

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.01.012

鼻咽癌组织中 HIF-2 α 和 Caspase-3 的表达及意义

丁 晖¹, 李先明², 高 艳², 胡丽霞¹, 杨 东², 周亚燕², 徐 钢²

Expression and Significance of HIF-2 α and Caspase-3 in Nasopharyngeal Carcinoma

DING Hui¹, LI Xian-ming², GAO Yan², HU Li-xia¹, YANG Dong², ZHOU Ya-yan², XU Gang²

1. Department of Radiology, Second Clinical Medical College of Ji'nan University, Shenzhen 518020, China, 2. Department of Radiotherapy

Corresponding Author: LI Xian-ming, E-mail: lxm1828@hotmail.com

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of HIF-2 α and Caspase-3 in nasopharyngeal carcinoma(NPC). **Methods** The expression of HIF-2 α and Caspase-3 protein were examined by immunochemistry in 46 samples of NPC and 20 samples of chronic nasopharyngitis. **Results** The expression of HIF-2 α protein in NPC was higher than that in chronic nasopharyngitis while Caspase-3 protein was opposite ($P < 0.05$). No statistical significance were observed between the expression of HIF-2 α protein and patients gender, age, clinical staging and lymph node metastasis ($P > 0.05$). There were significant statistical correlations between overexpression of HIF-2 α protein and T stage. The expression of Caspase-3 was not significantly correlated with patients gender, age, T stage, clinical staging, and lymph node metastasis ($P > 0.05$). There was no correlation between the expression of HIF-2 α protein and Caspase-3 protein expression in NPC ($r = -0.195, P > 0.05$). **Conclusion** The anomalous expression of HIF-2 α and Caspase-3 may be associated with the carcinogenesis and development of NPC. There was significant correlation between the higher expression of HIF-2 α protein and the malignant progression of NPC.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; HIF-2 α ; Caspase-3; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)和半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在鼻咽癌组织中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫组织化学法检测 46 例初诊鼻咽癌组织和 20 例鼻咽慢性炎组织中 HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白的表达。**结果** HIF-2 α 蛋白在鼻咽癌组织中的表达高于鼻咽慢性炎性组织,而 Caspase-3 蛋白表达则相反($P < 0.05$);HIF-2 α 蛋白表达与患者性别、年龄、颈部淋巴结转移状态及临床分期无明显相关($P > 0.05$),与 T 分期的早晚相关($P < 0.05$)。Caspase-3 蛋白的表达与患者的性别、年龄、T 分期、颈部淋巴结转移状态及临床分期无明显相关($P > 0.05$)。鼻咽癌组织中 HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白的阳性表达无相关性($r = -0.195, P > 0.05$)。**结论** HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白的异常表达可能涉及鼻咽癌的发生和发展过程;HIF-2 α 蛋白的高表达可能与鼻咽癌恶性进展密切相关。

关键词: 鼻咽肿瘤; HIF-2 α ; Caspase-3; 免疫组织化学

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)01-0041-04

0 引言

缺氧诱导因子 2 α (hypoxia inducible factor-2 α , HIF-2 α)是缺氧条件下广泛存在于体内的一

类转录因子,它通过促进与血管生成相关的缺氧反应基因转录和表达,产生生物效应。有研究表明 HIF-2 α 表达与肿瘤生物学行为和放疗的反应性密切相关^[1]。Caspases(即半胱氨酸天门冬氨酸特异蛋白酶)家族的激活是凋亡发生机制的重要环节之一,其中 Caspase-3 是该家族中关键效应分子之一^[2]。研究表明 Caspase-3 与多种肿瘤的发生、发展和患者的预后相关。本研究通过检测鼻咽癌组织中 HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白的表达,借以分析其与鼻咽癌生物学行为的相关性,探讨其在鼻咽癌诊断

收稿日期:2010-04-06;修回日期:2010-07-21

基金项目:广东省深圳市科技计划项目资金资助项目(200702102)

作者单位:1. 518020 广东深圳,暨南大学第二临床学院放射科,2. 肿瘤放疗科

通信作者:李先明, E-mail: lxm1828@hotmail.com

作者简介:丁晖(1968-),女,大专,主管技师,主要从事放射诊断工作

和治疗中的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2008 年 1 月—2009 年 1 月本院收治的且经病理证实,并在本院完成放射治疗且随诊时间大于 1 年的鼻咽癌患者 46 例,其中男 38 例,女 8 例,年龄 22~70 岁,中位年龄 40.5 岁。病理类型:非角化型癌 43 例,乳头状鳞状细胞癌 1 例,低分化鳞状细胞癌 2 例。采用“鼻咽癌 2008 分期”标准进行临床分期: I 期 2 例, II 期 6 例, III 期 23 例, IV 期 15 例。另选取鼻咽慢性炎症患者 20 例用于对照研究。

1.2 检测方法

鼠抗人单克隆 HIF-2 α 和 Caspase-3 抗体购自 Thermo 公司,工作浓度均为 1:100。即用型第二代免疫组织化学广谱试剂盒及 DAB 显色剂购自晶美生物工程有限公司。染色方法采用免疫组织化学染色二步法。切片常规脱蜡、水化,柠檬酸高压抗原修复,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 培养 20 min, DAB 显色,苏木精对比染色,设阳性对照及 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白均以细胞核或细胞质内有棕黄色或棕褐色颗粒为阳性染色^[3-4]。结果判定标准^[5]: (1)染色强度评分为:不染色 0 分,轻度染色 1 分,中度染色 2 分,强染色 3 分; (2)染色面积评分为:细胞染色 <10% 为 0 分, 10%~25% 为 1 分, >25%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分。两项得分之和 >2 分为阳性表达,其中积分等于 3 分为弱阳性表达,积分等于 4~5 分为中等阳性表达,积分等于 6 分为强阳性表达;积分 \leq 2 分为阴性表达。以上结果均至少由两位病理科医师以盲法观察确定。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计分析软件对数据进行处理,组间率的比较采用 χ^2 检验;相关性检验采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白在鼻咽癌和鼻咽慢性炎症组织中的表达

46 例鼻咽癌组织中, HIF-2 α 蛋白阳性表达 19 例(41.3%), 见图 1, 其中细胞核阳性表达 15 例(32.6%); Caspase-3 蛋白阳性表达 28 例(60.9%), 见图 2, 其中细胞质阳性表达 25 例(54.4%)。20 例鼻咽慢性炎症组织中 HIF-2 α 蛋白阳性表达 1 例

(5%); Caspase-3 蛋白阳性表达 18 例(90%)。鼻咽癌组织中 HIF-2 α 蛋白阳性表达率显著高于鼻咽慢性炎症组织($\chi^2 = 8.699, P < 0.01$), 而 Caspase-3 蛋白阳性表达率显著低于鼻咽慢性炎症组织($\chi^2 = 5.601, P < 0.05$)。

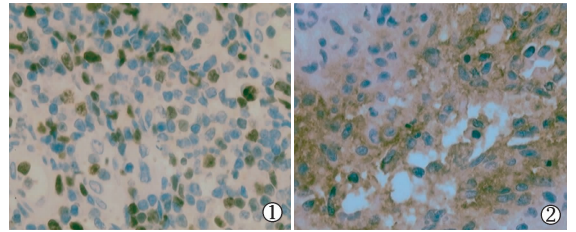


图 1 鼻咽癌组织中 HIF-2 α 呈细胞核阳性表达
Figure 1 Nuclear positive expression of HIF-2 α in nasopharyngeal carcinoma

(Immunohistochemistry Elivision \times 400)

图 2 鼻咽癌组织中 Caspase-3 呈细胞质阳性表达
Figure 2 Cytoplasmic positive expression of Caspase-3 in nasopharyngeal carcinoma

(Immunohistochemistry Elivision \times 400)

2.2 HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白在鼻咽癌中表达与生物学行为的关系

经 χ^2 检验只有 HIF-2 α 蛋白的表达与 T 分期有相关性($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 HIF-2 α 和 Caspase-3 表达的相关性

鼻咽癌组织中 HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白表达的相关性, 见表 2。经 Spearman 等级相关分析, HIF-2 α 和 Caspase-3 蛋白的阳性表达间无显著相关性($r = -0.195, P > 0.05$)。

表 2 HIF-2 α 和 Caspase-3 在鼻咽癌组织中表达的相关性

Table 2 Correlation of HIF-2 α and Caspase-3 expression in nasopharyngeal carcinoma

Caspase-3 expression	HIF-2 α Expression	
	+	-
+	7	21
-	12	6

3 讨论

乏氧是实体肿瘤中客观存在的表现, 肿瘤内乏氧细胞的存在不仅使肿瘤对放疗抗拒性增加, 而且使肿瘤更具侵袭性, 容易发生转移。最近有研究显示, 在较长时相的乏氧过程中, 肝癌 SMMC27721 细胞内 HIF-2 α 随乏氧时间的延长表达进行性升高。由此研究者认为在慢性乏氧中, HIF-2 α 与肿瘤的进展及放、化疗抗拒密切相关^[6]。HIF-2 α 是乏氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)同源二聚体转

表 1 鼻咽癌组织 HIF-2 α 和 Caspase-3 表达与生物学行为各因素关系
Table 1 Association of HIF-2 α and Caspase-3 expression with histologic variables

Characteristics	n	HIF-2 α		χ^2	P*	Caspase-3		χ^2	P*
		Positive	Negative			Positive	Negative		
Gender									
Male	38	16	22			23	15		
Female	8	3	5	0.000	1.000	5	3	0.000	1.000
Age									
≤ 50	35	15	20			22	13		
> 50	11	4	7	0.001	0.976	6	5	0.019	0.890
T stage									
T1, T2	20	4	16			15	5		
T3, T4	26	15	11	6.624	0.010	13	13	2.966	0.085
Neck lymph node metastasis									
N0	5	0	5			4	1		
N1~3	41	19	22	2.268	0.132	24	17	0.196	0.658
Clinical stage									
I, II	8	1	7			6	2		
III, IV	38	18	20	2.032	0.154	22	16	0.252	0.615

Note: * : P value for Chi-square test

录因子家族的新成员,由 α 和 β 亚单位组成。 α 亚单位在正常氧分压下会迅速被泛素水解酶系统水解,而缺氧时此降解过程受抑制, α 亚单位迅速与 β 亚单位结合形成异二聚体结构,进而通过识别并结合其靶基因的缺氧反应元件上的核心序列,增强下游靶基因血管内皮生长因子、红细胞生成素和糖酵解酶等表达,以适应缺氧性改变,从而影响肿瘤的血管生成、细胞能量代谢、转移和凋亡等病理过程^[7]。Giatromanolaki 等^[8] 研究发现乳腺浸润性导管癌中 HIF-2 α 通过增加血管形成促进肿瘤转移,且 HIF-2 α 高表达与腋窝淋巴结转移密切相关。Winter 等^[9] 对头颈部鳞癌患者进行研究,发现 HIF-2 α 主要在细胞核表达,仅部分在细胞质表达,HIF-2 α 的表达与患者生存率和无瘤生存率无明显相关性。本研究结果显示,鼻咽癌组织中 HIF-2 α 表达的阳性率为 41.3%,显著高于鼻咽黏膜炎性组织,表明 HIF-2 α 在鼻咽癌的发生中起重要作用。研究还发现 HIF-2 α 表达与鼻咽癌 T 分期显著相关,随着 T 分期的提高,HIF-2 α 表达显著增加,提示随着肿瘤的增大、侵袭部位的增加,肿瘤缺氧程度加重,HIF-2 α 通过诱导缺氧相关基因的表达使肿瘤适应缺氧性改变,因此可认为 HIF-2 α 可能是促进鼻咽癌进展的一个重要因素。但本组研究未发现 HIF-2 α 表达与淋巴结转移及临床分期的相关性,考虑与本组研究的病例少及病例分组分布不均匀有关,有待进一步扩大样本量进行临床观察和深入研究。

细胞增殖与凋亡的失衡是恶性肿瘤形成机制之一已属共识,研究显示 Caspase-3 在细胞凋亡中起

关键性作用,与肿瘤的发生、发展和预后密切相关^[10]。Hsia 等^[11] 研究发现食管鳞癌中 Caspase-3 蛋白的低表达促进了肿瘤的发生和发展,Caspase-3 阳性表达患者的 5 年生存率为 25%,而阴性表达患者仅为 6%,认为 Caspase-3 表达状况可能是食管鳞癌独立的预后因素。Oudejans 等^[12] 对 36 例行根治性放疗的鼻咽癌患者进行研究,发现 Caspase-3 活性降低与较高的 T、N 分期显著相关。本研究显示 Caspase-3 主要在鼻咽癌及鼻咽慢性炎症组织的细胞质表达,偶有少量细胞核和细胞质同时表达。鼻咽癌组织中 Caspase-3 蛋白阳性表达率显著低于鼻咽慢性炎症组织,提示在鼻咽癌形成过程中可能存在 Caspase-3 蛋白表达的缺失,致使细胞的凋亡过程受到抑制,进而促进肿瘤的形成。本研究未发现 Caspase-3 表达状况与患者 T 分期、颈淋巴结转移及临床分期有相关性,这与相关报道不尽相同。

在本研究中 Caspase-3 蛋白阳性表达的 28 例鼻咽癌中 HIF-2 α 蛋白有 21 例呈阴性表达,而 Caspase-3 蛋白阴性表达的 18 例鼻咽癌中 HIF-2 α 蛋白有 12 例却呈阳性表达,经 Spearman 等级相关分析,相关系数为 -0.195,有负相关趋势,但无统计学意义($P > 0.05$),仍需进一步深入研究。

总之,HIF-2 α 和 Caspase-3 的异常表达在鼻咽癌的发生、发展过程中有一定作用。进一步评价 HIF-2 α 和 Caspase-3 在鼻咽癌诊断、治疗及预后评估方面的价值,仍需积累更多的临床资料进行深入研究。

参考文献:

[1] Raval RR, Lau KW, Tran WG, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 α in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(13):5675-5686.

[2] Dey S, Mactutus CF, Booze RM, et al. Cocaine exposure *in vitro* induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons by altering the Bax/Bcl-2 ratio and through caspase-3 apoptotic signaling[J]. *Neuroscience*, 2007, 144 (2):509-521.

[3] Koukourakis MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, et al. Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(5): 727-735.

[4] Törmänen-Näpänkangas U, Soini Y, Kahlos K, et al. Expression of caspases-3,-6 and-8 and their relation to apoptosis in non-small cell lung carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2001, 93(2): 192-198.

[5] Mattern J, Koomägi R, Volm M, et al. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(6): 1459-1463.

[6] 王健, 易继林, 王炜煜, 等. HIF-1 α 和 HIF-2 α 在肝癌细胞中的时相差异表达[J]. *中国癌症杂志*, 2006, 16(2):124-127.

[7] Park SK, Dadak AM, Haase VH, et al. Hypoxia-Induced Gene Expression Occurs Solely through the Action of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α): Role of Cytoplasmic Trapping of HIF-2 α [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (14): 4959-4971.

[8] Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α alpha (HIF-2 α) induces angiogenesis in breast carcinomas[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2006, 14(1): 78-82.

[9] Winter SC, Shah KA, Han C, et al. The Relation Between Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Expression With Anemia and Outcome in Surgically Treated Head and Neck Cancer [J]. *Cancer*, 2006, 107(4): 757-766.

[10] Jang JS, Kim KM, Choi JE, et al. Identification of Polymorphisms in the Caspase-3 Gene and Their Association With Lung Cancer Risk[J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47 (5):383-390.

[11] Hsia JY, Chen CY, Chen JT, et al. Prognostic significance of Caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2003, 29 (1):44-48.

[12] Oudejans JJ, Harijadi A, Cillessen SA, et al. Absence of Caspase-3 activation in neoplastic cells of nasopharyngeal carcinoma biopsies predicts rapid fatal outcome[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(7):877-885.

[编辑:黄国玲;校对:贺文]

(上接第 37 页)

总之,本实验结果显示,¹³¹I-Rituximab 经瘤内途径给药可以获得更好的放射免疫治疗效果。考虑到淋巴瘤为一全身性疾病,应以全身治疗为主。因此,本实验结果为下一步探讨全身放射免疫配合局部放射免疫治疗淋巴瘤这一新途径奠定了一定的基础。

参考文献:

[1] McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program[J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(8):2825-2833.

[2] Patel S, Stein R, Ong GL, et al. Enhancement of tumor-to-nontumor localization ratios by hepatocyte-directed blood clearance of antibodies labeled with certain residualizing radio-labels[J]. *J Nucl Med*, 1999, 40(8):1392-1401.

[3] Press OW, Rasey J. Principles of radioimmunotherapy for hematologists and oncologists[J]. *Semin Oncol*, 2000, 27 (6 Suppl 12):62-73.

[4] Kinuya S, Li XF, Yokoyama K, et al. Intraperitoneal radioimmunotherapy in treating peritoneal carcinomatosis of colon cancer in mice compared with systemic radioimmunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(7):650-654.

[5] Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, et al. Radioimmunotherapy with iodine (131)I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term

follow-up of the University of Michigan experience[J]. *Blood*, 2000, 96(4):1259-1266.

[6] Vose JM, Wahl RL, Saleh M, et al. Multicenter phase II study of iodine-131 tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade and transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(6):1316-1323.

[7] Reddy LH, Murthy RS. Pharmacokinetics and biodistribution studies of Doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques[J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2004, 148 (2):161-166.

[8] Dale RG. Dose-rate effects in targeted radiotherapy[J]. *Phys Med Biol*, 1996, 41(10):1871-1884.

[9] O'Donnell RT, DeNardo SJ, Yuan A, et al. Radioimmunotherapy with (111)In/ (90)Y-2IT-BAD-m170 for metastatic prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(6):1561-1568.

[10] Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, et al. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(6):1236-1243.

[11] Fani M, Vranjes S, Archimandritis SC, et al. Labeling of monoclonal antibodies with ¹⁵³Sm for potential use in radioimmunotherapy[J]. *Appl Radiat Isot*, 2002, 57(5):665-674.

[12] de Jong GM, Boerman OC, Heskamp S, et al. Radioimmunotherapy prevents local recurrence of colonic cancer in an experimental model[J]. *Br J Surg*, 2009, 96(3):314-321.

[编辑:刘红武;校对:安凤]