

# 脑胶质瘤中 bcl-2 基因表达水平及临床意义

王新军<sup>1</sup>, 赵忠伟<sup>2</sup>, 刘 泉<sup>1</sup>, 寿纪新<sup>1</sup>, 李培栋<sup>1</sup>, 单 峤<sup>1</sup>

Expression and Clinical Significance of bcl-2 Gene in Human Glioma

WANG Xin-jun<sup>1</sup>, ZHAO Zhong-wei<sup>2</sup>, LIU Quan<sup>1</sup>, SHOU Ji-xin<sup>1</sup>, LI Pei-dong<sup>1</sup>, SHAN Qiao<sup>1</sup>

1. Department of Neurosurgery, Zhengzhou Railway Central Hospital, Zhengzhou 450052, China; 2.

He'nan Key Laboratory of Tumor Pathology

**Abstract:** **Objective** To study the correlation of bcl-2 gene expression level with the prognosis in human glioma. **Methods** The expression of bcl-2 protein and bcl-2 mRNA were determined by immunohistochemical staining method and in situ hybridization in 61 samples of human glioma tissues, as well as 20 normal brain tissues. **Results** The positive rates of bcl-2 protein (90.2%) and bcl-2 mRNA (95.1%) in glioma group was significantly higher than those in human normal brain tissues ( $P < 0.01$ ), and a significant correlation was found between bcl-2 protein and bcl-2 mRNA expression level, between bcl-2 expression level and pathological grading ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** High bcl-2 expression was prevalent in malignant glioma tissue, and the bcl-2 expression level was a close correlation with the clinical prognosis.

**Key words:** Glioma; bcl-2; Immunohistochemical; In situ hybridization; Prognosis

**摘 要:** **目的** 探讨 bcl-2 基因在胶质瘤细胞中的表达水平与肿瘤恶性程度和临床预后的关系。方法用免疫组化染色和原位杂交检测 61 例人胶质瘤组织和 20 例正常人脑组织中 bcl-2 蛋白和 bcl-2 mRNA 的表达。结果 免疫组化染色 55 例 (87.0%) 表达 bcl-2 蛋白, 原位杂交显示 58 例 (92.8%) 表达 bcl-2 mRNA, 两者的表达水平呈正相关, bcl-2 在转录水平的表达明显高于蛋白质水平, 且 bcl-2 表达水平与胶质瘤病理分级呈显著正相关关系, 而 20 例正常人脑组织中仅 4 例表达 bcl-2 蛋白, 6 例表达 bcl-2 mRNA (均  $P < 0.01$ )。结论 恶性胶质瘤细胞中普遍存在 bcl-2 基因的高表达, 表达水平与胶质瘤的恶性程度、临床预后存在密切关系, bcl-2 基因可能成为恶性胶质瘤基因治疗的靶点。

**关键词:** 脑胶质瘤; bcl-2 基因; 免疫组织化学; 原位杂交; 预后

**中图分类号:** R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)10-0605-03

## 0 引言

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 其发生发展是一个多步骤、多因素参与的过程, 除了原癌基因激活, 抑癌基因灭活外, 某些凋亡控制基因的异常表达也促使细胞恶性转化<sup>[1]</sup>。自从 Vanx 等<sup>[2]</sup>首次提出 bcl-2 高表达可诱发肿瘤后, 近年来, 通过对人多系肿瘤的研究发现: bcl-2 高表达可延长细胞生存期, 抑制细胞凋亡, 与多种颅外肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[3-5]</sup>。本研究采用免疫组化和原位杂交的方法来探讨胶质瘤中 bcl-2 表达的临床意义, 现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例与组织标本

选择我院 2000 年 1 月 ~ 2002 年 12 月间手术切除的新鲜胶质瘤标本 61 例, 其中男 36 例, 女 25 例, 年龄 18 ~ 69 岁, 平均  $40.1 \pm 3.7$  岁。按 WHO 病理分级, 级 10 例, 级 9 例, 级 22 例, 级 20 例。另随机选取 20 例同期颅脑损伤患者手术获得的无神经系统肿瘤的正常脑组织标本作正常对照, 对照组男性 16 例, 女性 4 例, 年龄 21 ~ 51 岁, 平均  $37.9 \pm 4.2$  岁。标本收集时, 取中心无出血坏死组织, 部分 4% 甲醛固定; 部分用冷冻包埋剂 (OCT) 包埋, 液氮快速冷冻, -70℃ 冰箱保存。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 bcl-2 蛋白的免疫组织化学染色

bcl-2 蛋白单抗和免疫组化 SP 法试剂盒均购于博士公司, 实验过程严格按照说明书进行。用已知阳性表达切片做阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性细胞呈棕黄色, 结果判定: (-) 没有阳性信号; (+) 弱阳性, 阳性细胞  $< 25\%$ ; (++) 弱阳性, 阳性细胞介于  $25\% \sim 50\%$ ; (+++) 强阳性, 阳性

收稿日期: 2004-11-29; 修回日期: 2005-04-01

基金项目: 郑州铁路局科技发展重点项目 (04W01)

作者单位: 1. 450052 郑州铁路局中心医院神经外科; 2. 河南省肿瘤病例重点实验室

细胞 51 % ~ 75 % ; ( + + + + ) 强阳性 , 阳性细胞 > 75 % 。

1.2.2 bcl-2 mRNA 原位杂交检测

经地高辛标记的 bcl-2 探针及检测试剂盒均购自北京奥克公司。组织切片经常规脱蜡、水化, 预处理后, 蛋白酶 K 消化 30min, 预杂交 2 ~ 4h, 杂交及杂交后检测程序均严格按该试剂盒说明进行。空白对照加不含探针的杂交液作为阴性对照。阳性细胞呈紫蓝色, 结果判定同上。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 对相应数据进行  $\chi^2$  检验、 $t$  检验、 $F$  检验及直线相关分析和等级相关分析, 以  $P = 0.01$  作为检验水准。

2 结果

2.1 bcl-2 蛋白的免疫组化染色

bcl-2 蛋白阳性胶质瘤细胞为胞质呈棕黄色均匀染色, 阳性细胞散在分布, 见图 1。20 例正常脑组织中仅 4 例 (20.0 %) 表达 bcl-2 蛋白, 61 例胶质瘤中, 有 55 例 (90.1 %) 不同程度的表达 bcl-2 蛋白, 其阳性率随肿瘤级别升高而相应递增。除 I、II 级组间差异不十分显著外, 其他组间差异均有显著性, 见表 1。

表 1 免疫组化检测 bcl-2 蛋白表达结果比较

组别	例数	阳性数		强度例数 ( % )				
		( % )	+	++	+++	++++	+++++	++++++
正常组	20	4 (20)	3 (75.0)	1 (25.0)	0	0	0	0
组	10	7 (70.0)	4 (57.1)	1 (14.2)	2 (28.5)	0	0	0
组	9	8 (88.9)	5 (62.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	0
组	22	21 (95.4)	2 (9.5)	10 (47.6)	4 (19.0)	5 (23.8)	0	0
组	20	20 (100)	1 (5.0)	2 (10.0)	7 (35.0)	10 (50.0)	0	0

注: 经两两比较  $t$  检验证实 5 组间  $P < 0.01 \sim 0.001$

2.2 原位杂交

bcl-2 mRNA 阳性胶质瘤细胞呈紫蓝色颗粒均匀着色分布于胞质中, 见图 2。61 例胶质瘤中, 有 58 例 (95.1 %) 不同程度地表达 bcl-2 mRNA, 其阳性率总体上随肿瘤级别升高而相应增加, 除 I、II 级组间差异不明显外, 三组间差异均有显著性。20 例正常脑组织中 bcl-2 mRNA 表达水平显著低于胶质瘤组, 见表 2。

2.3 胶质瘤组织中 bcl-2 蛋白与 bcl-2 mRNA 表达之间的关系

经等级相关分析证实, bcl-2 mRNA 和蛋白表达的等级间呈显著性正相关 ( $r_s = 0.987, P < 0.01$ ), 见表 3。

表 2 原位杂交检测 bcl-2 mRNA 表达结果比较

组别	例数	阳性数		强度例数 ( % )				
		( % )	+	++	+++	++++	+++++	++++++
正常组	20	6 (30)	3 (66.7)	1 (33.3)	0	0	0	0
组	10	9 (90.0)	5 (55.5)	3 (33.3)	0	1 (11.1)	0	0
组	9	8 (88.9)	5 (58.8)	2 (25.0)	1 (12.5)	0	0	0
组	22	21 (95.4)	2 (9.5)	10 (47.6)	4 (19.0)	5 (23.8)	0	0
组	20	20 (100)	1 (5.0)	2 (10.0)	7 (35.0)	10 (50.0)	0	0

注: 经两两比较  $t$  检验证实 5 组间  $P < 0.02 \sim 0.001$

表 3 bcl-2 在蛋白质水平和转录水平表达结果比较

组别	例数	总阳性数 ( % )	强度例数 ( % )				
			-	+	++	+++	++++
免疫组化	61	55 (90.2)	6 (9.8)	11 (18.1)	15 (24.6)	13 (21.3)	15 (23.8)
原位杂交	61	58 (95.1)	3 (4.9)	13 (21.3)	17 (27.9)	12 (19.7)	16 (50.0)

3 讨论

细胞凋亡是正常组织细胞精细调节的重要机制, 受基因调控, 其控制基因主要是通过调节细胞存活期而发挥生物效应。肿瘤细胞的凋亡易感性受多种凋亡基因表达产物相互间的作用影响, 各种凋亡因子与肿瘤的形成密不可分<sup>[6]</sup>。bcl-2 蛋白是 bcl-2 家族中重要的凋亡抑制基因, 主要通过稳定线粒体膜电位, 阻止细胞色素 C 和凋亡抑制因子的释放, 阻断 Caspase 酶活化的上游信号传递通路等作用, 抑制细胞凋亡的发生, 最终导致细胞恶变<sup>[7,8]</sup>。研究证实: bcl-2 在多种肿瘤组织细胞中高表达, 它的异常表达可使已有基因异常改变的细胞逃避凋亡, 参与肿瘤的形成<sup>[1,5]</sup>。在本实验中, 我们发现胶质瘤组织中普遍存在 bcl-2 高表达, 明显不同于正常脑组织 ( $P < 0.01$ )。说明 bcl-2 基因可能参与了胶质瘤细胞凋亡的调节, 在胶质瘤中促进肿瘤生长的表达性反应, 可能是导致胶质瘤形成的一个重要因素。

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 由于其多质性和浸润性的特点, 手术切除难以完全彻底, 放射治疗不十分敏感, 化疗多产生耐药。因此, 复发率高、预后差是目前临床治疗的世界性难题。bcl-2 在胶质瘤中的高表达性反应, 给胶质瘤的治疗带来了新的思路。已有研究发现, bcl-2 高表达提高了肿瘤细胞对化疗药物的耐药性, 通过促进基质蛋白酶的合成、分泌和活化提高了恶性肿瘤浸润性生长的能力<sup>[9,10]</sup>。本研究, 61 例胶质瘤组织中 bcl-2 蛋白和 bcl-2 mRNA 阳性率和表达强度随肿瘤恶性程度增加而增加, 特别在 III 级组和 IV 级组更为明显, 这一实

验结果与本组病例临床资料、手术所见和随访结果相符合,与文献报道一致<sup>[11]</sup>。同时,对比免疫组化和原位杂交还发现,bcl-2 蛋白表达强度和 bcl-2 mRNA 表达强度在等级间是呈一个显著的正相关系,且在转录水平上的表达量显著高于蛋白翻译水平( $P < 0.01$ )。此外,也发现在部分、级胶质瘤组织中,不论是采用免疫组化还是原位杂交均显示有 bcl-2 异常高强度表达,结合再次多点病理,验证了胶质瘤多质性的存在。说明在恶性胶质瘤组织中 bcl-2 的高表达与肿瘤恶性进展及浸润性生长能力的获得密切相关,与临床预后呈显著负相关,进一步揭示了胶质瘤细胞凋亡/存活的机制,这有可能成为恶性胶质瘤凋亡治疗的新靶点和克服胶质瘤化疗耐药性的新途径。

(本文图见第 672 页)

#### 参考文献:

- [1] Sharma H, Sen S, Mathur M, et al. Combined evaluation of expression of telomerase, surviving, and anti-apoptotic Bcl-2 family members in relation to loss of differentiation and apoptosis in human head and neck cancers[J]. *Head Neck*, 2004, 26(8): 733-740.
- [2] Vanx DL, Cory S, Adams JM, et al. bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c myc to immortalize pre B cells[J]. *Nature*, 1988, 335(2): 440-444.
- [3] Sjostrom J, Blomqvist C, von Boguslawski K, et al. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-XL, bag-1, Fas, and FasL for chemotherapy response in advanced breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 811-816.
- [4] Korkolopoulou P, Lazaris Ach, Konstantinidou AE, et al. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rates and survival[J]. *Eur Urol*, 2002, 41(3): 274-283.
- [5] Bush JA, LI G. The role of bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(6): 531-539.
- [6] Tsujimoto Y, Shimizu S. bcl-2 family: life-or-death switch[J]. *FEBS Lett*, 2000, 466(1): 6-10.
- [7] Marzo I, Perez Galan P, Giraldo P, et al. Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and independent pathways acting on mitochondria[J]. *Biochem J*, 2001, 359(3): 537-546.
- [8] Blood A, Edwards CJ, Ishii HH, et al. Epstein-Barr virus-mediated protection against etoposide-induced apoptosis in B1A-B cell lymphoma cells: role of bcl-2 and caspase proteins[J]. *Arch Virol*, 2004, 149(2): 289-302.
- [9] Chun E, Lee KY. Bcl-2 and Bcl-XL are important for the induction of paclitaxel resistance in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(3): 771-779.
- [10] 刘宇,张幸平,陈晓品,等. p53、bcl-2 蛋白和 p-pg 在鼻咽鳞癌中表达的研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2004, 31(7): 415-417.
- [11] McDonald FE, Ironside JW, Gregor A, et al. The prognostic influence of bcl-2 in malignant glioma[J]. *British Journal of Cancer*, 2002, 86(4): 1899-1904.

[编辑: 贺文]

## 脑胶质瘤中 bcl-2 基因表达水平及临床意义

(正文见 605 页)

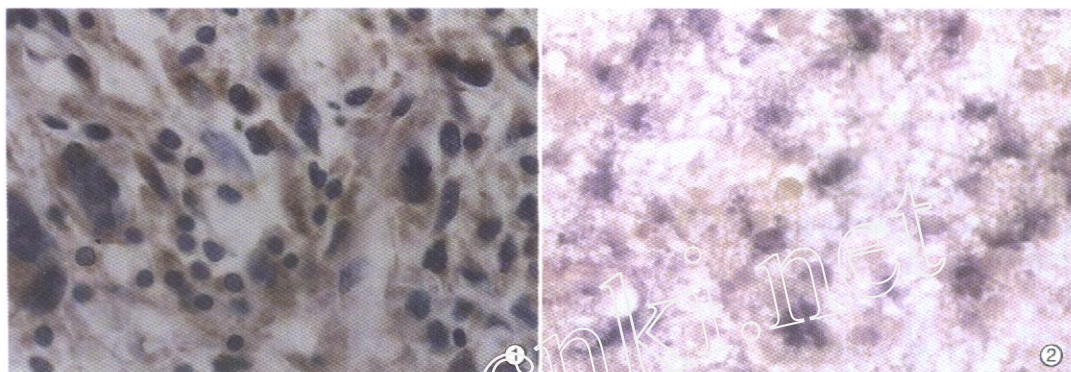


图1 免疫组化 bcl-2 蛋白在多形性胶质母细胞瘤中的表达: 阳性物质为棕黄色, 主要位于细胞质中, SP 法, DAB 染色, 苏木素复染 (bcl-2 强表达  $\times 400$ )

图2 原位杂交 bcl-2 mRNA 在多形性胶质母细胞瘤中的表达: 阳性物质为紫蓝色颗粒, 主要位于胞质中, DAB 染色(强表达  $\times 400$ )

## 舒林酸、尼美舒利对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖及 COX-2、NF- $\kappa$ B 表达的抑制作用

(正文见 623 页)

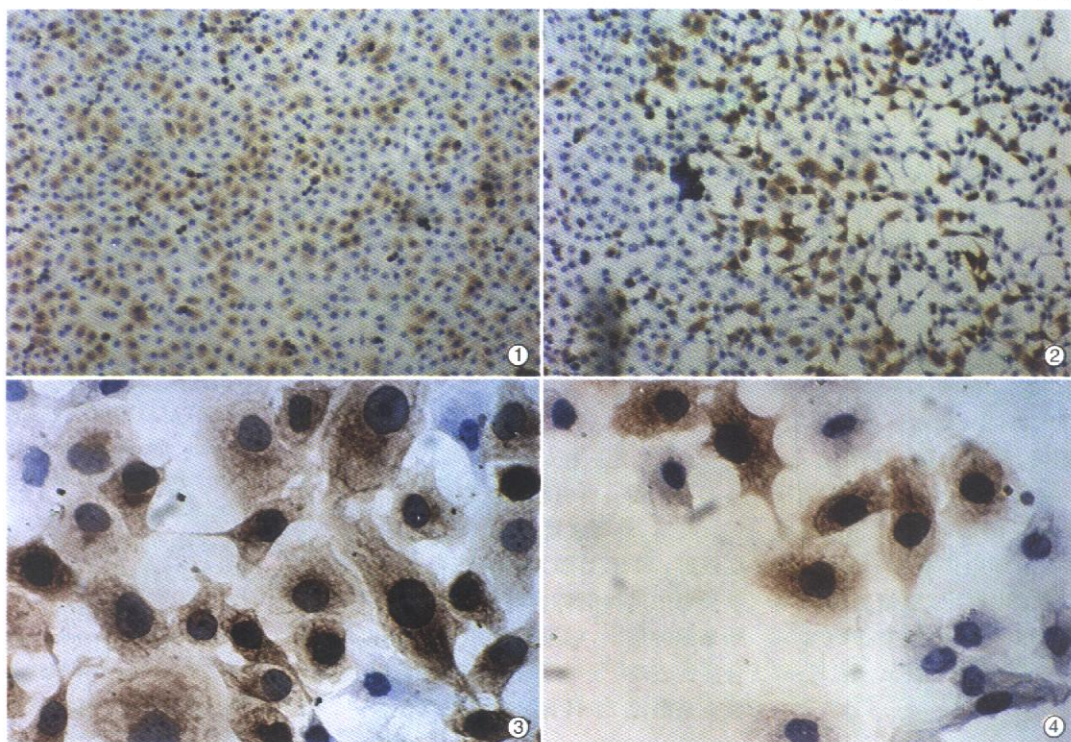


图1 阴性对照组 SGC7901 细胞 COX-2 的表达 (Power vision™ 法,  $10 \times 10$ )

图2 尼美舒利 200 $\mu$ mol/L 组 SGC7901 细胞 COX-2 的表达 (Power vision™ 法,  $10 \times 10$ )

图3 阴性对照组 SGC7901 细胞 NF- $\kappa$ B 的表达 (Power vision™ 法,  $10 \times 40$ )

图4 舒林酸 1.2mmol/L 组 SGC7901 细胞 NF- $\kappa$ B 的表达 (Power vision™ 法,  $10 \times 40$ )