

结肠癌组织中抗凋亡基因 bag-1 和 bcl-2 的表达及意义

孙念峰, 王国斌, 陈景波

Expression and Significance of Anti-apoptotic Gene bag-1 and bcl-2 in Colorectal Cancer

SUN Nianfeng, WANG Guo-bin, CHEN Jing-bo

Department of General Surgery, Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract: **Objective** To investigate bag-1 and bcl-2 expressions in colorectal cancer and evaluate their clinical significance. **Methods** bag-1 and bcl-2 expressions were studied by immunohistochemical Streptavidin-Biotin Peroxidase Complex (SABC) method in 64 samples of colorectal cancer tissues, 10 normal colorectal tissues, and their clinical significance were analyzed. **Results** The positive rate of bag-1 expression in the colorectal carcinoma tissues was 64.1%, and it was 10.0% in the normal colorectal tissues ($P < 0.05$). Similarly, the positive rate of bcl-2 expression in the carcinoma tissues was 70.3%, it was 10.0% in the normal tissues ($P < 0.05$). Though, bag-1 was positively related to the tumor grade, it was not related to the pathological cell types. On the other hand, bcl-2 correlated neither to the tumor grade nor to the pathological cell types. There is a positive correlation between bag-1 and bcl-2 ($r = 0.475$). **Conclusions** There are over expression of bag-1 and bcl-2 protein in colorectal cancer, they can affect the generation of colorectal cancer by participating in the regulation of apoptosis. bag-1 and bcl-2 might serve as a biomarker to diagnose the earlier period colorectal cancer, and it was significance in prognosis of colorectal cancer.

Key words: Colorectal cancer; bag-1; bcl-2; Apoptosis

摘要: **目的** 研究抗凋亡基因 bag-1 和 bcl-2 在结肠癌组织中的表达及意义,并探讨二者之间的关系。**方法** 应用免疫组织化学 SABC 法对 64 例结肠癌组织及 10 例正常结肠组织中 bag-1 和 bcl-2 基因的表达进行检测。**结果** 结肠癌组织中 bag-1 和 bcl-2 蛋白阳性表达率分别为 64.1% 和 70.3%, 显著高于结肠正常组织 10.0% ($P < 0.05$); bag-1 和 bcl-2 在结肠癌中的表达与结肠癌病理类型无关,但 bag-1 与病理分级密切相关 ($P < 0.05$), 而 bcl-2 与病理分级无明显相关性 ($P > 0.05$); 抗凋亡基因 bag-1 和 bcl-2 在结肠癌的发生发展过程中呈正相关, $r = 0.475$ 。**结论** 结肠癌组织中有不同水平的 bag-1 和 bcl-2 蛋白的高表达, 两者相互作用并通过调节细胞凋亡而参与结肠癌的发生、发展, 它们可以作为结肠癌早期筛选的一项指标, 并对疾病的预后有着重要意义。

关键词: 结肠癌; bag-1; bcl-2; 细胞凋亡

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2006)03-0180-03

0 引言

结肠癌是人类胃肠道最常见的恶性肿瘤之一, 且其发病率有逐年上升的趋势。细胞凋亡障碍是肿瘤发生的重要机制之一, 目前的研究表明, 凋亡是一个多受基因控制的过程^[1]。bag-1 是最近才发现的一种多功能结合蛋白, 它具有与抗凋亡基因 bcl-2 相互结合, 相互影响, 从而促进细胞抗凋亡的能力^[1-4], 抗凋亡基因 bag-1 在肿瘤发生发展中的作用正成为国内外研究的热点问题之一, 但目前国内关

于它在胃肠道肿瘤发病中作用的研究尚未见有关报道。在本研究中我们采用免疫组织化学研究了 64 例结肠癌中 bag-1 和 bcl-2 的表达情况, 并就其临床意义及相互关系作了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 收集 2001~2003 年手术切除的结肠癌石蜡包埋组织块 64 例, 均来自协和医院病理科存档标本, 标本均经过 4% 多聚甲醛灌注固定, 常规石蜡包埋连续切片, 厚约 5 μ m。病人年龄范围为 35~67 岁。按 WHO 病理分级, 腺癌 46 例, 粘液癌 10 例, 未分化癌 8 例。其中高分化腺癌 18 例, 中分化 18 例, 低分化 10 例。同时选择 10 例正常结肠组织石

收稿日期: 2005-04-18; 修回日期: 2005-10-20

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2001AA218051)

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科

蜡标本作对照。

1.2 方法 兔抗人多克隆 bag-1 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。兔抗人 bcl-2 抗体和 SABC 免疫试剂盒购自北京中山生物制品公司。采用 SABC 法测定 bag-1 和 bcl-2 的表达,抗 bag-1 的工作浓度 1:50,生物素化单抗和 SABC 试剂的工作浓度均为 1:100。石蜡组织连续切片 5μm,载玻片防脱片处理,常规脱蜡至水。石蜡切片经热抗原修复,滴加正常山羊血清封闭过夜,室温 20min,甩去多余液体,滴加 1:50 抗 bag-1 或 bcl-2 抗体,4 度孵育过夜,次日滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20 ~ 37 度 20min,再滴加 SABC 试剂,20 ~ 37 度 20min,PBS 5min × 4 次,DAB 室温显色 20 min,苏木素复染,脱水,透明,封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性反应片作阳性对照。

1.3 判定标准 bag-1 和 bcl-2 皆以胞质、胞核棕黄色为阳性。在 10 ×40 倍光镜下随机观察 5 个视野,计算其平均数,每个视野计数 100 个细胞。bag-1 阳性细胞占肿瘤细胞数 < 10 % 为低表达(+),10 % ~ 30 % 为中度表达(++),> 30 % 为高表达(+++)。bcl-2 阳性细胞占肿瘤细胞数 < 30 % 为低表达(+),30 % ~ 50 % 为中度表达(++),> 50 % 为高表达(+++)。

1.4 统计学方法 阳性表达率比较用 χ^2 检验,bag-1 与 bcl-2 的关系采用相关系数(*r*)分析。

2 结果

2.1 bag-1 和 bcl-2 在结肠癌组织中的表达

2.1.1 bag-1 的表达 bag-1 在结肠癌组织的免疫组化染色分为不表达、胞质表达、胞核表达和在二者同时表达四种形式。大部分表达在胞核,小部分表达在胞质,呈棕黄色颗粒,染色强弱不等。bag-1 在 10 例正常组织中只有 1 例阳性表达,阳性率为 10 %,在结肠癌组织中的阳性表达有 41 例,阳性率为 61.4 %,二者有显著性差异($P < 0.05$),见图 1、图 2、图 5。

2.1.2 bcl-2 的表达 bcl-2 蛋白的表达部位主要在细胞核或胞质,成灶状或弥漫状分布。在 10 例结肠正常组织中,bcl-2 蛋白阳性表达 1 例,阳性率为 10 %,主要在胞核成灶性分布。在 64 例结肠癌组织标本中,bcl-2 蛋白表达阳性 45 例,阳性率为 70.3 %,在胞核或胞浆内呈灶状或弥漫分布的棕黄色颗粒。在结肠癌组织中 bcl-2 蛋白表达明显高于正常组织,二者有显著差异($P < 0.05$),见图 3、图 4、图 6。

2.2 bag-1 与 Bcl-1 表达与病理类型的关系 bag-

1 蛋白在 46 例腺癌中有 29 例阳性表达,阳性率为 63.0 %;在 10 例粘液癌中有 7 例阳性表达,阳性率为 70.0 %;在 8 例未分化癌中阳性表达有 5 例,阳性率为 62.5 %。经 χ^2 检验, $P > 0.05$,三者之间无显著差异。bcl-2 蛋白在腺癌中有 32 例阳性表达,阳性率为 71.1 %,在粘液癌中有 8 例阳性表达,阳性率为 80.0 %,在未分化癌中,阳性 5 例,阳性率 62.5 %。经 χ^2 检验, $P > 0.05$,三者之间无显著差异,见表 1。

表 1 bag-1 和 bcl-2 蛋白表达与结肠癌临床病理特征之间的关系

临床病理特征	例数 (n)	bag-1 表达		bcl-2 表达	
		(%)	P	(%)	P
病理分型					
腺癌	46	29(63.0)		32(71.1)	
粘液癌	10	7(70.7)	>0.05	8(80.0)	>0.05
未分化癌	8	5(62.5)		5(62.5)	
病理分级					
高分化腺癌	18	6(33.3)		13(72.2)	
中分化腺癌	18	14(77.7)	<0.05	15(83.3)	>0.05
低分化腺癌	10	9(90.0)		8(80.0)	
正常组织	10	1(10.0)		1(10.0)	

2.3 bag-1 和 bcl-2 的表达与结肠癌病理分级的关系 在 18 例高分化、18 例中分化和 10 例低分化腺癌中,bag-1 蛋白分别有 6 例、14 例和 9 例阳性表达,其阳性表达率用 χ^2 检验进行比较 $P < 0.05$,三者之间有显著性差异。在相应的高、中、低分化腺癌标本中,bcl-2 的阳性表达结果经 χ^2 检验 $P > 0.05$,三者之间无显著差异,见表 1。

2.4 bag-1 和 bcl-2 表达的相互关系 在 64 例结肠癌标本中,bag-1、bcl-2 共同阳性表达的有 27 例,共同阴性表达的有 7 例,通过对 64 例结肠癌标本中 bag-1 与 bcl-2 蛋白的平均阳性表达数进行相关系数分析, $r = 0.475$,二者成正相关。

3 讨论

bag-1 基因是 Takayama 等 1985 的首先报道的一种抗凋亡基因,其分泌蛋白是一种已经被确认的多功能结合蛋白,它不属于 bcl-2 家族成员,但可与之相互结合,相互作用,增强其抗凋亡的能力^[1-4]。bag-1 在正常组织中几乎不表达,而在乳腺癌、肺癌、前列腺癌、甲状腺癌及胃肠道恶性肿瘤中都有阳性表达^[5,6]。Shou-Ching Tang^[1]认为 bag-1 蛋白可以作为乳腺癌发病机理中的一种分子标记,并可作为影响乳腺癌预后的一项独立预后因素。Kikuchi 等^[7,8]的实验表明在结肠癌标本中 bag-1 在细胞核表达阳性的病人中,其伴有远处转移的比率要高于胞核表达阴性的病人,且其 5 年生存率要明显低于

其他病人。本实验结果表明, bag-1 在结肠癌组织中的阳性表达明显高于正常组织, 且 bag-1 蛋白在结肠癌细胞的胞质和胞核都有阳性表达, 这可能是由于 bag-1 mRNA 在翻译起始过程中产生两种主要的蛋白, 其中短的蛋白分子 (bag-1S) 主要是存在于胞质中, 而长的蛋白分子 (bag-1L) 则主要定位于胞核, 而本试验所用的多克隆 bag-1 抗体可以同时作用于这两种形式的 bag-1 蛋白分子^[7]。bag-1 的表达与结肠癌组织的细胞类型无关, 而与结肠癌的病理分级密切相关, 病理分级越高, 其阳性表达率也越高, 说明 bag-1 在肿瘤的发生及发展过程中都起着重要的作用, 对 bag-1 的深入研究可能对结肠癌的早期诊断及预后产生深远的影响。

bcl-2 是一种抗凋亡基因, 其通过抑制细胞凋亡而参与肿瘤的发生, 在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等多种肿瘤研究中, bcl-2 与肿瘤的分级、分期及预后无关^[10,11]。但国内外也有部分研究认为 bcl-2 的表达与肿瘤的分级、分期及预后有关, 这可能是应用了不同的免疫组织化学方法, 不同的抗体及各地的实验室条件不同所导致。同时一些研究也认为 bcl-2 的表达是一些肿瘤产生耐药的机制之一^[9]。本实验结果表明, bcl-2 在各种细胞类型及病理分级的结肠癌组织中阳性表达率都很高, 其间无显著差异, 说明 bcl-2 的表达与结肠癌的细胞类型及病理分级没有明显相关性, bcl-2 可能参与了结肠癌的发生过程, 但可能与肿瘤的发展分化无关。

bag-1 基因是一个正调节 bcl-2 抗细胞凋亡的蛋白, bag-1 基因并非 bcl-2 家族成员的同源物, 但其启动子区与 bcl-2 具有高度同源性, 两者可以形成复合物, 并相互作用, 从而增强细胞抗凋亡的能力, 其作用机制也许与影响蛋白质的稳定性有关^[3,9,11]。

本研究发现, 在结肠癌组织中, bag-1 与 bcl-2 的阳性表达成正相关, 表明结肠癌的发生发展是由多基因调控的, 其中 bag-1 与 bcl-2 基因在其发病过程中发挥着重要作用, 且它们之间具有相互增强的

作用。研究探索它们在结肠癌发生发展过程中的作用, 对结肠癌的早期诊断和指导治疗有着重要的意义。

(本文图见第 214 页)

参考文献:

- [1] Shou-Ching Tang. Bag-1, An anti-apoptotic tumour marker [J]. IUMBM Life, 2002, 53(2): 99-105.
- [2] Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, et al. BAG-1: a multi-functional regulator of cell growth and survival [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1603(2): 83-98.
- [3] Ito Y, Yoshida H, Nakano K, et al. Bag-1 expression in thyroid neoplasm: its correlation with Bcl-2 expression and carcinoma dedifferentiation [J]. Anticancer Res, 2003, 23(1B): 569-576.
- [4] Cutress RI, Townsend PA, Brimmell M, et al. BAG-1 expression and function in human cancer [J]. Br J Cancer, 2002, 87(8): 834-839.
- [5] Turner BC, Krajewski S, Krajewska M, et al. Bag-1, a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2001, 19(12): 992-1000.
- [6] Noguchi T, Takeno S, Shibata T, et al. Nuclear BAG-1 expression is a biomarker of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Dis Esophagus, 2003, 16(2): 107-111.
- [7] Kikuchi R, Noguchi T, Takeno S, et al. Nuclear Bag-1 expression reflects malignant potential in colorectal carcinomas [J]. British Journal of cancer, 2002, 87(11): 1136-1139.
- [8] Kikuchi R, Noguchi T, Takeno S, et al. Immunohistochemical detection of membrane-type-1-matrix metalloproteinase in colorectal carcinoma [J]. Br J Cancer, 2000, 83(3): 215-218.
- [9] Takahashi N, Yanagihara M, Ogawa Y, et al. Down-regulation of Bcl-2-interacting protein BAG-1 confers resistance to anti-cancer drugs [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(3): 798-803.
- [10] 刘浩淼, 朱朝晖, 曾甫清, 等. 膀胱移行细胞癌中 P53 突变 Bcl-2 的表达及其临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(6): 125-127.
- [10] Antoku K, Maser RS, Scully WJ Jr, et al. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286(5): 1003-1010.

[编辑:周永红]

胃癌腹膜高转移潜能细胞系的建立及其生物学特性

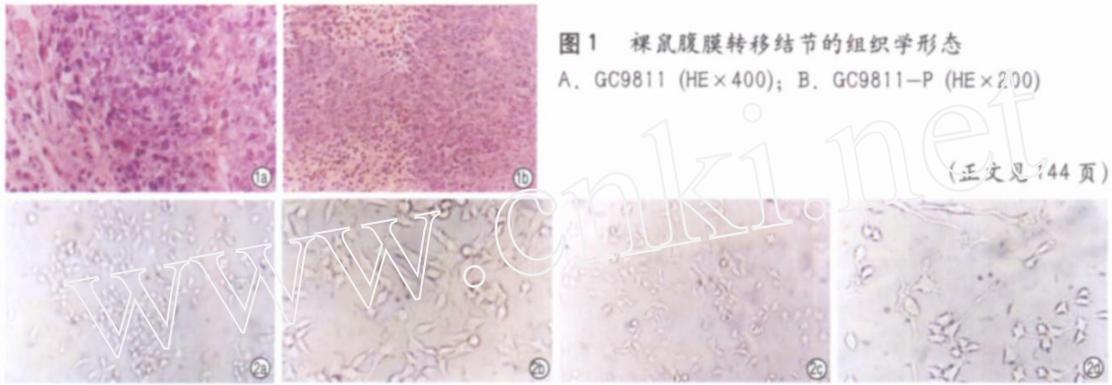


图1 裸鼠腹膜转移结节的组织学形态
A. GC9811 (HE×400); B. GC9811-P (HE×200)

(正文见144页)

图2 光镜下的细胞形态
A. GC9811 × 100; B. GC9811×200; C. GC9811-P×100; D. GC9811-P×200

结肠癌组织中抗凋亡基因 bag-1 和 bcl-2 的表达及意义

(正文见180页)

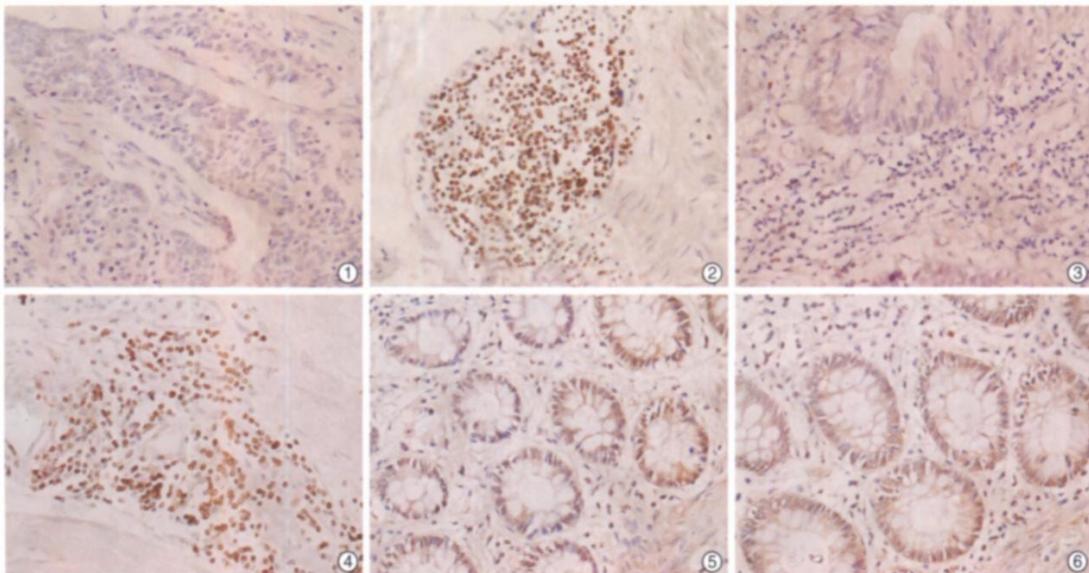


图1 bag-1 在结肠癌组织中的阴性表达
 图2 bag-1 在结肠癌组织中的阳性表达 (细胞核)
 图3 bcl-2 在结肠癌组织中的阴性表达
 图4 bcl-2 在结肠癌组织中的阳性表达 (细胞核)
 图5 bag-1 在正常结肠组织中的阴性表达
 图6 bcl-2 在正常结肠组织中的阴性表达