维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0694-03

FLIP、FADD 在喉癌中的表达及其临床意义

于 超,魏莲枝

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:分析凋亡信号蛋白 FLIP、FADD 在人喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义。方法:应用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化酶连接法(S-P 法),检测 56 例喉癌患者手术切除的病理组织标本中 FLIP、FADD 的表达情况,并且用 PCNA 检测喉鳞状细胞癌细胞增殖情况。结果:FLIP 的表达与喉鳞状细胞癌细胞增殖正相关($P<0.05$);FADD 的表达与喉鳞状细胞癌细胞增殖负相关($P<0.05$);FLIP 表达与 FADD 表达无相关性($P>0.05$);FLIP、FADD 的表达与喉鳞状细胞癌临床分期,病理分级有关,而与患者的年龄、性别、淋巴结转移无关($P>0.05$)。结论:FLIP,FADD 的异常表达在喉鳞状细胞癌的发生发展中起重要作用。

【关键词】FLIP;FADD;喉肿瘤;鳞状细胞癌;凋亡

【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-3-20

Expression and clinical value of FLIP,FADD in carcinoma of larynx

YU Chao, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:*To study the expression of apoptosis related gene FLIP and FADD in 56 cases of human laryngeal squamous cell carcinoma.*Methods:*Immunohistochemical method (SP) was used to detect the expressions of FLIP and FADD in larynx carcinoma.PCNA was detected to evaluate the proliferation of carcinoma cell.*Results:*FLIP expression showed a positive correlation with the proliferation of larynx carcinoma cells.FADD displayed a reverse results.No associations were observed in the expressions of FLIP and FADD.The expressions of FLIP and FADD were related to tumor's clinical stage, pathological grade ,but not to age,sex of patients and lymphatic metastasis. *Conclusions:*The abnormal expressions of FLIP and FADD may play an important role in the development of larynx carcinoma .

【Key words】FLIP;FADD;Larynx carcinoma;Squamous cell carcinoma;Apoptosis

凋亡信号蛋白表达异常,往往会直接影响细胞凋亡,从而与肿瘤的发生发展密切相关。FLIP(FLICE-inhibitory proteins),FADD(Fas-associated death domain)是凋亡相关蛋白,在喉鳞状细胞癌中是否表达,目前国内外尚未见报导。鉴于此,本实验采用免疫组化法,研究 FLIP、FADD 在喉鳞状细胞癌组织中的表达情况来探讨其与喉鳞状细胞癌预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

56 例喉鳞状细胞癌石蜡组织切片均取自我院 2000 年 ~2005 年接受手术治疗的患者,其中男 51 例,女 6 例,年龄 35~71 岁,平均年龄 58.1 岁。患者术前均未行放、化疗,术后病理学诊断明确。组织病理分级 I 级 29 例,II 级 27 例。按国际抗癌协会(UICC)通过的头颈部恶性肿瘤 TNM 分类标准(1997)修订的方案,56 例喉癌中:T1 期 7 例,T2 期 20 例,T3 期 14 例,T4 期 15 例,有颈淋巴结转移者 15 例。所有标本经 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,切成 4μm 厚切片作免疫组织化学检测。

1.2 主要试剂

兔抗人 FLIP 多克隆抗体(H-202)购于美国 Santa Cruz 公司,兔抗人多克隆抗体 FADD、鼠抗人增殖细胞核抗原 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)单克隆抗体、DAB 及 SP 免疫组化试剂盒均由北京中山生物技术公司提供。

1.3 实验方法

采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白—过氧化酶连接法(s-p 法)。石蜡切片贴附于经多聚赖氨酸处理的防脱玻片上,经常规脱蜡、水化,PBS 漂洗;3%双氧水处理 10min,PBS 漂洗;微波热修复抗原;血清封闭 30 min;加一抗 FLIP(稀释度 1:100),FADD(稀释度 1:50),4℃冰箱孵育过夜,

作者介绍:于 超(1978-),女,硕士,
主要研究方向:头颈肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

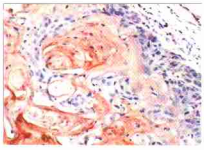


图 1 FLIP 在喉鳞状细胞癌组织中的表达(SP × 400)

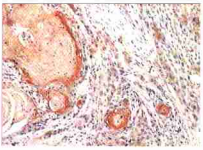


图 2 FADD 在喉鳞状细胞癌组织中的表达(SP × 200)

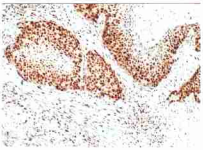


图 3 PCNA 在喉鳞状细胞癌组织中的表达(SP × 200)

表 1 临床病理特征与喉癌组织 FLIP、FADD 表达水平的关系($\bar{x}\pm s$)

临床病理特征	例数	FLIP表达	FADD表达	PCNA表达
年龄 / 岁				
>60	32	12.53 ± 5.97	16.38 ± 6.87	21.35 ± 7.46
≤60	24	13.12 ± 7.38	15.69 ± 8.02	20.12 ± 6.73
临床分期				
I、II	23	10.88 ± 9.25	19.13 ± 8.26	17.21 ± 8.69
III、IV	33	13.61 ± 7.32	15.92 ± 6.77	22.79 ± 6.38
组织病理分级				
I	29	10.32 ± 6.72	20.35 ± 6.17	17.18 ± 8.62
II	27	14.18 ± 8.47	14.54 ± 7.28	23.35 ± 7.41
淋巴结转移				
有	15	11.86 ± 5.23	17.28 ± 9.31	19.93 ± 9.71
无	41	12.49 ± 7.34	16.17 ± 8.25	20.76 ± 6.58

PBS漂洗；余按 SP 试剂盒操作过程进行；DAB 显色，蒸馏水洗涤，苏木精复染、脱水、透明、封片。阳性对照为已知 FLIP、FADD、PCNA 阳性的宫颈癌组织标本，用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

FLIP、FADD 均以胞质显示淡黄色至棕黄色颗粒为阳性细胞标志，PCNA 以胞核棕黄色至黄褐色颗粒为阳性细胞。每张玻片随机选取 5 个 400 倍视野，经 HPIAS10000 图象分析系统分析，计算出平均阳性单位 pu（positive unit）。pu=（Gα－Gβ）/Gmax × 100，Gα、Gβ 分别为待测结构的平均灰度，算出各标本阳性染色度 =pu × 阳性面积百分比。

1.5 统计学处理

阳性染色度以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SAS8.0 统计分析软件包对数据进行处理，采用 t 检验及直线相关分析。

2 结 果

2.1 FLIP、FADD、PCNA 的表达与喉癌临床病理学关系

喉癌组织中 FLIP、FADD、PCNA 的表达结果见图 1，2，3。FLIP、FADD、PCNA 的阳性染色度（$\bar{x}\pm s$）分别见表 1。不同的病理分级（I 级、II 级）及临床分期（I、II 期；III、IV 期）中，FLIP、FADD、PCNA 阳性染色度各自经过 t 检验，差别有统计学意义（$P<0.05$）。而三者的阳性染色度在喉癌患者的性别，年龄，有无淋巴结转移比较中差别无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2 FLIP、FADD 的表达与喉癌细胞凋亡的关系

随着肿瘤病理分级程度的升高，喉鳞癌组织中 FLIP 蛋白阳性染色度增高，PCNA 蛋白阳性染色度也增高，而 FADD 蛋白阳性染色度降低（见表 1）。采用直线相关分析，FLIP 表达与 PCNA 表达呈正相关（$P<0.05$）；FADD 表达与 PCNA 表达呈负相关（$P<0.05$）。这一结果表明 FLIP、FADD 表达与喉鳞状细胞癌细胞增殖程度密切相关。

2.3 喉鳞癌中 FLIP、FADD 表达关系

直线相关分析，本实验中 FLIP 的阳性染色度与 FADD 蛋白阳性染色度无相关关系（$P>0.05$）。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

FLIP作为一种重要的凋亡抑制蛋白首先在病毒的研究中被发现,称为 vFLIP。1997 年 Irmler 等[1]在研究黑色素瘤时发现一种类似于 vFLIP 的高表达蛋白即 cFLIP。人类 FLIP 基因位于染色体的 2q33-34,含有 13 个外显子。FLIP 蛋白结构上包含两个 DED(death effector domains)区和一个 caspase 相似区。DED 与 Fas 的死亡结构域 DD (death domains) 的功能相似, 能介导蛋白质之间的相互结合, 可竞争性结合 FADD 上的 DED 或与 caspase8 上的 DED 结合, 因而 cFLIP 能阻断 FADD 与 caspase8 之间的相互作用, 但 cFLIP 不具有 caspase8 的活性,故能阻断死亡信号复合体形成,从而抑制凋亡[2-4]。研究表明:FLIP 的过量表达在肿瘤的发生发展中起重要作用。Daisuke MD[5]在胰腺癌细胞株研究中发现:FLIP 表达增强抑制细胞凋亡, 下调 FLIP 表达强度时细胞凋亡则增强。Longley,DB 等[6]在化学方法诱导的直肠癌细胞凋亡实验中发现:cFLIP 能抑制 Caspase-8 的活性并能抑制 Fas、CD95 等死亡受体介导的细胞凋亡。高思海[7]等用免疫组化法测定了 96 例食管鳞癌中 FLIP 的表达情况,发现 FLIP 阳性率与食管鳞癌病理分级、临床分期相关,FLIP 的表达程度越高,肿瘤的恶性程度也越高,提示这可能是细胞恶变中的重要环节,即细胞内染色体异常改变,使 FLIP 基因激活、过度转录表达。FLIP 蛋白增多进一步促进细胞恶化。

FADD 是 1995 年 Chinnaiyan AM 等[8]发现的一种死亡域蛋白, 其基因位于人 11 号染色体长臂 11q13.3,由一个死亡结构域 DD 和一个死亡效应结构域 DED 组成。FADD 基因介导着多种死亡受体诱导的细胞凋亡信号传导通路。FADD 基因广泛存在于许多成年个体和胚胎的组织中,如成年个体的结肠、睾丸、卵巢、脾脏、前列腺、胸腺等组织中。研究表明 FADD 在组织中表达异常与肿瘤的发生发展关系密切。Sun B 等[9]在研究肝癌细胞株凋亡中推测:肝癌细胞可能通过下调 FADD 的表达使 Fas 所介导的细胞凋亡必须因子 Caspase-3 和 8 失活,从而抑制肝癌细胞的凋亡,如果注入了 FADD,可使这些细胞获得对 Fas 的敏感性, 重新发生 Fas 介导的凋亡。顾炜等[10]在肝癌组织中凋亡信号蛋白的研究中发现:FADD 随着肝细胞癌恶性程度的增加而被下调。

PCNA 是 DNA 多聚酶的辅助因子,在细胞的分裂增殖中必不可少。因 PCNA 存在于增殖细胞核内而静止细胞缺乏,故 PCNA 免疫组化染色可作为估计细胞增殖活性的指标[11]。学者们普遍认为 PCNA 与肿瘤的组织病理分级,临床分期,浸润程度及预后密切相关,通过对细胞 PCNA 表达情况进行检测可以了解肿瘤组织的增殖活性[12,13]。本研究通过免疫组化半定量法检测喉鳞状细胞癌组织中 FLIP、FADD 的表达水平, 并用 PCNA 检测喉鳞状细胞癌细胞增殖情况发现:FLIP、FADD、表达均与喉癌患者性别、年龄、淋巴结转移无关;与喉鳞癌组织病理分级、临床分期有关。FLIP,PCNA 阳性染色度随着喉癌恶性程度、临床分期的增高而增高;FADD 阳性染色度则随着喉癌恶性程度、临床分期增高而降低。FLIP 阳性染色度与 PCNA 阳性染色度正相关;FADD 阳性染色度与 PCNA 阳性染色度负相关;而 FLIP 与 FADD 的阳性染色度无相关关系。根据这一研究结果可以推测:FLIP 可能通过抑制癌细胞凋亡参与喉鳞状细胞癌的发生发展;FADD 却通过促进喉鳞癌细胞凋亡参与喉鳞状细胞癌的发生发展,了解这一特点对喉癌基因治疗有一定的指导意义。

参 考 文 献

[1] Imnler M,Thome M,Hahne M,et al.Inhibitition of death receptor signals by celluar FLIP [J].Nature,1997;388(6624):190-195.

[2] RajashekharG,LoganathA,RoyAC,et alResistancetoFas-mediated cell death in Bewo and NJG choriocarcinoma cell lines:implications in immune privilege [J].Gynecol Oncol,2003;89-100.

[3] Liu K,McDufie E,Abrams SI.Exposure of human primary colon carcinoma cells to anti-Fas interactions influences the emergence of pre-existing Fas-resistant metastatic subpopulations [J].Immunol,2003;171:4164-4174.

[4] Sun Q,Zachariah S,Chaudary PM.The human herps virus 8-encoded viral FLICE-inhibitory protein induces cellular transformation via NF-kaoosB activation[J].Biol Chen,2003;278:52437-52445.

[5] Daisuke MD,Kami,Kazuhiro MD,et al.Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis as a'new strategy for pancreatic cancer [J].Surgery,2005;138(1):71-77.

[6] Longley DB,Wilson TR,McEwan M,et alcFLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death [J].Oncogene,2006;25(6):838-848.

[7] 高思海,潘铁成,赵金平,等.食管鳞癌 FLIP 表达与细胞凋亡相关[J].世界华人消化杂志,2004;12(4):1470-1473.

[8] Chinnaiyan AM,Rourke K.FADD,a novel death domain-containing protein,interacts with the death domain of Fas initiates apoptosis[J].Cell,1995;81(19):505-510.

(下转第 700 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

片段影响或改变内含子转录因子,也可能是其与其它位点多态性形成连锁不平衡[13],从而改变 ERa 基因表达而使 ER 量及功能发生改变。而 ERa 是雌激素发挥作用的中介,雌激素必须通过与 ERa 结合才能发挥作用,故不同的 ERa 基因型有可能决定不同个体间 ER 表达水平与功能差异,进而影响到体内雌激素的生物学效应[14-16]。当然重复序列附近调控部分变异、ERa 基因与其它基因是否存在关联等问题,还有待进行多方面、大样本、多地域、多民族等广泛深入的协同研究。

参 考 文 献

[1] Letonja M, Steblovnik K, Peterlin B, et al. Oestrogen receptor dinucleotide (TA) polymorphism affects total and LDL cholesterol but does not predict premature myocardial infarction in Caucasian men [J]. Acta Cardiol, 2005; 60(3): 307-309.

[2] Sano M, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1995; 217(1): 378-383.

[3] Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling [J]. Biological Chemistry, 2001; 276(40): 36869-36872.

[4] Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited [J]. Genetics, 1993; 133(3): 737-749.

[5] Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, et al. Association of estrogen receptor gene Polymorhisms with endometriosis [J]. Fertility and Sterility, 1999; 72(1): 164-166.

[6] Kim SH, Choi YM, Jun JK, et al. Estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism is associated with minimal or mild endometriosis [J]. Fertil Steril, 2005; 84(3): 774-777.

[7] Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, et al. Estrogen receptor thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphismis associated with susceptibility to leiomyoma[J]. Fertil Steril, 2003; 79(1): 96-99.

[8] Hoetzer G, Irmiger HM, Stauffer BL, et al. Estrogen receptor-alpha thymidine and adenine repeat polymorphism and endothelial fibrinolytic regulation in postmenopausal women [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005; 193(2): 366-370.

[9] Demissie S, Cupples LA, Shearman AM, et al. Estrogen receptor-alpha variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: the Framingham Heart Study [J]. Atherosclerosis, 2006; 185(1): 210-218.

[10] Guarducci E, Nuti F, Becherini L, et al. Estrogen receptor alpha promoter polymorphism: stronger estrogen action is coupled with lower sperm count[J]. Hum Reprod, 2006; 21(4): 994-1001.

[11] Leibowitz D, Dresner-Pollak R, Dvir S, et al. Association of an estrogen receptor-alpha gene polymorphism with left ventricular mass[J]. Blood Press, 2006; 15(1): 45-50.

[12] Gennari L, Melotti D, De Paola V. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of steoporosis: a HuGE review[J]. Am J Epidemiol, 2005; 161(4): 307-320.

[13] Weiderpass E, Persson I, Hahan M, et al. Estrogen receptor a gene polymorphisms and endometrial cancer risk [J]. Carcinogeeis, 2000; 21(4): 623-627.

[14] Deng HW, Li J, Li JL, et al. Charges of bonemass in post-menopausal Caucasian woman with and without hormone replacment therapy is associated with vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes [J]. Hum Genet, 1998; 103(5): 576-585.

[15] Pollake A, Rokach A, Blumennfeldt A, et al. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphism with the angiographic extent of coronaryartery disease[J]. EurHeart, 2004; 25(3): 240-245.

[16] Han W, Kang D, Lee KM, et al. Full sequencing analysis of estrogen receptor alpha gene polymorphism and its association with breast cancer risk[J]. Anticancer Res, 2003; 23(6): 4703-4707.

(上接第 696 页)

[9] Sun B, Wang B, Ahao X. Expression of FADD in primary hepatocellular carcinoma and its relationship with hepatic apoptosis [J]. Zhonghua Gan Bing Za Zhi, 2000; 8(1): 37-39.

[10] 顾 炜,彭志海,裘国强,等.肝癌组织中凋亡信号蛋白的表达及其临床意义[J].中国肿瘤,2003;12(1):48-50.

[11] Zhao R, Hirano M, LKurita S. Expression of proliferating cell nuclear antigen in premalignant lesions of the larynx[J]. Am Otolaryngeal, 1996; 17: 36-44.

[12] 杨 培,罗亿治.增殖细胞核抗原研究进展[J].重庆医科大学学报,1998;3:327-328.

[13] Okuno Y, Nishimura Y, Kashu I, et al. Prognostic values of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 for radiotherapy of oesophageal squamous cell carcinomas [J]. Br J Cancer, 1999; 80(3-4): 387-395.