cell lung cancer. *Methods*: The expressions of Dicer protein and PCNA protein and the clinico-pathologic features of lung cancer in 57 cases of lung cancer and 16 cases of normal lung tissue were analyzed statistically by immunohistochemical SP method. *Results*: The loss of expression of Dicer protein in 57 cases of lung carcinoma was 50.9%, while in 16 cases of normal lung tissues the loss was 37.5%($P>0.05$). The loss of expression of Dicer protein in lung adenocarcinoma was 66.7%, while the loss was 37.0% in squamous carcinoma, which was statistically significant ($P<0.05$) between the two pathological types. The loss of expression of Dicer protein in high differentiation carcinoma (33.3%) was lower than in low differentiation carcinoma (76.5%), which was statistically significant ($P<0.05$) between high and low differentiation cancers. However, no correlation was found between pTNM stages, lymph node metastasis, age and gender ($P>0.05$). The mean index of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in low and high level expression of Dicer were (48.32±25.34)% and (37.61±20.31)% respectively ($P>0.05$). *Conclusion*: The loss of expression of Dicer protein may take part in the onset and process of lung adenocarcinoma; it influences the direction of differentiation of the lung carcinoma cell and is not directly linked to the expression of PCNA protein.

【Key words】dicer protein; cancer cell proliferation; non-small cell lung cancer; immunohistochemistry

核酸内切酶 Dicer 基因细胞内重要基因,是 2000 年被克隆的,定位于人染色体 14q32.13,编码蛋白属于 RNA 酶Ⅲ家族,在许多组织中广泛表达。编码的 Dicer 蛋白在小干扰 RNA(Small interfere RNA,siRNA)和微小 RNA(MicroRNA,miRNA)的产生过程中起着重要的作用,其中 miRNA 及其他蛋白质形成核酸蛋白复合物在多种生物过程中起调节作用,包括细胞增殖、分化、凋亡、死亡等。近年来,发现 miRNA 与人类癌症的发生发展,癌细胞增殖密切相关。由此推测miRNA 是一类新的癌基因或肿瘤抑制基因,而作为 miRNA 成熟关键酶 Dicer 在肿瘤中表达的报道甚少。本研究对原发性非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)患者手术切除的石蜡组织标本,应用免疫组织化学 S-P 法检测 NSCLC 中 Dicer、增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)蛋白表达情况,探讨 Dicer 基因表达及与癌细胞增殖的相互关系,以期为肺癌的发生、发展及基因治疗提供理论基础。

作者介绍:章少中(1984-),男,硕士,
研究方向:肺癌的早期诊断与治疗。
通信作者:向小勇,男,教授,Email:charliexiang@sina.com。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取重庆医科大学附属第一医院胸外科自 2007 年 2 月至 2010 年 1 月间进行手术切除的 NSCLC 石蜡标本 57 例，癌旁正常肺组织 16 例，术前均无放化疗史；其中男性 32 例，女性 25 例；中位年龄 58 岁（35～73 岁）；有无吸烟史分别是 36 例和 21 例。经病理确诊，鳞癌 27 例，腺癌 30 例；高分化癌 15 例，中分化癌 24 例，低分化癌 18 例；TNM 分期按 2009 年 UICC 修订版，其中Ⅰ期 18 例，Ⅱ期 12 例，Ⅲ期 27 例；无淋巴结转移 33 例，有淋巴结转移 24 例。

1.2 主要试剂

S-P免疫组化染色浓缩型试剂盒及 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。鼠抗人 Dicer 蛋白单克隆抗体购自 SantaCruz 公司，兔抗人 PCNA 蛋白多克隆抗体及其 S-P 试剂盒购自北京博奥森生物技术公司。

1.3 免疫组织化学染色

57 例 NSCLC 均经 4%甲醛溶液固定，常规石蜡包埋，4 μm 厚连续切片 3 张，采用链霉素-生物素过氧化酶连接（SP）免疫组织化学方法和氨基联苯胺（DAB）显色，染色方法按其说明书进行。以磷酸盐缓冲液（PBS）代替一抗作为阴性对照，用以证实含有靶抗原阳性切片作为阳性对照。主要步骤如下：常规脱蜡至水，1 mmol/L、pH 6.0、柠檬酸盐微波 95℃煮沸后调至低火 15～20 min，滴加过氧化酶阻断溶液以阻断内源性过氧化物酶的活性，正常羊血清封闭，分别滴加一抗配置浓度均为 1:100，4℃过夜；次日依次加生物素标记的羊抗鼠二抗和，DAB 显色；苏木素复染，脱水、透明、封固。由 2 位病理科医生复读切片，诊断明确。

1.4 判断标准与评分

每张切片观察 5 个高倍视野（×400），总细胞计数>1 000，根据判断标准，将阳性细胞及总细胞计数，计算出阳性率，其数量按百分数分为：1 分表示 25%；2 分表示 25%~50%；3 分表示 50%以上。根据细胞阳性着色程度（抗原含量），分为弱阳性（+）为 1 分，中等阳性（++）为 2 分，强阳性（+++）为 3 分。参照 Lu 等的方法，将阳性细胞百分率和强度计分相加所得总分进行结果判定 0 分为阴性，1～2 分为弱阳性（+），3～4 分为中度阳性（++），5～6 分为强阳性（+++）。评分低于 2 分为低表达，高于或等于 3 分为高表达。PCNA 阳性细胞于细胞核内见棕黄色或褐黄色。排除胞浆阳性而胞核阴性细胞。用显微目镜网格，在×400 视野下每例任取 5 个不重复视野，计数视野网格内细胞总数及阳性细胞数，按公式求出每例 PCNA 阳性标记指数（Labeling index，LI）。LI= 阳性细胞总数/细胞总数×100%。

1.5 统计学分析

应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理，两组计量资料间比较采用 t 检验，计数资料比较采用 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Dicer 蛋白的表达与临床病理特征的关系

Dicer 表达主要位于肿瘤细胞质呈棕黄色染色。Dicer 在 NSCLC、癌旁正常肺组织中低表达率分别是 50.9%（29/57）、37.5%（6/16），NSCLC 组织中 Dicer 蛋白与正常癌旁组织中表达差异无统计学意义；Dicer 蛋白失表达率在不同的分化程度、病理类型方面差异有统计学意义（$P<0.05$），未发现与 pTNM 分期、有无淋巴结转移、年龄、性别以及有无吸烟史有关（$P>0.05$），见表 1、图 1~4。

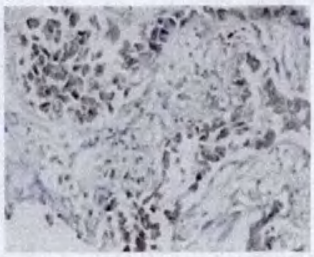


图 1 Dicer 蛋白在肺鳞癌的高表达，阳性细胞浆呈棕黄色（SP×400 倍）

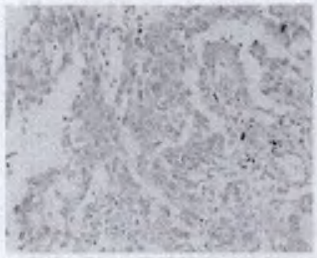


图 2 Dicer 在肺腺癌呈低表达（SP×400 倍）

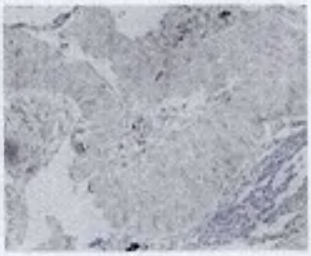


图 3 Dicer 蛋白在低分化型肺鳞癌的低表达（SP×400 倍）

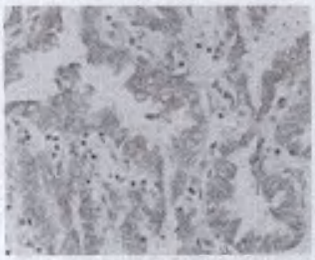


图 4 Dicer 蛋白在高分化型腺癌的高表达（SP×400 倍）

表 1　Dicer 蛋白与NSCLC临床病理特征的关系

临床特征	n	低表达	高表达	失表达率	χ^2	P
年龄（岁）						
≤60	32	21	11	65.6%	1.083	0.298
≥60	25	13	12	35.4%		
性别						
男	37	23	14	62.2%	0.277	0.599
女	20	11	9	55.0%		
吸烟史						
有	41	26	15	63.4%	1.826	0.177
无	16	7	9	43.8%		
病理类型						
鳞癌	27	10	17	37.0%	5.004	0.025
腺癌	30	20	10	66.7%		
分化程度						
高分化	15	5	10	33.3%	6.776	0.034
中分化	25	11	14	44.0%		
低分化	17	13	4	76.5%		
TNM分期						
Ⅰ~Ⅱ	30	14	16	46.7%	0.449	0.503
Ⅲ~Ⅳ	27	15	12	55.6%		
淋巴结转移						
N_0	32	17	13	53.2%	1.516	0.218
N_{1-3}	25	10	15	40.0%		

2.2　NSCLC Dicer 蛋白表达与 PCNA-LI 的关系

PCNA 阳性染色定位于细胞核，染色方式呈颗粒型或弥漫型，以前者为多见。NSCLC 组织中 Dicer 蛋白高表达组 PCNA 平均指数(46.32 ± 27.54)%和低表达组 PCNA 平均指数(37.61 ± 20.31)%相比，二者之间差异无统计学意义(P>0.05)，见表 2、图 5、6。

表 2　NSCLC 组织中 Dicer 蛋白表达与 PCNA-LI 表达的比较

Dicer 蛋白	n	PCNA-LI（%）
高表达	28	37.61 ± 20.31
低表达	29	48.32 ± 25.34

3　讨　论

肺癌是当今世界威胁人类健康的第一杀手，发病率和死亡率居恶性肿瘤之首。癌细胞增殖和凋亡的平衡被打破，细胞不受控制的增殖，受到损伤的细胞不能正常死亡而无限期的增殖，直接导致肿瘤的发生、发展，目前还尚未找到有效的靶点来调控两者平衡。正常细胞在发育过程中和成体中的细胞通过一种相互协调的机制，进行正常的分裂、分化、和死亡。多种调控因子通过基因表达的开关，调节细胞分裂和分化。而在肿瘤细胞中，被称为肿瘤抑制基因和癌基因表达失调。大多数肿瘤抑制基因和癌基因都是从 DNA 转录成 RNA，然后翻译成蛋白质，行使其生物学功能。最近的证据表明核酸内切酶 Dicer，属于 RnaseⅢ，能够在肿瘤基因转录、翻译中起到调节作用，包括细胞增殖、分化、凋亡、死亡等。2002 年 NicholsonRH[1]等报道，Dicer 在小鼠的肝脏、脑、肾脏、脾脏、睾丸以及肺泡上皮细胞都有散在表达，且与生物体参与内源性 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）现象相关。RNAi 现象已在不同种属的生物体中发现，是真核生物体内在转录后水平调控基因表达的机制，参与 RNAi 现象的重要分子有 2 种，分别是 miRNA 和 siRNA。Dicer 蛋白是参与 miRNA 或 siRNA 生物合成及成熟所必需的酶，其功能是将具有颈环结构的 RNA或

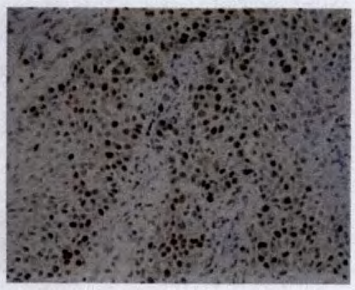


图 5　PCNA 蛋白在肺癌细胞核中阳性表达（SP × 200 倍）

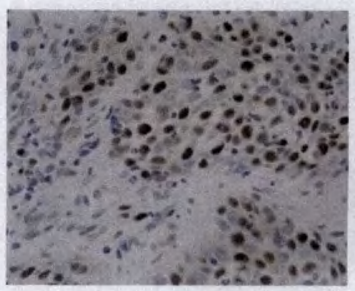


图 6　PCNA 蛋白在肺癌细胞核中阳性表达（SP × 400 倍）

双链 RNA 剪切成长约 21 个碱基的成熟 miRNA（或 siRNA）[2]。这类 miRNA 数量很多且高度保守，构成 1 个 RNA 调节体系，能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译，从而对基因进行转录后表达调控。当 miRNA 与某一基因同源时，若与该基因 mRNA 的 3'端非翻译区不完全互补结合，此时核酸蛋白复合物会阻止该基因 mRNA 翻译成相应的蛋白质，称之此为翻译抑制期；若与该基因 mRNA 完全互补结合，则在核酸蛋白复合物核酸内切酶 Dicer 的作用之下，该基因 mRNA 就会被切割降解，达到基因沉默效应，发挥类似 siRNA 的作用[3,4]。越来越多的实验证明 miRNA 导致 RNA 量的改变与人类肿瘤的发生有关。在慢性淋巴细胞白血病患者中发现 miR-15 和 miR-16 这 2 个基因的表达有缺失或下调；在原发性肝癌中，miR-16 表达下降；在肺癌细胞系中，miR-26a 和 miR-99a 表达减少[5]。故可以推测 miRNA 的上游酶 Dicer 在肿瘤的发生发展中也起着非常重要的作用。另外也有实验表明 Dicer 基因所在的 14 号染色体存在杂合性缺失，引起染色体改变和单倍体不足，能促进 K-ras 基因激活诱导肺癌动物模型发展成肺癌[6]。

文献经报道在肺腺癌的癌前病变组织中 Dicer 蛋白表达上调[7]。本文运用免疫组化 SP 法进一步研究 Dicer 蛋白在 NSCLC的表达，结果发现 Dicer 蛋白在腺癌中失表达率（66.7%）显著高于鳞癌（37.0%），这与多数学者的结论相一致。这从蛋白水平证实了 Dicer 基因异常是肺腺癌发生学中的频发事件，其蛋白表达异常与 NSCLC，尤其存在肺腺癌的发生发展过程中。特别是在低分化型肺腺癌中 Dicer 蛋白表达水平较低，这可能与 Dicer 基因直接调控肺泡上皮细胞的发育、分化和转化功能有关，它的突变或缺失引起 miRNA 量的减少，miRNA 序列数量不同直接与肺腺癌发生发展、细胞分化程度有关，但具体机制目前尚未清楚。

本研究中 Dicer 蛋白失表达率与肺癌分化程度不同而不同，高分化（33.3%）、中分化（44.0%）表达率显著低于低分化（76.5%），差异有统计学意义（$P<0.05$），而高分化及中分化二者之间差异无统计学意义，但仍有随分化程度的降低，失表达率增高的趋势。Dicer 表达越低，促进 miRNA 相关机制调节因子-非对称 RNA 沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）基因表达水平降低，引起癌基因表达上调或使抑癌基因表达下降，因而促进肺癌细胞发展与演化。另外，肿瘤生物学行为与细胞增殖活性密切相关，PCNA能够客观地反映肺细胞癌细胞增殖活性。虽然本实验发现 NSCLC中PCNA 指数在 Dicer 表达高表达和低表达之间的差异无统计学意义（$P>0.05$），Dicer 低表达的 PCNA 指数高于 Dicer 高表达的 PCNA 指数，表明 Dicer 基因缺失或突变并没有直接促进细胞有丝分裂和肺癌细胞的恶性增殖，而是由于 Dicer 蛋白缺失造成 miRNA 调节癌基因 myc 的表达，从而调控细胞生长的转录因子，使细胞周期调控序列破坏造成细胞增殖；也可能通过调节细胞异染色质和着丝粒的形成来完成[8]。

综上，本研究从蛋白水平说明了 Dicer 蛋白表达缺失率在肺腺癌中增高，其 dicer 基因突变可能参与肺腺癌发生发展的过程，同时 Dicer 蛋白表达缺失将影响肺癌的分化程度，将有助于进一步深化肺癌相关 miRNA 的研究。同时也可利用体外和（或）体内转导 dicer 基因，调节内源性 miRNA 或 siRNA 的表达水平，为抗肿瘤以及其他疾病的发生和治疗提供 1 个新的方法。

参 考 文 献

[1] Nicholson R H, Nicholson A W. Molecular haracterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease Ⅲ ortholog involved in RNA interference[J]. Mamm Genome, 2002, 13(4): 67-73.

[2] Garmell M A, Hannon G J. Rnase Ⅲ enzymes and the initiation of gene silencing[J]. Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(5): 214-218.

[3] Doench J G, Petersen C P, Sharp P A. siRNAs can function as miRNAs[J]. Genes Dev, 2003, 17(4): 438-442.

[4] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA[J]. Nature, 2004, 431(7006): 343-349.

[5] Calin G A, Garzon R, Cimmino A, et al. MicrnRNAs and leukemias: How strong is the connection[J]. Leuk Res, 2006, 30(6): 653-655.

[6] Kunmr M S, Lu J, Mercer K L, et al. Impaired microRNA processing enhauces cellular transformation and tumorigenesis[J]. Nat Genet, 2007, 39(5): 673-677.

[7] Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, et al. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(2): 2345.

[8] Tang K F, Wang P, Chen M, et al. Upregulation of PHLDA2 in Dicer knockdown HEK293 cells[J]. Biocchim Biophys Acta, 2007, 1770(5): 820-825.

（责任编辑：冉明会）