

BAG-1 在大肠癌中的表达及其临床意义

杨光华¹, 赵晶¹, 李磊¹, 王天阳¹, 张小艳¹, 吕春秀², 王凤安¹

Expression and Clinical Significance of BAG-1 in Human Colorectal Carcinomas

Yang Guanghua¹, Zhao Jing¹, Li Lei¹, Wang Tianyang¹, Zhang Xiaoyan¹, Lv Chunxiu², Wang Feng'an¹

1. Department of Gastrointestinal Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

2. Department of Oncology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University

Corresponding Author: Wang Feng'an, E-mail: wfa2983@163.com

Abstract: Objective To investigate the relationship and clinical significance of Bag-1 expression in colorectal carcinoma tissues and normal colorectal tissues, and its relationship with lymphnode metastasis. **Methods** The expressions of Bag-1 in 55 patients' colorectal carcinoma tissues (case group) and 25 normal colorectal tissues (control group) were examined by Western blot analysis and RT-PCR. **Results** (1) The expressions of Bag-1 in 55 colorectal carcinoma tissues were inordinately detected, the protein relative strength of Bag-1 was (5~109, 64.09 ± 31.59). We found that the protein relative strength of Bag-1 in colorectal carcinoma tissues with lymphnode metastasis (30.34~109, 81.05 ± 19.64) was higher than that in colorectal carcinoma tissues without lymphnode metastasis (5~70, 13.26, 19 ± 16.32) ($P < 0.001$), however, both of them were obviously higher than that in normal colorectal tissues (0~10, 4.28 ± 2.82) ($P < 0.001$). (2) The gene fragments of Bag-1 and β -actin primers amplified were clearly visible by electrophoresis and EB staining. The length of the gene fragments amplified was 331 bp and 254 bp respectively, which was consistent with that we designed. The relative expression value of Bag-1 mRNA in 55 colorectal carcinoma tissues was (0.33~1.21, 0.74 ± 0.26). The relative expression value of Bag-1 mRNA in colorectal carcinomas tissues with lymphnode metastasis (0.52~1.21, 0.87 ± 0.21) was higher than that in colorectal carcinoma tissues without lymphnode metastasis (0.33~0.65, 0.45 ± 0.09) ($P < 0.001$), however, both of them were significantly higher than that in normal colorectal tissues (0~0.22, 0.10 ± 0.06) ($P < 0.001$). **Conclusion** The overexpression of Bag-1 plays an important role in the development and progression of colorectal carcinomas. The expression level of Bag-1 is correlated with lymphnode metastasis. Bag-1 can serve as a biomarker to prognosticate the metastasis potentiality of colorectal carcinomas. Detecting Bag-1 may contribute to estimate the prognosis of patients.

Key words: Bag-1; Colorectal carcinoma; RT-PCR; Western blot

摘要: 目的 探讨 Bag-1 基因在大肠癌组织和正常大肠组织中的表达变化以及与淋巴结转移之间的关系和临床意义。 **方法** 联合采用 Western blot 和 RT-PCR 方法分别检测经手术切除的 55 例大肠癌组织标本中 Bag-1 的表达, 另取 25 例正常大肠黏膜组织为对照组。 **结果** (1) 55 例大肠癌均检测到不同程度的 Bag-1 蛋白表达, 相对强度为 (5~109, 64.09 ± 31.59), Bag-1 在有淋巴结转移的大肠癌组织中蛋白相对强度 (30.34~109, 81.05 ± 19.64) 高于无淋巴结转移的大肠癌组织中蛋白相对强度 (5~70, 13.26, 19 ± 16.32) ($P < 0.001$), 但两者均明显高于正常大肠黏膜 Bag-1 蛋白相对强度 (0~10, 4.28 ± 2.82) ($P < 0.001$)。 (2) 55 例大肠癌组织中 Bag-1 mRNA 表达量相对值为 (0.33~1.21, 0.74 ± 0.26); 在有淋巴结转移的大肠癌组织中表达量相对值 (0.52~1.21, 0.87 ± 0.21) 高于无淋巴结转移的大肠癌组织中表达量相对值 (0.33~0.65, 0.45 ± 0.09) ($P < 0.001$), 但两者均明显高于正常大肠黏膜组织 (0~0.22, 0.10 ± 0.06) ($P < 0.001$)。 **结论** Bag-1 高表达对大肠癌的发生、发展起重要作用, Bag-1 表达水平与大肠癌的淋巴结转移有关, 可作为预测大肠癌转移潜能的生物学指标, 检测 Bag-1 表达水平可能有助于患者预后的判断。

关键词: Bag-1; 大肠癌; RT-PCR; Western blot

中图分类号: R735.3⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)01-0071-04

0 引言

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一。近几年来, 大肠癌发病率逐年升高。细胞凋亡障碍是肿瘤学研究

的一个热点, 研究这些基因在肿瘤中的表达及相互作用, 对于揭示肿瘤发生、发展的机制有着十分重要的意义。Bag-1 是一种抗凋亡基因, 其在恶性肿瘤的发生、发展中起着十分重要的作用, 但其确切的机制我们尚不十分清楚。本研究采用 Western blot 和 RT-PCR 方法检测 Bag-1 分别在大肠癌组织和正常大肠黏膜组织中的表达, 探讨 Bag-1 蛋白异常表达在大肠癌发生、发展中的作用及其与淋巴结转移的关系和临床意义, 现报道如下。

收稿日期: 2011-02-21; 修回日期: 2011-08-30

作者单位: 1. 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院胃肠外科; 2. 河北医科大学第四医院肿瘤内科

通信作者: 王凤安, E-mail: wfa2983@163.com

作者简介: 杨光华 (1984-), 男, 硕士, 主要从事胃肠外科临床及消化道肿瘤研究

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我科 2008 年 9 月—2010 年 5 月手术切除并经病理证实的大肠癌标本 55 例,另外选取经手术切除的正常大肠黏膜组织 25 例作为健康对照组。55 例大肠癌患者,年龄 30~74 岁,平均年龄 51.6 岁,其中有淋巴结转移的 38 例,无淋巴结转移的 17 例,患者术前均未作放化疗等任何抗肿瘤治疗。所有用于 Western blot 及 RT-PCR 检测的标本均于手术切下组织后立即取材液氮保存。

1.2 主要试剂

兔抗人多克隆 Bag-1 抗体和兔抗人多克隆 β -actin 抗体均购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自北京博奥森生物公司,RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司,RT-PCR 引物购自赛百盛生物工程公司,ECL 发光试剂盒购自上海炎彬化工科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 Western blot (1)取适量(100~200 mg)大肠癌和正常大肠组织,加 1 ml 含多种蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂,抽提总蛋白。(2)按考马斯亮蓝 G250 法测定蛋白样品浓度。(3)不同样品取等量(每加样孔总蛋白量为 150 mg)蛋白加样,恒压条件下做聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。(4)以 β -actin 为内参切胶后,恒流条件下低温转膜。(5)转膜结束后,TPBS 洗膜 2 遍,PBS 洗膜 1 遍,每次 5 min。(6)5%脱脂奶粉溶液(TBS 配制)中室温封闭 1 h。(7)按照每平方厘米膜面积加 0.1 ml 的抗体稀释液加入用封闭液稀释好的一抗(浓度 1:200),4℃缓慢摇动孵育过夜。(8)同上洗涤。(9)加入用 PBS 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标志的二抗(浓度 1:2000),室温缓慢摇动孵育 5~6 h。(10)同上洗涤。(11)ECL 低温显色,X 线暗匣中压片。(12)通过 Optimas 6.0 蛋白印记分析软件进行蛋白条带分析,测得蛋白相对强度(Relative Intensity)。

1.3.2 RT-PCR 引物设计:Bag-1:上游引物 5'-AAGCGACCTGGAGTGAAG-3',下游引物:5'-AGTGCTGACAACGGTGT-3',扩增长度 331 bp; β -actin:上游引物 5'-CTGTCTGGCGGCAC-CACCAT-3',下游引物 5'-GCAACTAAGTCAT-AGTCCGC-3',扩增长度 254 bp。(1)取适量(50~100 mg)大肠癌和正常大肠黏膜组织,用 Trizol 法提取总 RNA,注意防止污染。(2)用紫外分光光度计测定 OD_{260} 和 OD_{280} ,从而确定所提 RNA 的纯度及浓度。(3)配制含 EB 的 1% Agarose 凝胶进行 RNA 完整性的鉴定。(4)cDNA 合成:按照总体系

20 μ l 分别加入总 RNA、Oligo(dN)₉、DEPC water、5 $\times$ M-MLV buffer、dNTPs、RNasin、DTT、M-MLV,离心混匀后置于 PCR 仪中,合成 cDNA,-80℃保存备用。(5)制备引物工作液(10 μ M),按照总体系 25 μ l 分别加入 Go Taq Green Master Mix 2 $\times$ 、上游引物、下游引物、cDNA 模板、Nuclease-Free water,离心混匀后置于 PCR 仪中扩增。(6)配制含 EB 的 1% Agarose 凝胶,加入 DNA marker 和样本后 80 V 电压下电泳,1 h 后在紫外灯下 GelID 凝胶图像分析系统摄片并测定分析其光密度,分别计算各个样本 Bag-1 基因表达量的相对值(relative expression value)=待测基因扩增条带的灰度值/ β -actin 基因扩增条带的灰度值。

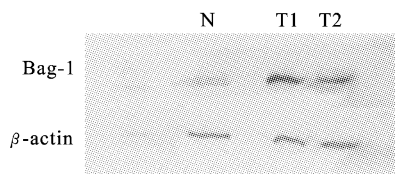
1.4 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 结果

55 例大肠癌患者癌组织均检测到不同程度的 Bag-1 蛋白表达,见图 1。通过 Optimas 6.0 蛋白印记分析软件蛋白条带进行分析后发现,Bag-1 在大肠癌组织中的蛋白相对强度为 5~109,平均 64.09 ± 31.59 ,在正常大肠黏膜组织中 Bag-1 蛋白相对强度为 0~10,平均 4.28 ± 2.82 。我们进一步分析发现,有淋巴结转移的大肠癌组织中 Bag-1 蛋白表达相对强度为 30.34~109,平均 81.05 ± 19.64 ,而无淋巴结转移的为 5~70.13,平均 26.19 ± 16.32 。大肠癌组织中 Bag-1 蛋白表达相对强度明显高于正常大肠黏膜组织,两者比较差异有统计学意义($t = 13.919, P < 0.001$);有淋巴结转移的大肠癌组织中 Bag-1 蛋白表达相对强度高于无淋巴结转移的,两者比较差异有统计学意义($t = 10.054, P < 0.001$),见表 1。



N:normal colorectal tissues;T1:colorectal carcinoma tissues with lymphnode metastasis;T2:colorectal carcinoma tissues without lymphnode metastasis

图 1 Western blot 检测 Bag-1 和 β -actin 分别在大肠癌组织及正常大肠黏膜组织的表达

Figure 1 Western blot detects the protein relative strength of Bag-1 and β -actin in colorectal carcinoma tissues and normal colorectal tissues

表 1 Western blot 和 RT-PCR 检测 Bag-1 在各组的表达相对量
Table 1 The expression of Bag-1 in each group by Western blot and RT-PCR

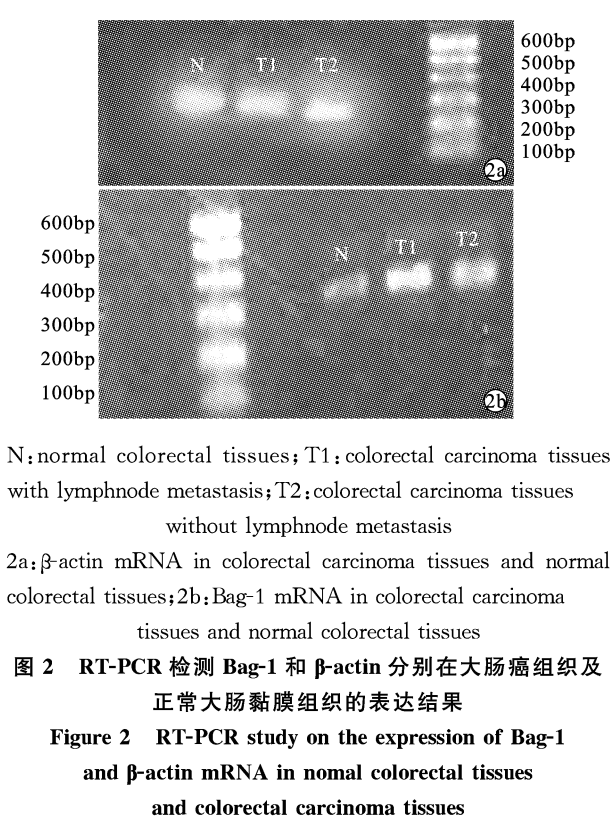
Groups	Cases	Western blot	Statistic	RT-PCR	Statistic
		The protein relative strength of Bag-1 ($\bar{x} \pm s$)		The relative value of Bag-1 mRNA ($\bar{x} \pm s$)	
Colorectal carcinoma tissues	55	64.09 $\pm$ 31.59	$t = 13.919$	0.74 $\pm$ 0.26	$t = 16.854$
Normal colorectal tissues	25	4.28 $\pm$ 2.82	$P < 0.001$	0.10 $\pm$ 0.06	$P < 0.001$
With lymphnode metastasis	38	81.05 $\pm$ 19.64	$t = 10.054$	0.87 $\pm$ 0.21	$t = 10.499$
Without lymphnode metastasis	17	26.19 $\pm$ 16.32	$P < 0.001$	0.45 $\pm$ 0.09	$P < 0.001$

2.2 RT-PCR 结果

Bag-1 和 β -actin 引物的扩增基因片段经电泳和 EB 染色后在紫外灯下可见清晰电泳条带,其扩增片段大小与所设计的大小完全一致,分别为 331 bp、254 bp,见图 2。Bag-1mRNA 在大肠癌组织中的表达量相对值为 0.33~1.21,平均 0.74 $\pm$ 0.26,在正常大肠黏膜组织中 Bag-1mRNA 表达量相对值为 0~0.22,平均 0.10 $\pm$ 0.06。有淋巴结转移的大肠癌组织中 Bag-1mRNA 表达量相对值为 0.52~1.21,平均 0.87 $\pm$ 0.21,而无淋巴结转移的为 0.33~0.65,平均 0.45 $\pm$ 0.09。应用 SPSS17.0 软件进行 t 检验分析,大肠癌组织中 Bag-1mRNA 表达量相对值明显高于正常大肠黏膜组织,两者比较差异具有统计学意义($t = 16.854, P < 0.001$);有淋巴结转移的大肠癌组织中 Bag-1mRNA 表达量相对值高于无淋巴结转移的,两者比较差异具有统计学意义($t = 10.499, P < 0.001$),见表 1。

3 讨论

Bag-1 蛋白是由位于染色体 9p12Bag-1 基因编码的酸性蛋白。它是 Takayama 等^[1]最早发现的一种抗凋亡基因,是一种定位于细胞质和细胞核的多功能蛋白,不仅可以作用于 Bcl-2 和 Raf-1 等蛋白抑制细胞凋亡,而且通过作用于分子伴侣等多种蛋白分子调节细胞的增生、转录、迁移和运动^[2]。Bag-1 调控的信号通路在癌症的发生、发展、侵袭以及病人对癌症治疗的反应性等方面起重要作用,所以恶性细胞中 Bag-1 表达水平的临床意义引起了人们的极大兴趣。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。Bag-1 蛋白在人体正常组织中呈弱表达甚至几乎不表达,而在胆管癌、喉癌、乳腺癌、宫颈癌中都有阳性表达^[3-9]。有研究通过免疫组织化学染色证实,Bag-1 在大肠癌原发灶中呈阳性表达,参与了大肠黏膜由良性向恶性转化的过程。本研究应用 Western blot 和 RT-PCR 方法联合检测发现 55 例大肠癌组织中 Bag-1 表达相对量均明显高于 25 例正常大肠黏膜 Bag-1 表达相对



量,这与所查文献的研究结果一致,从而进一步证实 Bag-1 高表达与大肠癌的发生发展相关。

目前,关于 Bag-1 与大肠癌淋巴结转移是否相关,国内外学者研究结果尚存在分歧。有研究表明 Bag-1 的表达在肿瘤的直径、浆膜浸润程度、淋巴结转移等临床病理因素方面差异无统计学意义^[10]。也有研究证实大肠癌组织中 Bag-1 高表达与肿瘤分化程度,Dukes 分期和淋巴结转移有密切关系。分化程度越低,Dukes 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^[11-13]。本研究应用 Western blot 和 RT-PCR 方法联合检测发现 38 例有淋巴结转移大肠癌组织中 Bag-1 表达相对量均高于 17 例无淋巴结转移的大肠癌组织 Bag-1 表达相对量,从而我们认为大肠癌组织中 Bag-1 高表达与其淋巴结转移相关,Bag-1 高表达促进了淋巴结转移。

通过本研究,我们得出结论:Bag-1 高表达与大肠癌的发生发展相关,促进了大肠癌的淋巴结转移。

分析其可能的机理:(1)抑制细胞凋亡:Takayama 等^[1]最早发现 Bag-1 通过促进 Bcl-2 的功能抗凋亡能显著抑制十字孢碱诱导的淋巴瘤细胞系。有研究证实 BAG-1 通过调节 NF- κ B 的活性,影响转录,抑制癌细胞凋亡^[14-15]。(2)结合分子伴侣-热休克蛋白 Hsc70/Hsp70:Bag-1 通过 BAG 结构域与分子伴侣 HSC70/HSP70 结合形成 BAG-1-HSC70 复合体,调节分子伴侣对信号转导蛋白和转录因子的作用,最终影响到细胞的凋亡、增生和迁移^[16-18]。总之, Bag-1 参与多个重要的细胞生物学过程,在大肠癌的发生发展中起着重要作用, Bag-1 表达水平与大肠癌的转移有关,可作为预测大肠癌转移潜能的生物学指标,检测 Bag-1 可能有助于患者预后的判断。但 Bag-1 的具体作用机制及其与预后的关系有待我们进一步的研究探索。

参考文献:

- [1] Takayama 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.
- [2] Wang WQ, Chen J. Expression and functions of BAG-1 protein in human cancer cells[J]. Chin J Lung Cancer, 2008, 11(3): 470-472. [王伟强, 陈军. BAG-1 蛋白在人癌细胞中的表达和功能[J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(3): 470-472.]
- [3] Millar EK, Anderson LR, McNeil CM, et al. BAG-1 predicts patient outcome and tamoxifen responsiveness in ER-positive invasive ductal carcinoma of the breast[J]. Br J Cancer, 2009, 100(1): 123-133.
- [4] Chen X, Li J, Wang HL. Study on expression of Bag-1 and p53 in cholangiocarcinoma[J]. China J Mod Med, 2006, 16(12): 1789-1791. [陈翔, 李坚, 王洪林. Bag-1 及 p53 基因在胆管癌组织中表达的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(12): 1789-1791.]
- [5] Wu SH, Jiang XQ, Zhou XH, et al. Expression of BAG-1 in laryngeal squamous cell carcinoma and its relationship with p53 gene and cell apoptosis[J]. Cancer Res Prev Treat, 2006, 33(6): 404-407. [吴曙辉, 江孝清, 周绪红, 等. BAG-1 在喉鳞癌组织中表达及其与 p53 基因和细胞凋亡的相关性[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(6): 404-407.]
- [6] Wang RQ, Kong FM. Expression of BAG-1 and VEGF and its significance in breast carcinoma[J]. Pract J Cancer, 2005, 20(4): 351-354. [王仁启, 孔凡明. BAG-1 和 VEGF 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2005, 20(4): 351-354.]
- [7] Yun J, Yi J, Wang T, et al. Expression of bag-1 and its correlation with axillary lymph node metastasis in breast cancer[J]. J Mod Oncol, 2006, 14(3): 275-277. [负军, 易军, 王廷, 等. 乳腺癌中 bag-1 的表达及与腋窝淋巴结转移的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(3): 275-277.]
- [8] Yun J, Wang L, Wang T, et al. Expression and significance of bag-1 gene, ER and PR in human breast cancer[J]. J Mod Oncol, 2005, 13(4): 464-465. [负军, 王岭, 王廷, 等. 乳腺癌组织中 bag-1、ER 和 PR 的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(4): 464-465.]
- [9] Wu M, Liu SY, Jiang DQ. Expression and significance of Bag-1 and Bcl-2 in cervical carcinoma[J]. J Math Med, 2005, 18(4): 323-325. [吴明, 刘少扬, 江大琼. Bag-1、Bcl-2 在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. 数理医药学杂志, 2005, 18(4): 323-325.]
- [10] Wang GB, Sun NF, Huang QX. Expression of anti-apoptotic gene bag-1 and bcl-2 in colorectal cancer and their interactions[J]. Chin J Exp Surg, 2005, 22(2): 226-227. [王国斌, 孙念峰, 黄庆先. 抗凋亡基因 bag-1 和 bcl-2 在结肠癌组织中的表达及其相互关系[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(2): 226-227.]
- [11] Bai YX, Yi JL, Li JF, et al. Clinicopathologic significance of BAG1 and TIMP3 expression in colon carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(28): 3883-3885.
- [12] Jin J, Yuan HY, Xiong B. Expression and significance of bag-1 and bcl-2 in colorectal adenoma and carcinoma[J]. Cancer Res Prev Treat, 2005, 32(5): 284-286. [金军, 袁宏银, 熊斌. bag-1、bcl-2 在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(5): 284-286.]
- [13] Mi LN, Guan JM, Lv LY. Antiapoptosis genes and their correlations with the large intestinal carcinoma[J]. World Chin J Digest, 2006, 14(33): 3219-3223. [米丽娜, 关景明, 吕丽艳. 抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(33): 3219-3223.]
- [14] Clemons NK, Collard TJ, Southern SL, et al. BAG-1 is up-regulated in colorectal tumor progression and promotes colorectal tumour cell survival through increased NF- κ B activity[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(4): 849-857.
- [15] Barnes JD, Arhel NJ, Lee SS, et al. Nuclear BAG-1 expression inhibits apoptosis in colorectal adenoma-derived epithelial cells[J]. Apoptosis, 2005, 10(2): 301-311.
- [16] Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, et al. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors[J]. Science, 2001, 291(5508): 1553-1557.
- [17] Qu LL, Liu XQ. Advance in research on clinical significance of BAG-1 expression in various human cancers[J]. Bull Acad Military Med Sciences, 2006, 30(5): 480-483. [曲莉莉, 刘晓晴. BAG-1 蛋白及其在多种肿瘤中表达的临床意义研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(5): 480-483.]
- [18] Lv YM, Wang Y, Tao L. Expression of Heat Shock Protein 70 and Bag-1 protein in gastroenteric cancer[J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Medical Science), 2006, 26(8): 884-887. [吕元明, 王瑛, 陶蕾. 热休克蛋白 70 和 bag-1 蛋白在恶性肿瘤中的表达[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2006, 26(8): 884-887.]

[编辑: 刘红武; 校对: 安 凤]