

The Expression of Bcl-2, Bcl-xL and Bax Protein in Colorectal Carcinomas

Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白在结直肠癌中的表达

LI Yu-li, HU Jing-zi, LIU Hui-min, YU Hong-yu,
HE Jin, ZHU Wei-jian
(Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military
Medical University, Shanghai 200003, China)

李玉莉/胡静姿/刘惠敏/
余宏宇/何金/朱维健
(第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003)

【摘要】背景与目的：通过检测结直肠癌与癌旁组织中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达，以探讨其在结直肠癌发生发展中的作用。材料与方法：应用免疫组化 S-P 法检测 39 例结直肠癌组织与癌旁组织中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白表达的情况。结果：Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 的阳性颗粒均主要分布于细胞质/膜，在癌旁组织中，Bcl-2 阳性颗粒主要分布于陷窝的底部，Bax 主要分布在靠近表面的上皮细胞，Bcl-xL 则分布于整个陷窝。Bcl-2 蛋白的表达在癌组织和癌旁组织都很低，两者之间差异无统计学意义 ($Z = 0.072, P > 0.05$)，Bcl-xL 蛋白的表达均较高，且癌组织高于癌旁组织 ($Z = 3.157, P < 0.05$)；Bax 蛋白的表达最强，但在癌组织和癌旁组织之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；只有 Bcl-2 蛋白表达与 Dukes 分期和 TNM 分期均成负相关 (分别为 $r_s = -0.389, -0.396, P < 0.05$)，Bcl-xL 和 Bax 蛋白表达与临床病理相关因素 (性别、年龄、肿瘤大小、发生部位、组织学类型、分化程度、Dukes 分期及 TNM 分期) 均无关 ($P > 0.05$)。结论：Bcl-2 可能只在结直肠癌发生发展的早期起重要作用，而后期可能 Bcl-xL 起更主要的作用，而 Bcl-2 蛋白表达可能会与预后有关。

【关键词】 结直肠癌；Bcl-2；Bcl-xL；Bax；免疫组织化学；细胞凋亡

中图分类号：R735.34 文献标识码：A 文章编号：1004-616X(2007)01-0053-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To investigate the role of Bcl-2, Bcl-xL and Bax protein in colorectal carcinomatous tumorigenesis by detecting their expression in cancerous and adjacent tissues (> 5cm from the cancerous tissue). MATERIALS AND METHODS: The expression of Bcl-2, Bcl-xL and Bax protein by S-P staining were detected in 39 colorectal cancerous tissues and adjacent tissues. RESULTS: The expression of Bcl-2 protein were often absent or weak, and no significant difference between cancerous tissue and adjacent tissue was found ($Z = 0.072, P > 0.05$). On the contrary, the immunostaining intensity of Bcl-xL protein was higher and stronger in cancerous tissues than adjacent tissues ($Z = 3.157, P < 0.05$). The immunostaining intensity of Bax protein was the strongest, but showed no significant difference between cancerous and adjacent tissues ($Z = 1.707, P > 0.05$). Only the expression of Bcl-2 protein demonstrated a negative correlation with Dukes and TNM stages ($r_s = -0.389, -0.396, P < 0.05$), all others had no relationship with clinicopathological parameters ($P > 0.05$). CONCLUSION: Bcl-2 gene might play an important role in the early stage of colorectal carcinomas, however, Bcl-xL gene might be more important in the later stage. On the other hand, Bcl-2 protein expression may correlate with prognosis.

【KEY WORDS】 colorectal carcinomas; Bcl-2; Bcl-xL; Bax; immunohistochemistry; apoptosis

结直肠癌是临床最常见的恶性肿瘤之一。大量的研究已表明，肿瘤的发生发展和细胞增殖与凋亡动态平衡

受破坏有关^[1-2]。Bcl-2 家族蛋白是重要的细胞凋亡调节因子，它们中如 Bcl-2、Bcl-xL 抑制细胞凋亡，Bax、Bak 则

收稿日期：2005-11-29；修订日期：2005-12-25

作者简介：李玉莉(1953-)女，山东人，副主任医师，Tel: 021-63610109 转

73705 E-mail: ykzhh@163.com.

促进凋亡,这些调节因子表达的改变不仅影响正常细胞的凋亡,还影响肿瘤细胞的凋亡。大多数抗癌药物也是通过诱导肿瘤细胞的凋亡来发挥细胞毒作用。因此,我们检测 Bcl-2 家族蛋白在该肿瘤中的表达,以期对结直肠癌的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集长征医院 2004 年 11 月~2005 年 4 月期间术前未经化疗、放疗或免疫治疗的结直肠癌患者手术标本 39 例,癌组织和癌旁组织(距癌组织超过 5 cm)各 1 份。所有病例均经术后病理诊断明确。

1.1.2 临床资料 男性 24 例,女性 15 例,年龄 27~88(59.43±15.30)岁,直肠癌 26 例,结肠癌 13 例。按照新 WHO 标准(IARC Press,2000)腺癌 32 例,粘液腺癌 6 例,未分化癌 1 例;分化程度高、中、低及未分化分别为 9 例、18 例、11 例、1 例;DukesA 期 12 例,B 期 10 例,C 期 14 例,D 期 3 例,TNM 分期(UICC,2002) I 期 12 例,II 期 10 例,III 期 13 例,IV 期 4 例。

1.1.3 试剂 鼠抗 Bcl-2 单克隆抗体(克隆号 100/D5,即用型)、鼠抗 Bcl-xL 多克隆抗体(克隆号 2H12,1:20 稀释),鼠抗 Bax 多克隆抗体(克隆号 2D2,1:20 稀释)均购自上海长岛生物技术有限公司,S-P 试剂盒和 DAB 显色液购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 方法 采用 S-P 法,10% 中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋切片(厚度 4 μm),贴于涂有多聚赖氨酸的玻片上,常规脱蜡至水,0.3% 过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶,高温高压修复抗原,其余步骤按试剂盒说明操作,PBS 代替一抗作为阴性对照,Bcl-xL、Bax 用已知阳性切片作阳性对照,Bcl-2 以同一组织切片中的淋巴滤泡为阳性对照。

1.3 结果判定 用阳性细胞数量和着色程度两相加权法,阳性细胞数 < 5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,25%~50% 为 2 分,> 50%~75% 为 3 分,> 75% 为 4 分;着色程度淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;两者相加,总分 1~2 分记为 -,3 分记为 +,4 分记为 ++,≥5 分为 +++。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 11.5 软件进行分析,采用 Wilcoxon 符号秩检验和 Spearman 秩相关检验,以 α = 0.05 为检验水准。

2 结果

2.1 结直肠癌与癌旁组织中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达

Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 的阳性颗粒均主要分

布于细胞质/膜,(图 1),在癌旁肠粘膜中,Bcl-2 阳性颗粒主要分布于陷窝的底部(图 1a),而 Bcl-xL 阳性颗粒分布于整个陷窝(图 1b);Bax 阳性颗粒主要分布于靠近表面的上皮细胞(图 1c);在癌组织中,Bcl-2 表达相对较弱(图 1d);Bcl-xL 表达中到强阳性(图 1e);Bax 表达强阳性(图 1f)。Bcl-2 表达强度较弱,Bcl-xL 中等,Bax 较强,它们在癌与癌旁组织中的表达情况(见表 1、2),结果表明只有 Bcl-xL 在癌与癌旁组织之间的差异具有统计学意义($Z = 3.157, P < 0.05$)。

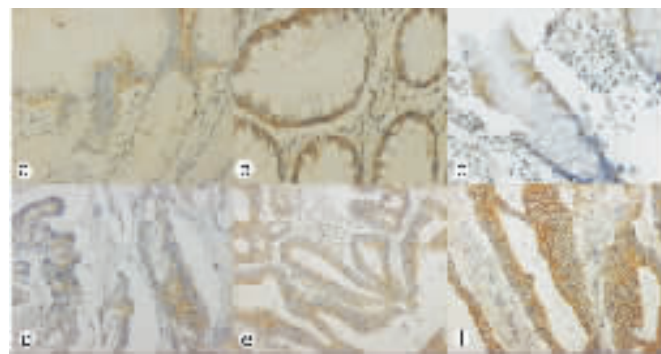


图 1 结直肠癌与癌旁组织中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白的免疫组织化学染色结果(SP 法 × 100)

Figure 1 Expression of Bcl-2, Bcl-xL and Bax protein in colorectal tumor and adjacent tissues(S-P method, × 100)

表 1 结直肠癌与癌旁组织中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达 (n = 39)
Table 1 Expression of Bcl-2, Bcl-xL and Bax protein in colorectal tumor and adjacent tissues (n = 39)

Target gene	Tumor tissue				Adjacent tissue			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Bcl-2	24	12	3	0	26	9	4	0
Bcl-xL	5	9	17	8	9	13	12	5
Bax	4	9	12	14	8	12	6	13

表 2 结直肠癌与癌旁组织中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白表达的比较 (n = 39)
Table 2 Comparison of the expression of Bcl-2, Bcl-xL and Bax protein in colorectal tumor and adjacent tissues (n = 39)

Target gene	Tumor > adjacent tissue*	Tumor = adjacent tissue**	Tumor < adjacent tissue***	P value
Bcl-2	8	24	7	0.942
Bcl-xL	22	12	5	0.03
Bax	14	18	7	0.088

* The expression level is stronger in tumor tissue than in adjacent tissue, ** means equal, *** means weaker.

2.2 结直肠癌组织中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达与临床病理相关因素的关系 Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达与性别、年龄、发生部位、组织学类型、分化程度、淋巴结转移与否、Dukes 分期及 TNM 分期都无关 ($P > 0.05$),但 Bcl-2 蛋白表达与 Dukes 分期和 TNM 分期都成负相关 ($P < 0.05$),而与其他因素无关(表 3)。

表 3 结直肠癌中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白的表达与肿瘤分期的关系 (n = 39)
Table 3 Correlation between expression of Bcl-2, Bcl-xL, Bax protein and tumor stage

Tumor stage	Bcl-2					Bcl-xL					Bax					
	-	+	++	+++	P value	-	+	++	+++	P value	-	+	++	+++	P value	
Dukes stage	A	4	5	3	0		2	1	7	2		2	4	2	3	
	B	7	3	0	0	$r_s = -0.389$	0	3	5	2	$r_s = -0.036$	1	0	3	6	$r_s = -0.094$
	C	12	2	0	0	$P = 0.013$	2	4	3	5	$P = 0.826$	1	4	5	4	$P = 0.563$
	D	2	1	0	0		0	1	1	0		0	0	2	1	
TNM stage	I	4	5	3	0		2	1	7	2		2	4	2	3	
	II	7	3	0	0	$r_s = -0.396$	0	3	5	2	$r_s = -0.040$	1	0	3	6	$r_s = -0.096$
	III	11	2	0	0	$P = 0.012$	2	4	3	4	$P = 0.820$	1	3	5	4	$P = 0.567$
	IV	3	1	0	0		0	1	1	1		0	1	2	1	

3 讨论

细胞凋亡与肿瘤的关系是近年来的研究热点之一，细胞凋亡调控的失调是导致肿瘤发生发展的重要方面，其中 Bcl-2 家族备受重视。Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 是该家族中的重要成员，它们主要通过线粒体途径参与凋亡调控，当细胞受到死亡信号刺激，与 Bcl-2 或 Bcl-xL 相结合的 Bax 就会被置换出来，线粒体膜通透性增加，释放出的一系列物质，最终导致细胞死亡^[2]。

研究证实许多实体肿瘤和血液系统肿瘤中凋亡相关基因表达异常，主要是抑凋亡基因表达上调，促凋亡基因表达下调^[1-3]，而且 Bcl-2/Bax 的比值对于决定细胞接受死亡刺激信号后存活与否起关键性作用^[4]。但是有关结直肠癌的报道众说纷纭，有的报道它们的表达情况与其他大多数肿瘤相似^[5]，有的则不尽然^[6]。

本实验的结果显示在结直肠癌患者的癌旁组织中 Bcl-2 表达主要分布在陷窝的底部，而 Bax 主要分布在靠近表面的上皮细胞，它们在正常肠粘膜组织中的这种分布，对于陷窝基底细胞的正常增殖，表面上皮细胞的正常更新，维持正常粘膜的新陈代谢，防止肿瘤的发生具有重要意义。同时本实验结果也显示在结直肠癌组织和癌旁组织水平中 Bcl-2 表达均较低，但其蛋白表达水平与肿瘤的 Dukes 分期和 TNM 分期呈负相关，而 Bcl-xL 和 Bax 的表达均较强，其中 Bcl-xL 的表达癌组织强于癌旁组织，Bax 在两者之间表达无差异，与 Maurer 等^[7]的结论相似，所以我们推测在结直肠癌发展的不同阶段凋亡受抑制的机制是不同的，在肿瘤晚期 Bcl-2 参与抑制凋亡的作用可能显得不那么重要，而 DCC、Bcl-xL 等基因的作用反而更突出，本实验结果显示在肿瘤晚期 Bcl-xL 表达也是很高的，虽然它的表达与肿瘤分期无关。另有一些研究者发现 Bcl-2 在结直肠腺瘤中呈高表达状态，癌组织中表达就降低了，这些似乎都提示 Bcl-2 可能只在结直肠癌发生发展的早期起重要作用^[7]，而后期 Bcl-xL 的作用可能更重要，而且已有研究者证实

Bcl-xL 的抑凋亡作用比 Bcl-2 强^[8]，所以，我们还认为在治疗中应该设计针对 Bcl-xL 而非 Bcl-2 靶点的药物。

虽然 Bcl-2 可能在结直肠癌的发展过程中起的作用不如 Bcl-xL，但 Bcl-2 蛋白在肿瘤早期的病例中表达更高，预示 Bcl-2 蛋白高表达预后可能更好，而 Bcl-xL 和 Bax 则因与肿瘤病理相关因素均无关，不能作为评价临床病理情况的参考指标。当然由于我们的样本比较小和缺乏随访资料，尚有待进一步完善以证实结果的可靠性。

参考文献：

- [1] Groeger AM, Esposito V, De-Luca A, et al. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers[J]. *Histopathology*, 2004, 44(1): 54-63.
- [2] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590-8607.
- [3] Gobe G, Rubin M, Williams G, et al. Apoptosis and Expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in Renal Cell Carcinomas[J]. *Cancer Invest*, 2002, 20(3): 324-332.
- [4] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis[J]. *Science*, 1998, 281(5385): 2027-2031.
- [5] 王 举, 忠 霞, 韩喜春, 等. 大肠癌及癌旁组织中抑凋亡基因 bcl-2 和促凋亡基因 bax 的表达及意义 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2002, 9(4): 252-254.
- [6] Paradiso A, Simone G, Lena MD, et al. Expression of apoptosis-related markers and clinical outcome in patients with advanced colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(5): 651-658.
- [7] Suzuki Y, Honma T, Hayashi S, et al. Bcl-2 expression and frequency of apoptosis correlate with morphogenesis of colorectal neoplasia[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(3): 212-216.
- [8] Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, et al. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL[J]. *Nature*, 1995, 374(6525): 811-813.

