

bag-1、bcl-2 在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义

金 军, 袁宏银, 熊 斌

Expression and Significance of bag-1 and bcl-2 in Colorectal Adenoma and Carcinoma

JIN Jun, YUAN Hong-ying, XIONG Bin

Department of Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of anti-apoptotic gene bag-1 and bcl-2 and their clinical significances in colorectal carcinoma. **Methods** The expressions of bag-1 and bcl-2 in 20 normal colorectal mucosa, 35 colorectal adenoma and 82 colorectal carcinoma were examined with S-P immunohistochemical staining. **Results** The positive rates of bag-1 in normal colorectal mucosa, colorectal adenoma and carcinoma were 10%, 60%, 81% respectively. The positive rates of bcl-2 in colorectal mucosa, adenoma and carcinoma were 25%, 80%, 65% respectively. The positive rates of bag-1 and bcl-2 expression in colorectal adenoma and carcinoma were significantly higher than that in normal colorectal mucosa ($P < 0.05$). A significant correlation was found between bag-1 expression in colorectal carcinoma and their clinicopathological features such as differentiation degree, Duke's stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expressions of bcl-2 were not related to the age and sex of patients, differentiation degree, Duke's stage and lymph node metastasis ($P > 0.05$). **Conclusion** bag-1 and bcl-2 overexpression might play an important role in the occurrence of colorectal carcinoma. The expression levels of bag-1 protein is related to the malignant degree of colorectal carcinoma and may be a new biomarker in predicting the potent invasion and the metastasis of colorectal carcinoma.

Key words: bag-1; bcl-2; Colorectal adenoma; Colorectal carcinoma

摘 要: **目的** 探讨抗凋亡基因 bag-1、bcl-2 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌中的表达变化及与大肠癌发生、发展和转移的关系。 **方法** 采用免疫组化 SP 法, 分别检测 20 例正常大肠黏膜、35 例大肠腺瘤和 82 例大肠癌中 bag-1、bcl-2 蛋白表达情况。 **结果** bag-1 蛋白在正常肠黏膜、大肠腺瘤、大肠癌中阳性表达率分别为 10%、60%、81%。 bcl-2 蛋白在正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌中阳性表达率分别为 25%、80%、65%。 大肠腺瘤和大肠癌中 bag-1、bcl-2 蛋白表达阳性率均显著高于正常大肠黏膜 ($P < 0.05$)。 bag-1 蛋白表达与大肠癌分化程度、Duke's 分期及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。 而 bcl-2 蛋白表达与性别、年龄、癌肿分化程度、Duke's 分期及淋巴结转移无关 ($P > 0.05$)。 **结论** bag-1、bcl-2 蛋白高表达对大肠癌的发生均起重要作用, 而 bag-1 表达水平与大肠癌的恶性程度有关, 可作为预测大肠癌浸润转移潜能的新的生物学指标。

关键词: bag-1; bcl-2; 大肠腺瘤; 大肠癌

中图分类号: R735.3⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)05-0284-03

0 引言

我们采用免疫组化 SP 法对大肠腺瘤、大肠癌组织中 bag-1、bcl-2 蛋白的表达情况进行观察, 并探讨它们在大肠癌发生、发展及转移中的作用和相互关系, 为临床预测肿瘤的转移潜能及预后提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2000 年 6 月 ~ 2001 年 3 月手术切除

经病理证实的大肠腺瘤标本 35 例, 大肠癌标本 82 例。另外选取正常大肠黏膜标本 20 例作为对照观察。82 例大肠癌标本中, 男 42 例, 女 40 例。年龄 22 ~ 78 岁。平均年龄 55.6 岁, 术前均未作任何抗肿瘤治疗。高分化腺癌 28 例, 中分化 39 例, 低分化 15 例。Duke's 分期: A 期 26 例, B 期 22 例, C 期 21 例, D 期 1 例。32 例有淋巴结转移。

1.2 试剂及免疫组化染色方法

鼠抗人 bcl-2 单克隆抗体、兔抗人 bag-1 多克隆抗体及 SP 试剂盒均购自福州迈新生物技术公司。其稀释度均为 1 : 100。所有标本均用 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 4μm 连续切片, 按 SP 法进行免

收稿日期: 2004-03-05; 修回日期: 2004-10-27

作者单位: 430071 武汉大学中南医院肿瘤科

疫组化染色,染色前标本切片进行抗原修复处理,一抗在 4℃冰箱过夜,DAB 显色,苏木素复染。用已知阳性的大肠癌标本作 bag-1 和 bcl-2 抗体的阳性对照,用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.3 判断标准

在 10×40 倍光镜下随机观察 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞。bag-1 染色阳性为胞核和胞质呈棕黄色,bag-1 染色阳性细胞 > 10 % 为阳性表达(+)。bcl-2 染色阳性为胞质呈棕黄色,bcl-2 染色阳性细胞 > 5 % 为阳性表达(+)。

1.4 统计学方法

统计结果采用 SPSS 11.5 软件进行 ² 检验、Fisher 精确检验、Kruskal-Wallis 法和两种属性相关分析,规定双侧 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 或 <0.01 为差异有显著性。

2 结果

2.1 正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌组织中 bag-1、bcl-2 蛋白的表达情况

bag-1 蛋白在正常大肠黏膜、大肠腺瘤、大肠癌组织中阳性表达见图 1、3,阳性表达率分别为 10 % (2/20)、60 % (21/35) 和 81 % (66/82),阳性表达率呈上升趋势,统计学分析发现差异有显著性 ($P<0.05$)。而 bcl-2 蛋白在上述三种组织中阳性表达

率分别为 25 % (5/20)、80 % (28/35) 和 65 % (53/82),大肠腺瘤和大肠癌阳性表达见图 2、4,大肠腺瘤和大肠癌组织中 bcl-2 蛋白表达阳性率均高于正常大肠黏膜 ($P<0.05$),而大肠腺瘤与大肠癌相比,前者高于后者 ($P<0.05$),见表 1。

2.2 bag-1、bcl-2 蛋白表达与大肠癌临床病理特征的关系

bag-1、bcl-2 蛋白阳性表达率与大肠癌患者的年龄、性别无关(未列入统计表中 $P>0.05$)。其中 bag-1 蛋白高表达与大肠癌分化程度、Duke's 分期和淋巴结转移有关 ($P<0.05$),在肿瘤中高分化、Duke's A+B 期,无淋巴结转移的大肠癌组织中,bag-1 蛋白表达阳性率分别为 77 % (52/67)、70 % (34/48) 和 28 % (14/50),而在肿瘤低分化、Duke's C+D 期、有淋巴结转移的大肠癌中 bag-1 蛋白表达阳性率分别为 93 % (14/15)、94 % (32/34) 和 96 % (30/32)。可见在肿瘤分化程度越低、Duke's 分期越晚和淋巴结转移的大肠癌中 bag-1 蛋白表达越明显。而 bcl-2 蛋白表达与大肠癌分化程度、Duke's 分期和淋巴结转移无关 ($P>0.05$),见表 2。

2.3 bag-1、bcl-2 蛋白表达的相互关系

82 例大肠癌标本中,bag-1、bcl-2 同时阳性表达者 48 例,占 57 % (48/82),统计学分析发现二者呈正相关 ($P<0.05$, $r=0.3827$),见表 3。

表 1 bag-1、bcl-2 蛋白在正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌中的表达情况

组别	例数	bag-1 蛋白表达(例 %)			bcl-2 蛋白表达(例 %)		
		阴性	阳性	<i>P</i>	阴性	阳性	<i>P</i>
正常肠黏膜	20	18 (90)	2 (10)		15 (75)	5 (25)	
大肠腺瘤	35	24 (40)	21 (60)	<0.05	7 (20)	28 (80)	<0.05
大肠癌	82	16 (19)	66 (81)	<0.05	29 (35)	53 (65)	<0.05

表示与正常大肠黏膜相比较 $P<0.05$; 表示大肠癌与大肠腺瘤相比较 $P<0.05$

表 2 bag-1、bcl-2 蛋白表达与大肠癌临床病理特征的关系

生物学指标	例数	bag-1 蛋白表达			bcl-2 蛋白表达		
		阴性	阳性	<i>P</i>	阴性	阳性	<i>P</i>
分化程度							
高分化	28	10	18	$<0.05^*$	6	22	$>0.05^*$
中分化	39	5	34		16	23	
低分化	15	1	14		7	8	
Duke's 分期							
A 期	26	12	14	$<0.05^*$	9	19	
B 期	22	2	20		20	12	$>0.05^*$
C 期	21	1	20		7	13	
D 期	13	1	12		3	9	
淋巴结转移							
有	32	2	30	<0.05	5	27	>0.05
无	50	14	36		24	26	

* 表示 Kruskal-Wallis 法

表 3 大肠癌中 bag-1、bcl-2 蛋白表达的相关性

bag-1 蛋白表达	例数	bcl-2 蛋白表达		P
		阴性	阳性	
阴性	16	11	5	< 0.01
阳性	66	18	48	

3 讨论

文献报道 90 % 以上的大肠癌来源于腺瘤^[1]。本组研究中,正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌中的 bcl-2 蛋白阳性表达率分别为 25 %、80 %、65 %。大肠癌 bcl-2 蛋白阳性率显著高于正常大肠黏膜,从大肠腺瘤到大肠癌,bcl-2 阳性表达率又明显减弱。表明 bcl-2 过表达是大肠癌发生的早期事件,与 Sinicrope 等^[2]研究结果一致。提示 bcl-2 作为抑制凋亡的基因,其过表达能延长细胞寿命,使已有 DNA 受损的细胞生存期延长,以致增加其他基因突变的机会,如 ras 基因的突变,p53 基因的点突变和缺失,从而导致肿瘤的发生^[2]。Watson 等^[3]同时也发现,一旦大肠腺瘤转化为腺癌,则逐渐失去了 bcl-2 基因的表达,细胞凋亡受到抑制减低,凋亡有所增强,此时细胞增殖已明显占优势,肿瘤得以生长,这与本组研究结果相近。本实验显示 bcl-2 蛋白表达变化与大肠癌分化程度、Duke's 分期及淋巴结转移等临床病理特征关系不明显,这与 Watson 等的报道相符^[3]。

bag-1 基因是在 1995 年发现的一种新的抗凋亡基因^[4]。其主要功能可能是 bag-1 蛋白的 C-末端 BAG 区与 Hsc70/ Hsp70 的肽结合区结合,高水平的 Hsc70/ Hsp70A TP 酶区与蛋白底物作用而促进细胞的增殖^[5]。它还可激活 Raf-1 信号级联途径,调节细胞增殖信号^[6],另外还可与细胞核激素受体(如雌激素受体)、酪氨酸激酶受体(如肝细胞生长因子、血小板生长因子)结合^[7,8]。调整它们的功能,促进肿瘤的发生。bag-1 在正常组织中几乎不表达,而在乳腺癌、前列腺癌、大肠癌中都有阳性表达^[7,9,10]。本研究发现 20 例正常大肠黏膜,35 例大肠腺瘤和 82 例大肠癌组织中 bag-1 蛋白表达阳性率分别为 10 %、60 %和 81 %,阳性率呈上升趋势。可见,从正常大肠黏膜到大肠腺瘤的发生、发展过程中 bag-1 表达异常起到一定作用,bag-1 高表达参与了大肠黏膜由良性向恶性转化的过程,这与 Takayama 等的研究结果一致^[11]。同时本研究也发现 82 例大肠癌组织中 bag-1 高表达与肿瘤分化程度,Duke's 分期和淋巴结转移有密切关系。分化程度越低,Duke's 分期越晚和有淋巴结转移的患者中 bag-1 蛋白表达就越明显,说明 bag-1 高表达参与了大

肠癌的发展过程,进一步说明 bag-1 高表达抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,增强肿瘤细胞的转移能力。由此,作者认为 bag-1 高表达可作为一个预测大肠癌转移潜能以及不良预后的新的生物学指标。

Takayama 认为很多肿瘤的抗凋亡机制是由 bag-1 和/或 bcl-2 高表达引起的。虽然 bag-1 不属于 bcl-2 家族成员,但它可上调 bcl-2 的功能,与 bcl-2 形成复合物促进抗凋亡的能力^[4]。本研究为进一步研究肿瘤细胞抗凋亡基因的相互关系,对 bag-1 与 bcl-2 阳性表达进行相关分析,二者呈正相关($P < 0.05$, $r = 0.3827$),说明肿瘤的发生、发展是多基因调控的,其中抗凋亡基因 bag-1 与 bcl-2 之间又相互增强作用。

(本文图见封 3)

参考文献:

[1] Fearon ER, Vogelstein B, Miletu R, et al. A genetic model for colorectal tumor genesis [J]. Cell, 1990, 61(5): 759-766.

[2] Sinicrope FA, Rusan SB, Cleary KR, et al. bcl-2 and P53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis [J]. Cancer Res, 1995, 55(3): 237-241.

[3] Watson AJ, Merritt AJ, Jones LS, et al. Evidence of reciprocity of bcl-2 and P53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas [J]. Br J Cancer, 1996, 73(8): 889-894.

[4] Takayma S, Sato T, Krajewski S, et al. Cloning and functional analysis of bag-1: A novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity [J]. Cell, 1995, 80(2): 279-284.

[5] Briknarova K, Takayama S, Brive L, et al. Structural analysis of bag-1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein [J]. Nat Struct Biol, 2001, 8(2): 249-352.

[6] Song J, Takeda M, Morimoto RI, et al. bag-1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth [J]. Nature Cell Biol, 2001, 3(2): 276-282.

[7] Froesh BA, Takayama S, Reed JC, et al. bag-1 protein enhances androgen receptor function [J]. Biol Chem, 1998, 273(12): 11660-11666.

[8] Bardelli A, Longati P, Alberio D, et al. The receptor associates with the anti-apoptotic protein bag-1 and prevents cell death [J]. EMBO, 1996, 15(2): 6205-6212.

[9] Zapata JM, Krajewska M, Krajewski S, et al. Expression of multiple apoptosis-regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumor [J]. Breast Cancer Res Treat, 1998, 47(2): 129-140.

[10] Kikachi R, Noguchi T, Takeno S, et al. Nuclear bag-1 expression reflects malignant potential in colorectal carcinomas [J]. British J of cancer, 2002, 87(10): 1136-1139.

[11] Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, et al. Expression and location of Hsp 70/ Hsc binding anti-apoptotic protein bag-1 and its variants in normal tissues and tumour cell lines [J]. Cancer Res, 1998, 58(7): 3116-3131.

[编辑: 贺文; 校对: 杨卉]

bag-1、bcl-2 在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义

(正文见 284 页)

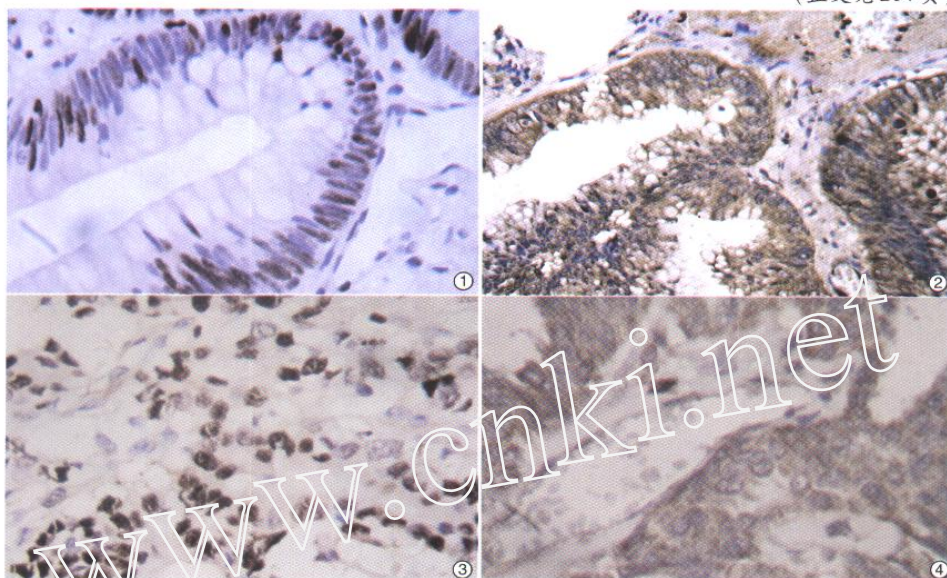


图1 大肠腺瘤细胞核 bag-1 阳性表达 (SP × 400)

图2 大肠腺瘤胞浆 bcl-2 阳性表达 (SP × 200)

图3 大肠癌细胞核 bag-1 阳性表达 (SP × 400)

图4 大肠腺瘤胞浆 bcl-2 阳性表达 (SP × 400)

肝细胞癌 VEGF、bFGF 与凋亡相关蛋白表达的关系

(正文见 276 页)

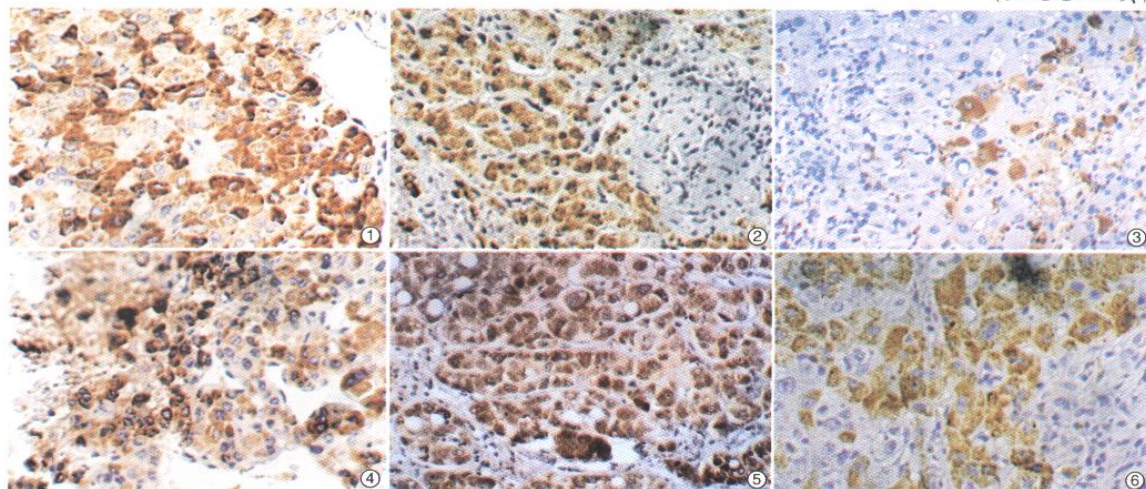


图1 免疫组化染色显示部分癌细胞胞浆/胞膜 VEGF 阳性 (棕黄色 × 400)

图2 免疫组化染色显示部分癌细胞胞浆/胞膜 bFGF 阳性 (棕黄色 × 400)

图3 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆/胞膜 Fas 阳性 (棕黄色 × 400)

图4 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆 bax 阳性 (棕黄色 × 400)

图5 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆 bcl-2 阳性 (棕黄色 × 400)

图6 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆 bcl-xl 阳性 (棕黄色 × 400)