

- cation of genetic alterations associated with the process of human experimental colon cancer liver metastasis in the nude mouse. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:246-252
- 24 Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in humor liver. *Electrophoresis* 1997; 18:533-537
- 25 Bradbury J. Proteomics:the next step after genomics?. *Lancet* 2000;356:50
- 26 Abbott A. And now for the proteome. *Nature* 2001;409:747
- 27 Blackstock WP, Weir MP. Proteomics:quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17: 121-127
- 28 Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley

- AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16:1090-1094
- 29 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics :new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998;19:1853-1861
- 30 俞利荣, 曾嵘, 夏其昌. 蛋白质组研究技术及其进展. *生命化学* 1998;18:4-9
- 31 Jensen ON, Larsen MR, Roepstorff P. Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels:strategies and applications. *Proteins* 1998;(Suppl 2):74-89

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

凋亡相关基因 *bcl-2* 与 *bax* 在人食管鳞癌中的表达

张林西, 齐凤英, 左连富, 刘江惠, 郭建文, 石卫东, 金春亭, 李海军

张林西, 金春亭, 李海军, 河北北方学院病理学教研室 河北省张家口市 075029
齐凤英, 左连富, 刘江惠, 郭建文, 河北医科大学病理教研室 石家庄市 050017
石卫东, 河北省人民医院病理科 河北省石家庄市 050051
河北省自然科学基金课题, No. 301351
项目负责人: 齐凤英, 050017, 河北省石家庄市山东路361号, 河北医科大学病理学教研室. qifengying1945@yahoo.com.cn
电话: 0311-6265724
收稿日期: 2004-10-25 接受日期: 2004-10-25

摘要

目的: 探讨 *bcl-2* 及 *bax* 基因在我国食管鳞癌中的表达特点, 研究其在食管癌变中的可能作用。

方法: 应用原位杂交技术、流式细胞术及免疫组化方法对 81 例食管鳞癌中 *bcl-2* 及 *bax* 基因的表达进行检测, 并应用图像分析技术对原位杂交及免疫组化结果进行定量分析。

结果: *bcl-2* mRNA 在正常食管上皮无表达, 在癌旁上皮主要是上皮近基底部细胞中呈阳性表达。食管鳞癌细胞胞质可见明显的 *bcl-2* mRNA 表达。图像定量分析显示 *bcl-2* mRNA 表达与分化程度有显著相关性(灰度值 37.88 ± 11.40 vs 23.03 ± 8.71 , 19.90 ± 4.33 , 6.60 ± 3.36 , $P < 0.05$; 44.89 ± 15.26 vs 23.03 ± 8.71 , 19.90 ± 4.33 , 6.60 ± 3.36 , $P < 0.05$)。Bcl-2 蛋白在食管鳞癌中表达随癌组织的分化程度降低其表达显著增高并且在不同分化组间差异显著($F=8.738$, $P < 0.01$)。Bax 蛋白在食管鳞癌细胞中都有表达, 但各组间均无显著性差异。

结论: 在食管鳞癌中凋亡相关基因 *bcl-2*, *bax* 表达异常增高, 尤其是抗凋亡基因 *bcl-2* 可能在食管鳞癌癌变及浸润过程中起着重要作用。

张林西, 齐凤英, 左连富, 刘江惠, 郭建文, 石卫东, 金春亭, 李海军. 凋亡相关

基因 *bcl-2* 与 *bax* 在人食管鳞癌中的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(1): 112-115
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/112.asp>

0 引言

食管癌是世界上最常见的十大恶性肿瘤之一, 在世界范围内居肿瘤死亡原因的第五位^[1]. 在我国其死亡率居所有恶性肿瘤的第二位, 严重威胁着我国高发区人民的生命和健康. 食管癌的发生可能是多种因素综合作用的结果^[2]. 细胞凋亡与肿瘤的发生、发展关系密切. 在肿瘤的细胞凋亡调控系统中, *bcl-2* 基因家族的作用备受重视. 我们应用原位杂交(in situ hybridization, ISH)技术、免疫组化及流式细胞术(flow cytometry, FCM)等方法, 对细胞凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *bax* 在我国食管鳞癌中(squamous cell carcinoma, SCC)中的表达进行检测, 研究其在食管癌变中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 河北医科大学第四医院 2001-08/11 食管癌患者手术切除标本共计 81 例. 男 50 例, 女 31 例. 年龄 30-71 岁, 平均年龄 55.9 岁. 其中高分化鳞癌 39 例, 中分化鳞癌 18 例, 低分化鳞癌 24 例. 同时取切端正常食管黏膜 5 例, 癌旁组织 10 例. 术后立即取材, 以 40 g/L 多聚甲醛 / 0.1 mol/L PBS (pH7.2) (内含 0.1% 焦碳酸二乙酯) 固定约 3 h, 常规脱水、浸蜡、包埋, 并进行连续切片, HE 染色, 由二位富有经验的病理医师分别进行病理组织学分级诊断. 同时在相同部位取材, 以 700 mL/L 冷乙醇固定,

进行流式细胞仪检测. 癌旁上皮经组织学证实都有明显的不典型增生. 患者术前未经放疗或化疗.

1.1.2 试剂 *bcl-2*、*bax* 抗体为小鼠 IgG 单克隆抗体, Santa Cruz 公司产品. 羊抗鼠 FITC-IgG, 为 Jackson Immunoresearch 公司产品. *bcl-2* 原位杂交试剂盒及 SABC 免疫组化试剂盒购自博士德生物工程有限公司. *bcl-2* mRNA 原位杂交试剂盒探针序列为: 5'-TGCGA CAGCT TATAA TGGAT GTACT TCATC-3'; 5'-GTGAA GGGCG TCAGG TGCAG CTGGC TGGAC-3'; 5'-AGGTG CCGGT TCAGG TACTC AGTCA TCCAC-3'.

1.2 方法

1.2.1 *bcl-2* mRNA 原位杂交 切片常规脱蜡、水化, 双氧水处理封闭内源性过氧化物酶. 继以按原位杂交试剂盒说明书进行检测, 个别步骤反应时间加以调整. 以已知阳性片作为阳性对照, 以反应中不加 mRNA 探针作为阴性对照. 显微镜下观察, 阳性对照充分显色后, 立即终止反应.

1.2.2 免疫组织化学检测 切片常规脱蜡、水化, 双氧水处理封闭内源性过氧化物酶. 继以按常规 S-P 法进行免疫组化染色. Bax 一抗的稀释度为 1:100. 以已知阳性片作为阳性对照, 以 0.01 mol/L PBS 代替一抗作为阴性对照, 显微镜下观察, 阳性对照充分显色后, 立即终止反应.

1.2.3 流式细胞仪基因蛋白定量检测 具体方法按文献[3]进行.

1.2.4 原位杂交及免疫组织化学结果定量分析 对原位杂交及免疫组织化学染色结果利用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行灰度测量分析, 将原位杂交及免疫组化染色结果转化为灰度值进行定量分析. 每张原位杂交及免疫组化切片以组织间质入射光的值作为定标. 每张切片测定 5 个视野 (10 × 20), 分别测定间质灰度及癌巢 (或上

皮) 灰度, 取平均值, 以净灰度值做为本例切片的测定值.

测定值 = 间质灰度值 - 癌巢 (或上皮) 灰度值.

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析. 对于原位杂交、免疫组化及 FCM 检测结果, 各组间显著性检验采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 Scheffe 法. $P < 0.05$ 表示差异有显著性.

2 结果

2.1 *bcl-2* 在食管鳞癌细胞中的表达 原位杂交检测可见, *bcl-2* mRNA 在正常食管上皮几乎无表达, 在癌旁异型增生上皮有少量表达, 主要是上皮近基底部细胞胞质呈棕黄色颗粒状 (图 1A). 在不同分化 SCC 中, 癌细胞胞质都有明显的 *bcl-2* mRNA 表达, 尤其是在低分化 SCC (图 1B). 经灰度测定分析, 其表达与分化程度有关, 在正常、癌旁上皮及不同分化 SCC 中的表达差异具有显著性 ($F = 25.733$, $P < 0.01$). *bcl-2* mRNA 表达在正常及癌旁上皮都相对较低, 在 SCC 中的表达则随着分化程度的降低明显升高 (表 1), 在低分化 SCC 中的表达最高.

表1 *bcl-2* mRNA 在食管鳞癌中表达的原位杂交检测

分组	<i>n</i>	mean±SD
(A)正常上皮	5	6.60 ± 3.36
(B)癌旁上皮	10	19.90 ± 4.33
(C)高分化 SCC	39	23.03 ± 8.71
(D)中分化 SCC	18	37.88 ± 11.40 ^a
(E)低分化 SCC	24	44.89 ± 15.26 ^c

D 组 vs A、B 和 C 组 ($^a P < 0.05$). E 组 vs A、B 和 C 组 ($^c P < 0.05$).

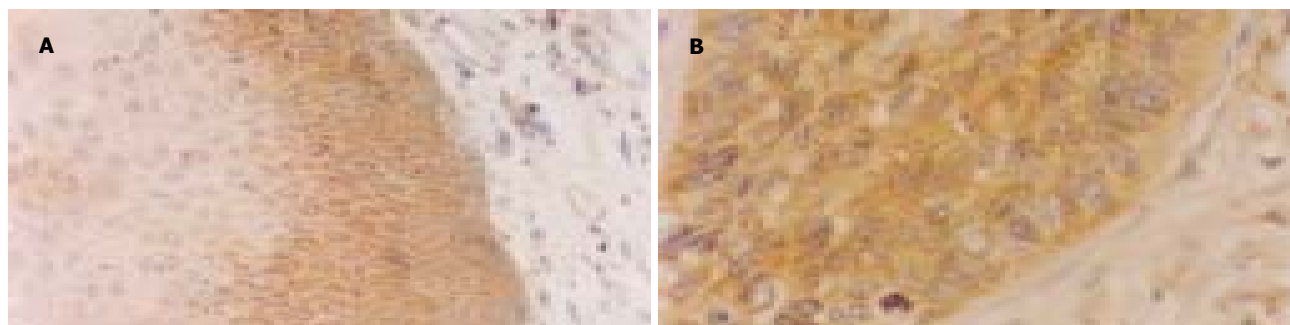


图1 *bcl-2* mRNA 原位杂交. A: *bcl-2* mRNA 在癌旁异型增生上皮中的表达 ×20; B: *bcl-2* mRNA 在低分化鳞癌中的表达 ×40.

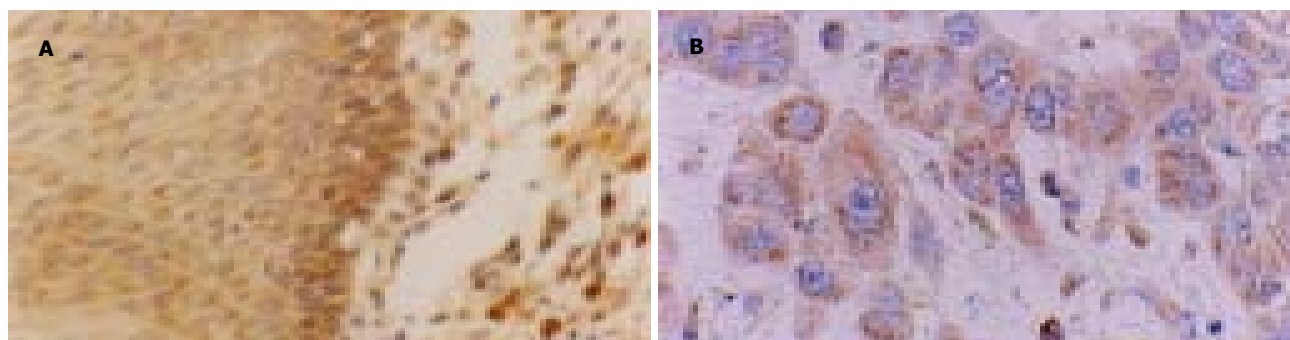


图2 Bax 蛋白表达免疫组化. A: Bax 蛋白在癌旁异型增生上皮中的表达 ×20; B: Bax 蛋白在低分化鳞癌中的表达 ×40.

FCM 检测显示, 在正常、癌旁上皮及 SCC 中 Bcl-2 蛋白表达逐渐增高, 并且随癌组织的分化程度降低其表达增高, 并且在不同分化组间差异显著 ($F = 8.738, P < 0.01$), 尤其是正常上皮、癌旁上皮组分别与中、低分化 SCC 组, 高分化与低分化 SCC 组间差异显著 (表 2, $P < 0.05$).

2.2 Bax 在食管鳞癌细胞中的表达 Bax 在正常上皮及癌旁异型增生上皮都有表达, 但癌旁上皮表达更为明显, 主要见于上皮近基底层细胞, 胞质呈棕黄色颗粒状 (图 2A). Bax 在高分化 SCC 中的表达主要表现为癌细胞胞质呈棕黄色, 中心角化珠不着色; 而低分化 SCC 中可见癌细胞胞质弥漫呈棕黄色 (图 2B). 经灰度分析发现, 随浸润深度的增加其表达呈增高趋势, 但组间差异无显著性 ($F = 1.534, P = 0.201$). (表 3).

表 2 Bcl-2 蛋白在食管鳞癌中表达的 FCM 检测(mean±SD)

分 组	n	Bcl-2 FI
(A)正常上皮	5	1.00 ± 0.12 ^a
(B)癌旁上皮	10	1.13 ± 0.13 ^c
(C)高分化 SCC	39	1.29 ± 0.21
(D)中分化 SCC	18	1.48 ± 0.40
(E)低分化 SCC	24	1.59 ± 0.31

A 组 vs D 组和 E 组 ($P < 0.05$). B 组 vs D 组和 E 组 ($P < 0.05$).

表 3 Bax 蛋白在食管鳞癌中表达的免疫组化检测

分 组	n	mean±SD
(A)正常上皮	5	47.20 ± 7.12
(B)癌旁上皮	10	32.80 ± 10.52
(C)高分化 SCC	39	44.08 ± 21.49
(D)中分化 SCC	18	47.76 ± 18.76
(E)低分化 SCC	24	37.36 ± 19.51

Bax 表达组间无显著差异.

3 讨论

癌变是一个长期的多步骤、多因素参与的过程, 机体的某些遗传不足加上长期的某些环境因素刺激可能改变宿主的遗传易感性. 长期的慢性致癌源的刺激可使原癌基因激活和/或抑癌基因失活, 二者可通过参与细胞周期的调控、信号传导、细胞分化及凋亡等事件, 引起肿瘤的发生和发展. 既往认为肿瘤形成是无限增生所致的细胞积聚, 但近年发现, 许多肿瘤不仅存在细胞增生, 同时也存在细胞凋亡受阻^[4-10].

Bcl-2、Bax 都是调控细胞凋亡的相关蛋白, Bcl-2 是凋亡抑制因子, 而 Bax 是凋亡促进因子. *bcl-2* 原癌基因由 3 个外显子组成, 编码 239 个氨基酸组成的分子质量为 26 kD 的 Bcl-2 α 蛋白和 205 个氨基酸组成的分子质量为 22 kD 的 Bcl-2 β 蛋白^[11]. 有关 *Bcl-2* 与食管癌发生关系的报道尚少. *Bcl-2* 和 *Bax* 以同源或异源二聚体形

式发挥作用. *Bcl-2* 抑制凋亡必须通过与 *Bax* 形成异源二聚体来实现. 当 *Bax* 同源二聚体形成, 便诱导凋亡; 随 *Bcl-2* 蛋白表达量上升, 越来越多的 *Bax* 二聚体分开, 与 *Bcl-2* 形成比 *Bax-Bax* 更稳定的 *Bax-Bcl-2* 异源二聚体, 从而“中和”了 *Bax-Bax* 诱导凋亡的作用. 因此, 细胞内 *Bax* 与 *Bcl-2* 的比例调节了凋亡的发生.

在食管上皮癌变过程中, 正常上皮无 *Bcl-2* 表达, 而癌旁上皮中 *Bcl-2*、*Bax* 均有少量表达; 不同分化的 SCC 中 *Bax* 都有明显的表达且与 SCC 分化程度无关, 而 *Bcl-2* 在 SCC 中的表达随分化程度的降低明显增高. 提示随 *Bcl-2* 表达增多而形成了较多的 *Bcl-2-Bax* 异源二聚体, 从而显示其抗凋亡活性, 抑制了癌细胞凋亡, 即分化程度越低, 癌细胞抗凋亡能力越强. Sarbia *et al*^[12] 也发现, *Bcl-2* 表达与食管癌病理学分级呈正相关. Liu *et al*^[13] 运用转基因小鼠对乳腺细胞的研究发现, COX-2 诱导的肿瘤组织中促凋亡蛋白 *Bax* 表达水平降低而抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 表达升高. 乳腺上皮细胞凋亡降低可能导致肿瘤的形成. 已有研究显示^[14], *Bcl-2* 蛋白过度表达抑制细胞凋亡是一个早期事件, 对于食管癌 *bcl-2* 可能是一个药物治疗的新靶点^[15].

总之, *bcl-2* 及 *bax* 基因表达与细胞凋亡密切相关, 可能在食管上皮癌变及 SCC 的生物学行为中起重要作用; 尤其是抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 表达在食管 SCC 中异常增高, 可能在食管癌变及浸润过程中扮演着重要角色.

4 参考文献

- Montesano R, Hainaut P. Molecular precursor lesions in oesophageal cancer. *Cancer Surv* 1998;32:53-68
- 王东旭, 李伟. 食管癌病因学进展. 世界华人消化杂志 2000;8:1029-1030
- 齐凤英, 张林西, 韩彩丽, 左连富, 林培中, 郭建文. 食管上皮癌变过程中环氧化酶-2 表达上调. 世界华人消化杂志 2003;11:508-511
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2016
- 沈云芳, 庄蕙, 沈健伟, 陈士葆. 细胞凋亡与肿瘤. 世界华人消化杂志 1999;7:267-268
- 乔庆, 吴金生, 张静, 马庆久, 赖大年. 凋亡相关基因 *bcl-2*, *bax* 在人类大肠腺癌中的表达意义. 世界华人消化杂志 1999;7:936-938
- 袁荣文, 丁庆, 姜汉英, 覃修福, 邹声泉, 夏穗生. 胰腺癌 *Bcl-2*, *P53* 蛋白表达和细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:851-854
- Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression of *bcl-2* protein in gastric carcinoma and its significance. *World J Gastroenterol* 1998;4:228-230
- 彭晓谋, 彭文伟, 陈青, 姚集鲁. 肝细胞癌 *P53*, *Bcl-2* 蛋白的表达和细胞凋亡. 华人消化杂志 1998;6:834-836
- Beardsmore DM, Verbeke CS, Davies CL, Guillou PJ, Clark GW. Apoptotic and proliferative indexes in esophageal cancer: predictors of response to neoadjuvant therapy [corrected]. *J Gastrointest Surg* 2003;7:77-86
- Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5214-5217
- Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, Verreet P, Dutkowski P, Willers R, Gabbert HE. *Bcl-2* expression and prognosis in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 1996;69:324-328
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276:18563-18569

- 14 Metzger R, Schneider PM, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Holscher AH. Molecular biology of esophageal cancer. *Onkologie* 2004;27:200-206

- 15 Sutter AP, Zeitz M, Scherubl H. Recent results in understanding molecular pathways in the medical treatment of esophageal and gastric cancer. *Onkologie* 2004;27:17-21

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

肿瘤坏死因子 β 1069位点基因多态性与胃癌易感性的相关性研究

李立人, 鞠少卿

李立人, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
鞠少卿, 南通大学附属医院检验医学中心 江苏省南通市 226001
项目负责人: 李立人, 226001, 江苏省南通市西寺路 20 号, 南通大学附属医院消化内科. larry017@163.com
电话: 0513-5052206 传真: 0513-5519820
收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-11-04

摘要

目的: 探讨江苏汉族人群肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor β , TNF β) 1069 位点等位基因多态性与胃癌的关系。

方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法对 168 名健康人和 45 例胃癌患者 TNF β 基因的单碱基突变多态性进行了分析。

结果: 胃癌患者的 TNF β *1/2 等位基因频率(66.7%) 较正常人(47.0%) 明显升高($P=0.019<0.05$)。

结论: TNF β *1/2 等位基因频率与胃癌易感性相关。

李立人, 鞠少卿. 肿瘤坏死因子 β 1069 位点基因多态性与胃癌易感性的相关性研究. 世界华人消化杂志 2005;13(1):115-117
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/115.asp>

0 引言

胃癌是我国发病率最高的恶性肿瘤, 其发生与外界各种不良因素持续作用以及个体遗传易感性有关. 最近, 人们逐渐意识到不同个体易感性的不同在胃癌发病机制中的重要性. 人群中存在易感个体是由于一些与肿瘤发生相关的基因存在多态性. 随着限制性内切酶、Southern 杂交技术以及克隆测序技术的完善, 目前研究较深入的基因多态性主要为单核苷酸多态、微卫星 DNA 多态、AluI 序列多态. 自从 1985 年 Kroutiris *et al* 报道了检测 *ras* 癌基因多态性可用于估计肿瘤发生的危险性后, 国内外学者在多个层面研究了基因多态性与胃癌发生的相关性, 阐明了基因型与表型之间的联系。

虽然胃癌的发病机制至今还在争论, 但大量的证据认为细胞因子如白介素在胃癌的过程中发挥着重要的作用^[1]. 肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor-beta,

TNF β) 是体内具有多种生物活性的细胞因子, 具有抗肿瘤、抗病毒感染的作用及诱发炎症反应以及刺激某些正常细胞的生长. 编码 TNF β 的基因位于 HLA-B 以及 HLA-C₂ 位点之间的 HLA-III 抗原基因族内, 包含若干个多态性位点. 近年来研究显示 TNF β 基因多态性主要有 5 种, Shimura *et al*^[2] 报道第 1 内含子内, 转录起始位点下游第 252 位点(+252 位点, 也就是 TNF β 基因第 1069 位点) 处鸟嘌呤(G)→腺嘌呤(A) 碱基变化与胃癌预后有关, 发现携带 TNF β 10.5 kb 纯合子基因型的胃腺癌患者预后较好, TNF β 基因 1069 处位点为 G 称为 TNF β *1, 具有 *Nco*I 限制性内切酶的识别位点, 1069 位为 A 的基因称为 TNF β *2, 无 *Nco*I 限制性内切酶的识别位点, TNF β 基因 G-A 突变可调节 TNF β 转录水平^[3], 与 TNF 水平特征性增高有密切关系^[4]. TNF β 基因多态性是否与人类自身免疫性疾病、感染、肿瘤等许多疾病相关联, 国外学者进行了探讨^[5-6], 但结论不完全相同. 我们采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 方法探讨江苏地区汉族人群肿瘤坏死因子 β (TNF β) 等位基因多态性与胃癌的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对象 (1) 患者组: 45 例胃癌患者(高中分化型 14 例, 低分化型 31 例), 其中女性 30 例, 男性 15 例, 年龄 38-72 岁, 平均年龄(56.6 $\pm$ 9.2) 岁, 均经病理证实胃癌, 临床排除自身免疫病、感染性疾病、其他恶性肿瘤; (2) 正常对照组: 168 名年龄、性别与胃癌患者组大致匹配的健康体检者及献血员, 其中男性 102 名, 女性 66 名, 年龄 36-70 岁, 平均年龄(54.2 $\pm$ 9.7) 岁. 以上患者及正常对照人群均系江苏地区、无血缘关系、三代亲属均为汉族。

1.1.2 仪器和试剂 Gene Amp 9600 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司), 2360K 离心机(德国 Hermle 公司), SX-100 型凝胶自动成像系统(上海生物技术公司); Taq DNA 聚合酶