

探讨 Fas/FasL 的表达与大肠癌发展及转移的关系

黄文生¹, 彭 慧², 谭进富¹, 谭 敏¹

(1. 中山大学附属第一医院微创外科, 广东 广州 510080;

2. 中山大学附属第六医院胃肠外科, 广东 广州 510655)

摘 要: 【目的】探讨 Fas/FasL 在大肠癌组织细胞的表达以及它们与肿瘤的发展及转移的关系。【方法】应用免疫组化(SABC)法对 41 例(包括各个不同 Dukes 分期)的大肠癌组织以及正常大肠组织的 Fas/FasL 进行检测。【结果】大肠癌组织 Fas 阳性率为 48.8%, 低于正常大肠黏膜组织的 Fas 阳性率 92.7% ($P < 0.01$)。大肠癌组织 FasL 阳性率为 53.7%, 高于正常大肠黏膜组织的 FasL 阳性率 4.9% ($P < 0.01$)。在不同分期的大肠癌组织中, Fas 阳性率分别为: A 期 87.5%, B 期 66.7%, C 期 25.0%, D 期 21.2%。而 FasL 阳性率分别为: A 期 25.0%, B 期 33.3%, C 期 66.7%, D 期 88.8%。随着 Dukes 分期的递升, Fas 阳性率呈递减趋势, 而 FasL 阳性率呈递升趋势。【结论】在大肠癌组织中, Fas 表达下调, 以及 FasL 表达上调, 肿瘤细胞凋亡减少, 这有利于肿瘤细胞的增殖。Fas/FasL 在大肠癌的发生、发展和转移中起着重要的作用, 为大肠癌的基因治疗提供了新思路。

关键词: 结直肠肿瘤; 细胞凋亡; Fas; FasL

中图分类号: R735.35

文献标识符: A

文章编号: 1672-3554(2008)01-0034-04

Expression of Fas/FasL in Colorectal Carcinoma and Their Associations with Development and Metastasis of Colorectal Carcinoma

HUANG Wen-sheng¹, PENG Hui², TAN Jin-fu¹, Tan Ming¹

(1. Department of Minimal Invasive Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Gsurgery, The Sixth Appiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: 【Objective】To study the expression of Fas/FasL in colorectal carcinoma and their associations with the development and metastasis of colorectal carcinoma. 【Method】By using the immunohistochemical methods (SABC), we analyzed 41 cases of colorectal carcinoma, which included different Dukes stage cases, and 20 cases of normal colorectal tissues. We detected the expression rates of Fas/FasL in those cases. 【Result】The expression rates of Fas in the colorectal carcinoma was 48.8%, which was significantly lower than the rate of 92.7% in the normal colorectal tissues ($P < 0.01$). The expression rates of FasL in the colorectal carcinoma was 53.7%, which was significantly higher than the rate of 4.9% in the normal colorectal tissues ($P < 0.01$). In the different Duke stages, the rates of Fas (+) were: A=87.5%, B=66.7%, C=25.0%, D=21.2%. The rates of FasL (+) were: A=25.0%, B=33.3%, C=66.7%, D=88.8%. The expression rates of Fas and FasL were closely related to the Dukes stage. The higher the tumor stage was, the lower expression rates of Fas were, and the higher the expression rates of FasL were. 【Conclusion】The increased expression of FasL and the decreased expression of Fas both played important roles in the development and metastasis of colorectal carcinoma. These may serve as new approaches for us to do some genetic therapy in metastasis of colorectal carcinoma.

Key words: colorectal carcinoma; apoptosis; Fas; FasL

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(1):34-37]

收稿日期: 2007-09-25

基金项目: 广东省自然科学基金(C03031906); 广东省科技计划项目(2007B030702012)

作者简介: 黄文生(1973-), 男, 广东海丰人, 博士研究生, 主治医师, E-mail: hwsh2001@tom.com; 谭敏, 通讯作者, 教授, 博士生导师, Tel: 87755766-8720

Fas又称 APO-1,现命名为 CD95, Fas 的天然配体是 FasL(Fas Ligand)。Fas 发现于 1989 年,是两个研究组同一年在各自的实验室的独立发现的。而 Fas 的天然配体 FasL 是利用亲和层析技术从鼠细胞毒性 T 淋巴细胞中纯化发现的。Fas 是细胞凋亡的信号分子,表达 Fas 的细胞在与 Fas 抗体或自然存在的 FasL 结合形成三聚体后,可活化并传导凋亡信号,触发 Fas 所在靶细胞数小时内凋亡^[1,2]。为了探讨 Fas/FasL 在大肠癌组织细胞的表达以及它们与大肠癌的发展、转移的关系。我们用免疫组化法检测了 41 例的大肠癌(包括各个不同的 Dukes 分期)和正常大肠组织中 Fas 和 FasL 的表达,了解 Fas 与 FasL 在大肠癌发展及转移中的免疫逃逸及反击的重要作用。

1 材料与方 法

1.1 标本与临床资料

选取我校病理教研室于 2000 年~2005 年期间,已经病理证实为大肠癌的手术标本,术前均未接受化疗、放疗或免疫治疗。癌标本按 Dukes 分期再进行细分。每例标本同时切取正常的大肠组织作对照。41 例患者中,男性 23 例,女性 18 例,年龄 29~86 岁,平均 56.3 岁。肿瘤位于升结肠 10 例,横结肠 8 例,降结肠 5 例,乙状结肠 15 例,直肠 3 例。按 Dukes 分期,A 期 8 例,B 期 12 例,C 期 12 例,D 期 9 例。41 例的正常大肠组织分别取自以上病例的切除标本的正常肠段。

1.2 免疫组化试剂及染色方法

1.2.1 试 剂 兔抗人 Fas、FasL 的多克隆抗体、SP 试剂盒以及 DAB 显色试剂盒均购至北京中山公司。

1.2.2 免疫组化染色方法 依照产品说明书介绍的方法进行:载玻片防脱片剂处理,使切片紧密黏附,切片脱蜡至水;30% H_2O_2 1 份+蒸馏水 10 份混和,室温 5~10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次;滴加山羊血清封闭液,室温 20 min。甩去多余的液体,不洗。滴加兔抗 FAS 抗体,37℃,1~2 h,或 4℃过夜。PBS(pH7.2~7.6)洗 2 min,共 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37℃ 20 min,PBS(pH7.2~7.6)洗 2 min,共 3 次;滴加试剂 SABC,20~37℃ 20 min,PBS(pH7.2~7.6)洗 5 min,共 4 次;DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒(AR1022)。取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A,B,C 试剂各 1 滴,

混匀后加至切片,室温显色,镜下控制反应时间,一般 5~30 min,蒸馏水洗涤;苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。FasL 的也按照产品说明书介绍的方法进行,基本步骤同上。

1.2.3 结果的判断 Fas、FasL 蛋白表达以细胞膜和(或)细胞浆着色显棕黄色为阳性细胞。根据切片内随机抽取 20 个高倍视野计数平均阳性细胞数,阳性细胞>75%以上者认定为阳性病例。用所购阳性对照片作为阳性对照。用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 统计学方法

使用运用 SPSS 10.0 软件进行统计处理。率的比较采用 χ^2 检验,检验水准取 $\alpha=0.01$ 。

2 结 果

2.1 正常大肠黏膜及癌组织中 Fas/FasL 的表达

在正常大肠黏膜组织中,Fas 呈 92.7%(38/41)的阳性表达,而且是弥漫性的表达,在胞膜与胞浆均可以见到棕黄色颗粒。而在大肠癌组织中 Fas 的阳性表达率为 48.8%(20/41;图 1)。经过统计 χ^2 检验统计分析,正常大肠黏膜组织与大肠癌组织的 Fas 阳性表达率之间存在统计学意义的显著性差别($\chi^2=6.04, P < 0.01$)。在正常大肠黏膜组织中 FasL 的阳性率为 4.9%(2/41),大肠癌组织的 FasL 阳性率 53.7%(22/41)。经过 χ^2 检验分析,正常大肠黏膜组织与大肠癌组织的 FasL 阳性表达率之间存在统计学意义的显著性差别($\chi^2=8.31, P < 0.01$)。

2.2 不同 Dukes 分期的大肠癌组织的 Fas/FasL 的表达

根据 Dukes 分期,由下表可知,不同分期的大肠癌的 Fas 阳性率分别为:A 期 87.5%(7/8),B 期 66.7%(8/12),C 期 25.0%(3/12),D 期 21.2%(2/9)。经过 χ^2 检验分析,可以知道 A 期、B 期、C 期、D 期的 Fas 阳性率之间存在着统计学意义的显著性差别($P < 0.01$)。但是两组间比较发现 C 期与 D 期之间不存在统计学意义的显著性差别($P > 0.05$)。并且从数据可以看出,随着 Dukes 分期的递升,Fas 阳性率呈递减的趋势。C 期、D 期的 Fas 阳性率比 A 期、B 期的 Fas 阳性率明显降低。至于 FasL 的阳性率,不同分期的大肠癌的 FasL 阳性率分别为:A 期 25%(2/8),B 期 33.3%(4/12),C 期

66.7%(8/12),D 期 88.8%(8/9)。经过 χ^2 检验分析,可以知道 A 期、B 期、C 期、D 期的 FasL 阳性率之间存在着统计学意义的显著性差别($P < 0.01$)。

随着 Dukes 分期的递升,FasL 阳性率呈递升的趋势。C 期、D 期的 FasL 阳性率比 A 期、B 期的 FasL 阳性率明显高。

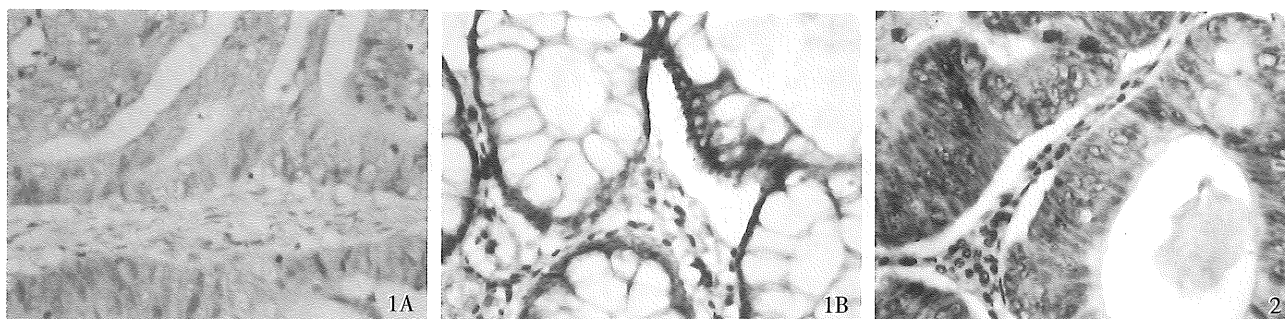


图 1 大肠癌组织(A)与正常大肠黏膜组织(B)表达 Fas 的免疫组化图

图 2 大肠癌组织表达 FasL 的免疫组化图

Fig.1 Immunohistochemical expression of Fas in the colorectal carcinoma and the normal membrane tissue

A:Fas in the colorectal carcinoma; $\times 100$; B:Fas in the normal membrane tissue; $\times 200$

Fig.2 Immunohistochemical expression of FasL in the colorectal carcinoma ($\times 400$)

3 讨 论

细胞程序性死亡也就是细胞凋亡,它是一种生理性细胞自杀现象。通过细胞凋亡,机体就能够维持细胞正常数量,并且在组织和器官中的生长与死亡之间的保持一种动态平衡。凋亡与细胞增殖是保持机体相对稳定的对立统一体,它们共同决定组织器官的增生与退化。细胞基因调控异常,使细胞过度增殖或凋亡减弱是肿瘤的重要发生机制^[2]。Fas 是调控细胞凋亡的一个重要基因。Fas/FasL 系统在肿瘤的发生、发展、转移中扮演着重要的角色。Fas 是一种细胞膜 I 型糖蛋白,分子量为 48KD,属于肿瘤坏死因子受体家族(TNFR)及神经生长因子受体家族(NGFR)。它由 325 个氨基酸组成,具有信号功能。Fas 抗原在结构上分为细胞外区、穿膜区和胞浆区,其中在胞浆区存在信号传递和信号抑制区,其中有一段是死亡域,可以传导凋亡信号。Fas 主要以膜受体的形式存在,也可通过在转录水平的不同拼接产生可溶性分子,它可能在凋亡中起调节作用^[3,4]。Fas 配体(FasL, FasLigand)为细胞膜 II 型糖蛋白,分子量约为 40 KD,由 281 个氨基酸组成,与 TNF 家族成员有着显著同源性,但无信号序列。FasL 蛋白为 Fas 的体内天然配体^[5,6]。FasL 与 Fas 结合使细胞表面 Fas 分子交联,几小时内就可以引起表达 Fas 的细胞凋亡,所以

FasL 又称死亡因子。Fas 与 FasL 结合后,Fas 相关死亡区蛋白(FADD)激活 Caspase8,组成死亡诱导信号复合物(DISC),再激活一系列的 Caspase1、3、7 等级联反应促使 Fas 蛋白所在细胞的凋亡发生^[7,8]。在非淋巴系统的恶性肿瘤中的许多细胞中的细胞有广泛的 Fas 表。FasL 主要表达在活化细胞和 NK 细胞,但在很多恶性度很高的癌细胞中,如结直肠癌、黑色素瘤、肝癌等^[9],也有大量的 FasL 表达,有些同时还伴有 Fas 表达,这可能是这些肿瘤细胞用来杀伤免疫细胞,逃避免疫攻击的一个机制。因此探讨 Fas 和 FasL 在大肠癌组织细胞的表达以及它们与肿瘤的发展、转移的关系,对于更好地防治大肠癌有着深刻的意义。

在本实验中,大肠癌组织与正常大肠黏膜组织的 Fas 和 FasL 的阳性表达率均存在统计学意义的显著性差别。由表 1 可见,正常的大肠黏膜组织的 Fas 表达率达 92.7%,FasL 的表达率约 4.9%,而在大肠癌组织 Fas 表达明显下调,仅 48.8%,但是 FasL 表达率却达到 53.7%。这两组的 Fas 和 FasL 均存在显著差异。在大肠癌组织中,Fas 表达下调,意味着大肠癌细胞通过 Fas 途径介导的细胞凋亡数量减少,有利于肿瘤细胞的增殖。从表 2 可见,而且 Fas 表达与分期密切相关。随着 Dukes 分期的递升,Fas 阳性率呈递减的趋势。由这可以提示 Fas 在肿瘤组织的发生发展中起着重要的作用。肿瘤细胞 Fas 的低表达,表明细胞的凋亡减

少,同时也就意味着有利于肿瘤细胞的增殖。同时大肠黏膜上皮细胞在癌变过程中通过上调其自身 FasL 的表达,可以诱导那些表达 Fas 的淋巴细胞(特别是肿瘤周围的浸润淋巴细胞)的凋亡,达到肿瘤浸润、免疫逃逸,从而促进了肿瘤细胞的发展、转移。从表 2 中可见,在本实验中,A 期、B 期与 C 期、D 期的 FasL 阳性率之间存在着统计学意义的显著性差别。C 期 D 期的 FasL 阳性率比 A 期 B 期的 FasL 阳性率明显高。根据 Dukes 分期,C、D 期是有淋巴结转移甚至有远处脏器(如肝脏等)或腹腔广泛转移的。这也一定程度上揭示了 FasL 是肿瘤细胞逃避免疫监视和免疫清除,从而浸润或转移到其他脏器的一种重要工具。既然在大肠癌组织中,同时存在着 Fas 和 FasL,那么它们自身的 Fas 和自身的 FasL 会不会相互结合,而发生自身的细胞凋亡呢?答案是否定的。这是因为肿瘤细胞具有抵抗自身 Fas 介导凋亡的多种机制^[4]:Fas 跨膜蛋白受体的功能缺损,凋亡传导信号的障碍,多种抑制凋亡分子的存在等。另外还有 Fas 信号受体近端和信号传导途径的缺陷、癌基因和抑癌基因的突变、Fas 相关磷酸酶 1 (FAP1) 的增多、Caspase8 抑制蛋白(FLIP)等的参与作用^[8],所有的这些因素都可以防止肿瘤细胞诱导自身凋亡。

鉴于 Fas/FasL 系统在肿瘤的发生、发展、转移起着重要的作用。我们认为采用合适的载体,通过转基因等方法,诱导癌细胞表达高浓度的 Fas 蛋白^[10],或联合其他的促进癌细胞凋亡或死亡的手段,比如共转染 AG、CD、TK 基因等等^[11],或采取合适的方法封闭癌细胞自身的 FasL 基因,使癌细胞低表达 FasL 蛋白,或者在肿瘤生长处注射高浓度的高特异性的 FasL 单克隆抗体等等方法,将有可能成为治疗肿瘤的有效手段。

参考文献:

- [1] Zidar N, Dolenc-Strazar Z, Jeruc J, et al. Immunohistochemical expression of activated Caspase-3 in human myocardial infarction [J]. Virchows Arch, 2006,448(1):75-79.
- [2] Scholz M, Cinatl J. Fas/FasL interaction: a novel immune therapy approach with immobilized biologicals [J]. Med Res Rev, 2005,25(2):331-342.
- [3] 毕蔓茹,杨宝山,马英骥,等. 复方甘草酸苷对小鼠暴发性肝衰 Fas/FasL 介导的肝细胞凋亡的保护作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2005,13(1):26-30.
- [4] Thorburn J, Moore F, Rao A, et al. Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(9):1189-1199.
- [5] Zhu Q, Liu JY, Qin T, et al. Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system [J]. World J Gastroenterol, 2005,11 (39):6125-6129.
- [6] Abrams SL. Positive and negative consequences of Fas/Fas ligand interactions in the antitumor response [J]. Front Biosci, 2005,10(4):809-21.
- [7] Kamei T, Inui M, Pierik M, et al. Experimental therapy using interferon gamma and anti-Fas antibody against oral malignant melanoma cells [J]. Melanoma Res, 2005,15(5):393-400.
- [8] Nomura J, Matsumoto K, Iguchi-Ariga SM, et al. Mitochondria-independent induction of Fas mediated apoptosis by MSSP [J]. Oncol Rep, 2005,14(7):1305-1309.
- [9] 刘琦,马桂璋,马佩琦,等. γ 干扰素对 Bel-7402 细胞株 Fas/FasL 表达的调节作用 [J]. 热带医学杂志, 2004,4(6):674-677.
- [10] 侯劲松,黄洪章,王建广,等. C-Myc/Fas 基因转染对 人类癌细胞移植瘤的影响 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006,27(1):72-75.
- [11] 王天宝,汪建平,董文广,等. CEA 启动子启动双自杀基因与单自杀基因对 LOVO 细胞杀伤作用的比较 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2005,26(3):308-311.

(编辑 徐杰)