DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.006
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2191-03

论著

细胞凋亡、PCNA、p53和Fas与肝细胞癌临床病理特征关系的研究

张艳玲[1],梁后杰[1],肖文华[2],阎晓初[3] (第三军医大学西南医院:[1]肿瘤科,[3]病理科,重庆 400038;[2]解放军304医院肿瘤科,北京 100037)

提 要:目的 探讨肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中细胞凋亡、增殖及其相关调控因子p53和Fas表达特征与HCC临床病理的关系。方法 分别以末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的d-UTP缺口末端标记技术(TUNEL)和S-P免疫组化方法检测35例人HCC与其癌旁组织中凋亡细胞和增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及p53、Fas的表达特征,并结合临床病理资料进行统计学分析。结果 细胞凋亡指数(AI)、PCNA指数(LI)、p53和Fas表达与HCC的性别、年龄及肿瘤大小无显著性差异;AI、p53和Fas表达与HCC的组织学类型间也无显著差异($P>0.05$);LI与HCC组织学类型有关:实体型较梁状型和腺样型明显增高($P<0.01$);随Edmondson分级、TNM分期增加,AI逐渐减少,而LI及p53表达强度则逐级增高,Fas表达无显著变化($P>0.05$)。结论 HCC的恶性程度与细胞凋亡指数呈负相关,而与PCNA指数呈正相关。HCC细胞凋亡为p53依赖型,p53基因高突变、Fas表达的下调的肝癌组织其分化程度较低,提示预后不佳。

关键词:肝细胞癌;细胞凋亡;增殖细胞核抗原;p53;Fas;病理
中图法分类号:R329.28;R394.3;R735.7 文献标识码:A

Relationship of apoptosis, proliferation, p53, and Fas with clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma

ZHANG Yan-ling[1], LIANG Hou-jie[1], XIAO Wen-hua[2], YAN Xiao-chu[3] ([1]Department of Oncology, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3]Department of Oncology, No. 304 Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of apoptosis, proliferation and its related factors (p53, Fas) with clinical pathological characteristics in hepatocellular carcinoma (HCC). Methods Apoptosis, nuclear antigen of proliferating cells (PCNA), p53, and Fas proteins were detected by labelling technique of *in situ* terminal deoxynucleotide transferase and immunohistochemical method on 35 HCC samples. Statistical analysis was employed to evaluate the correlations between the experimental data and clinical pathological characteristics. Results There was no significant difference between the apoptotic index (AI), PCNA index (LI), expressions of p53 and Fas and the age, sexual distinction of patient, and tumor size. Expressions of p53, Fas, and AI were not associated with the histological types of tumor at all. However, the index of PCNA was much higher in poorly differenciatiated type than that in trabecular type and pseudo glandular type of HCC. Importantly, following the advanced Edmondson stages and the TNM stages, p53 expression and LI increased in HCC, but AI showed a lower level at same time. Conclusion The malignancy of HCC is negatively correlated with AI but positively with PCNA. The apoptosis in HCC occurs in a p53-dependent manner. The higher mutant of p53 and the lower regulation of Fas expression may contribute to the genesis and progression of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; apoptosis; proliferation cell nuclear antigen; p53; Fas; pathology

近来研究表明,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生发展与组织内部细胞增殖和凋亡之间的平衡失调相关,特别是细胞凋亡过程的异常,不仅与肿瘤的形成相关,而且与肿瘤的恶性转化及转移等生物学行为也有较密切的关系。因此,本研究收集我院近期收治的35例HCC患者的临床病理资料,并结合癌肿组织中细胞增殖、细胞凋亡及其相关调控因子Fas、p53进行研究,以探讨二者与HCC临床病理特征的关系,为HCC的防治提供更多的实验与临床资料。

作者简介:张艳玲(1966-),女,云南省昆明市人,硕士,主治医师,主要从事恶性肿瘤的化疗和放疗方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754000-73058
收稿日期:2004-03-19;修回日期:2004-11-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 临床资料

35例HCC中男29例，女6例，年龄平均46.5岁，其中＜40岁7例，40～60岁21例，＞60岁7例。所选HCC病例术前均未做过任何放疗或化疗。肿瘤大小：肿瘤直径＜3 cm，6例；直径3～5 cm，7例；直径＞5 cm，22例；参照全国肝癌病理协作组标准组织学分类，其中：梁状型14例；腺样型6例；实体型15例。按照Edmondson标准分级，其中：Ⅰ级2例，Ⅱ级8例，Ⅲ级18例，Ⅳ级7例。按照国际抗癌联盟(UICC)肝癌TNM临床分期：Ⅰ期2例(瘤体直径≤2 cm，无血管侵犯，无淋巴结和远处转移)；Ⅱ期11例(瘤体直径≤2 cm，侵犯血管，或＞2 cm，不伴血管侵犯，无淋巴结和远处转移)；Ⅲ期13例(肿瘤直径＞2 cm，侵犯血管，或伴有淋巴结转移，无远处转移)；Ⅳ期9例(肿瘤多个结节，超出1叶，侵犯门脉血管主要分支，伴有淋巴结转移，或出现远处转移)。原发性肝癌5年的生存率为2.3%，因本组HCC患者大多为Ⅲ、Ⅳ期，其1年生存率很低，故未进行随访。

每例取癌肿组织1块，同时收集非肝病死亡的尸检组织作为正常对照。标本用甲醛液固定，常规石蜡包埋，厚4 μm连续切片，备用。

1.2 试剂

原位细胞凋亡检测试剂盒系德国Boehringer Mannhiem公司产品；蛋白酶K购自德国E.Merck公司；Fas多克隆抗体、p53单克隆抗体均为美国Senta Cruz产品；PCNA单克隆抗体及S-P免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

1.3 Fas、p53、PCNA免疫组化染色

石蜡切片常规脱蜡至水后，经微波炉抗原修复，余步骤严格遵照S-P试剂盒说明书操作。DAB显色，苏木精复染，常规脱水、透明、封片。用已知阳性的肝癌标本做阳性对照，用PBS代替一抗做空白对照。以胞质内或核内有明显的棕色颗粒作为核阳性的判定标准。

增殖细胞指数(PCNA-Labeling index，PCNA-LI)：每张切片选择5个以上具有代表性的高倍视野，计数500个肿瘤细胞或肝细胞，取阳性细胞平均百分率，作为PCNA指数。

Fas、p53的半定量分析：每张切片分别观察10个高倍视野，每个高倍视野计数100个肿瘤细胞或非肿瘤肝细胞内免疫染色阳性细胞数，计算出每张切片的阳性细胞百分数，按阳性细胞百分数分为4个等级，低于5%为阴性(－)，5%～25%为(＋)，26%～50%为(＋＋)，51%以上为(＋＋＋)。

1.4 细胞凋亡TUNEL检测

按试剂盒说明书稍加改进。具体步骤如下：① 切片经常规脱蜡至水；②0.3% H_2O_2 封闭30 min；③ 20 μg/ml蛋白酶K消化20 min；④TUNEL反应液，37 ℃孵育60 min；⑤过氧化物酶连接的抗荧光素抗体，37 ℃孵育30 min，②～⑤步后均以PBS清洗3次，每次5 min；⑥DAB显色，苏木精复染、脱水、透明、封片。荧光显微镜下观察。

TUNEL阳性信号以核内有明显的黄色或黄绿色荧光作为判定标准，并结合HE染色，对HE染色证实为坏死的细胞不记数。随机移动组织片，选择相邻的5个以上具有代表性的高倍视野，排除有炎症反应和坏死的视野，计数500个肿瘤细胞或肝细胞，取阳性细胞平均百分率，作为TUNEL指数，凋亡指数(apoptosis index，AI)。

1.5 统计学处理

应用SPSS10.0统计软件包进行完全随机设计方差分析和均数间两两比较。

2 结果

本组35例HCC组织细胞凋亡、PCNA、p53和Fas表达与肝细胞癌临床病理参数的关系见表1。

表1 细胞凋亡、PCNA、p53和Fas表达与肝细胞癌临床病理

Tab 1 Relation of apoptotic index，PCNA index，expressions of p53 and Fas with the clinicopathological characteristics in hepatocellular carcinoma

Item	AI	PCNA-LI	p53 (case)		Fas (case)	
	$\bar{x}\pm s$	$\bar{x}\pm s$	－	＋	－	＋
Sex						
Male	3.72±2.10	58.21±14.56	15	14	24	5
Female	3.15±2.06	48.24±10.71	4	2	4	1
Age (years)						
＜40	3.43±2.07	54.85±12.15	3	4	6	1
40～60	3.85±2.22	59.66±16.00	12	9	17	4
＞60	3.28±1.80	54.00±7.46	4	3	6	1
Size (cm)						
≤3	3.17±1.86	53.67±9.83	4	2	4	2
4～5	3.14±1.47	57.14±11.71	3	4	5	2
＞5	3.95±2.27	58.77±16.00	12	10	20	2
Histology-types						
Bridge-shape	3.64±2.02	51.07±11.10	8	6	12	2
Aden-shape	3.17±1.94	50.60±15.25	3	3	6	1
Entity-shape	4.20±2.17	66.40±11.21	8	7	12	3
Grades						
Ⅰ	6.50±0.71	37.50±10.61	2	0	1	1
Ⅱ	4.87±1.95	48.87±9.46	6	2	7	1
Ⅲ	3.22±1.96	62.61±14.09	9	9	15	3
Ⅳ	2.57±1.51	60.28±9.51	2	5	6	1
TNM-staging						
Ⅰ	5.50±0.71	42.50±17.67	2	0	0	2
Ⅱ	4.91±2.02	51.18±10.98	7	4	9	2
Ⅲ	2.92±2.59	59.84±15.56	8	5	11	2
Ⅳ	2.77±1.39	65.44±8.81	2	7	9	0

细胞凋亡指数(AI)与患者性别、年龄、肿瘤大小和组织学类型无统计学意义($P>0.05$)。但与肿瘤Edmondson分级和临床分期(TNM)分期相关，随分级的增加，AI逐渐减少，其中Ⅰ、Ⅱ级组间及Ⅲ、Ⅳ级组间AI相差不显著($P>0.05$)，Ⅲ、Ⅳ级(3.04±1.87)与Ⅰ、Ⅱ级(5.20±1.83)相比，AI均值显著降低，经统计学处理具有非常显著的差异($P<0.01$)；随TNM级别增高，AI均值有降低趋势，其中Ⅰ、Ⅱ级(5.00±1.86)与Ⅲ、Ⅳ级(2.86±1.78)两组间相差显著($P<0.05$)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PCNA 表达标记指数(LI)与患者性别、年龄和肿瘤大小无显著差异($P>0.05$);随 HCC 分级增加, LI 呈逐级增高趋势, 其中Ⅰ、Ⅱ级组与Ⅲ、Ⅳ级组比较差异非常显著($P<0.01$);LI 与 HCC 组织学类型相关, 实体型与梁状型和腺样型相比相差非常显著($P<0.01$);随 TNM 分期增高, 其 AI 逐渐增加, Ⅲ、Ⅳ级组显著高于Ⅰ、Ⅱ级($P<0.01$)。p53 蛋白阳性表达率与患者性别、年龄及肿瘤大小和组织学类型也无关($P>0.05$);经但与肿瘤分级相关, 随 Edmondson 分级增加, p53 蛋白阳性表达程度逐渐增强, Ⅳ级阳性率显著高于Ⅰ、Ⅱ级($P<0.05$)临床 TNM 分期中, Ⅰ、Ⅱ期与Ⅲ、Ⅳ期的 p53 阳性表达率经统计学处理两者间无显著性差异($P>0.05$), 但Ⅳ期 p53 阳性率显著升高, 与Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期相比具有非常显著的差异($P<0.05$)。

Fas蛋白表达在不同性别、年龄患者间相差不显著($P>0.05$)。与肿瘤大小、组织学类型无关($P>0.05$)。在 Edmondson 分级和 TNM 分期间 Fas 表达无显著性差异($P>0.05$)。

3　讨论

既往研究认为肿瘤形成是细胞无限增殖所致的细胞积累, 最近发现肿瘤中不仅存在细胞增殖, 同时亦存在细胞凋亡。本研究表明, HCC 组织中凋亡细胞呈散在分布, 且随癌细胞恶性度增高呈递减趋势; 而 PCNA 阳性细胞指数则以癌细胞分化愈低, 其指数愈高表现。结果说明 HCC 在去分化过程中随着肿瘤的不断增殖和生长, 细胞凋亡相对减少, 肿瘤细胞的生长优势不但可以从肿瘤细胞强大的增殖力和低分化程度中获得, 而且可以从肿瘤细胞凋亡受抑, 生存期延长中获得。HCC 越高的 LI 与越低的AI 使 HCC 表现出更明显的恶性表型, 其生物学行为亦更加恶性。因此, HCC 的细胞凋亡与增殖的检测, 无疑会对临床上判断 HCC 的恶性程度、手术切除范围、预后等有着重要的意义。但 HCC 中, HCC 与 LI 和 AI 更为明确的相关性尚待进一步研究。

正常的 p53 产物有抗增殖和抗转化作用, 有时能促进细胞凋亡作为细胞生长和转化的潜在抑制剂, p53 可以在 DNA 损伤后的细胞反应中表现出来。损伤后细胞核中野生型 p53 很快积累, 经过一系列步骤使细胞周期停止于 G_1 期 S 阶段, 细胞得以修复, 再重新进入细胞周期, 如 DNA 损伤过于严重, DNA 无法修复, 则产生细胞凋亡。人类肿瘤经常有 p53 突变, 而 p53 突变失去了和 DNA 结合以及相关的生物活性能力[1~3]。本研究表明, HCC 组织中 p53 的表达率随 Edmondson 分级呈递增现象。结果表明, 伴有 p53 高突变的肝癌组织其恶性程度较高, 诚如文献[4]报道 p53 突变产生的突变型 p53 蛋白丧失了负性调节作用, 使进入 S 期的瘤细胞大大增加, 肿瘤的恶性程度增高。文献[5]报道, 肿瘤细胞的凋亡过程可分为 p53 依赖型与 p53 非依赖型, 如直肠癌肿瘤细胞的凋亡和增殖与 p53 无直接关联, 而我们的结果提示, HCC 组织的瘤细胞凋亡为 p53 依赖型。此外, 研究还表明, 有 3 例 HCC 组织的瘤细胞胞浆而不是核内表达 p53 蛋白, 且这 3 例 HCC 均为 Edmondson Ⅲ、Ⅳ级, 是否预示这些 HCC 预后结果不良, 尚需增加标本例数进一步研究。

Fas 抗原是人体多种细胞表面的一种膜蛋白, 是一种触发凋亡的蛋白质。属于肿瘤坏死因子/神经因子受体家族。Fas 传导凋亡信号是通过与 Fas 配体或抗 Fas 抗体的结合实现的。虽然本实验对 Fas 表达与 HCC 的组织学类型、Edmondson 分级和 TNM 分期间无阳性发现, 但我们既往的研究对 HCC 组织中 p53 和 Fas 表达间的关系进行分析[6~8], 发现二者呈相反的表达变化, 即 p53 蛋白表达阳性组的 PI 明显较阴性组高, 而 AI 较阴性组低; Fas 蛋白表达阳性组的 AIPI 明显较阴性组低。可能与 p53 和 Fas 在 HCC 形成过程中的作用不同有关。Fas 低水平表达, 促细胞凋亡作用较弱, 突变型 p53 表达增加, 抑制凋亡作用增强, 最终都可导致肝细胞凋亡减少, 细胞数目异常增多, 继而形成肿瘤或肿瘤的恶性程度提高。

参考文献:

[1] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5381): 1305－1308.

[2] Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(49): 242－249.

[3] Beroud C, Soussi T. p53 gene mutation: software and database[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(1): 200－204.

[4] Li Y X, Lin Z B, Tan H R. Wild type p53 increased chemosensitivity of drug-resistant human hepatocellular carcinoma Bel7402/5-FU cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(1): 76－82.

[5] Mercer W E, Shields M T, Lin D, *et al*. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression[J]. Proc Nati Acad Sci U S A, 1991, 88(5): 1958－1962.

[6] Okano H, Shiraki K, Inoue H, *et al*. Fas stimulation activates NF-kappaB in SK-Hep1 hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2003, 10(5): 1145－1148.

[7] Egle A, Villunger A, Marschitz I, *et al*. Expression of Apo-1/Fas (CD95), Bcl-2, Bax and Bcl-x in myeloma cell lines: relationship between responsiveness to anti-Fas mab and p53 functional status[J]. Br J Haematol, 1997, 97(2): 418－428.

[8] 张艳玲, 梁后杰, 肖文华. 肝细胞癌细胞凋亡、增殖及其相关调控因子表达的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1287－1289.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net