

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)12-1112-03

Fas/FasL 系统在人子宫内膜增生过长和子宫内膜癌中的表达

王红英¹, 于月成¹, 卜宁² (第四军医大学西京医院: ¹ 妇产科, ² 血液科 陕西 西安 710033)

Expression of Fas/FasL in human endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma

WANG Hong-Ying¹, YU Yue-Cheng¹, BU Ning²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, ²Department of Hematology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the roles of Fas and Fas ligand (FasL) in the pathogenesis of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. **METHODS:** Immunohistochemical SP method was employed to detect the expressions of Fas and FasL in endometrial hyperplasia (40 cases), endometrial carcinoma (18 cases) and normal controls (25 cases). *In situ* hybridization technique was used to investigate the level of FasL mRNA. **RESULTS:** The expression of Fas was lower in endometrial hyperplasia (58%) and endometrial carcinoma (22%), when compared to the controls (68%, $P < 0.05$). However, the expression of FasL was higher in endometrial hyperplasia (68%) and endometrial carcinoma (94%) as compared to the controls (32%, $P < 0.05$). Results of *in situ* hybridization showed that the positive rates of FasL mRNA in endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma were both higher than that in normal endometrium ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The abnormal expression of Fas/FasL might be one of the pathogenesis factors for endometrial hyperplasia and immune escape for endometrial carcinoma, which may play an important role in the pathophysiology of the diseases.

【Keywords】 Fas; Fas ligand; endometrial hyperplasia; endometrial neoplasms

【摘要】目的: 探讨 Fas 和 Fas 配体(FasL)在人子宫内膜增生过长和子宫内膜癌发病中的作用。方法: 采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白过氧化物酶染色法(SP法)检测 40 例子宫内膜增生过长的异位内膜与 18 例子宫内膜癌内膜中 Fas 和 FasL 蛋白的表达, 采用原位杂交方法检测 FasL mRNA 水平。设正常子宫内膜 25 例为对照组。结果: Fas 蛋白在正常子宫内膜的阳性表达率为 68%, 在子宫内膜增生过长与子宫内膜癌组的阳性表达率分别为 58% 和 22%, 差异具有统计学意义

($P < 0.05$)。FasL 蛋白在子宫内膜增生过长与子宫内膜癌组中的阳性表达率分别为 68% 和 94%, 明显高于对照组 32%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。FasL mRNA 的表达强度在子宫内膜增生过长与子宫内膜癌组亦明显高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: Fas 与 FasL 蛋白表达失调, 可能是子宫内膜增生过长的发病机制之一, 对子宫内膜癌组织逃避免疫系统监视具有重要作用。

【关键词】 Fas; Fas 配体; 子宫内膜增生; 子宫内膜肿瘤

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A

0 引言

Fas/FasL 系统的生理功能在于通过对细胞凋亡的调节, 限制某些细胞群落的过分膨胀或过分萎缩, 参与正常细胞增殖、分化和凋亡动态平衡的维持, 在临床多种疾病的发生过程中具有重要的作用^[1-2]。近年的研究发现, 在多种肿瘤细胞出现 Fas 表达下调和 FasL 表达上调的现象, 直接参与或间接促进了肿瘤逃避免疫系统的监视, 从而有利于肿瘤细胞的进展和转移^[3]。但有关 Fas/FasL 系统与子宫内膜增生过长和子宫内膜癌发生中的作用少见报道。本实验采用免疫组化和原位杂交方法检测 Fas/FasL 系统在子宫内膜增生过长和子宫内膜癌中的表达, 旨在探讨其在子宫内膜癌发生发展中蛋白及基因表达的意义, 为临床诊断和治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选用第四军医大学西京医院妇产科 2002-01/2003-04 手术切除子宫标本 83 例。分为子宫内膜腺癌组 18 例, 年龄(44.2 ± 7.8)岁; 子宫内膜增生过长组 40 例, 年龄(44.5 ± 8.2)岁; 以正常子宫内膜 25 例作为对照组, 年龄(45.5 ± 7.6)岁。子宫内膜腺癌采用国际妇产科联盟(FIGO)的三级分类法分为 I 级 7 例, II 级 5 例, III 级 6 例。子宫内膜增生过长按 1985 年国际妇科病理协会提出的分类标准进行分类, 根据腺体增殖程度及腺上皮有无非典型性(atypical, ATP)分为四类: 单纯性增殖不伴 ATP 11 例, 单纯性增殖伴有 ATP 12 例, 复杂性增殖不伴 ATP 9 例, 复杂性增殖伴有 ATP 8 例。

Fas 和 FasL 多克隆抗体(兔抗人)及通用型超敏

收稿日期 2007-03-13; 接受日期 2007-05-10

作者简介: 王红英, 博士, 主治医师。Tel (029) 84775522 Email: wanghyy@sina.com

SP kit(福州迈新试剂公司);FasL 原位杂交试剂盒(武汉博士德试剂公司);地高辛标记的 FasL mRNA 多相寡核苷酸探针序列为:① 5'-CCCAG ATCTA CT-GGG TGGAC AGCAG TGCCA-3', ② 5'-TATTC CAAAG TATAC TTCCG GGGTC AATCT-3', ③ 5'-CTCTC TGGTC AATTT TGAGG AATCT CAGAC-3' 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 SP 法测定 Fas 和 FasL 蛋白的表达水平 标本经 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡切片厚 4 μm , 抗原经微波热修复, Fas 及 FasL 一抗的工作浓度均为 1:100, DAB 显色。操作方法按试剂盒说明书进行。

1.2.2 原位杂交法测定 FasL mRNA 石蜡切片常规脱蜡至水, 30 mL/L H_2O_2 室温处理 10 min, DEPC 水洗 2 \times 5 min, 用胃蛋白酶 37 $^\circ\text{C}$ 消化 30 min, 0.5 mol/L PBS 洗 3 \times 5 min, 进行 40 $^\circ\text{C}$ 预杂交 3 h, 用滤纸吸去预杂交液, 加入 FasL mRNA 探针的原位杂交液杂交过夜。以链霉素-过氧化物酶(SABC)免疫组化法染色, DAB 显色。操作方法参照说明书进行。

1.2.3 对照设计 免疫组化分别用已知 Fas 和 FasL 均阳性的乳腺癌组织切片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。原位杂交用杂交试剂盒内配置的阳性切片作为阳性对照, 杂交过程中加不含标记探针的原位杂交液作为阴性对照。

1.2.4 结果判定 免疫组化和原位杂交染色, 以黄色和棕黄色为阳性信号。根据染色强度和显色细胞比例的综合评分, 将染色结果分为“- , + , ++ , +++”四级: ① 按内膜组织中显色有无及深浅评分: 无显色为 0 分, 浅黄色或黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。② 按内膜组织的显色比例评分: <5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 25% ~ 50% 为 2 分, >50% 为 3 分。每例标本的积分为(①+②)/2, 按积分高低分为 0 分为阴性(-), 0.5 ~ 1 分为弱阳性(+), 1.5 ~ 2 分为阳性(++), 2.5 ~ 3 分为强阳性(+++)。

统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。FasL, Fas 及 FasLmRNA 表达的强弱程度用 Kruskal-Wallis 检验, 组间多重比较采用 Nemenyi 检验。

2 结果

2.1 FasL/Fas 蛋白的表达 三组间年龄差异无统计学意义。FasL 蛋白在子宫内增生过长组与子宫内增生过长组中的阳性表达率分别为 68% 和 94%, 均明显高于正常子宫内膜对照组 32%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。Fas 蛋白在正常子宫内膜对照组的阳性表达率为 68%, 在子宫内增生过长组与子宫内增生过长组的阳性表达率分别为 58% 和 22%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 FasL, Fas 在各种子宫内增生过长中的表达

(n)

组别	n	FasL 蛋白				总阳性率(%)	Fas 蛋白				总阳性率(%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
子宫内增生过长											
单纯性增殖不伴 ATP	11	3	5	1	2	73	5	2	3	1	55
单纯性增殖伴 ATP	12	3	4	2	3	75	5	3	2	2	58
复杂性增殖不伴 ATP	9	4	2	1	2	56	4	2	2	1	55
复杂性增殖伴 ATP	8	3	2	2	1	63	3	3	1	1	63
合计	40	13	13	6	8	68 ^a	17	10	8	5	58
子宫内增生过长											
I 级	7	1	2	2	2	86	5	1	1	0	29
II 级	5	0	1	2	2	100	4	1	0	0	20
III 级	6	0	1	3	2	100	5	1	0	0	17
合计	18	1	4	7	6	94 ^b	14	3	1	0	22 ^b
正常子宫内膜对照											
增生期	12	8	2	2	0	33	6	3	2	1	50
分泌期	13	9	1	2	1	31	2	2	3	6	84
合计	25	17	3	4	1	32	8	5	5	7	68

^a $P < 0.05$ vs 正常子宫内膜对照; ^b $P < 0.05$ vs 子宫内增生过长。

2.2 FasL 基因的表达 FasLmRNA 的表达强度在子宫内膜增生过长组与子宫内膜癌组亦明显高于正常子宫内膜对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 表 2)。

表 2 FasL mRNA 在各种子宫内膜中的表达 (n)

组别	n	FasL mRNA				总阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
子宫内膜增生过长						
单纯性增殖不伴 ATP	11	2	3	1	5	82
单纯性增殖伴 ATP	12	2	2	4	4	83
复杂性增殖不伴 ATP	9	3	1	2	3	67
复杂性增殖伴 ATP	8	24	1	1	75	
合计	40	9	10	8	13	53 ^a
子宫内膜腺癌						
I 级	7	1	3	1	2	86
II 级	5	0	0	2	3	100
III 级	6	0	1	1	4	100
合计	18	1	4	4	9	94 ^b
正常子宫内膜对照						
增生期	12	8	3	1	0	33
分泌期	13	11	1	0	1	15
合计	25	19	4	1	1	24

^a $P < 0.05$ vs 正常子宫内膜对照, ^b $P < 0.05$ vs 子宫内膜增生过长。

3 讨论

Fas 及 FasL 蛋白在正常子宫内膜中的生理性表达, 有利于维持细胞增殖和细胞凋亡平衡^[2]。Fas 的表达随月经周期波动, 在增生期无表达或弱表达, 而在分泌期则逐渐增强; FasL 在整个月经周期中呈阴性表达或弱表达, 且不随月经周期波动^[3]。二者主要定位于功能层腺上皮细胞的胞质中。在月经周期中激素水平不断变化的情况下, Fas/FasL 系统在调节正常内膜组织的增殖平衡与结构重建中起重要作用^[4-5]。我们的实验结果表明, 子宫内膜腺癌 Fas 表达的阳性率明显低于子宫内膜增生过长, 子宫内膜腺癌 FasL 蛋白及基因的表达的阳性率明显高于子宫内膜增生过长, FasL 蛋白及基因的表达在子宫内膜增生过长中明显高于正常子宫内膜 ($P < 0.05$), 但在子宫内膜增生过长及子宫内膜腺癌各型之间却无显著性差异 ($P > 0.05$)。这与国外学者的研究结果一致^[5]。

Fas 抗原属于神经生长因子/肿瘤坏死因子受体超家族的成员之一^[6]。FasL 是 Fas 抗原的配体, 属于 TNF 家族, 两者结合可导致细胞凋亡^[7]。Fas/FasL 系统参与子宫内膜增生过长的形成^[8]。正常功能时, Fas 通过诱导凋亡而作为肿瘤抑制因子, Fas 信号失活导致细胞凋亡失败、不正常细胞生存、肿瘤形成。赵向阳等^[9]的研究发现, Fas 在癌变组织中表达的下调, 细胞凋亡减少, 而 FasL 则与 Fas 在胃癌发生发展过程中的表达呈现相反趋势, 表达强度呈增强趋势, 这种 Fas/FasL 的不协调表达可能也是造成胃癌细胞凋亡减弱的原因之一。我们研究表明子宫内膜癌 Fas 表达降低, 导致 Fas 介导的细胞凋亡相对减少, 细胞增殖相对增加。这可能是子宫内膜癌发病机制之一。

综上, 子宫内膜癌 FasL 表达增高和 Fas 的低表达, 可导致细胞对局部免疫细胞产生抑制, 对周围正常组织的侵袭, 使子宫内膜癌得以发生、发展。

【参考文献】

- [1] Bohana-Kashtan O, Civin CI. Fas ligand as a tool for immunosuppression and generation of immune tolerance[J]. Stem Cells, 2004, 22(6):908-924.
- [2] 李海民, 袁科峰, 帝振宇, 等. 肝内嵌合 Sertoli 细胞对肝组织中 Fas/FasL 表达的影响及其意义[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(12):1091-1093.
- [3] 王滨, 郑维国, 辛晓燕, 等. Fas/FasL 系统在子宫内膜异位症中的表达与意义[J]. 山西医科大学学报, 2003, 34:490-492.
- [4] Wang S, Pudney J, Song J, et al. Mechanisms involved in the evolution of progesterin resistance in human endometrial hyperplasia--precursor of endometrial cancer[J]. Gynecol Oncol, 2003, 88(2):108-117.
- [5] Taylor DD, Lyons KS, Gercel-Taylor C, et al. Shed membrane fragment-associated markers for endometrial and ovarian cancers[J]. Gynecol Oncol, 2002, 84(3):443-448.
- [6] 桑威. Fas/FasL 系统参与的几种生物学效应[J]. 国际免疫学杂志, 2006, 11(9):389-392.
- [7] Iwase M, Kondo G, Watanabe H, et al. Regulation of fas-mediated apoptosis in neutrophils after surgery induced acute inflammation[J]. J Surg Res, 2006, 134(1):114-123.
- [8] Wang S, Pudney J, Song J, et al. Mechanisms involved in the evolution of progesterin resistance in human endometrial hyperplasia--precursor of endometrial cancer[J]. Gynecol Oncol, 2003, 88:108-117.
- [9] 赵向阳, 王为忠, 李玉红, 等. Fas, FasL 和 Bcl-2 在胃癌发生发展中的表达意义[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(10):938-939.

编辑 杨湘华