维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0409－03

Clusterin、bcl－2 及 FasL 在前列腺癌中的表达及相关性研究

陈 刚，唐 伟

(重庆医科大学临床学院泌尿外科，重庆 400016)

【摘 要】目的：通过检测新的凋亡抑制因子 Clusterin 在前列腺癌组织中的表达，探讨其与前列腺癌发生发展的关系及其与 bcl－2 和 FasL 表达的关系。方法：A 采用免疫组织化学染色法检测 Clusterin、bcl－2、FasL 在 10 例正常前列腺组织、15 例良性前列腺增生组织(BPH)、49 例前列腺癌组织标本中的表达。结果：Clusterin 在前列腺正常、增生、癌组织中的阳性及弱阳性表达率分别为 10%(1/10)、66.6%(10/15)、91.8%(45/49)。前列腺癌组织中 Clusterin 表达水平明显高于前列腺正常组织($P<0.005$)及增生组织($P<0.005$)，且在癌组织中与肿瘤临床分期($P<0.001$)、病理分级($P<0.001$)呈正相关。比较 Clusterin 与 bcl－2 在前列腺癌组织中的表达，差异有显著性($P<0.05$)。比较 Clusterin 与 FasL 在前列腺癌组织中的表达，差异也有显著性($P<0.05$)。结论：Clusterin 基因可能通过抑制凋亡在前列腺癌的发生发展中发挥重要作用，且其表达与 bcl－2、FasL 的异常表达密切相关。

【关键词】前列腺肿瘤；凋亡；Clusterin；FasL；bcl－2；免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R737.25 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－03－03

Expression and significance of Clusterin ,bcl－2 and FasL in prostate cancer

CHEN Gang, et al

(*Department of Urology, College of Clinical Medicine , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and significance of an inhibitor gene of apoptosis, Clusterin, in prostate cancer, and its relationship with the expression of bcl－2, FasL. *Methods*: The expression of Clusterin, bcl－2 and FasL in sample of 10 normal prostate, 15 BPH and 49 prostate cancer were examined by immunohistochemical stain. *Results*: The rate of positive or weak positive for normal prostate, BPH and prostate cancer was 10%(1/10), 66.6%(10/15) and 91.8%(45/49) respectively. The expression level of Clusterin in prostate cancer was much higher than in normal prostate($P<0.005$), BPH($P<0.005$), and it was related positively with clinical stage($P<0.001$) and pathological grade($P<0.001$) of prostate cancer. Clusterin positive cases were strongly associated with bcl－2 expression($P<0.05$) and FasL expression($P<0.05$). *Conclusion*: Clusterin, alone or in cooperarion with bcl－2 and FasL, may play an important role in the onset and progression of prostate cancer by the antiapoptosis pathway.

【Key words】Prostatic neoplasms; Apoptosis; Clusterin; FasL; bcl－2; Immunohistochemistry

Clusterin 是一种新发现的凋亡抑制因子。Clusterin 基因定位于 $8q^{21}$，编码由 448 个氨基酸组成的蛋白质。本研究采用免疫组织化学染色法检测新的凋亡抑制因子 Clusterin 在前列腺癌组织中的表达及其与 bcl－2 和 FasL 表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集我院近年来的前列腺癌手术标本 49 例、BPH 摘除术标本 15 例及前列腺组织标本 10 例(正常对照组)。标本均经 10%甲醛固定，常规石蜡包埋，连续切片，留一张复诊。前列腺癌按 Gleason 评分分级：2～5 分划分为高分化腺癌，共 18 例；6～8 分划分为中分化腺癌，共 15 例；9～10 分划分为低分化腺癌，共 16 例。另按 Jewett 方法分为 A、B、C、D 四期，各期分别为 10、12、15、12 例。

1.2 检测方法

采用 SP 法。一抗 Clusterin 鼠单抗为 Santa Cruz 公司产品，FasL 和 bcl－2 鼠单抗及 SP 试剂盒为福建迈新公司产品。实验按试剂盒说明书进行，用 PBS 代替一抗作阴性对照，用已知阳性切片作阳性对照。

1.3 结果判定

根据各免疫组化标记物在不同分组前列腺上皮组织中的表达强度与反应特点，在光镜中高倍镜下半定量划分反应

作者介绍：陈 刚(1975－)，男，医师，硕士，
主要研究方向：泌尿男生殖系肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

等级：弱阳性（+）：阳性细胞数<10%，显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色；强阳性（+++）：阳性细胞数>60%，多数细胞呈黄至棕黄色染色；中度阳性（++）：阳性细胞数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间；凡显色强度与背景无明显差别者为阴性（-）。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行秩和检验及等级相关检验。

2 结 果

2.1 Clusterin 在正常前列腺组织、良性前列腺增生组织和前列腺癌组织中的表达（见表 1）

Clusterin 的阳性表达主要位于胞浆，为黄色或黄棕色颗粒，其在前列腺癌中的阳性表达率为 91.8%（45/49）（图 1）。秩和检验及两两组间比较表明：Clusterin 在正常前列腺、BPH 和前列腺癌中的表达不同（$H_C = 21.28$，$P < 0.005$），在正常前列腺和 BPH 中的表达差异无显著性（$\chi^2 = 1.087$，$0.75 > P > 0.5$），在正常前列腺和前列腺癌中的表达差异有显著性（$\chi^2 = 24.54$，$P < 0.005$），在 BPH 与前列腺癌中的表达差异有显著性（$\chi^2 = 19.21$，$P < 0.005$），即前列腺癌中 Clusterin 表达水平明显高于前列腺正常及增生组织。

2.2 前列腺癌组织中 Clusterin 表达水平与肿瘤病理分级、临床分期的关系（见表 1）

等级相关检验表明：Clusterin 在前列腺癌组织中的表达与肿瘤病理分级呈正相关（$r_s = 0.777$，$P < 0.001$），且与肿瘤临床分期呈正相关（$r_s = 0.645$，$P < 0.001$）。

表 1 Clusterin 在正常前列腺、BPH 和前列腺癌组织中的表达及与病理分级、临床分期的关系

类别	n	Clusterin							
		-		+		++		+++	
		n	%	n	%	n	%	n	%
组织标本									
正常前列腺组织	10	9	90.00	1	10.00	0	0	0	0
BPH	15	5	33.33	10	66.66	0	0	0	0
前列腺癌	49	4	8.16	2	4.08	28	57.14	15	30.61
Gleason 分级									
2-5 分	18	3	16.66	1	5.55	14	77.77	0	0
6-8 分	15	1	6.66	1	6.66	11	73.33	2	13.33
9-10 分	16	0	0	0	0	3	18.75	13	81.25
临床分期									
A	10	2	20.00	1	10.00	7	70.00	0	0
B	12	1	8.33	1	8.33	9	75.00	1	8.33
C	15	1	6.66	0	0	10	66.67	4	26.67
D	12	0	0	0	0	2	16.67	10	83.33

表 2 Clusterin，bcl-2 和 FasL 在前列腺癌组织中表达的关系

类别	n	Clusterin							
		-		+		++		+++	
		n	%	n	%	n	%	n	%
bcl-2									
-	13	2	15.38	0	0	9	69.23	2	15.38
+	14	1	7.14	1	7.14	8	57.14	4	28.57
++	14	1	7.14	1	7.14	9	64.29	3	21.43
+++	8	0	0	0	0	2	25.00	6	75.00
FasL									
-	19	3	15.79	1	5.26	11	57.89	4	21.05
+	10	1	10.00	1	10.00	6	60.00	2	20.00
++	12	0	0	0	0	9	75.00	3	25.00
+++	8	0	0	0	0	2	25.00	6	75.00

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 Clusterin 在前列腺癌组织中的表达与 bcl-2、FasL 表达的关系(见表 2)

bcl-2 的阳性染色主要定位于胞浆,为黄色或黄棕色颗粒。bcl-2 在前列腺癌组织中的阳性表达率为 73.4%(36/49)(图 2)。FasL 的阳性表达主要位于胞浆或胞膜,为黄色或黄棕色颗粒,其在前列腺癌组织中的阳性表达率为 61.2%(30/49)(图 3)。等级相关检验表明:Clusterin 与 bcl-2 在前列腺癌组织中的表达呈正相关($r_s = 0.308$, $P < 0.05$),Clusterin 与 FasL 在前列腺癌组织中的表达呈正相关($r_s = 0.369$, $P < 0.05$)。

3 讨 论

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动性程序性死亡过程。凋亡的调控异常可能导致肿瘤、神经退行性疾病或其他病理的变化。许多研究证实:凋亡的抑制是肿瘤发生发展的重要原因。Clusterin 是一种凋亡抑制因子。Sintich 等[1]认为 Clusterin 及抗体均为大分子蛋白,不可能进入细胞内发生作用,细胞膜是其作用部位,Clusterin 是在细胞外发挥抗凋亡作用的。Clusterin 的前 21 个氨基酸残基为其前导信号部分,是 Clusterin 分泌至细胞外所必须的结构[2]。Sintich 等[1]研究认为 Clusterin 抑制凋亡机制有三种可能:Clusterin 是一种"粘附蛋白",它可能直接与细胞毒 TNF 分子相互作用,而使靶细胞无法获得细胞因子;另可能 Clusterin 是在 TNF 的受体水平发挥作用;Clusterin 与表面分子(如鞘磷脂)相互作用,干涉 TNF 的信号传导。Sintich 等[1]用 TNF 诱导前列腺癌细胞凋亡,观察到 Clusterin 可对抗 TNF 的细胞凋亡作用。本实验采用免疫组织化学方法在蛋白水平检测 Clusterin 的表达,结果表明前列腺癌组织中表达水平明显高于前列腺正常组织及增生组织,且在癌组织中与肿瘤临床分期、病理分级呈正相关。Steinberg 等[3]用免疫组化测定 40 例前列腺癌根治术标本和穿刺活检标本(包括各期)的 Clusterin,发现前列腺癌标本表现出程度不同的染色,并与 Gleason 评分有关,故认为高水平 Clusterin 与前列腺癌侵袭性有关。综上,Clusterin 基因可能通过抑制凋亡而参与前列腺癌的发生发展,可望成为前列腺癌诊断和评估预后的指标。

本实验结果表明:Clusterin 在前列腺癌组织中的表达与 FasL 表达呈正相关。FasL 为Ⅱ型膜蛋白,属 TNF 家族,是可以与 Fas 结合的细胞膜表面分子。当 Fas 与 FasL 结合后,能将胞外的凋亡信号传导入胞内,进而活化 Caspases 级联反应,最终导致凋亡。正常情况下,免疫细胞和免疫器官有 FasL 的表达,FasL 是维持免疫系统正常发育、平衡调节及功能的一个关键分子。存在于 CTL 细胞上的 FasL 与 Fas 结合,可诱导膜表面表达 Fas 的细胞发生凋亡,故 Fas/FasL 介导了 CTL 细胞识别和杀死肿瘤细胞、衰老细胞等的细胞毒作用。Fas/FasL 的异常表达与肿瘤免疫有关。张徽等[4]认为:在甲状腺乳头状癌中 FasL 的高表达与肿瘤侵袭性有关,肿瘤细胞高表达 FasL 可能使瘤细胞具有逃避机体免疫监视的作用。Clusterin 可能直接与 Fas/FasL 相互作用,干涉 TNF 的信号传导,而使靶细胞无法获得细胞因子,阻止了由 Fas 介导的凋亡。而 FasL 的高表达对消除组织中浸润的淋巴细胞起着重要作用,从而使肿瘤细胞能够免疫逃逸。同时本实验结果表明:Clusterin 在前列腺癌组织中的表达与 bcl-2 表达密切相关。bcl-2 分布于线粒体膜上,通过改变线粒体的通透性,阻止细胞色素 C 的释放,并阻止细胞色素 C 与蛋白酶活性因子 1(Apaf-1)的结合,从而抑制凋亡。另 bcl-2 可能通过阻止胞浆内钙离子浓度增加来抑制凋亡。细胞凋亡是细胞内基因的调节控制的,而细胞间的信号传导也是影响凋亡的重要因素。Fas/FasL 系统即是重要的信号传导系统。Clusterin 就是通过干涉 TNF 的信号传导,从而抑制了由 Fas/FasL 介导的凋亡。Mapara 等[5]认为 Fas/FasL 介导的凋亡与 bcl-2 表达有某种程度的偶联,故推断 bcl-2 对 Fas/FasL 介导的凋亡有负调节作用。bcl-2 也可能因此反馈调节 Clusterin 的表达,进而影响其向细胞外的分泌。

前列腺癌,尤其是激素非依赖性前列腺癌缺乏十分有效的治疗方法。研究证实通过诱导凋亡有望提高其治疗效果。Mikata 等[6]将野生型 p53 基因转染入前列腺癌 Pc3 细胞系。结果:转染了野生型 p53 基因的肿瘤的生长被显著抑制。Gleave 等[7]对激素非依赖性前列腺癌的小鼠模型去势后,将 bcl-2 反义核苷酸导入小鼠模型,结果 bcl-2 表达明显降低,PSA 水平明显下降,瘤体缩小。Miyake 等[8]检测反义 Clusterin 寡聚多核苷酸处理过的 Shionogi 肿瘤模型,发现肿瘤出现更快的凋亡,雄激素非依赖性的出现明显推迟,故认为 Clusterin(下转第 420 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

而再生晶体的理论。但从实验结果看,无论是再生晶体的发生率,还是再生物质的形态学、组织学,与以往研究相比均有较大差距,在进一步的研究中还需要仔细分析相关的调控因素和影响条件,并且对再生过程进行详细的组织学分析,甚至遗传学的研究,希望能在较高等哺乳动物体内观察到晶体再生的发生。

参 考 文 献

[1] Shekhawat D S, Jangir O P, Prakash A, et al. Lens regeneration in mice under the influencee of vitamin A[J]. J Biosci, 2001;26(5):571 - 576.

[2] Fell H B, Rinaldini L M. The effect of vitamin A and C on cells and tissues; in cell and tissues in crlture(ed)[J]. E N Wilmer(New York: Academic Press) vol 1, 659 - 699.

[3] Niazi I A. Background to work on retinoids and amphibian limb regeneration; studies on anuran tadpoles[J]. A retrospect. J Biosci, 1996;21:273 - 297.

[4] Maden. the homeotic transformationof tails into limb in Rana temporaria[J]. Dev Biol, 1993;159:379 - 391.

[5] Emwright JF, grainer RM. Altered retinoid signaling in the heads of small eye mouse embryos[J]. Dev Biol, 2000;221(1):10 - 22.

[6] Tsonis PA, Trombley MT, Rowland T, et al. Role of retinoic acid in lens regeneration[J]. Dev Dyn, 2000;219(4):588 - 593.

[7] Tsonis PA, Tsavaris M, Call MK, et al. Expression and role of retinoic acid receptor alpha in lens rgeneration [J]. Dev Growth Differ, 2002;44(5):391 - 394.

(上接第 411 页)是一种抗凋亡基因可加速雄激素非依赖性的进展。Gleave 等[9]用 Clusterin 反义寡核苷酸作用于雄激素非依赖性前列腺癌,发现在动物模型中与紫彬醇有相同作用,可提高肿瘤的凋亡率和消退率。综上,Clusterin 不仅可望成为前列腺癌诊断和评估预后的指标而且有望成为前列腺癌,尤其是激素非依赖性前列腺癌治疗新的靶目标。

参 考 文 献

[1] Sintich SM, Steinberg J, Kozlowski JM, et al. Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor - alpha in Pc3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP - 2(clusterin)[J]. Prostate, 1999;39(2):87 - 93.

[2] Kirszbaum L, Sharpe JA, Murphy B, et al. Molecular cloning and characterlzation of the novel human complement - associated protein, SP - 40, 40: a link between the complement and reproductive system[J]. EMBO J, 1989;8:711 - 718.

[3] Steinberg I, Oyasu R, Lang S, et al. Intracellular levels of SGP - 2(Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 1997;3(10):1707 - 1711.

[4] 张 徽,刘 纯,李园园. 47 例甲状腺癌中 FasL 检测的病理学意义[J]. 重庆医科大学学报, 2003;28(1):69 - 71.

[5] Mapara, MY, Bargou R, Zugck C, et al. APO - 1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl - 2 oncogene expression[J]. Eur J Immunol, 1993;23(3):702 - 708.

[6] Mikata K, Uemura H, Ohuchi H, et al. Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of P53 gene: gene transfer by electroporation [J]. Mol Cancer Ther, 2002;1(4):247 - 252.

[7] Gleave M, Tolcher A, Miyake H, et al. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisene bcl - 2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model[J]. Clin Cancer Res, 1999;5(10):2891 - 2898.

[8] Miyake H, Nelson C, Rennie PS, et al. Testosterone - repressed prostate message - 2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2000;60(1):170 - 176.

[9] Gleave ME, Miyake H, Zellweger T, et al. Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, Clusterin/testosterone - repressed prostate message2 to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer[J]. Urology, 2001 ;58(2 suppl 1):39 - 49.