

# 喉鳞状细胞癌组织中 Caspase-3 的表达及其与 bFGF 和微血管密度的关系

徐勤<sup>1</sup> 高珊<sup>2</sup> 刘吉娜<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:探讨喉癌中 Caspase-3、bFGF 的表达以及在新生血管生成过程中的作用。方法:应用免疫组织化学 SP 法分别检测 67 例喉鳞状细胞癌组织和 36 例癌旁组织中 Caspase-3 和 bFGF 两种蛋白的表达情况,并用 CD34 标记并计数微血管密度(MVD)。结果:bFGF 在喉鳞状细胞癌组织中的表达高于癌旁组织,Caspase-3 的表达低于癌旁组织( $P < 0.05$ );喉鳞状细胞癌组织中 bFGF 和 Caspase-3 的表达在不同分化程度之间、淋巴结有无转移及不同临床分期的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在不同临床分型、有无吸烟史、不同性别及年龄方面的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。bFGF 与 Caspase-3 在喉癌组织中表达呈显著负相关( $r = -0.523, P < 0.05$ )。喉癌中 MVD 值明显大于喉癌旁黏膜( $P < 0.05$ ),并与淋巴结转移显著相关( $P < 0.05$ ),与不同分化程度、不同临床分期、不同临床分型、有无吸烟史、不同性别及年龄方面的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。喉鳞状细胞癌组织中 bFGF 蛋白表达阳性组 MVD 值,显著高于 bFGF 阴性表达组 MVD 值( $P < 0.05$ )。Caspase-3 蛋白表达阴性组 MVD 与 Caspase-3 蛋白表达阳性组 MVD 值比较,二者差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:bFGF 和 Caspase-3 关系密切,二者在喉鳞状细胞癌的表达与喉癌的临床病理学特征密切相关,二者的检测将有助于喉癌的诊断、评估喉癌患者的恶性程度及预后。

**[关键词]** bFGF;Caspase-3;微血管密度;喉肿瘤;癌;鳞状细胞

**[中图分类号]** R739.65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2013)19-1084-04

## The expression of Caspase-3, bFGF and MVD in laryngeal squamous cell carcinoma and the relationship among them

XU Qin<sup>1</sup> GAO Shan<sup>2</sup> LIU Ji'na<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Radiation Oncology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, 067000, China; <sup>2</sup>Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College) Corresponding author: GAO Shan, E-mail: xuqin4463@163.com

**Abstract Objective:** To investigate the expression of Caspase-3 and bFGF in laryngeal squamous cell carcinoma and the effect on angiogenesis. **Method:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of Caspase-3, bFGF and MVD in 36 cases of para-carcinoma tissue and 67 cases of laryngeal squamous cell carcinoma. **Result:** The expression of bFGF in laryngeal squamous cell carcinoma was significantly higher than that in para-carcinoma tissue ( $P < 0.05$ ), however the expression of Caspase-3 was significantly higher in para-carcinoma tissue than that in laryngeal squamous cell carcinoma ( $P < 0.05$ ). In laryngeal carcinoma, the expression of bFGF and Caspase-3 were associated with differentiation, lymph node metastasis and clinical stage ( $P < 0.05$ ), but was independent of clinical classification, smoking history, sex and gender ( $P > 0.05$ ). A significantly negative correlation was found between bFGF and Caspase-3 ( $P < 0.05$ ). The value of MVD in laryngeal squamous cell carcinoma was significantly higher than that in para-carcinoma tissue ( $P < 0.05$ ), and was significantly associated with lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ), but not associated with age, gender, differentiation, clinical stage, clinical classification or smoking history. The MVD of the tissue with positive expression of bFGF was significantly higher than that with negative expression of bFGF in laryngeal squamous cell carcinoma ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the MVD of the tissue with positive expression of bFGF and that with negative expression of bFGF in laryngeal squamous cell carcinoma ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** bFGF was positively related to Caspase-3, which might play an important role in the carcinogenesis and development of laryngeal carcinoma by synergic effect.

**Key words** basic fibroblast growth factor; caspase-3; density of microvessels; laryngeal neoplasm; carcinoma, squamous cell

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,主要病理类

型为鳞状细胞癌,多见于中老年男性,严重威胁人们的健康及生命,其发生发展机制尚未完全阐明,细胞凋亡与增生失衡、瘤体周围的新生血管生长等均与肿瘤发生发展密切相关。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是

<sup>1</sup>承德医学院附属医院肿瘤放疗科(河北承德,067000)

<sup>2</sup>承德医学院附属医院耳鼻咽喉科

通信作者:高珊, E-mail: xuqin4463@163.com

广泛存在于人体组织内的多肽因子之一,其在机体的生长发育、自身修复及血管形成等复杂过程中起着重要的作用,与肿瘤的生长、侵犯、转移及预后关系紧密。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)是细胞凋亡过程中的关键蛋白酶,被认为是凋亡的“执行者”。微血管密度(density of microvessels, MVD)是反映恶性肿瘤侵袭和转移等生物学行为的一个重要指标。我们对 62 例喉鳞状细胞癌组织分别用免疫组织化学方法检测 Caspase-3 和 bFGF 表达情况,并用 CD34 标记并计数 MVD。探讨二者在喉癌的发生发展过程中的作用及意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床材料

67 例喉鳞状细胞癌组织(喉癌组)及 36 例喉鳞状细胞癌相应癌旁组织(癌旁组,距离肿瘤切缘至少  $>0.5\text{ cm}$ <sup>[1]</sup>)取自 2005-01—2011-10 于承德医学院附属医院耳鼻咽喉科住院手术的 67 例原发喉鳞状细胞癌患者。所有患者术前均未接受放、化疗,标本为手术切除后 1 h 内获得,标本获得后经 10% 甲醛固定、石蜡包埋、4  $\mu\text{m}$  厚度连续切片。所有标本均经过病理学检查确诊。67 例喉鳞状细胞癌患者中,男 60 例,女 7 例;年龄 32~76 岁,中位年龄 58 岁;采用国际抗癌协会(UICC)2010 年公布的 TNM 分类分期标准:I+II 期 42 例,III+IV 期 25 例。依据术后病理检查确定有淋巴结转移者 18 例,无淋巴结转移者 49 例;声门上型 21 例,声门型 46 例;发病前吸烟史 20 年以上(每日  $>20$  支)者 54 例(吸烟组),余 13 例为(非吸烟组);癌肿  $<3\text{ cm}$  者 26 例,癌肿  $\geq 3\text{ cm}$  者 41 例;高分化( $G_1$  级)28 例,中低分化( $G_2\sim G_3$  级)39 例。

### 1.2 试剂和仪器耗材

兔抗人 Caspase-3、bFGF 多克隆抗体(北京中杉金桥)及鼠抗人 CD34 单克隆抗体(福州迈新生物技术开发有限公司)。

### 1.3 实验方法

免疫组织化学 SP 法,每例标本解冻后经甲醛固定 24 h 内行石蜡包埋,连续切取切片 3 张,分别进行 bFGF、Caspase-3 和 CD34 染色石蜡 5  $\mu\text{m}$  切片,常规脱蜡至水,3% 过氧化氢液室温孵育 10 min,抗原修复 15 min,室温放置 40 min,PBS 液冲洗,小牛血清封闭 10 min,滴加一抗 50  $\mu\text{L}$  (1:100 工作液)4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,PBS 液冲洗,加二抗,室温孵育 15 min,PBS 液冲洗,DAB 显色 5 min,终止显色,蒸馏水冲洗,苏木精复染,透明,封片,镜检。

### 1.4 结果判定

bFGF、Caspase-3 主要表达于细胞质或细胞核(多数在胞质),以出现棕黄色颗粒为阳性反应。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知喉鳞状细胞癌阳性组织切片为阳性对照。采用 Volm 双评分

法<sup>[1]</sup>进行判定,在染色均匀的肿瘤区选取 5 个高倍镜视野( $\times 400$ ):①按阳性细胞百分率(A 值)评分: $<25\%$  为 1 分, $25\%\sim 50\%$  为 2 分, $>50\%$  为 3 分;②按染色强度(B 值)评分:不着色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。综合染色阳性细胞数(A 值)与染色强度(B 值)判断结果<sup>[2]</sup>:阴性(-)为 0 分,弱阳性(+)为 1~2 分,中度阳性(++)为 3~4 分,强阳性(+++)为 5~6 分。

MVD 的判定:CD34 阳性的血管内皮细胞胞质呈棕黄色颗粒。微血管计数根据 Weidener<sup>[2]</sup>方法:任何被 CD34 标记成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇可作为一个计数单位,不以是否形成管腔或管腔内有无红细胞为计数依据。管腔径大于 8 个红细胞直径或有肌层的血管不计数。先用 100 倍镜扫视整个切片,寻找肿瘤组织内 MVD 最高密度区,然后在 200 倍镜下计数每一视野的微血管数目,由 2 人采用双盲法进行计数。结果采用 5 个 200 倍视野下微血管数目的平均值作为 MVD。以上结果均由 2 位不知患者临床病理资料的病理科医师判定。

### 1.5 统计学方法

所有数据结果经 Excel 数据库整理,应用 SPSS13.0 统计软件完成。计数资料采用  $\chi^2$  检验。计量资料的实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,两样本均数比较采用  $t$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义, $P<0.01$  为差异有显著性差异。采用 Spearman 等级相关分析 Caspase-3 和 bFGF 表达的相关性。

## 2 结果

### 2.1 Caspase-3 蛋白和 bFGF 蛋白在喉鳞状细胞癌组织、癌旁组织中的表达

Caspase-3 蛋白在喉癌组中阳性率为 49.25%;癌旁组阳性率为 91.67%。喉癌组和癌旁组间 Caspase-3 的表达差异有统计学意义( $P<0.05$ )。bFGF 蛋白在喉癌组中的阳性率为 86.57%;癌旁组中有 12 例(33.33%)为弱阳性。喉癌组和癌旁组间 bFGF 的表达差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.2 MVD 在喉鳞状细胞癌组织、癌旁组织中的表达

喉癌组 MVD 值在高倍视野下( $\times 200$ )为  $(27.02\pm 5.05)$ ,明显高于癌旁组  $(14.41\pm 4.11)$ ,二者差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.3 喉鳞状细胞癌组织中 Caspase-3、bFGF 表达及 MVD 与临床病理因素的关系

Caspase-3 蛋白与 bFGF 蛋白的表达均与喉鳞状细胞癌组织中的淋巴结转移、临床分期、分化程度有相关性(均  $P<0.05$ ),均与喉鳞状细胞癌组织中的肿瘤大小、吸烟史、年龄及性别无相关性(均  $P>0.05$ )。MVD 与淋巴结转移有相关性( $P<$

0.05),与临床分期、分化程度、肿瘤大小、吸烟史、年龄及性别无相关性(均  $P > 0.05$ )。见表 1。

**2.4 Caspase-3 与 bFGF 在喉鳞状细胞癌组织中表达的相关性**

Caspase-3 表达阳性的 33 例喉鳞状细胞癌组织中,bFGF 阳性 25 例(75.76%);Caspase-3 表达阴性的 34 例喉鳞状细胞癌组织中,bFGF 阳性 33 例(97.05%)。Caspase-3 与 bFGF 在喉鳞状细胞癌组织中表达呈负相关,差异有统计学意义( $r = -0.523, P < 0.05$ )。

**2.5 喉鳞状细胞癌组织中 Caspase-3、bFGF 表达各组的 MVD 值比较**

Caspase-3 蛋白表达阴性组 MVD 值(27.72 ± 5.01)高于 Caspase-3 蛋白表达阳性组 MVD 值(25.89 ± 4.19),二者差异无明显统计学意义( $P > 0.05$ )。bFGF 蛋白表达阳性组 MVD 值(28.07 ± 4.23),显著高于 bFGF 阴性组 MVD 值(23.59 ± 3.71),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**3 讨论**

肿瘤的发生是一个复杂的过程,其细胞增殖与细胞凋亡失衡,受细胞内多种因素控制。细胞凋亡一直是肿瘤研究的热点。Caspase 蛋白酶家族即半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶,是包括人类在内的哺乳动物细胞凋亡的关键酶类。Caspase-3 是

Caspase 家族成员中最重要的效应因子,处于凋亡有序级联反应的下游;大多数触发细胞的因素,最终均需要通过 Caspase-3 介导信号传导途径而导致细胞凋亡<sup>[3]</sup>。Caspase-3 广泛表达于正常人体组织和多种肿瘤组织中。已有研究显示,Caspase-3 在肿瘤中的表达较正常组织明显降低<sup>[4-5]</sup>。同时,当肿瘤生长初期达到一定程度后,需要新生血管供养,其生长过程需要经历以下几个阶段:①血管前期:该期肿瘤细胞依靠弥散获得营养,生长缓慢;②血管期:该期肿瘤组织内部出现新生血管,为其提供大量营养以促进快速生长;③侵袭期:肿瘤长到一定程度后向周围侵袭,新生的肿瘤血管数量与瘤体侵袭力密切相关。而在肿瘤新生血管生长调控过程中,bFGF 至关重要。bFGF 是最早从牛垂体中分离出的一种对成纤维细胞具有明显促增殖作用的多肽物质,其基因定位于染色体 4q26-27,主要表达在细胞质,编码序列包括 3 个外显子和 2 个内含子<sup>[6]</sup>。bFGF 具有多种生物学活性,如促进胚胎发育和分化、刺激新生血管形成、参与组织损伤后的再生及愈合、营养神经以及调节内分泌和细胞凋亡等。bFGF 可能通过以下几种机制参与肿瘤的形成和发展:① bFGF 以自分泌或旁分泌以及调节细胞凋亡等方式促进细胞过度增殖和肿瘤生长;② 通过促进瘤床上新生血管形成,为肿瘤细胞生长提

表 1 喉鳞状细胞癌组织中 Caspase-3、bFGF 表达及 MVD 与临床病理因素的关系 例(%)

临床因素	例数	Caspase-3		bFGF		MVD
		阳性	%	阳性	%	$\bar{x} \pm s$
淋巴结转移						
有	18	15	83.3	11	61.1	32.47 ± 4.32
无	49	18	36.7 <sup>1)</sup>	47	95.9 <sup>1)</sup>	24.55 ± 5.11 <sup>1)</sup>
临床分期						
I + II 期	42	23	54.8	33	78.6	26.77 ± 5.65
III + IV 期	25	10	40.0 <sup>2)</sup>	25	100.0 <sup>2)</sup>	29.06 ± 4.83
分化程度						
G <sub>1</sub>	28	20	71.4	21	75.0	25.63 ± 5.39
G <sub>2</sub> ~ G <sub>3</sub>	39	13	33.3 <sup>3)</sup>	37	94.9 <sup>3)</sup>	28.37 ± 4.73
肿瘤大小						
直径 < 3 cm	26	15	57.7	24	92.3	24.17 ± 4.93
直径 ≥ 3 cm	41	18	43.9	34	82.9	26.09 ± 5.33
吸烟史						
吸烟组	54	29	53.7	46	85.2	28.92 ± 5.63
非吸烟组	13	4	30.8	12	92.3	28.21 ± 4.87
年龄/岁						
< 60	36	15	41.7	32	88.9	26.49 ± 5.51
≥ 60	31	18	58.1	26	83.9	27.13 ± 4.97
性别						
男	60	31	51.7	53	88.3	25.36 ± 5.29
女	7	2	28.6	5	71.4	24.81 ± 4.82

与淋巴结有转移比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 I + II 期比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;<sup>3)</sup> 与 G<sub>1</sub> 比较, $P < 0.05$ 。

供丰富的营养<sup>[7]</sup>;③bFGF 对中胚层和神经外胚层来源的细胞具有强烈的促分裂活性,同时通过激活蛋白激酶 C(PKC)启动 MAPK 磷酸化级联反应,促进体内某些凋亡抑制蛋白表达,间接抑制细胞凋亡<sup>[-8-9]</sup>。

喉癌组织生长过程中随着范围的扩大,造成周围缺血缺氧坏死,产生肿瘤炎症性改变,产生大量氧自由基,引起细胞内  $Ca^{2+}$  超载,而细胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高是公认的凋亡始动因子,并产生大量 TNF- $\alpha$  等炎症因子导致血管内皮细胞破坏及痉挛出现低灌注,从而诱导 bFGF 表达增高促进剩余内皮细胞分裂增殖。即一方面促进组织内毛细血管快速再生,一方面继而抑制 Caspase-3 的表达及随后的 DNA 断裂,抑制细胞凋亡作用,导致细胞增殖。bFGF 表达增高还可引起组织粘连<sup>[10]</sup>。Fujiwara 等<sup>[11]</sup>发现 bFGF 能够加强并延长磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)的激活,抑制 Caspase-3 激活,减少 TUNEL 阳性凋亡细胞数量,从而显著减小脑梗死灶体积。同时瘤内微血管生成可能通过以下机制促进肿瘤淋巴结转移:新生血管充足的血供使瘤体迅速增大,从而与周围形成压力差,促进肿瘤细胞进入瘤体周围微淋巴管导致淋巴结转移。黄清丽等<sup>[12]</sup>发现 MVD 高表达的喉鳞状细胞癌组织淋巴结转移明显。本研究结果与该文献报道一致。同时本研究还发现 MVD 与 bFGF 表达成正相关。同样,杨媛等<sup>[13]</sup>亦发现 bFGF 与卵巢上皮性癌组织中的 MVD 呈正相关,提示在卵巢上皮性癌血管生成中 bFGF 具重要作用。尚海等<sup>[14]</sup>发现 bFGF 在大肠癌组织中的表达量与肿瘤恶性程度及侵袭力密切相关。这种上皮与周围间质细胞间的相互作用既维持正常组织结构利于正常修复,但也成为肿瘤细胞生存的基础,这种“双刃剑”效果对喉黏膜癌前病变以及癌变的发生发展非常之重要。

本实验采用免疫组织化学检测喉鳞状细胞癌组织中 bFGF、Caspase-3 的表达以及肿瘤 MVD。结果显示 bFGF 和 Caspase-3 在喉鳞状细胞癌组织中呈负相关表达关系,二者表达与喉鳞状细胞癌的淋巴结转移、临床分期、肿瘤分化程度密切相关。Caspase-3 和 bFGF 蛋白的检测将有助于喉癌的诊断及评估喉癌患者的淋巴结转移情况。同时,喉鳞状细胞癌组织中 MVD 定量高则提示喉癌组织内可能存在血管增生现象,增生血管位于肿瘤间质,表明 MVD 与喉鳞状细胞癌的转移、复发及预后密切相关。在上述基因检测的基础上不断探索将有可能为喉癌综合生物治疗药物的研制方面提供一定思路。

## 参考文献

- [1] VOLM M, KOOMAGE R, MATTERN J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer[J]. *Int cancer*, 1997, 74: 64-68.
- [2] WEIDNER N. Intratumor microvessel density as prognostic factor in cancer[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147: 9-19.
- [3] BUDIHARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 269-290.
- [4] 王智明, 赵志国, 管新明, 等. Survivin mRNA 及 Caspase-3 mRNA 在舌鳞癌中的表达及相关性[J]. *上海口腔医学*, 2007, 16(6): 582-586.
- [5] 陈桂秋, 钟艳平, 王连有, 等. Livin, Caspase-3 在结肠癌和结肠腺瘤组织中的表达及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(7): 928-929.
- [6] CROSS M J, CLAESON-WELSH L. FGF and VEGF function in angiogenesis, signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition [J]. *Trends Pathways Sci*, 2001, 22: 201-207.
- [7] DOW J K, WHITE R W. Fibroblast growth factor-2: Its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate related mitogenic and oncogenic functions[J]. *Urology*, 2000, 55: 800-813.
- [8] MCKAY M M, MORRISON D K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 3113-3121.
- [9] CUENDA A, ROUSSEAU S. p38MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 1358-1375.
- [10] 刘晓毅, 王康, 仇广林, 等. 转化生长因子  $\beta$  与碱性成纤维细胞因子在术后腹腔粘连组织中的表达及其意义[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2011, 7(32): 485-488.
- [11] FUJIWARA K, DATE I, SHINGO T Y, et al. Reduction of infarct volume and apoptosis by grafting of encapsulated basic fibroblast growth factor-secreting cells in a model of middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Neurosurg*, 2003, 99: 1053-1062.
- [12] 黄清丽, 皇甫辉, 史敏, 等. 喉鳞状细胞癌 Caveolin-1 和 MVD 表达及与颈淋巴结转移的关系[J]. *中国医药导报*, 2011, 3(8): 25-28.
- [13] 杨媛, 郭钰珍, 颀丽. Ang-2 和 bFGF 的表达对卵巢上皮性癌血管生成的影响[J]. *山东医药*, 2008, 48(12): 29-30.
- [14] 尚海, 单吉贤, 高红, 等. 大肠癌组织中 aFGF、bFGF 及 FGFR 表达水平的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2003, 30: 424-424.

(收稿日期: 2012-11-21)