维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0022-05

cFLIP、FADD 在宫颈癌组织中的表达及意义

刘志能,唐良茜

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 cFLIP、FADD 在宫颈癌组织中的表达,探讨 cFLIP、FADD 在宫颈癌发生、发展中的作用及其临床意义。方法:采用免疫组化(SP 法)检测 64 例宫颈癌、15 例 CIN、12 例慢性宫颈炎病例以及 10 例正常宫颈组织中 cFLIP、FADD 蛋白的表达,并检测宫颈癌中增殖细胞核抗原标记指数(PCNA-LI)。结果:cFLIP、FADD 在宫颈癌中的表达与 CIN、慢性炎症组及正常组中的表达差异有显著意义($P<0.01$),宫颈癌组织中同时出现 cFLIP 的高表达和 FADD 的低表达。cFLIP 的表达水平与 PCNA-LI 呈正相关($r_1=0.7738$, $P<0.01$),FADD 的表达水平与 PCNA-LI 成负相关($r_2=-0.8011$, $P<0.01$)。进一步分析发现,在宫颈癌中,肿瘤细胞分化越差,临床分期越晚,以及伴有癌细胞转移的淋巴结中,cFLIP 高表达,而 FADD 低表达。cFLIP、FADD 的表达与患者年龄、组织学分型无关。结论:cFLIP、FADD 与宫颈癌的发生、发展和转移密切相关,可能是治疗宫颈癌的潜在靶点。

【关键词】cFLIP;FADD;PCNA;宫颈肿瘤/病理;病理分级;临床分期

【中国图书分类法分类号】R737.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-06

Expressions of cFLIP and FADD in cervical carcinoma and their significances

LIU Zhineng, et al

(*Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of cFLIP and FADD in cervical carcinoma and explore their associations with the carcinogenesis and development of cervical carcinoma, and to evaluate their clinical significances. *Methods*: The expressions of cFLIP and FADD proteins were detected in cervical tissue samples including 64 cervical carcinoma tissues, 15CIN, 12 chronic cervicitis tissues and 10 normal cervix tissues by immunohistochemistry (SP). And PCNA-LI in 64 cervical carcinoma samples was determined. *Results*: cFLIP and FADD expressions were significantly different among cervical carcinoma, CIN, chronic cervicitis tissue and normal cervix. The high expression of cFLIP and low expression of FADD were simultaneously found in cervical carcinoma. Statistical analysis showed that there was a positive correlation between the level of cFLIP expression and PCNA-LI ($r_1=0.7738$, $P<0.01$), and a negative correlation between the level of FADD expression and PCNA-LI ($r_2=-0.8011$, $P<0.01$) in cervical carcinoma tissue. The further analysis found that in cervical carcinoma with the poorer differentiation of tumor cells and at more advanced clinical stage, and in the tumor cells with positive lymph node metastasis, cFLIP expressed high and FADD expressed low. There was no significant correlation of cFLIP and FADD expressions to the age of patients and their histological types. *Conclusions*: cFLIP and FADD were closely related to the carcinogenesis, development and metastasis of cervical carcinoma, which indicated that cFLIP and FADD may be the potential targets for treating cervical carcinoma.

【Key words】cFLIP; FADD; PCNA; Cervix neoplasma/pathology; Pathology grade; Clinical stage.

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤,占女性恶性肿瘤发病率的第二位,在中国每年新发宫颈癌病例约计 13 万,占全世界宫颈癌新发病例的 28%。资料显示其发病与过早性生活、性生活紊乱、早年分娩、多产、HPV 病毒感染等因素有关,但真正的病因尚未完全清楚,探寻宫颈癌的发病病因、寻找更加有效的治疗方法始终是研究者们的研究方向之一。cFLIP (cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1β-converting enzyme(FLICE)-like inhibitory protein) 是近来新发现的一种凋亡抑制蛋白,研究者们注意到它与多种人类肿瘤的发生、发展、耐药性/耐受性以及治疗策略等日益密切[1]。FADD 在功能上常常与 cFLIP 扮演着相反的角色。本文采用免疫组化方法,对正常宫颈、慢性宫颈炎、

作者介绍:刘志能(1975-),男,主治医师,博士生,
主要研究方向:妇科肿瘤及子宫内膜异位症的治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、宫颈癌以及肿瘤浸润淋巴结中 cFLIP、FADD 的表达进行了检测与相关分析,旨在探讨 cFLIP、FADD 在宫颈癌发生、发展中的作用及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集本院 2003 年 4 月~2005 年 7 月间门诊宫颈活检及住院手术患者的宫颈组织存档石蜡块 101 例,包括宫颈癌 64 例(其中鳞癌 46 例,腺癌 18 例);年龄 29~70 岁,平均 51.7 岁;CIN 15 例,慢性宫颈炎 12 例,正常宫颈上皮标本 10 例。宫颈癌采用国际妇产科联盟(FIGO,2000)修订的临床分期,0 期 (原位癌)10 例,I~II 期 43 例,III~IV 期 11 例。依据 WHO (1985) 肿瘤细胞分化程度规定分 $G_1$24 例、$G_2$28 例、$G_3$12 例。41 例术中淋巴结活检,其中阳性 15 例、阴性 26 例。所有病例术前均未接受放化疗及免疫治疗。

1.2 方法

标本经 10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋,连续 4μm 切片,固定于经 100g/L 多聚赖氨酸预处理的载玻片上。一抗为兔抗人 $cFLIP_{LS}$ 多克隆抗体,购自美国 santa cruz 公司(编号为 sc-8347,0.2mg/ml,浓缩液),按 1:200 稀释成工作液;兔抗人 FADD 多克隆抗体购自美国 santa cruz 公司 (编号为 sc-5559,0.2mg/ml,浓缩液),稀释度为 1:150;鼠抗人 PCNA 单克隆抗体(1.5ml 工作液),购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DAB 及 SP 试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。采用 SP 法,经微波抗原修复,按试剂说明书操作。以已知 $cFLIP_{LS}$、PCNA 表达阳性的人结肠腺癌组织标本作阳性对照,以人乳腺癌组织标本作 FADD 的阳性对照,PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。免疫组化完成后 24h 内光镜阅片。

1.3 染色结果判断

将 $cFLIP_{LS}$、FADD 染色强度分为 4 级,无染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;在高倍镜下(400 倍)计算阳性染色的细胞比例,无阳性染色为 0 分,阳性表达≤25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分,将每张切片随机计数 5 个视野,将两种评分相加,分值在 0~1 分,计作阴性(-),2 分计作(+),3~4 分计作(++),≥5 分计作(+++)。在 400 倍光镜下,计数 1000 个细胞,计算阳性染色细胞数 a,a/1000×100%即为标记指数(PCNA-LI)。

1.4 统计学处理

统计学分析采用 SAS9.0 正版统计软件包进行处理。计数资料采用 χ^2 检验,秩和检验,以及 spearman 等级相关分析。

2 结 果

2.1 $cFLIP_{LS}$、FADD 在不同宫颈病变中的表达

$cFLIP_{LS}$ 在宫颈上皮细胞的胞质及胞膜上表达,阳性染色多呈弥漫状分布。见图 1,2。如表 1 所示,$cFLIP_{LS}$ 在正常、慢性宫颈炎及 CIN 中低表达(表达率分别为 20%、25%,40%),各组之间差异无显著性 (P=0.7805);而宫颈癌组织中阳性表达率为 79.7%,比上述各组高,并且差异有极显著性(P<0.01)。FADD 染色也出现在宫颈上皮细胞的胞质及胞膜部位,但在宫颈癌组织中未见强阳性表达(如图 3 所示),相反,FADD 的强阳性表达出现在正常、炎症及 CIN 的宫颈上皮中;两两组间比较发现,宫颈癌中 FADD 的表达与正常组织、慢性炎症及 CIN 各组间的表达差异均有显著性 (P<0.05),慢性炎症、CIN 与正常组之间差异无显著性(P>0.05)。

2.2 宫颈癌中 $cFLIP_{LS}$、FADD 的表达与 PCNA 标记指数的关系

PCNA 在全部宫颈癌病例中均有表达,胞核呈黄色或棕黄色染色(见图 4)。如表 2 所示,在宫颈癌组织中,随着 $cFLIP_{LS}$ 染色程度的加深,PCNA-LI(%)从 19.76±3.98 增加到 79.05±9.94,其差异具

表 1 $cFLIP_{LS}$、FADD 在不同宫颈组织中的表达

		$cFLIP_{LS}$					FADD				
	n	-	+	++	+++	(阳性率)	-	+	++	+++	(阳性率)
正常宫颈组织	10	8	2	0	0	20%	0	4	4	2	100%
慢性宫颈炎	12	9	3	0	0	25%	2	4	5	1	83.3%
CIN	15	15	9	5	1	40%	3	6	5	1	80%
宫颈癌	64	13	24	17	10	79.7%	36	20	8	0	43.75%

cFLIP、FADD:宫颈癌与其余各组间的比较 P<0.01

维普资讯 http://www.cqvip.com

有显著性($P<0.01$),而随 FADD 染色的增强,PCNA-LI(%)却从 69.73±12.26 减少至 23.67±6.90($P<0.01$),如表 3 所示。经 spearman 等级相关分析发现,$cFLIP_{LS}$ 的表达与 PCNA-LI 具有相关性($r_1=0.7738$,$P<0.01$),FADD 的表达与 PCNA-LI 呈负相关关系($r_2=-0.8011$,$P<0.01$)。

2.3 $cFLIP_{LS}$、FADD 的表达与宫颈癌临床病理参数间的关系

如表 4 所示,$cFLIP_{LS}$、FADD 的表达与患者年龄、组织学分型无关($P>0.05$),但与肿瘤病理分级、临床分期、是否伴有淋巴结转移密切相关:随着宫颈癌恶性程度增加,cFLIPL/S 的表达增加,而 FADD 的表达减少,这些差异均有显著性($P<0.01$);从原位癌(0 期)→宫颈癌(I~II 期)→宫颈癌(III~Ⅳ)的进展过程中,$cFLIP_{LS}$ 表达是增加的,FADD 表达则逐渐降低,且差异均有显著性($P<0.01$);此外,在伴有癌细胞转移的淋巴结中,cFLIPL/S 高表达,FADD 低表达,差异同样具有显著性($P<0.05$)。

表 2 $cFLIP_{LS}$ 的表达与 PCNA-LI 的关系

$cFLIP_{LS}$	n	PCNA-LI(%)
−	13	19.76±3.98
+	24	37.35±4.63
++	17	52.87±7.26
+++	10	79.05±9.94

表 3 FADD 的表达与 PCNA-LI 的关系

FADD	n	PCNA-LI(%)
−	36	69.73±12.26
+	20	43.54±8.87
++	8	23.67±6.90
+++	0	——

表 4 $cFLIP_{LS}$、FADD 的表达与宫颈癌临床病理参数间的关系

临床参数	n	$cFLIP_{LS}$					FADD				
		−	+	++	+++		−	+	++	+++	
年龄											
<50	17	3	5	6	3		10	5	2	0	
≥50	47	10	19	11	7	P=0.7472	26	15	6	0	P=0.8029
病理分级											
G1	24	11	11	2	0		2	15	7	0	
G2	28	2	12	13	1		23	4	1	0	
G3	12	0	1	2	9	$P^*<0.05$	11	1	0	0	$P^*<0.05$
临床分期											
0 期(原位癌)	10	8	1	1	0		1	3	6	0	
I~II 期	43	5	22	13	3		27	15	1	0	
III~Ⅳ期	11	0	1	3	7	$P^*<0.05$	8	2	1	0	$P^*<0.05$
组织学分型											
鳞癌	46	10	18	11	7		25	15	6	0	
腺癌	18	3	6	6	3	P=0.6452	11	5	2	0	P=0.6239
淋巴结转移											
阳性	15	2	6	5	2		8	5	2	0	
阴性	26	14	9	1	0	$P<0.05$	1	17	6	0	$P<0.01$

P 为组间比较;P^* 为组内两两比较

3 讨 论

cFLIP 首先由 Irmler 等[2]人发现,在初期,研究者们对其命名繁多,亦被称为 CASH,casper,I-FLCE,CLARP,FLAMME-1,MARIT,ursupin 等。现已知它至少有 4 种亚型,研究较多的是 $cFLIP_L$ 和 $cFLIP_S$ 2 种亚型。cFLIP 蛋白在结构与序列上与 caspase-8 有很多相似之处,其 N-端含有与 caspase-8 相似的两个串联的死亡效应域(DED),DED 与 Fas 的死亡结

维普资讯 http://www.cqvip.com

构域功能相似，能介导蛋白质之间的相互结合。cFLIP$_S$ 只有 2 个 DED，而 cFLIP$_L$ 除 2 个 DED 外还含有 1 个 caspase 同源结构域，即 caspase 蛋白水解酶区域，因起催化活性的半胱氨酸、组氨酸分别被酪氨酸、精氨酸取代，故不具备酶的活性。cFLIP$_L$ 与 cFLIP$_S$ 都可被接头分子 FADD 招募至死亡诱导信号传导复合体(DISC)上，从而阻止 caspase-8 与 DISC 的结合反应，使 caspase-8 无法激活，caspase 级联反应不能触发，从而强效抑制 Fas、TRAIL、TNF α 等多种死亡受体诱导的细胞凋亡。目前 cFLIP、FADD 在体内的具体作用环节尚不完全清楚[3]。

由于研究者们对 cFLIP$_L$ 与 cFLIP$_S$ 的具体作用机制尚有争议[4-6]，本文遂采用 cFLIP$_{LS}$ 型，对正常及不同病变的宫颈组织中两种亚型蛋白进行同时检测。近来不少研究提示 cFLI$_P$ 与妇科恶性肿瘤的凋亡及耐药性关系密切[7-8]，陈红霞等[9]认为 cFLIP 蛋白的表达水平上调促进了癌细胞的恶性生物学行为。本研究发现，cFLIP$_{LS}$ 在宫颈癌中的表达均高于正常组、慢性炎症组以及 CIN 组，且差异均有统计学意义，这与陈红霞等人的实验结果一致。而慢性炎症组、CIN 组的阳性表达率虽高与正常组，但彼此之间的差异无显著性($P>0.05$)。这个结果提示，cFLIP 蛋白的高表达可能是宫颈癌发生的一个重要分子事件。FADD 在正常宫颈组织中均有表达，而在宫颈癌组织中表达率仅 43.75%，提示这种蛋白表达减少或缺失可能与宫颈癌的发生有关；反过来推测，FADD 正常表达，可能是减少宫颈癌发生的保护因素。

进一步分析发现，cFLIP$_{LS}$、FADD 的表达与宫颈癌的病理分级、临床分期有关，即：肿瘤细胞分化越差(恶性程度越高)、临床分期越晚，cFLIP$_{LS}$ 的蛋白表达越高；而肿瘤细胞分化越差、临床分期越晚，FADD 表达越低。结果提示，cFLIP 与 FADD 不仅与宫颈癌细胞的恶性程度有关，而且与宫颈癌的进展密切相关。本研究还发现，在有癌细胞转移的淋巴结中，cFLIP$_{LS}$ 出现高表达，FADD 低表达，无癌细胞转移的淋巴结中，cFLIP$_{LS}$ 低表达，而 FADD 表达阳性率较高。这提示 cFLIP、FADD 可能同时参与了肿瘤细胞向周围淋巴结转移的过程，此可为宫颈癌的预后提供一定的辅助信息。统计分析未发现 cFLI-P$_{LS}$、FADD 的蛋白表达与患者年龄及组织学类型有

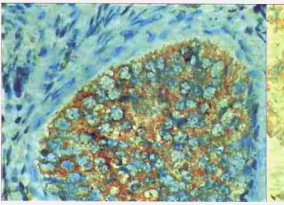


图 1　cFLIP$_{LS}$ 在宫颈鳞癌中的表达，×400

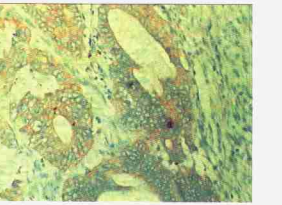


图 2　cFLIP$_{LS}$ 在宫颈腺癌中的表达，×200

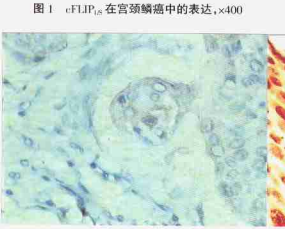


图 3　FADD 在宫颈鳞癌中的表达，×400

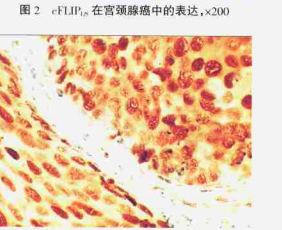


图 4　PCNA 在宫颈鳞癌中的表达，×400

维普资讯 http://www.cqvip.com

关。因此,我们认为 cFLIP、FADD 可以作为宫颈癌恶性程度及病情进展的预测指标,特别是二者联合检测,可能更有助于临床认识宫颈癌的生物学行为,同时为研究者们提供了新的思路:cFLIP 和/或 FADD 是否可以作为治疗宫颈癌又一个新的靶点,联合 cFLIP、FADD 的基因治疗策略是否更加有效?

PCNA 是一种含 261 个氨基酸,分子量为 35kD 的糖蛋白,其合成与 DNA 复制和细胞增殖直接相关,被认为是反映细胞增殖的良好标记物。近年来很多研究表明肿瘤细胞 PCNA 的表达对于许多恶性肿瘤的生物学行为和患者预后的判断具有重要意义[10,11]。本实验发现,cFLIP、FADD 蛋白表达与 PCNA 标记指数之间有密切的相关性。据此笔者推测,在宫颈癌中,cFLIP 表达升高,可能抑制了 caspase 级联反应,从而抑制了宫颈癌细胞的调亡并促进了肿瘤细胞的增殖;而 FADD 表达的减少,可能导致胞内不能形成正确的 DISC,caspase-8 不能被有效激活,从而使 Fas、TRAIL 等介导的调亡信号转导途径受阻,故出现癌细胞的过度增殖。cFLIP 大量表达的宫颈癌病例中,往往见不到 FADD 的表达,提示 cFLIP 可能存在不依赖 FADD 的作用途径。FADD 的表达规律为何与 cFLIP 相反,它们是否受同一个分子事件/环节的调控,目前尚不清楚,这需要我们进一步的实验研究。

参 考 文 献

[1] 刘志能,唐良苔.cFLIP 与人类疾病[J].重庆医学,2006;35(1):78-81.

[2] Irmler M,Thome M,Hahne M,et al.Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP[J].Nature,1997;388(6638):190-195.

[3] 刘志能,唐良苔.cFLIP 与卵巢癌[J].重庆医学,2005;34(10):1554-1556.

[4] Scaffid C,Schmitz I,Krammer PH,et al.The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis[J].J Biol Chem,1999;274(3):1541-1548.

[5] Kirchhoff S,Wolfgang WM,Krueger A,et al.TCR-Mediated Up-Regulation of c-FLIPshort Correlates with Resistance Toward CD-95-Mediated Apoptosis by Blocking Death-Inducing Signaling Complex Activity[J].J Immunol,2000;165(11):6293-6300.

[6] Benesch M,Platzbecker U,Ward J,et al.Expression of FLIPlong and FLIPshort in bone marrow mononuclear and CD34+cells in patients with myelodysplastic syndrome:correlation with apoptosis[J].Leukemia,2003;17(12):2460-2466.

[7] Wajant H.Targeting the FLICE Inhibitory Protein(FLIP)in cancer therapy[J].Mol Interv,2003;3(3):124-127.

[8] Dutton A,Young LS,Murray PG.The role of cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP)in the pathogenesis and treatment of cancer[J].Expert Opin Ther Targets,2006;10(1):27-35.

[9] 陈红霞,刘元姣,黎 辉,等.cFLIP 基因在子宫内膜腺癌组织中的表达[J].癌症,2004;23(3):254-258.

[10] Hall PA,Levison DA,Woods Al,et al.Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in paraffin sections:an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasmas[J].J Pathol,1990;162:285-294.

[11] Cheon J,Kim HK,Moon DG,et al.Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer:changes in tumour cell proliferative activity[J].Bju Int,2000;85(6):759-766.

(上接第 3 页)

[3] Lightowlers MW,Jensen O,Fernandez E,et al.Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the Eg95 hydatid vaccine in sheep[J].Int J Parasitol,1999;29(4):531-534.

[4] Cirillo JD,Stover CK,Bloom BR,et al.Bacterial vaccine vectors and bacillus calmette-Guerin[J].Clin Infect Dis,1995;20(4):1001-1009.

[5] Matsuo K,Yamaguchi R,Yamazaki A,et al.Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria[J].Infect Immun,1990;58(12):4049-4054.

[6] 李文桂,石佑恩,韩家俊.日本血吸虫重组 BCG-Sj26GST 疫苗免疫小鼠后 IgG 抗体反应的动态观察[J].重庆医科大学学报,2001;26(1):4-6.

[7] 林仁勇,丁剑冰,卢晓梅,等.细粒棘球绦虫 Eg95 抗原基因疫苗体外瞬时表达及对小鼠诱导的免疫应答[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004;24(4):204-208.

[8] 丁剑冰,魏晓丽,马秀敏,等.细粒棘球绦虫 Eg95 重组蛋白诱导小鼠免疫应答的研究[J].新疆医科大学学报,2005;28(4):305-307.

[9] Wu HY,Nkolova EB,Beagly KW,et alInduction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue[J].J Immunol,1996;88(4):493-500.