

大肠癌、大肠腺瘤组织中Caspase3、P53及Ki-67表达的变化

毕大明, 董艳玲, 吴金朋, 王雪宁, 胡二斌, 郑建国, 刘娜娜

背景资料
在我国, 大肠癌发病率达到消化系统肿瘤的第2位。其发生发展过程与细胞的恶性转变及过度增殖有关, 也受细胞凋亡的减少影响。其中Caspase3是一种细胞凋亡的关键蛋白酶, 一旦Caspase3失活或者活性抑制, 细胞凋亡发生障碍, 并且发生不可逆性凋亡。*p53*基因在防止细胞增生以及保持DNA受损基因组的完整性都有重要地位。

毕大明, 董艳玲, 吴金朋, 王雪宁, 胡二斌, 郑建国, 刘娜娜, 廊坊市第四人民医院病理室 河北省廊坊市 065700
毕大明, 主治医师, 主要从事病理学的研究。
作者贡献分布: 本研究设计、操作由毕大明完成; 董艳玲材料收集; 吴金朋、王雪宁、胡二斌、郑建国及刘娜娜参与完成。
通讯作者: 毕大明, 主治医师, 065700, 河北省廊坊市金康道1128号, 廊坊市第四人民医院病理室. bidaming123@163.com
电话: 0316-7238497
收稿日期: 2015-01-04 修回日期: 2015-01-07
接受日期: 2015-01-15 在线出版日期: 2015-01-28

Expression of Caspase3, P53 and Ki-67 in colon cancer and colon adenoma

Da-Ming Bi, Yan-Ling Dong, Jin-Peng Wu, Xue-Ning Wang, Er-Bin Hu, Jian-Guo Zheng, Na-Na Liu

Da-Ming Bi, Yan-Ling Dong, Jin-Peng Wu, Xue-Ning Wang, Er-Bin Hu, Jian-Guo Zheng, Na-Na Liu, Department of Pathology, Langfang Fourth People's Hospital, Langfang 065700, Hebei Province, China
Correspondence to: Ba-Ming Bi, Attending Physician, Department of Pathology, Langfang Fourth People's Hospital, 1128 Jinkang Road, Langfang 065700, Hebei Province, China. bidaming123@163.com
Received: 2015-01-04 Revised: 2015-01-07
Accepted: 2015-01-15 Published online: 2015-01-28

Abstract

AIM: To explore the expression of Caspase3, P53 and Ki-67 in colon cancer and colon adenoma.

METHODS: The expression of Caspase3, P53 and Ki-67 in 100 colon cancer tissues and 100 colon adenoma tissues was detected by immunohistochemistry. Correlations between Caspase3, P53 and Ki-67 expression and between their expression and clinicopathological parameters were investigated using Spearman correlation analysis.

RESULTS: The expression of Caspase3, P53 and Ki-67 had no significant correlation with age, sex, tumor differentiation or infiltration ($P > 0.05$). The positive expression rates of

Caspase3, P53 and Ki-67 differed significantly between the lymph node metastasis group (18.18%, 31.82%, and 90.91%, respectively) and non-lymph node metastasis group (52.56%, 89.74%, and 61.54%, respectively) and between Duke's stage A-B (52.56%, 89.74%, and 61.54%, respectively) and C-D (18.18%, 31.82%, and 90.91%, respectively) ($P < 0.05$). The positive expression rates of Caspase3, P53 and Ki-67 were 45.00%, 77.00% and 68.00%, respectively, in colon cancer tissues and 83.00%, 49.00% and 26.00%, respectively, in adenoma tissues ($P < 0.01$). The expression of P53 was positively correlated with that of Caspase3 ($r = 0.315$, $P < 0.01$), but negatively correlated with that of Ki-67 ($r = -0.302$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Caspase3, P53 and Ki-67 are all involved in the development and progression of colon cancer, and combined detection of their expression can help determine the invasion, metastasis and prognosis of this malignancy.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Caspase3; Immunohistochemistry; P53; Ki-67; Colon cancer; Colon adenoma

Bi DM, Dong YL, Wu JP, Wang XN, Hu EB, Zheng JG, Liu NN. Expression of Caspase3, P53 and Ki-67 in colon cancer and colon adenoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(3): 510-514 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/510.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i3.510>

摘要

目的: 探讨Caspase3在大肠癌中的表达及其与P53及Ki-67的相关性。

方法: 收集大肠癌、腺瘤组织标本各100例, 免疫组织化学SP染色方法检测Caspase3、P53与Ki-67的阳性表达。相关性采用Spearman相关性分析。

同行评议者
陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

结果: Caspase3、P53和Ki-67的表达在不同年龄、性别、分化程度、浸润程度方面的大肠癌组织中差异没有统计学意义($P>0.05$), 但是其阳性表达率在淋巴结转移组(18.18%、31.82%、90.91%)与无淋巴结转移组(52.56%、89.74%、61.54%), Duke's分期中A-B期(52.56%、89.74%、61.54%)和C-D期(18.18%、31.82%、90.91%)中均存在明显差异($P<0.05$). 大肠癌组织中Caspase3、P53以及Ki-67阳性率分别为45.00%、77.00%、68.00%, 大肠腺瘤组织中Caspase3、P53以及Ki-67阳性率分别为83.00%、49.00%、26.00%, 差异均具有统计学意义($P<0.05$).

结论: Caspase3、P53与Ki-67均参与了大肠癌的发展过程, 共同作用于大肠癌细胞, 有助于判断其侵袭能力、转移和预后情况.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: Caspase3; 免疫组织化学; P53; Ki-67; 大肠癌; 大肠腺瘤

核心提示: 本研究中采用免疫组织化学方法检测人大肠腺瘤中Caspase3、P53和Ki-67的阳性表达水平, 及在不同临床病理分期中的表达情况, 探讨其在大肠腺瘤及大肠癌发生和发展过程中的变化及作用. 以期为临床治疗及预后的评价提供可靠地参考依据.

毕大明, 董艳玲, 吴金朋, 王雪宁, 胡二斌, 郑建国, 刘娜娜. 大肠癌、大肠腺瘤组织中Caspase3、P53及Ki-67表达的变化. 世界华人消化杂志 2015; 23(3): 510-514 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/510.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i3.510>

0 引言

在我国, 大肠癌发病率达到消化系肿瘤的第2位. 其发生发展过程与细胞的恶性转变及过度增殖有关系, 也受细胞凋亡的减少影响. Caspase3是一种细胞凋亡的关键蛋白酶, 一旦Caspase3失活或者活性抑制, 细胞凋亡发生障碍, 并且发生不可逆性凋亡^[1]. Ki-67是一种增殖细胞核抗原, 在细胞的有丝分裂过程中有重要作用, 被认为是灵敏、特异的增殖期细胞标志物之一^[2]. 本研究中, 我们采用免疫组织化学方法检测人大肠腺瘤、大肠癌组织中Caspase3、P53和Ki-67的阳性表达水平, 探讨其在大肠腺瘤及大肠癌发生

和发展过程中的变化及作用.

1 材料和方法

1.1 材料 选取廊坊市第四人民医院2012-04/2014-04经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋的大肠癌、大肠腺瘤标本各100例. 大肠癌患者中男48例, 女52例, 年龄25-81岁, 平均年龄60.63岁±19.74岁. 大肠腺瘤患者中男女均50例, 年龄25-83岁, 平均年龄64.33岁±17.31岁. 两组病例无术前放疗或化疗情况, 选择标本时大肠腺瘤标本以绒毛状腺瘤为主, 大肠癌标本选择无坏死, 肿瘤细胞较多的组织. 对大肠癌、腺瘤病例一般资料进行统计, 所选病例的性别、平均年龄差异均无统计学意义($P>0.05$)(表1). 实验所用的Caspase3、P53和Ki-67抗体均购于北京中杉金桥生物技术有限公司, SA1022-SABC试剂盒购自于博士德生物, 按照试剂说明书进行各步操作, 分别用PBS、已知阳性组织切片作阴性对照、阳性对照.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学SP染色方法检测: 从每个蜡块标本中作4 μm厚连续切片, 脱蜡脱水, PBS洗5 min×2-3次; 在3% 过氧化氢-80%甲醇中37 °C浸泡10 min以灭活内源性过氧化氢酶, PBS冲洗; 采用枸橼酸-微波-SP法在10 mmol/L枸橼酸(pH 6.0)中(95 °C, 10 min), PBS冲洗; 室温10%羊血清封闭20 min; 加一抗Caspase3、P53和Ki-67各50 μL, 4 °C过夜; 37 °C复温45 min, PBS冲洗; 滴加二抗40-50 μL, 37 °C孵育1 h(可加入0.05%的Tween-20), PBS冲洗; 滴加SP溶液37 °C孵育20 min; DAB显色5-10 min, PBS冲洗; 苏木精复染2 min, 分化, 自来水洗10-15 min; 脱水、透明、封片、镜检. 对照切片同上, 阴性对照用PBS代替一抗孵育.

1.2.2 结果判断: 两位主治医师通过双盲方式判读. 以黄色、棕黄色、棕褐色为阳性标准, 排除非特异性染色. 与背景着色对比进行染色强度观察, 以切片中细胞染色的深浅程度评分, 3分、2分、1分、0分分别为棕褐色、棕黄色、浅黄色、无着色. 按切片中阳性细胞数比例评分: 随机观察5个高倍视野, 每个视野中有100个细胞, 计分4分、3分、2分、1分、0分, 分别为显色细胞数占75%-100%、50%-74%、25%-49%、5%-24%、0%-4%. 将两种评分相加为最终结果并将其分为: 4-7分为阳性, 0-3分

研究前沿
p53基因可以调节细胞的正常生长过程, 显著抑制细胞的转化增殖. 一旦p53基因缺失或发生突变则变为突变型mt p53, 这种基因会诱发多种癌变.

相关报道

Ki-67是一种增殖细胞核抗原,在细胞的有丝分裂过程中有重要作用,被认为是灵敏、特异的增殖期细胞标志物之一。

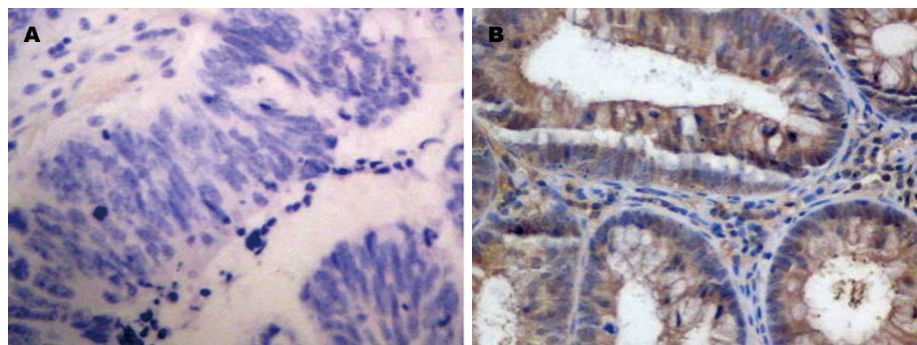


图1 Caspase3在大肠癌、腺瘤中的表达($\times 400$). A: 大肠癌; B: 大肠腺瘤.

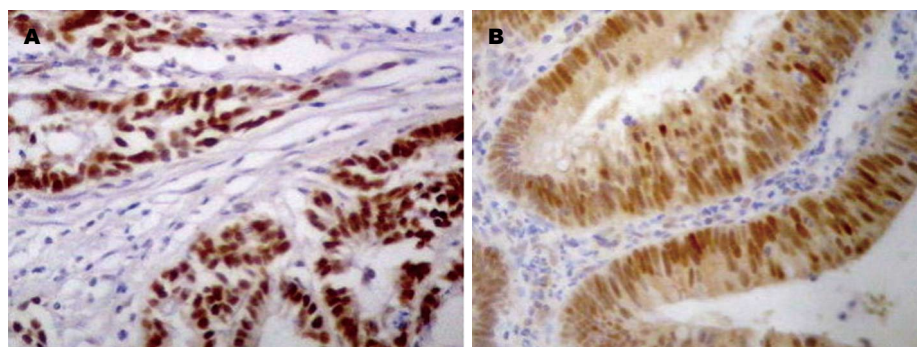


图2 P53在大肠癌、腺瘤中的表达($\times 400$). A: 大肠癌; B: 大肠腺瘤.

表1 Caspase3、P53和Ki-67在大肠癌、腺瘤中的表达 [$n = 100, n(\%)$]

分组	Caspase3		P53		Ki-67	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
大肠癌	55(55.00)	45(45.00)	23(23.00)	77(77.00)	32(32.00)	68(68.00)
大肠腺瘤	17(17.00)	83(83.00)	51(51.00)	49(49.00)	74(26.00)	26(26.00)
χ^2 值	31.337		16.817		35.408	
P 值	<0.001		<0.001		<0.001	

为阴性。

统计学处理 用SPSS13.0软件对数据进行处理,采用 χ^2 检验分析大肠癌与大肠腺瘤两组中Caspase3、P53及Ki-67的组间差异,3种分子阳性表达的相关性采用Spearman相关性分析。组间年龄比较采用两独立样本 t 检验,结果以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌及腺瘤组织中Caspase3、P53及Ki-67的表达 阳性细胞呈黄色、棕黄色、棕褐色,阳性表达率越高的细胞颜色越深(图1-3)。大肠癌组织中Caspase3阳性率低于腺瘤组织, P53、Ki-67阳性率高于腺瘤组织且具有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 Caspase3、P53及Ki-67在不同类型的大肠癌组织中的表达情况 在年龄、性别、分化程度、浸润程度等类型的大肠癌组织中, Caspase3、P53和 Ki-67的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。淋巴结转移和淋巴结分期不同患者的Caspase3、P53、Ki-67表达情况差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

2.3 大肠癌组织中Caspase3与P53、Ki-67蛋白表达的相关性 在Caspase3表达阳性的45例大肠癌组织中,有12例P53表达阳性者(26.67%);在Caspase3表达阴性的55例大肠癌组织中,有21例P53表达阳性者(38.18%);Spearman等级相关分析, Caspase3表达与P53表达呈正相关($r = 0.315, P < 0.05$)。在Caspase3表达阳性的45例大肠癌组织中,有19例Ki-67表达阳性者(42.22%);在

表 2 大肠癌组织中Caspase3、P53及Ki-67的表达

项目	n	Caspase3				P53				Ki-67			
		阳性	阳性率(%)	χ^2 值	P值	阳性	阳性率(%)	χ^2 值	P值	阳性	阳性率(%)	χ^2 值	P值
年龄(岁)				0.070	0.792			0.003	0.958			0.108	0.742
60	43	20	46.51			33	76.74			30	69.77		
<60	57	25	43.86			44	77.19			38	66.67		
性别				0.040	0.841			0.057	0.813			0.184	0.668
男	50	23	46.00			39	78.00			35	70.00		
女	50	22	44.00			38	76.00			33	66.00		
分化程度				0.001	0.974			0.127	0.721			0.127	0.722
高中分化	89	40	44.94			69	77.53			60	67.42		
低分化	11	5	45.45			8	72.73			8	72.73		
浸润程度				0.112	0.738			0.402	0.526			0.461	0.497
侵及外膜	36	17	47.22			29	80.56			26	72.22		
未侵及外膜	64	28	43.75			48	75.00			42	65.63		
临床分期				8.196	0.004			32.512	<0.001			6.803	0.009
A-B	78	41	52.56			70	89.74			48	61.54		
C-D	22	4	18.18			7	31.82			20	90.91		
淋巴结转移				8.196	0.004			32.512	<0.001			6.803	0.009
有	22	4	18.18			7	31.82			20	90.91		
无	78	41	52.56			70	89.74			48	61.54		

同行评价
本文有一定的可
读性.

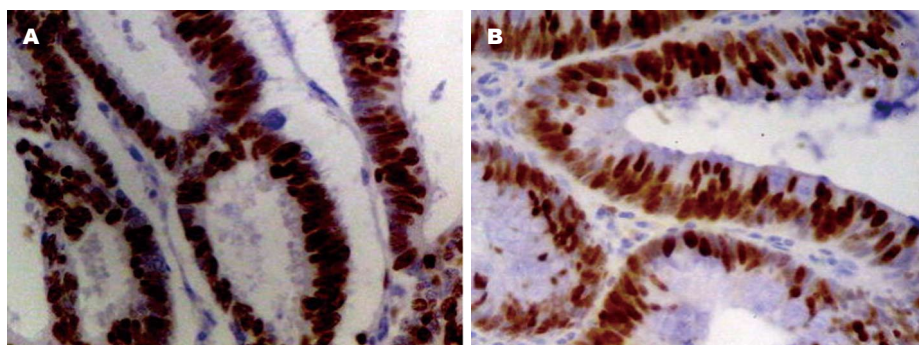


图 3 Ki-67在大肠癌、腺瘤中的表达($\times 400$). A: 大肠癌; B: 大肠腺瘤.

Caspase3表达阴性的55例大肠癌组织中, 有20例Ki-67表达阳性者(36.36%); 经Spearman等级相关分析, Caspase3表达与Ki-67表达呈负相关($r = -0.302, P < 0.05$).

3 讨论

Caspase全称为半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶, 在真核细胞凋亡中有很重要的作用^[3,4]. Caspase3是该家族中最重要的细胞凋亡执行者之一, 合成后的Caspase3一般以无活性的酶原形式存在于细胞中, 受到多种凋亡信号刺激后激活, 进而降解多种蛋白底物, 在细胞凋亡中发挥作用^[5]. *p53*基因存在于人类染色体17p13.1上, 可以编码分子量为53 kb的核内磷酸化蛋白^[6]. 该基因在防

止细胞增生以及保持DNA受损基因组的完整性都有重要地位^[7-10]. 野生型wt *p53*为正常的*p53*基因, 可以调节细胞的正常生长过程, 显著抑制细胞的转化增殖. 一旦*p53*基因缺失或发生突变则变为突变型mt *p53*, 这种基因会诱发多种癌变. Ki-67是细胞G₁、S、M、G₂期出现的核抗原, 其表达的高低反映了细胞增殖指数^[11]. Ki-67抗原可以反映细胞的增殖活性, 与肿瘤的发生发展以及转移有密切关系^[12].

本研究结果表明, Caspase3、P53和Ki-67的表达在不同类型大肠癌组织中, 包括年龄、性别、分化程度、浸润程度方面差异没有统计学意义($P > 0.05$), 但是其阳性表达率在淋巴结转移组(18.18%、31.82%、90.91%)与无淋

巴结转移组(52.56%、89.74%、61.54%), 临床A-B期(52.56%、89.74%、61.54%)和临床C-D期(18.18%、31.82%、90.91%)中均存在明显差异($P<0.05$), 提示Caspase3、P53以及Ki-67可能在大肠癌的发生、发展、转移中发挥了一定作用, 与大肠癌发展及预后有关, 这与国内外同行的研究结果较为一致^[13-15]。大肠癌组织中Caspase3、P53以及Ki-67阳性率分别为45.00%、77.00%、68.00%, 大肠腺瘤组织中阳性表达率分别为83.00%、49.00%、26.00%, 差异均具有统计学意义($P<0.05$), 说明Caspase3在大肠癌组织中低表达, 在腺瘤组织高表达, P53和Ki-67在癌变组织高表达, 在腺瘤组织中低表达。因此推测Caspase3可能在大肠细胞的发育转化以及细胞凋亡过程的调节中有重要作用, 其表达促进了肿瘤细胞的生长, 最后导致大肠癌的形成。说明在大肠癌的发生过程中伴有细胞增殖能力的逐渐增强, 最终得以无限增殖。Caspase3表达阳性例数中, P53、Ki-67表达阳性率分别为26.67%、42.22%; Caspase3表达阴性例数中, P53、Ki-67表达阳性率分别为38.18%、36.36%; Spearman等级相关分析后, Caspase3阳性表达与P53阳性表达呈正相关, 与Ki-67呈负相关($r_1 = 0.315, r_2 = -0.302, P<0.05$)。

总之, 表明大肠癌的发生是Caspase3、P53、Ki-67等表达改变的结果, 这些变化相互作用和积累, 共同作用于大肠癌细胞, 对其侵袭能力、转移和预后产生重要影响。改变Caspase3、P53、Ki-67等表达可能为日后大肠癌的治疗提供有效的帮助。

4 参考文献

- Perraud A, Akil H, Nouaille M, Petit D, Labrousse F, Jauberteau MO, Mathonnet M. Implications of cleaved caspase 3 and AIF expression in colorectal cancer based on patient age. *Oncol Rep* 2012; 27: 1787-1793 [PMID: 22447208 DOI: 10.3892/or.2012.1737]
- de Sousa-Júnior EC, Alencar AP, da Silva BB. Ki-67 and Bcl-2 antigen expression in adenomatous colorectal polyps from women with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 2378-2383 [PMID: 20177797 DOI: 10.1245/s10434-010-0968-5]
- 张超, 卢学仁. Caspase-3和E-cadherin在肾透明细胞癌中的表达及其临床意义. *中国实验诊断学* 2012; 16: 613-615
- 王雨, 刘春英. 补中益气汤对A549荷瘤小鼠脾脏上Caspase-3蛋白表达影响研究. *中国生化药物杂志* 2014; 34: 19-21
- Heravi RE, Hadizadeh F, Sankian M, Afshari JT, Behravan J. Cyclooxygenase-2 inhibition by novel Bisaryl imidazolyl imidazole derivatives increases Bax/Bcl-2 ratio and upregulates Caspase-3 gene expression in Caco-2 colorectal cancer cell line. *Genes & Genomics* 2012; 34: 199-204 [DOI: 10.1007/s13258-011-0168-0]
- Zeestraten EC, Speetjens FM, Welters MJ, Saadatmand S, Stynenbosch LF, Jongen R, Kapiteijn E, Gelderblom H, Nijman HW, Valentijn AR, Oostendorp J, Fathors LM, Drijfhout JW, van de Velde CJ, Kuppen PJ, van der Burg SH, Melief CJ. Addition of interferon- α to the p53-SLP® vaccine results in increased production of interferon- γ in vaccinated colorectal cancer patients: a phase I/II clinical trial. *Int J Cancer* 2013; 132: 1581-1591 [PMID: 22948952 DOI: 10.1002/ijc.27819]
- Morad SA, Madigan JP, Levin JC, Abdelmageed N, Karimi R, Rosenberg DW, Kester M, Shanmugavelandy SS, Cabot MC. Tamoxifen magnifies therapeutic impact of ceramide in human colorectal cancer cells independent of p53. *Biochem Pharmacol* 2013; 85: 1057-1065 [PMID: 23353700 DOI: 10.1016/j.bcp.2013.01.015]
- Ochiai H, Ohishi T, Osumi K, Tokuyama J, Urakami H, Seki S, Shimada A, Matsui A, Isobe Y, Murata Y, Endo T, Ishii Y, Hasegawa H, Matsumoto S, Kitagawa Y. Reevaluation of serum p53 antibody as a tumor marker in colorectal cancer patients. *Surg Today* 2012; 42: 164-168 [PMID: 22075664 DOI: 10.1007/s00595-011-0044-1]
- 郑茂金, 王超群, 包义喜, 梁栋. survivin反义寡核苷酸对人胃癌细胞裸鼠皮下移植瘤P53蛋白表达的影响. *徐州医学院学报* 2011; 31: 625-627
- Pedersen JW, Gentry-Maharaj A, Fourkala EO, Dawnay A, Burnell M, Zaikin A, Pedersen AE, Jacobs I, Menon U, Wandall HH. Early detection of cancer in the general population: a blinded case-control study of p53 autoantibodies in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013; 108: 107-114 [PMID: 23169294 DOI: 10.1038/bjc.2012.517.PMID: 23169294]
- 林春华, 唐蜜, 陈明, 马波, 刘曼. ER、PR、Ki-67和p53在子宫内膜癌的表达及其临床意义. *医学临床研究* 2011; 28: 204-206
- 田琦, 吕胜军. Survivin、Ki-67核抗原在宫颈癌及宫颈上皮内瘤变中的表达意义. *中国实验诊断学* 2011; 15: 2067-2069
- 马颖, 杨向红, 林连捷, 姜卫国. PTEN和Caspase-3在大肠癌中的表达及临床意义. *中国医科大学学报* 2010; 39: 290-292
- Wan Y, Xin Y, Zhang C, Wu D, Ding D, Tang L, Owusu L, Bai J, Li W. Fermentation supernatants of *Lactobacillus delbrueckii* inhibit growth of human colon cancer cells and induce apoptosis through a caspase 3-dependent pathway. *Oncol Lett* 2014; 7: 1738-1742 [PMID: 24765211]
- 杨雪峰, 杨伟明, 刘宙, 赵洪远, 王超宇, 邬江华. CD83、CD1a和Ki-67在大肠癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 256-261

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍

