DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.016
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1287-03

论著

肝细胞癌细胞凋亡、增殖及其相关调控因子表达的研究

张艳玲[1],梁后杰[1],肖文华[2] ([1]第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038;[2]解放军第304医院肿瘤科,北京 100037)

提 要:目的 探讨肝细胞癌中细胞凋亡、增殖及其相关调控因子表达特征与HCC分化状态的关系。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SP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(PCNA)及p53、Fas的表达特征,并结合临床资料进行分析。结果 凋亡细胞在HCC组织中呈散在分布,其凋亡细胞指数显著低于癌旁组织,而PCNA指数明显高于癌旁组织;在HCC Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级中,凋亡细胞指数分别为0.53,0.42,0.20,0.21。PCNA指数分别为0.06,0.41,0.63,0.80,均存在显著性差异;HCC组织的p53表达随Edmondson分级呈递增现象;而Fas均呈低水平表达。结论 HCC的分化程度与细胞凋亡指数呈正相关,而与PCNA指数呈负相关。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恶性程度较高,提示预后不佳。

关键词:细胞凋亡;增殖细胞核抗原;肝细胞癌;分化
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.7 文献标识码:A

Study on the expression of apoptosis, proliferation and the related regulation factors in hepatocellular carcinoma

ZHANG Yan-ling, LIANG Hou-jie, XIAO Wen-hua (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of apoptosis, proliferation and the related regulation factors in hepatocellular carcinoma (HCC). Methods Apoptosis, nuclear antigen of proliferating cells (PCNA), p53 and Fas protein were detected by labeling technique of *in situ* terminal deoxynucleotide transferase and immunohistochemical method in 35 HCC and tumor-adjacent specimens. Results The index of apoptotic cells scattered in HCC tissue was significantly lower than that in adjacent tissue. However, the index of PCNA was much higher in HCC than that in adjacent tissue. Importantly, the apoptotic index of stage Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ of HCC was 0.53, 0.42, 0.20, 0.21 and the index of PCNA was 0.06, 0.41, 0.63, 0.80, respectively. There was a marked statistical difference ($P<0.01$) both in the index of PCNA and apoptosis among the various stages. The p53 expression in HCC increased with Edmondson stages. However, the Fas expression was at low level. Conclusion Tumor differentiation is positively correlated to the apoptotic index but negatively to the index of PCNA in HCC. 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: apoptosis; proliferation cell nuclear antigen; hepatocellular carcinoma; differentiation

肿瘤形成包括起始、促进和进展三个阶段。无论在何阶段,肿瘤的生长速度由细胞增殖和丢失的比值所决定。细胞凋亡是细胞丢失的方式之一,细胞增生和凋亡之间的平衡失调对细胞癌变的引发、癌前细胞和癌细胞的生存、生长起着基本的作用。凋亡在肝细胞癌的生长过程中起着重要作用。对肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)组织中细胞凋亡和细胞增殖的研究有助于阐述二者在HCC发生发展中的作用。本研究利用TUNEL技术和免疫组化方法对HCC组织中细胞凋亡和细胞增殖现象及其相关调控因子Fas、p53进行研究,以探讨二者与HCC临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 标本

收集西南医院肝胆科1996—1999年手术切除并经病理诊断明确的HCC 35例,每例取癌及相应癌旁肝组织各一块,同时收集非肝病死亡的尸检组织作为正常对照。标本用10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,厚4μm连续切片,备用。HCC患者术前均未做过任何放疗或化疗。HCC组织根据Edmondson标准分级,其中Ⅰ级2例,Ⅱ级8例,Ⅲ级18例,Ⅳ级7例。35例HCC平均年龄46.5岁,男性23例,女性12例。

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SP免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

1.3 Fas、P53、PCNA(Proliferating cell nuclear antigen)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,苏木素复染,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。以胞浆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(×200),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。

作者简介:张艳玲(1966—),女,云南省昆明市人,硕士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的基础与临床方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)65459990

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-10-09

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

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；③20 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；⑥ DAB 显色，苏木素复染、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

2.1 HCC 组织中细胞凋亡和 PCNA 的形态及分布

凋亡细胞体积小，核染色质浓缩，经 TUNEL 技术标记阳性信号均为核型；PCNA 阳性细胞体积大、核大、可见核分裂象或病理性核分裂象，PCNA 染色阳性物位于胞核。在 HCC 组织中，凋亡细胞呈散在分布，见图 1；PCNA 阳性细胞呈弥漫片状或簇状分布，见图 2。

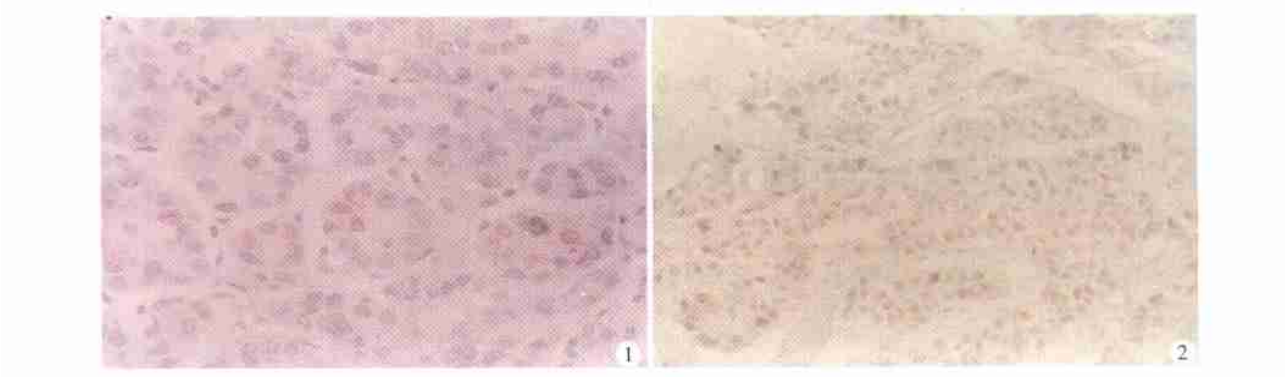


图 1 HCC 组织中，凋亡细胞呈散在核阳性 (TNULE ×200)

Fig 1 Apoptotic cells positively stained in the nuclei, were scattered in HCC tissue (TNULE ×200)

图 2 HCC 组织中，PCNA 阳性细胞呈弥漫性核阳性 (S-P ×200)

Fig 2 The cells with PCNA positive staining nuclei were diffused in the HCC tissue (S-P ×200)

2.2 HCC、癌旁肝组织中 AI 和 PCNA-LI 变化情况

HCC 的 AI 明显低于癌旁肝组织，但在癌旁肝组织中，PCNA-LI 显著低于 HCC ($P<0.01$)，见表 1；而在Ⅰ～Ⅳ级 HCC 中，AI 呈逐渐递减趋势 ($P<0.05$)。PCNA-LI 与 HCC 分化程度有关，分化愈低 PCNA-LI 愈高($P<0.01$)，见表 2。

2.3 HCC 组织中 P53 蛋白、Fas 蛋白的表达及与 PI、AI 之间的关系

HCC 组织中 P53 的表达率为 45.45%，明显高于癌旁组织 12.12%，且随 Edmondson 分级呈递增现象；而 HCC 组织中 Fas 蛋白的表达率为 18.18%，且定位于细胞浆内的 4 例均为 Edmondson Ⅲ、Ⅳ级，癌旁组织中 Fas 蛋白的表达率为 57.58%，且定位于细胞浆内或细胞膜上，阳性强度以(＋＋)为主，；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 AI 明显较阴性组高，见表 3。

表 1 HCC 和癌旁组织中 AI 和 PCNA-LI 比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of AI and PCNA-LI of HCC and adjacent tissue($\bar{x}\pm s$)

Group	n	AI	PCNA-LI
HCC tissues	35	0.2721±0.2083	0.5791±0.1965
Tumor-adjacent tissues	35	0.5679±0.2019 *	0.2186±0.2564 *

*：$P<0.01$ *vs* HCC tissues

表 2 各级 HCC 组织中 AI 和 PCNA-LI 比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of AI and PCNA-LI among various stages of HCC($\bar{x}\pm s$)

Grade	n	AI(ISD)	PCNA-LI(S-N-K)
Ⅰ	2	0.5300±0.2888	0.0550±0.07778
Ⅱ	8	0.4188±0.2437	0.4075±0.07960 *
Ⅲ	18	0.2011±0.1507 *	0.6267±0.06713 *
Ⅳ	7	0.2132±0.1685	0.8029±0.04071

*：$P<0.05$ *vs* Ⅳ

表 3 HCC 组织中 P53 蛋白、Fas 蛋白表达与 PI、AI 之间的关系

Tab 3 Correlation among P53 protein, Fas protein, PI, AI in 35 patients with HCC

Exponent	n	P53		Fas	
		Negative(20)	Positive (15)	Negative(29)	Positive (6)
PI	35	0.3168±0.1915	0.5721±0.1571 *	0.5962±0.2311	0.6118±0.2465
AI	35	0.5524±0.1432	0.3326±0.1813 *	0.1623±0.0954	0.3689±0.1845 *

*：$P<0.05$ *vs* negative

3 讨论

3.1 HCC 的细胞凋亡与增殖检测的意义

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。由于凋亡细胞小体只在凋亡过程的某个时相出现，而且持续时间短，很快被巨噬细胞或实质细

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

胞吞噬, 所以在光镜下, 很难区分正在凋亡的细胞。检测细胞凋亡的方法很多, 如流式细胞仪检测细胞凋亡、核酸电泳检测细胞凋亡等。原位凋亡检测是近年发展起来的细胞凋亡检测技术, 包括 DNA 聚合酶Ⅰ, Klenow 酶催化的原位末端标记技术和末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的 d-UTP 端口末端标记技术(TUNEL)。后者能对双链 DNA 断裂的平端进行末端标记, 这种反应不依赖模板, 从理论上讲, 它比依赖模板的缺口翻译技术敏感且反应的速度快, 有研究发现, 在凋亡的早期, 凋亡细胞优先被 TUNEL 标记, 而用 DNA 聚合酶Ⅰ缺口翻译技术对坏死细胞同样能够染色且强度无显著性差异。TUNEL 技术可在组织原位同时显示细胞凋亡的形态和分布, 这是其它技术所不及的[1]。本研究即采用 TUNEL 技术检测细胞凋亡。

PCNA 是存在于细胞核中能影响细胞增殖的一种蛋白质, 是 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白, 含 216 个氨基酸[2]。细胞核中的 PCNA 有两种形式: 一是可溶性的 PCNA, 可溶于如乙醇等有机溶剂而被洗脱; 一是不溶性的 PCNA, 不溶于有机溶剂。前者与 DNA 复制无关, 后者与 DNA 紧密结合, 是 DNA 复制所必需的。它的合成与细胞周期有关。G_1晚期开始增加, S 期达高峰, G_2期明显下降。因此, 它可作为细胞增殖的一个指标, 已证实可在多种实体癌、炎性增殖乃至正常增殖组织的细胞核中表达, 并被认为 PCNA 阳性率与肿瘤的分级、分期、疗效和预后有一定关系。

本研究发现, HCC 组织中凋亡细胞呈散在分布, 其指数明显低于癌旁组织, 且随癌细胞恶性度增高呈递减趋势; PCNA 阳性细胞指数则以 HCC 组织明显高于癌旁组织, 癌细胞分化愈低, 其指数愈高。结果说明 HCC 在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 中越高的 PCNA-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 与 PCNA-LI 和 AI 更为明确的相关性尚待进一步研究。

3.2　P53、Fas 在 HCC 组织中的表达及调控作用

凋亡相关基因大致分为二大类: 一类为凋亡抑制基因, 以 bcl-2 为主要代表。第二类为促凋亡基因, 有 bax、Fas 等。近年来研究发现 p53 基因不仅调节细胞的增殖和分化, 还参与细胞凋亡的调节过程, 野生型 P53 能促进细胞凋亡, 突变型 P53 抑制细胞凋亡。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而向肝癌转化[3-5]。本研究发现, HCC 组织中 P53 的表达率为 45.45%, 明显高于癌旁组织 12.12%, 且随 Edmondson 分级呈递增现象; 结果表明, 伴有 p53 基因高突变的肝癌组织其恶性程度较高, 诚如 Mercer 所述, p53 基因突变产生的突变型 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[6]。据报道, 肿瘤细胞的凋亡过程可分为 P53 依赖型与 P53 非依赖型[7~8], 如直肠癌肿瘤细胞的凋亡和增殖与 P53 无直接关联, 而肝癌肿瘤细胞的凋亡和增殖与 P53 有关。我们的结果提示, HCC 组织的瘤细胞凋亡为 P53 依赖型, 与报道相符。

Fas 抗原是一种触发凋亡的蛋白质。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。本实验发现, HCC 组织中 Fas 蛋白的表达率为 18.18%, 且定位于细胞浆内的 4 例均为 Edmondson Ⅲ、Ⅳ级, 癌旁组织中 Fas 蛋白的表达率为 57.58%, 且定位于细胞浆内或细胞膜上, 阳性强度以(++)为主。据报道[9~10], HCC 组织的凋亡进展不仅与 Fas 的表达有关而且与其位置有关, 当癌细胞分化水平低或生物学特性更为恶性时, 癌细胞表面的 Fas 表达较差, 凋亡发生的频率低, 即低分化或恶性的癌细胞能逃避 Fas 介导的凋亡。Yono 等[10]也发现抗 Fas 诱导的凋亡的敏感性与细胞表面 Fas 有关, 而与胞浆内 Fas 表达无关。

我们对 HCC 组织中 P53 和 Fas 表达的关系进行分析, 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 AI 明显较阴性组高($P<0.05$)。这可能与 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] 李　江, 王文亮, 王文勇, 等. TUNEL 技术原位观察肝细胞凋亡[J]. 华人消化杂志, 1998; 6(6): 491－494

[2] Pizem J, Marolt V F, Luzar B, *et al*. Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non-neoplastic liver tissue[J]. Pflugers Arch, 2001, 442 (6 supply 1): 174－176.

[3] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: Signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5 381): 1 305－1 308.

[4] Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspases: enemies within[J]. Science, 1998, 281(5 381): 1 312－1 316.

[5] Beroud C, Soussi T. P53 gene mutation: software and database[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(1): 200－204.

[6] 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 USA, 1991, 88(5): 1 958－1 962

[7] Kim Y H, Lee J H, Chun H, *et al*. Apoptosis and its correlation with proliferative activity in rectal cancer[J]. J Surg Oncol, 2002, 79(4): 236－242.

[8] Lera J, Lara P C, Perez S, *et al*. Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinomas: relation to the results of radiotherapy[J]. Cancer, 1998, 83(10): 2 493－2 501.

[9] Fukuzawa Y, Takahashi K, Furuta K, *et al*. Expression of Fas/Fas ligand (FasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. J. Gastroenterol, 2001, 36(9): 681－688.

[10] Yano H, Fukuda K, Haramaki M, *et al*. Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinomas cell lines[J]. J Hepatology, 1996, 25(4): 454－464.

（编辑　张　宁）

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