

## Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub>和Bax在结直肠癌中的表达

胡静姿, 刘惠敏\*, 李玉莉, 何金, 朱维建

(第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**观察结直肠癌与癌旁组织中 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* 的表达, 探讨它们在结直肠癌发生发展中的可能作用。 **方法:**RT-PCR、免疫组化 MaxVision 一步法分别检测 40 例结直肠癌组织与癌旁组织中 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* mRNA 表达及其相应蛋白表达水平。 **结果:**癌组织和癌旁组织的 *Bcl-2* mRNA 及其蛋白表达水平都很低, 两者之间无显著差异; 两者 *Bcl-x<sub>L</sub>* mRNA 及蛋白表达水平均较高, 且癌组织明显高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ); 两者 *Bax* mRNA 及蛋白表达水平均较 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 高, 但两者间无显著差异。两者 *Bcl-2/Bax* 和 *Bcl-x<sub>L</sub>/Bax* 的比值间无显著差异。 *Bcl-2* 蛋白表达与 Dukes 分期和 TNM 分期都呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 与其他临床病理相关因素(性别、年龄、肿瘤大小、发生部位、组织学类型、分化程度)无明显相关; 而 *Bcl-x<sub>L</sub>*、*Bax* 在基因及蛋白水平的表达均与临床病理相关因素无关。 **结论:**结直肠癌中 *Bcl-x<sub>L</sub>* 在基因及蛋白表达水平明显强于 *Bcl-2*, 且明显高于癌旁组织; 前者可能促进了肿瘤的发生发展。 *Bcl-2* 蛋白表达与肿瘤分期呈负相关, 可作为评价结直肠癌临床预后的参考指标。

**[关键词]** 结直肠肿瘤; *Bcl-2*; *Bcl-x<sub>L</sub>*; *Bax*; 免疫组织化学; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R 735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0249-04

### Expression of *Bcl-2*, *Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bax* in colorectal carcinomas

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

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the expression of *Bcl-2*, *Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bax* in colorectal cancer tissues and their corresponding adjacent tissues (>5 cm from the tumor tissue), and to study their roles in the development and progression of colorectal cancer. **Methods:** The mRNA levels of *Bcl-2*, *Bcl-x<sub>L</sub>*, *Bax* were detected by RT-PCR and their protein levels were detected by MaxVision one step method in 40 colorectal cancer tissues and their corresponding adjacent tissues. **Results:** The mRNA and protein levels of *Bcl-2* were very low in both cancer tissues and adjacent tissues ( $P > 0.05$ ). Both cancer tissues and adjacent tissues had higher *Bcl-x<sub>L</sub>* mRNA and protein levels, with those of the cancer tissues obviously higher than those of the adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). The levels of *Bax* mRNA and protein were higher than those of *Bcl-2* and *Bcl-x<sub>L</sub>* in both tissues, but with no significant difference between the 2 tissues. The ratio of *Bcl-2/Bax* and *Bcl-x<sub>L</sub>/Bax* in 2 tissues had no significant difference, either. The expression of *Bcl-2* protein was negatively correlated with Dukes and TNM stages of the colorectal cancer ( $P < 0.05$ ), and was not correlated with other factors such as sex, age, tumor size, tumor location and morphological types. Levels of mRNA and protein of *Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bax* were not correlated with pathological factors. **Conclusion:** *Bcl-x<sub>L</sub>* expression is obviously higher than that of *Bcl-2* in colorectal tissues and also higher than that of *Bcl-x<sub>L</sub>* in adjacent tissues, suggesting that *Bcl-x<sub>L</sub>* may enhance the development and progression of colorectal cancer. *Bcl-2* may be a prognostic indicator for colorectal cancer because it is negatively correlated with tumor stages.

**[KEY WORDS]** colorectal neoplasms; *Bcl-2*; *Bcl-x<sub>L</sub>*; *Bax*; immunohistochemistry; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 249-252]

结直肠癌是临床最常见的恶性肿瘤之一。大量的研究<sup>[1,2]</sup>表明, 肿瘤的发生发展与细胞增殖、凋亡的动态平衡受破坏有关。Bcl-2 家族蛋白是重要的细胞凋亡调节因子, 它们中有些抑制细胞凋亡(如 Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub>), 有些则促进凋亡(如 Bax、Bak), 其表达的改变不仅影响 DNA 损伤或周期异常细胞的正常凋亡, 还影响肿瘤细胞自身的凋亡。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。所以, 本研究通过检测 Bcl-2 家族在结直肠癌中

的表达, 探讨它们在结直肠癌发生发展中的可能作用, 为结直肠癌的化学药物治疗和基因治疗提供新依据。

### 1 材料和方法

1.1 标本和试剂 收集第二军医大学长征医院

**[作者简介]** 胡静姿, 硕士, 住院医师。

\* Corresponding author. E-mail: minliuhui@126.com

2004年11月至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新鲜手术标本40例,癌组织和癌旁组织(距癌组织超过5cm)各2份,1份迅速放入冻存管,存于 $-196^{\circ}\text{C}$ 液氮;另1份用10%中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋以备免疫组化染色。所有病例均经病理检查确诊。小量组织/细胞总RNA快速抽提纯化试剂盒(W6701)购于上海华舜生物工程有限公司,RT kit(Cat:205111)购于Qiagen公司,PCR各试剂购于Promega公司,鼠抗单克隆Bcl-2蛋白抗体(上海长岛,克隆号100/D5,即用型)、兔抗多克隆Bcl-x<sub>L</sub>蛋白抗体(Santa Cruz Biotech Inc., clone S-18, 1:100稀释),兔抗多克隆Bax蛋白抗体(Santa Cruz Biotech Inc., clone N-20, 1:100稀释),MaxVision™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 一般资料 男25例,女15例,年龄27~88(59.43±15.30)岁,直肠癌27例,结肠癌13例。按照WHO最新标准(IARC Press,2000)腺癌33例,黏液腺癌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、12例、1例;Dukes A期12例,B期10例,C期15例,D期3例;TNM分期(UICC,2002)Ⅰ期12例,Ⅱ期10例,Ⅲ期14例,Ⅳ期4例。

### 1.3 RT-PCR

1.3.1 总RNA提取及cDNA合成 采用异硫氰酸胍一步法,按照W6701试剂盒操作说明提取,用核酸分析仪测定所提取RNA的浓度和纯度。按试剂盒说明合成cDNA,反应条件: $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。

1.3.2 引物设计、合成 Bcl-2<sup>[3]</sup>(459 bp):上游5'-GGT GCC ACC TGT GGT CCA CCT G-3',下游5'-GTT CAC TGT TGG CCC AGA TAG G-3'; Bcl-x<sub>L</sub>(211 bp):上游5'-GTG AAT GGA GCC ACT GCG CA-3',下游5'-CCC CAT CCC GGA AGA GTT CA-3'; Bax(209 bp):上游5'-GCC CAC CAG CTC TGA GCA GAT CAT-3',下游5'-CGG CAA TCA TCC TCT GCA GC-3'; GAPDH(500 bp):上游5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。后三者均用Vector NTI 7.0引物设计软件设计,由上海生工生物工程技术服务公司合成。

1.3.3 PCR扩增 反应体系为Taq DNA聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ )0.25  $\mu\text{l}$ , dNTP Mix (2.5 mmol/L)2  $\mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)1.5  $\mu\text{l}$ , 10×Reaction buffer 2.5  $\mu\text{l}$ ,目的基因引物各0.5  $\mu\text{l}$ ,GAPDH引物各

0.25  $\mu\text{l}$ (均10  $\mu\text{mol/L}$ ),cDNA 1  $\mu\text{l}$ ,共25  $\mu\text{l}$ 。

PCR反应条件: $94^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, $58\sim 64^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, $72^{\circ}\text{C}$ 延伸50 s,35个循环后延伸10 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.3.4 结果判定 扩增产物进行凝胶电泳后,BIO-RAD凝胶成像系统摄像,Quantity one 4.1.0软件进行半定量分析,以目的基因与GAPDH的比值为目的基因的相对含量。

1.4 免疫组化 采用MaxVision一步法,常规石蜡包埋切片,脱蜡至水,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-x<sub>L</sub>、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。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, $5\%\sim 25\%$ 为1分, $25\%\sim 50\%$ 为2分, $50\%\sim 75\%$ 为3分, $\geq 75\%$ 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++, $\geq 5$ 分为+++。

1.5 统计学处理 应用SPSS 11.5软件进行分析,癌组织与癌旁组织间基因表达的比较用Wilcoxon符号秩检验,mRNA水平与临床病理相关因素的关系采用Kruskal-Wallis检验,蛋白表达与临床病理相关因素的关系用Spearman秩相关。

## 2 结果

2.1 结直肠癌与癌旁组织中Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub>和Bax mRNA表达 结果显示结直肠癌与癌旁组织Bcl-2 mRNA表达均很低,大部分标本检测不到或只有很弱的条带,其平均mRNA水平分别为 $0.127\pm 0.073$ 、 $0.121\pm 0.080$ ,两者无明显差异( $Z=0.257$ , $P=0.797$ )。但所有的标本均能检测到Bcl-x<sub>L</sub> mRNA表达,癌与癌旁组织的平均mRNA水平分别为 $0.569\pm 0.214$ 、 $0.310\pm 0.176$ ,两者之间存在显著性差异( $Z=3.191$ , $P=0.01$ )。Bax在癌与癌旁组织中的平均mRNA水平则分别为 $0.658\pm 0.363$ 、 $0.593\pm 0.343$ ,两者之间无显著性差异( $Z=1.856$ , $P=0.063$ ,图1)。同时癌组织和癌旁组织间Bcl-2/Bax和Bcl-x<sub>L</sub>/Bax的比值均没有差异( $Z=0.240$ , $P=0.811$ ; $Z=0.768$ , $P=0.443$ )。

2.2 结直肠癌与癌旁组织中Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub>和Bax蛋白的表达 无论癌组织还是癌旁组织,Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub>和Bax蛋白的阳性颗粒均主要分布于细胞质;在癌旁组织中,Bcl-2蛋白阳性颗粒主要分布于陷窝的底部,Bax蛋白阳性颗粒主要分布在靠近表面的上皮

细胞,*Bcl-x<sub>L</sub>* 蛋白阳性颗粒则分布于整个陷窝(图2)。表达强度上 *Bcl-2* 蛋白较弱,*Bcl-x<sub>L</sub>* 蛋白中等强度,*Bax* 蛋白较强,癌组织中 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* 蛋白的总阳性率分别为 37.5%、87.5%和 90%,癌旁

组织中则分别为 32.5%、77.5%和 80%,它们在癌与癌旁组织中的表达情况详见表1,结果表明只有 *Bcl-x<sub>L</sub>* 蛋白在癌与癌旁组织之间的差异具有显著性意义( $Z=3.157, P=0.02$ )。

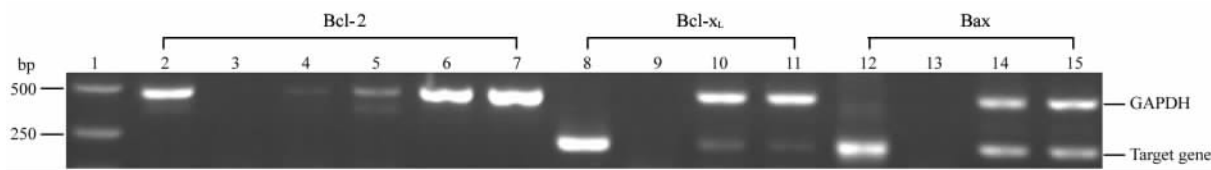


图1 结直肠癌与癌旁组织中 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* 的 RT-PCR 电泳结果

Fig 1 RT-PCR results of *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bax* in colorectal cancer tissues and adjacent tissues

1;Marker; 2,8,12; Positive controls; 3,9,13; Negative controls; 4,10,14; Tumor tissues; 5,11,15; Adjacent tissues; 6; T-GAPDH; 7; N-GAPDH. The right GAPDH labeling was just to *Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bax* gene

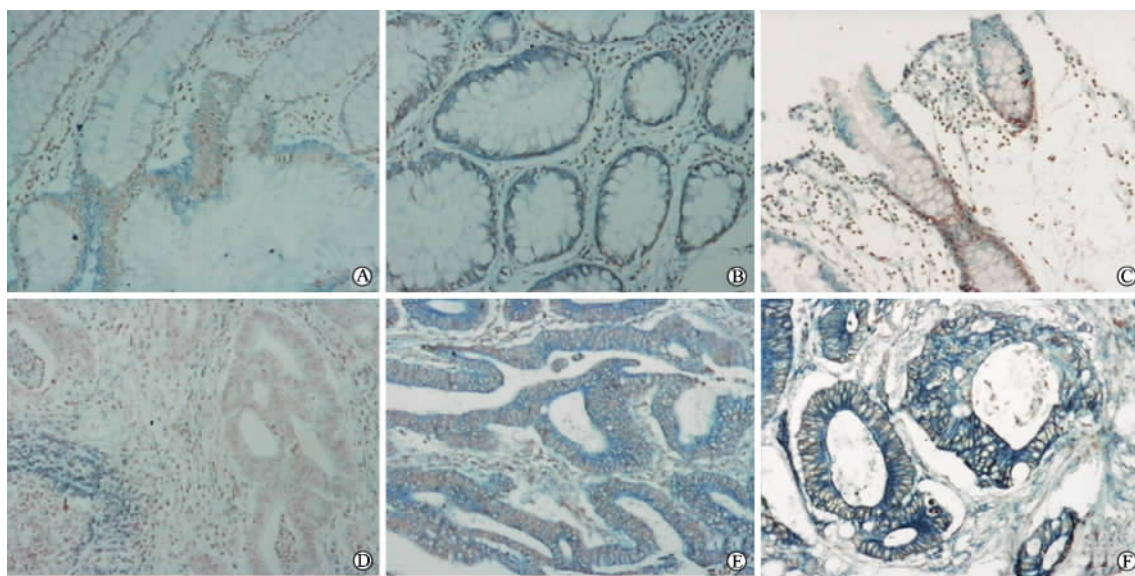


图2 结直肠癌与癌旁组织中 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* 蛋白的表达

Fig 2 Expression of *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bax* protein in colorectal cancer tissues and adjacent tissues(MaxVision, ×100)

A: The expression of *Bcl-2* protein was mainly located in the epithelial cell of the crypt's ground; B: The expression of *Bcl-x<sub>L</sub>* protein was mainly located throughout the crypt; C: The expression of *Bax* protein was mainly in the apical epithelial cell of the crypt; D: The expression of *Bcl-2* protein was weak (the self-positive control in the lower left); E: The expression of *Bcl-x<sub>L</sub>* protein was moderate to strong; F: The expression of *Bax* protein was strong. A-C were in colorectal adjacent tissues; D-F were in the colorectal tumor tissue

表1 结直肠癌与癌旁组织中 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* 蛋白表达的比较

Tab 1 Comparison of expression of *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bax* protein in colorectal cancer tissues and adjacent tissues

(N=40)

Target gene	Expression of protein[n(%)]			P
	Tumor> Adjacent tissue	Tumor< Adjacent tissue	Tumor= Adjacent tissue	
<i>Bcl-2</i>	8(20)	7(17.5)	25(62.5)	0.79
<i>Bcl-x<sub>L</sub></i>	22(55)	5(12.5)	13(32.5)	0.02
<i>Bax</i>	14(35)	7(17.5)	19(47.5)	0.09

2.3 结直肠癌组织中 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* mRNA 及蛋白表达与临床病理相关因素的关系 *Bcl-2* mRNA 水平, *Bcl-x<sub>L</sub>* 和 *Bax* 无论 mRNA 水平还是其蛋白表达水平,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 分期均无关( $P>0.05$ ),*Bcl-2* 蛋白表达与 Dukes 分期和 TNM 分期都呈负相关( $r_s = -0.389, P=0.013; r_s = -0.396, P=0.012$ ),但与其他因素无关。

### 3 讨论

细胞凋亡与肿瘤的关系是近年来的研究热点之一,细胞凋亡的失控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-x<sub>L</sub>* 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-x<sub>L</sub>* 蛋白相结合的 *Bax* 蛋白就会被置换出来,线粒体膜通透性增加,释放出一系列物质,最终导致细胞死亡<sup>[2]</sup>。

目前研究表明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<sup>[1,4]</sup>,其中 *Bcl-2/Bax* 比值对于细胞接受死亡刺激信号后存活与否起关键性作用<sup>[5]</sup>。但是该比值在结直肠癌中的作用仍存在争议<sup>[6-9]</sup>,有的报道显示在结直肠癌中 *Bcl-x<sub>L</sub>* 的表达要明显高于 *Bcl-2*<sup>[8]</sup>,而且 *Bcl-x<sub>L</sub>* 的抑凋亡作用比 *Bcl-2* 强<sup>[10]</sup>,从而推测 *Bcl-x<sub>L</sub>/Bax* 的值对于维持结直肠癌细胞的存活可能更为重要,现已有研究证实 *Bcl-x<sub>L</sub>/Bax* 而非 *Bcl-2/Bax* 与人结直肠癌细胞系对 5-FU 化学敏感性显著相关<sup>[11]</sup>。本研究结果显示无论是在 mRNA 水平,还是蛋白水平,*Bcl-x<sub>L</sub>* 蛋白的表达均要显著强于 *Bcl-2* 蛋白,而且它的表达在癌组织中明显高于癌旁组织,这提示 *Bcl-x<sub>L</sub>* 蛋白在结直肠癌的发生发展过程中可能起到较重要的作用,同时也提示 *Bcl-x<sub>L</sub>/Bax* 的值对于维持结直肠癌肿瘤细胞的存活具有更为重要的意义。但实验结果也显示尽管 *Bcl-x<sub>L</sub>* 在癌组织中的表达明显要高于癌旁组织,但是在癌组织和癌旁组织中 *Bcl-x<sub>L</sub>/Bax* 的值相近,无统计学差异,这提示在结直肠癌中 *Bcl-x<sub>L</sub>* 蛋白等抗凋亡蛋白组成的保护力量与 *Bax* 蛋白等构成的促凋亡力量在更高水平处于一种新的平衡,如能打破该平衡,或许能有效诱导结直肠肿瘤细胞凋亡,从这一点出发 *Bcl-x<sub>L</sub>* 或许是一个潜在的抗结直肠癌的治疗靶点。

本实验的结果表明在结直肠癌患者的癌旁组织中 *Bcl-2* 蛋白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,它们在癌旁组织中的这种分布,对于陷窝基底细胞的正常增殖,表面

上皮细胞的正常更新,维持黏膜的新陈代谢,防止肿瘤的发生具有重要意义。结果也显示 *Bcl-2* 蛋白不论在癌组织还是癌旁组织中的表达均较弱,但是其表达水平与 Dukes 分期和 TNM 分期都成负相关,这与 Maurer 等<sup>[8]</sup>的结论比较相似,提示 *Bcl-2* 可能与预后有关,可作为评价结直肠癌临床预后的参考指标。

### [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-x<sub>L</sub>* in resected non-small-cell lung cancers[J]. *Histopathology*, 2004, 44: 54-63.
  - [2] Cory S, Huang DC, Adams JM. The *Bcl-2* family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2003, 22:8590-8607.
  - [3] 王 玮,岑建农,李建勇,等. 急性白血病中 *MDR1* *MRP* 和 *Bcl-2* 基因表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2003, 30: 470-473.
  - [4] Gobe G, Rubin M, Williams G, et al. Apoptosis and expression of *Bcl-2*, *Bcl-x<sub>L</sub>*, and *Bax* in renal cell carcinomas[J]. *Cancer Invest*, 2002, 20: 324-332.
  - [5] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. *Bax* and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis[J]. *Science*, 1998, 281: 2027-2031.
  - [6] Yang WL, Addona T, Nair DG, et al. Apoptosis induced by cryo-injury in human colorectal cancer cells is associated with mitochondrial dysfunction[J]. *Int J Cancer*, 2003, 103: 360-369.
  - [7] 王 举, 窦忠霞, 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: 252-254.
  - [8] Maurer CA, Friess H, Buhler SS, et al. Apoptosis inhibiting factor *Bcl-x<sub>L</sub>* might be the crucial member of the *Bcl-2* gene family in colorectal cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 1998, 43: 2641-2648.
  - [9] 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: 651-658.
  - [10] Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, et al. Prevention of hypoxia-induced cell death by *Bcl-2* and *Bcl-x<sub>L</sub>*[J]. *Nature*, 1995, 374: 811-813.
  - [11] Zhang L, Yu J, Park BH, et al. Role of *Bax* in the apoptotic response to anticancer agents[J]. *Science*, 2000, 290: 989-992.
- [收稿日期] 2005-10-18 [修回日期] 2005-12-14  
[本文编辑] 贾泽军