

# 肺结节组织中 Caspase 3 和 Caspase9 蛋白表达在良恶性诊断及肺癌临床病理特征中的价值研究

陈敬信<sup>1</sup>, 王小玲<sup>2</sup> (1. 陕西省森工医院病理科, 西安 710300; 2. 渭南市第二医院病理科, 陕西渭南 714000)

**摘要:** 目的 探讨肺结节组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine aspartic acid-specific protease, Caspase) 3, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine aspartic acid-specific protease, Caspase) 9 蛋白表达在其良恶性诊断及肺癌临床病理特征中的价值研究。方法 选择 2018 年 1 月~2020 年 7 月在陕西省森工医院诊治的 86 例肺结节患者作为研究对象, 并根据病理诊断结果分为良性结节 46 例 (良性组) 和恶性结节 40 例 (恶性组)。然后采用免疫组织化学法检测两组患者肺结节组织中 Caspase 3, Caspase 9 蛋白表达情况, 调查恶性肺结节的病理特征, 并进一步分析 Caspase 3 和 Caspase 9 表达阳性率与病理特征的相关性。结果 恶性组的 Caspase 3 和 Caspase 9 表达阳性率分别为 70.0% 和 82.5%, 显著高于对照组 (13.0%, 15.2%), 差异均有统计学意义 ( $\chi^2=29.035, 38.932$ , 均  $P<0.001$ )。在恶性组中, 不同组织学分化、淋巴结转移、临床分期患者的 Caspase 3, Caspase 9 表达阳性率对比差异有统计学意义 ( $\chi^2=5.614 \sim 15.920$ , 均  $P<0.05$ )。Pearson 相关性分析显示组织学分化、淋巴结转移、临床分期与 Caspase 3, Caspase 9 表达阳性率均呈显著正相关 ( $r=0.591 \sim 0.762$ , 均  $P<0.05$ )。结论 肺结节组织中 Caspase 3, Caspase 9 蛋白呈现高表达状况, 也与患者的病理特征存在相关性, 因此其临床检测有利于肺结节良恶性的临床鉴别诊断。

**关键词:** 肺结节; 良恶性; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9; 诊断价值; 病理特征  
中图分类号: R734.2; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 04-092-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.018

## Value of Caspase3 and Caspase9 Protein Expression in Lung Nodules in Diagnosis of Benign and Malignant and Clinicopathological Characteristics of Lung Cancer

CHEN Jing-xin<sup>1</sup>, WANG Xiao-ling<sup>2</sup> (1. Department of Pathology, Shaanxi Sengong Hospital, Xi'an 710300, China; 2. Department of Pathology, the Second Hospital of Weinan, Shaanxi Weinan 714000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the value of Caspase3 and Caspase9 protein expression in lung nodules in the diagnosis of benign and malignant and the clinical pathological characteristics of lung cancer. **Methods** 86 patients with pulmonary nodules who were diagnosed and treated in Shaanxi Sengong Hospital from January 2018 to July 2020 were selected as the research objects. And according to the pathological diagnosis results, they were divided into 46 cases of benign nodules (benign group) and 40 cases of malignant nodules (malignant group). Then immunohistochemical method was used to detect the expression of Caspase3 and Caspase9 protein in the lung nodules of the two groups of patients. The pathological characteristics of malignant lung nodules were investigated and the correlation between the positive rate of Caspase3 and Caspase9 expression and pathological characteristics was further analyzed. **Results** There were 46 cases were pathologically diagnosed as benign nodules (benign group) and 40 cases were malignant nodules (malignant group). The positive rates of Caspase3 and Caspase9 expression in the malignant group were 70.0% and 82.5%, respectively, which were higher than 13.0% and 15.2% in the control group, the differences were statistically significant ( $\chi^2=29.035, 38.932$ , all  $P<0.001$ ). In the malignant group, the positive rates of Caspase3 and Caspase9 expression in patients with different histological differentiation, lymph node metastasis, and clinical stages were significantly different ( $\chi^2=5.614\sim15.920$ , all  $P<0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that histological differentiation, lymph node metastasis, clinical staging were significantly positively correlated with the positive rates of Caspase3 and Caspase9 ( $r=0.591\sim0.762$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** The high expression of Caspase3 and Caspase9 proteins in lung nodule tissue was also related to the pathological characteristics of the patient. Therefore, their clinical detection is beneficial to the clinical differential diagnosis of benign and malignant pulmonary nodules.

**Keywords:** pulmonary nodules; benign and malignant; Caspase 3; Caspase 9; diagnostic value; pathological features

肺癌为全球发病率最高的恶性肿瘤之一, 多由肺结节发展而来。尽管多数肺结节为良性, 但是

作者简介: 陈敬信 (1964-), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 病理诊断, E-mail: chenjingxin651027@163.com。

通讯作者: 王小玲 (1974-), 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤诊断、免疫组化方面, E-mail: 544677517@qq.com。

也有部分结节是早期肺癌,因此对于肺结节进行早期定性诊断具有重要价值<sup>[1]</sup>。影像学可对肺结节的形态学改变进行整体判断,肺结节的病灶比较小,恶性征象更少,导致常规影像学诊断效果不佳<sup>[2]</sup>。细胞凋亡是通过基因控制的细胞的自主死亡,产生这一现象的主要原因是由一系列具有高度调控的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid-specific protease, Caspase)通过级联反应形成的<sup>[3]</sup>。Caspase 3是Caspase家族最重要的效应成员之一,其主要负责调控细胞凋亡的下游,使细胞内的底物进行降解导致细胞死亡,从而利于机体处于平衡状态<sup>[4]</sup>。据以往报道显示,对于淋巴上皮组织恶性程度以及预后情况可通过Caspase 3水平判断,其对肺癌的诊断与治疗也起到了一定作用,在侵袭性肺癌细胞中的表达上调<sup>[5]</sup>。Caspase 9作为参与内质网介导细胞凋亡的生物标志分子,在多种癌细胞的凋亡中均起到了一定的作用。聂美玲等<sup>[6]</sup>研究显示,血清Caspase 9可介导神经母细胞与宫颈癌细胞的凋亡。本文具体探讨了肺结节组织中Caspase 3和Caspase 9蛋白良恶性诊断中的价值,希望避免该病

的过度诊断及治疗。现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2018年1月~2020年7月在陕西省森工医院诊治的肺结节患者86例作为研究对象,纳入标准:①患者年龄20~70岁;②病灶直径0.4~1.5 cm,符合肺结节的诊断标准(经手术切除后病理证实);③预计生存时间 $\geq 3$ 个月;④具有完整临床及影像学资料;⑤研究得到了医院伦理委员会的批准。排除标准:①并发其他部位肿瘤的患者;②临床及影像学资料缺乏者;③妊娠与哺乳期妇女;④心肺功能不全,肝肾功能严重障碍。

86例患者中,病理诊断为良性结节46例(良性组),恶性结节40例(恶性组)。见表1。两组的性别、年龄、体重指数、结节部位等对比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ ),结节最大径对比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

另外,在恶性组中,组织学分化:高分化26例,中分化8例,低分化6例;病理类型:鳞癌21例,腺癌19例;淋巴结转移19例;临床分期:I期22例,II期10例,III期8例。

表1 两组患者一般资料对比

类别	良性组(n=46)	恶性组(n=40)	t或 $\chi^2$	P
性别(男/女)	23/23	21/19	0.054	0.817
年龄(岁)	45.69 $\pm$ 1.58	45.98 $\pm$ 2.11	0.727	0.469
体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	22.74 $\pm$ 2.14	22.67 $\pm$ 1.98	0.157	0.876
结节部位(中央型/周围型)	25/21	22/18	0.004	0.952
结节最大径(cm)	1.22 $\pm$ 0.24	0.78 $\pm$ 0.11	10.657	<0.001

1.2 仪器与试剂 免疫组织化学试剂盒, EVOS成像系统(美国赛默飞世尔科技有限公司);多克隆抗体Caspase 3和Caspase 9(英国Abcam公司),倒置光学显微镜(德国徕卡公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 蛋白表达检测:采用免疫组织化学染色法对肺结节组织中Caspase 3和Caspase 9阳性表达情况进行检测,其工作浓度分别为1:500和1:200,阴性对照采用磷酸盐缓冲溶液(取代一抗),阳性对照采用已知的阳性切片。

将病理组织进行石蜡包埋并切片,脱蜡水化后进行清洗,封闭处理后分别加入Caspase 3蛋白一抗和Caspase 9蛋白一抗溶液,4℃孵育1天后,对应二抗溶液常规孵育30 min。清洗后进行DAB显色,苏木素复染后封片。按照染色强度+阳性细胞百分数进行综合积分,无染色为0分,浅染色为1分,棕黄色为2分,深棕色为3分;没有阳性细胞为0分,低于10%的阳性细胞为1分,10%~50%的阳性细胞为2分,50%~100%的阳性细胞为3分。综合积分 $\geq 4$ 分为阳性表达。

1.3.2 调查内容:调查患者的病历资料,包括姓名、性别、年龄、体重指数、病理类型、临床分期、组织学分化、淋巴结转移、结节最大径、结节部位等。

1.4 统计学分析 数据分析选择SPSS20.00,计量数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,行t检验;计数数据用n(%)表示,行 $\chi^2$ 检验,采用Pearson相关进行相关性分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 两组患者Caspase 3和Caspase 9表达阳性率对比 恶性组肺结节组织中Caspase 3[28(70.0%)]和Caspase 9[33(82.5%)]表达阳性率均显著高于对照组[6(13.0%), 7(15.2%)],差异均有统计学意义( $\chi^2=29.035, 39.932$ , 均 $P<0.05$ )。

2.2 不同病理特征患者的Caspase 3和Caspase 9表达阳性率比较 见表2。不同病理类型患者肺结节组织中Caspase 3和Caspase 9表达阳性率比较,差异均无统计学意义(均 $P<0.05$ )。恶性组中,不同淋巴结转移、组织学分化、临床分期患者肺结节组织中Caspase 3和Caspase 9表达阳性率对比,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$ )。

表2 不同病理特征患者的 Caspase 3 和 Caspase 9 表达阳性率比较 [ $n=40, n(\%)$ ]

类别	$n$	Caspase3 表达阳性率 ( $n=28$ )	$\chi^2$	$P$	Caspase9 表达阳性率 ( $n=33$ )	$\chi^2$	$P$
组织学分化	高分化	26	15(57.69)	5.614	0.029	17(57.58)	15.920
	中分化	8	7(87.50)			8(100.00)	
	低分化	6	6(100.00)			6(100.00)	
病理类型	鳞癌	21	14(66.67)	0.234	0.629	17(80.95)	0.073
	腺癌	19	14(73.68)			16(84.21)	
淋巴结转移	是	19	19(100.00)	15.510	0.000	19(100.00)	7.677
	否	21	9(42.86)			14(66.67)	
临床分期	I 期	22	11(50.00)	9.524	0.009	15(68.18)	6.942
	II 期	10	9(90.00)			10(100.00)	
	III 期	8	8(100.00)			8(100.00)	

2.3 恶性结节 Caspase 3 和 Caspase 9 表达阳性率与病理特征的相关性 见表3。Pearson 相关性分析显示组织学分化、淋巴结转移、临床分期与肺结节组织中 Caspase 3 和 Caspase 9 表达阳性率均呈正相关 (均  $P<0.05$ )。

表3 恶性结节 Caspase3 和 Caspase9 表达阳性率与病理特征的相关性 ( $n=40$ )

类别	Caspase3		Caspase 9	
	$r$	$P$	$r$	$P$
组织学分化	0.654	0.000	0.762	0.000
淋巴结转移	0.598	0.004	0.677	0.000
临床分期	0.611	0.002	0.591	0.003

### 3 讨论

肺结节是人类较为常见的呼吸道病变之一,肺结节多是一种边界清楚或模糊、单发的结节病变,由于居民年龄增加与病毒感染等因素的影响,肺恶性结节在我国的发病人数逐年增加<sup>[7-8]</sup>。现代研究表明 Caspases 3 对细胞凋亡的过程起到决定性作用<sup>[9]</sup>。而细胞凋亡又是一个复杂的过程, Caspases 家族的激活是细胞凋亡发生机制中最关键的环节之一。Caspases 家族由两部分构成,分别为起始型 Caspases 与效应型 Caspases,其中 Caspase 9 属于起始型 Caspases,其主要职能是启动凋亡和调节效应型 Caspases 的活性;而 Caspase3 属于效应型 Caspases,其主要职能是对细胞凋亡的参与者与终结者。尤其是经过激活的 Caspase 3,可通过降解多种底物直接使细胞发生凋亡<sup>[10]</sup>。本研究表明肺癌细胞多伴随有 Caspase 3 和 Caspase 9 的高表达。不过也有研究认为 Caspase 3 水平明显下降,这可能与肺癌的恶性程度、异质化程度有关,同时还发现肺癌患者若出现 Caspase 3 蛋白表达缺失,则更加容

易发生淋巴结转移,而且伴随有预后不良<sup>[11-12]</sup>。

早期肺癌以肺结节形成存在,随着病灶不断增大,该病的恶性特征越明显。肺癌的形成是一个由正常细胞逐渐向恶性转化的过程,这是通过多阶段、多因素、长期相互作用形成的,可在多种基因(如抑制凋亡基因、促凋亡基因、凋亡效应基因等)共同作用下调控肿瘤细胞的凋亡<sup>[13-14]</sup>。从机制上分析, Caspase 3 和 Caspase 9 蛋白均为执行细胞凋亡较为重要的因子,主要通过级联效应导致细胞凋亡。而癌症的临床分期、淋巴结转移、组织学分化等均可能是 Caspase 3 和 Caspase 9 异常表达的影响因素,其表达的异常可能促进了癌症的发生、发展过程<sup>[15]</sup>。本研究 Pearson 相关性分析显示恶性肺结节的组织学分化、淋巴结转移、临床分期与 Caspase 3 和 Caspase 9 表达阳性率都存在相关性,从机制上分析,细胞凋亡的过程主要是由 Caspase 家族进行调控的,其中 Caspase 9 可在凋亡信号传导的多个途径中发挥作用<sup>[16-17]</sup>。

Caspase 3 一般情况是以酶原的形式存在于胞浆中,当发生细胞凋亡时则立即被激活,激活后由两个大亚基和两个小亚基组成,然后将胞浆胞核底物进行裂解,使细胞发生凋亡<sup>[18]</sup>。同时本研究还有不足之处,如样本量相对较小,未从基因表达水平方面探讨两者与良恶性结节间是否存在差异,将在后续研究中深入分析。

总之, Caspase 3 和 Caspase 9 蛋白在恶性肺结节中呈现高表达状况,也与患者的病理特征存在相关性,有利于肺结节良恶性的临床鉴别诊断。

### 参考文献:

- [1] CLARK M E, BEDFORD L E, YOUNG B, et al. Lung cancer CT screening: Psychological responses in the presence and absence of pulmonary nodules[J]. Lung Cancer, 2018, 124:160-167.



- [2] 毛娟娟, 程伟松, 杨亦德, 等. 顺铂联合小檗碱通过诱导 DNA 损伤和 ROS 依赖性凋亡抑制肺癌细胞 A549 的生长 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(6): 844-851.  
MAO Juanjuan, CHENG Weisong, YANG Yide, et al. Cisplatin in combination with berberine suppresses lung cancer cell A549 growth through induction of DNA damage and ROS-dependent apoptosis [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(6): 844-851.
- [3] MAHIB M R, HOSIJIMA S, KUSHIYAMA H, et al. Caspase-7 mediates caspase-1-induced apoptosis independently of Bid[J]. Microbiology and Immunology, 2020, 64(2): 143-152.
- [4] 王笑, 李鑫, 杨学刚, 等. 非小细胞肺癌微波消融术后血清 Caspase-4 变化及意义 [J]. 中华肺部疾病杂志 (电子版), 2020, 13(2): 218-222.  
WANG Xiao, LI Xin, YANG Xuegang, et al. Changes and significance of serum Caspase-4 in patients with non-small cell lung cancer after microwave ablation [J]. Chinese Journal of Lung Diseases (Electronic Edition), 2020, 13(2): 218-222.
- [5] XU Xiaotao, ZHU Qingwei, NIU Fangfang, et al. A2BAR activation attenuates acute lung injury by inhibiting alveolar epithelial cell apoptosis both in vivo and in vitro [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2018, 315(4): C558-C570.
- [6] 聂美玲, 王业亚, 陈俊文. 虫草素调节非小细胞肺癌细胞株细胞周期、凋亡及相关抑癌基因的实验研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(8): 826-829.  
NIE Meiling, WANG Yeya, CHEN Junwen. Experimental study of cordycepin regulating cell cycle, apoptosis and related tumor suppressor genes in non-small cell lung cancer cell lines [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2020, 19(8): 826-829.
- [7] NAKAJIMA J. Advances in techniques for identifying small pulmonary nodules[J]. Surgery Today, 2019, 49(4): 311-315.
- [8] LI Bin, WANG Zhiwei, ZHOU Kang, et al. Safety and feasibility within 24 h of discharge in patents with inoperable malignant lung nodules after percutaneous microwave ablation [J]. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2016, 12(Supplement): C171-C175.
- [9] 张昊, 崔秀洁, 郭玉华, 等. 放疗联合安罗替尼对小细胞肺癌患者胱天蛋白酶 3、多腺苷二磷酸核糖聚合酶表达的影响研究 [J]. 癌症进展, 2020, 18(6): 603-605.  
ZHANG Hao, CUI Xiujie, GUO Yuhua, et al. Effects of radiotherapy combined with anlotinib on the expression of Caspase 3 and poly (ADP-ribose) polymerase in patients with small cell lung cancer [J]. Oncology Progress, 2020, 18(6): 603-605.
- [10] 于哲, 李晓敏, 槐梅, 等. 核仁纺锤体相关蛋白 1 激活 AKT/mTOR 信号通路促进肺癌进展 [J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(7): 551-555.  
YU Zhe, LI Xiaomin, HUAI Mei, et al. NUSAP1 promotes lung cancer progression by activating AKT/mTOR signaling pathway[J]. Chinese Journal of Oncology, 2020, 42(7): 551-555.
- [11] 耿良, 吕静, 范敬. 肺瘤平膏联合环磷酰胺化疗对肺癌的抑瘤作用和酸性微环境的影响 [J]. 北京大学学报 (医学版), 2020, 52(2): 247-253.  
GENG Liang, LÜ Jing, FAN Jing. Effect of Fei-Liu-Ping ointment combined with cyclophosphamide on lung cancer cell proliferation and acidic microenvironment [J]. Journal of Peking University(Health Sciences), 2020, 52(2): 247-253.
- [12] WANG Limin, LI Xueqin, REN Yinghui, et al. Cancer-associated fibroblasts contribute to cisplatin resistance by modulating ANXA3 in lung cancer cells[J]. Cancer Science, 2019, 110(5): 1609-1620.
- [13] CAO Xiaopei, HE Yuanzhou, LI Xiaochen, et al. The IRE1  $\alpha$ -XBP1 pathway function in hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling, is upregulated by quercetin, inhibits apoptosis and partially reverses the effect of quercetin in PSMCs[J]. American Journal of Translational Research, 2019, 11(2): 641-654.
- [14] 赵格, 高琼, 余宗涛, 等. 肺癌患者血浆 miR-3151 表达水平与临床病理特征的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5): 28-32.  
ZHAO Ge, GAO Qiong, YU Zongtao, et al. Study on the correlation between the expression of miR-3151 in plasma and clinicopathological features in patients with lung cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(5): 28-32.
- [15] 叶奇, 梁应凤, 郭姗姗, 等. 健脾益肾方对非小细胞肺癌细胞体外增殖凋亡作用的实验研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(5): 574-577.  
YE Qi, LIANG Yingfeng, GUO Shanshan, et al. Effect of Jianpi Yishen prescription on proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells in vitro [J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 41(5): 574-577.
- [16] 赵英伦, 马元, 莫森, 等. 腰椎间盘突出症患者血清中 Caspase-3 和 Caspase-9 活性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 13-15.  
ZHAO Yinglun, MA Yuan, MO Sen, et al. Serum Caspase-3 and Caspase-9 activity in patients with lumbar intervertebral disc protrusion [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(2): 13-15.
- [17] JIN Qing, LIN Cunzhi, ZHU Xinhong, et al.  $^{125}\text{I}$  seeds irradiation inhibits tumor growth and induces apoptosis by Ki-67, P21, survivin, livin and Caspase-9 expression in lung carcinoma xenografts [J]. Radiation Oncology (London, England), 2020, 15(1): 238.
- [18] LI Yi, YU Hong, ZHAO Liang, et al. Effects of carbon nanotube-mediated Caspase-3 gene silencing on cardiomyocyte apoptosis and cardiac function during early acute myocardial infarction [J]. Nanoscale, 2020, 12(42): 21599-21604.

收稿日期: 2020-11-30

修回日期: 2021-09-17