

Bcl-2、Bax、Cyt-C 和 Bid 在原发性肝细胞癌中的表达及意义

陈 昊 王红霞 张春芳 张 昶 赵文海 陈乃玲

摘 要 **目的** 观察 Bcl-2、Bax、细胞色素 C (Cyt-C) 和 Bid 在原发性肝细胞癌 (PHC) 组织中的表达并分析其与病理分期、肿瘤分化程度和淋巴结转移间的关系。**方法** 应用免疫组织化学法检测 Bax 以及应用原位分子杂交方法检测 Bcl-2、Cyt-C 和 Bid 在 50 例 PHC 组织及 30 例正常肝脏组织 (对照组) 中的表达。**结果** PHC 组 Bcl-2、Bax 和 Bid 的阳性表达率较对照组均明显下降 ($P < 0.05$ 或 0.01), 但 Cyt-C 阳性表达率与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。高及中分化 PHC 组 Cyt-C 阳性表达率均明显高于低分化组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 但不同病理分级和有无淋巴结转移组间差异未见统计学意义 ($P > 0.05$)。PHC 不同病理分级、分化程度和有无淋巴结转移组间 Bcl-2、Bax 和 Bid 表达比较均未见统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** PHC 促凋亡基因 Bid 表达下调, 同时 Cyt-C 随着 PHC 分化程度的降低而表达下调。

关键词 原发性肝细胞癌 凋亡 Bcl-2、Bax、细胞色素 C Bid

Expression and Significance of Bcl-2, Bax, Cyt-C and Bid in Primary Hepatocellular Carcinoma. Chen Hao, Wang Hongxia, Zhang Chunfang, Zhang Chang, Zhao Wenhai, Chen Nailong. The First People's Hospital of Lianyungang City, Jiangsu 222002, China

Abstract **Objective** To observe the expression of Bcl-2, Bax, Cytochrome C (Cyt-C) and Bid in 50 cases of primary hepatocellular carcinoma (HCC group) and 30 cases of normal liver specimens (control group), and then to analyze their relationship with pathological grade, tumor differentiation and lymph node metastasis. **Methods** The expression of Bax was detected by immunohistochemistry, and the expressions of Bcl-2, Cyt-C and Bid by hybridization in situ in 50 cases of primary HCC group and 30 cases of control group. **Results** The positive expression rate of Bcl-2, Bax and Bid all decreased in HCC group as compared with control group ($P < 0.05$ or 0.01). The positive expression rate of Cyt-C didn't have significant difference between two groups (all $P > 0.05$). The positive expression of Cyt-C in high differentiation and middle differentiation sub-groups were higher than that in low differentiation sub group, and there was significant difference ($P < 0.01$ and < 0.05). However, the expression of Cyt-C had no relation with pathological grade and lymph node metastasis. The expression of Bcl-2, Bax and Bid didn't have significant difference in different pathological grades, tumor differentiation and lymph node metastasis groups (all $P > 0.05$). **Conclusion** The expression of pro-apoptotic gene Bid decreased in PHC, and the expression of Cyt-C in PHC decreased with the decreasing of tumor differentiation extent.

Key words Primary hepatocellular carcinoma; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Cyt-C; Bid

原发性肝细胞癌 (primary hepatocellular carcinoma, PHC) 是一系列慢性肝病的终末阶段, 严重危害人民的生命健康。它是一种复杂而异质性的肿瘤, 存在多种基因组变异。有证据表明, PHC 存在多种信号通路的异常激活, 其中包括表皮生长因子受体、肝细胞生长因子和凋亡信号通路调控机制紊乱。本文拟通过检测 PHC 组织中凋亡蛋白或基因 Bcl-2、Bax、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 和 Bid 的表

达情况来探讨其表达意义及临床应用前景。

材料与方法

1. 材料来源: 选择 2004 年 1 月 ~ 2008 年 12 月于笔者医院病理科手术切除和尸检蜡块标本, 所有标本均经组织病理证实。PHC 组: 50 例, 男性 41 例、女性 9 例, 年龄 33 ~ 74 岁、平均 52.84 ± 9.15 岁。分化程度: 高分化 8 例, 中分化 35 例, 低分化 7 例。病理分级: 参照 Edmondson 分级法进行病理分级, 其中 I 级 4 例, II 级 24 例, III 级 22 例^[1]。淋巴结转移情况: 淋巴结转移 10 例, 无淋巴结转移 40 例。对照组: 正常肝脏组织标本 30 例, 男性 17 例, 女性 13 例, 年龄 4 ~ 71 岁、平均 41.53 ± 18.20 岁。所有组织标本均经 10% 中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋并 $4\mu\text{m}$ 切片。

2. 试剂: Bax 兔抗人多克隆抗体、Bcl-2 mRNA、Cyt-C mRNA 和 Bid mRNA 原位分子杂交试剂盒; 免疫组化二抗试

基金项目: 江苏省连云港市卫生局科研项目 (09041)

作者单位: 222002 江苏省连云港市第一人民医院 (陈昊、王红霞、张春芳、张昶、赵文海); 100700 北京军区总医院全军肝病治疗中心 (陈乃玲)

通讯作者: 陈昊, 电子信箱: whx_1984happy@126.com

剂盒、DAB 显色剂均购自武汉博士德生物有限公司。

3. 免疫组织化学和原位分子杂交:免疫组织化学和原位分子杂交染色均按照试剂说明书操作,以 PBS 代替一抗作为空白对照。采用半定量积分法判断结果,即每张切片随机选取 10 个高倍镜视野,分析其阳性细胞数及着色强度。①阳性细胞百分数计分:阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为 0 分,6% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分;②着色强度积分,无色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。将①和②两者积分相乘得到总积分,0 分为阴性(-),1 ~ 4 分为弱阳性(+),5 ~ 8 分为阳性(++),9 ~ 12 分为强阳性(+++)。

4. 统计学处理:采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,运用卡方检验比较各组间阳性表达率的差异。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. PHC 组织中 Bcl - 2、Bax 和 Cyt - C 的表达: Bcl - 2、Bax 与 Cyt - C 均阳性表达于细胞质,染色弥散分布(图 1 ~ 图 3)。Bcl - 2 阳性表达率在 PHC 组为 38.00% (19/50)、对照组为 86.67% (26/30),两组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),PHC 组低于对照组。Bax 阳性表达率在 PHC 组为 70.00% (35/50)、对照组为 93.33% (28/30),两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),PHC 组低于对照组。Cyt - C 阳性表达率在 PHC 组为 78.00% (39/50)、对照组为 63.33% (19/30),两组间比较差异未见统计学意义($P > 0.05$)(表 1、表 2)。

2. PHC 组织中 Bid 的表达:Bid 阳性表达于细胞质,染色弥散分布(图 4)。Bid 阳性表达率 PHC 组为 66.00% (33/50)、对照组为 96.67% (29/30),对照组高于 PHC 组,两组间差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 2)。

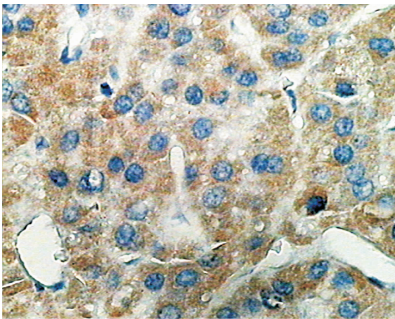


图 1 Bcl - 2 在 PHC 中的阳性表达 (ISH $\times 400$)

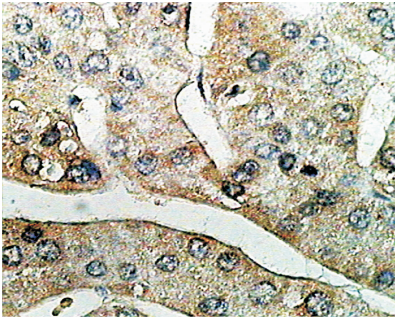


图 2 Bax 在 PHC 中的阳性表达 (SP $\times 400$)

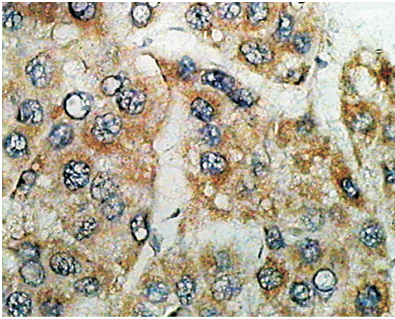


图 3 Cyt - C 在 PHC 中的阳性表达 (ISH $\times 400$)

表 1 Bcl - 2 和 Bax 在 PHC 组织中的阳性表达

组别	n	Bcl - 2				Bax			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
对照组	30	4	6	15	5	2	12	13	3
PHC 组	50	31	9	6	4	15	24	7	4

PHC 组与对照组比较, Bcl - 2 阳性表达率, $\chi^2 = 18.045$, $P < 0.01$; Bax 阳性表达率, $\chi^2 = 6.100$, $P < 0.05$

表 2 Cyt - C 和 Bid 在 PHC 组织中的阳性表达

组别	n	Cyt - C				Bid			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
对照组	30	11	6	10	3	1	13	9	7
PHC 组	50	11	11	17	11	17	7	21	5

PHC 组与对照组比较, Cyt - C 阳性表达率, $\chi^2 = 2.203$, $P > 0.05$; Bid 阳性表达率, $\chi^2 = 10.112$, $P < 0.01$

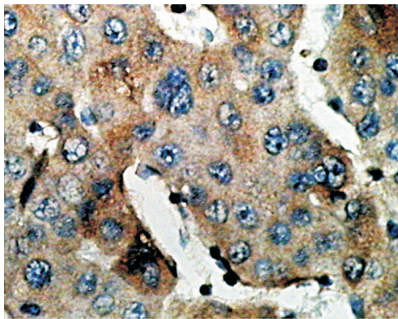


图 4 Bid 在 PHC 中的阳性表达
(ISH × 400)

3. PHC 组凋亡蛋白或基因与分化程度、病理分级及有无转移的关系:Cyt - C 阳性表达率在 PHC 高分化组为 87. 50% (7/8)、中分化组为 85. 71% (30/35)、低分化组为 28. 57% (2/7);中分化组与低分化组间以及高分化组与低分化组间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),但高分化组与中分化组间比较未见统计学差异($P > 0.05$)(表 3)。Cyt - C 在不同病理分级及有无淋巴结转移组间均未见统计学差异($P > 0.05$)。Bcl - 2、Bax、Bid 表达在不同分化程度、病理分级及有无淋巴结转移组间均未见统计学差异($P > 0.05$)(表 3、表 4)。

表 3 PHC 组织 Cyt - C 和 Bid 阳性表达与病理分级、分化程度、有无淋巴结转移间的关系

组别	n	Cyt - C			Bid		
		n (%)	χ^2	P	n (%)	χ^2	P
病理分级	50	39 (38.00)	0.775	>0.05	33 (66.00)	0.761	>0.05
I 级	4	3 (75.00)			2 (50.00)		
II 级	24	20 (83.33)			17 (70.83)		
III 级	22	16 (72.73)			14 (63.64)		
分化程度	50	39 (38.00)	11.601	<0.01	33 (66.00)	0.535	>0.05
高	8	7 (87.50)			6 (75.00)		
中	35	30 (85.71)			22 (62.86)		
低	7	2 (28.57)			5 (71.43)		
淋巴结转移	50	39 (38.00)	0.029	>0.05	33 (66.00)	1.426	>0.05
有	10	8 (80.00)			5 (50.00)		
无	40	31 (77.50)			28 (70.00)		

Cyt - C 高分化组与低分化组比较, $\chi^2 = 5.402, P < 0.05$;Cyt - C 中分化组与低分化组比较, $\chi^2 = 10.500, P < 0.01$

表 4 PHC 组织 Bcl - 2 和 Bax 阳性表达与病理分级、分化程度、有无淋巴结转移的关系

组别	n	Bcl - 2			Bax		
		n (%)	χ^2	P	n (%)	χ^2	P
病理分级	50	19 (38.00)	0.738	>0.05	39 (78.00)	2.519	>0.05
I 级	4	2 (50.00)			3 (75.00)		
II 级	24	10 (41.67)			21 (87.50)		
III 级	22	7 (31.82)			15 (68.18)		
分化程度	50	19 (38.00)	0.764	>0.05	39 (78.00)	0.300	>0.05
高	8	4 (50.00)			6 (75.00)		
中	35	13 (37.14)			28 (80.00)		
低	7	2 (28.57)			5 (71.43)		
淋巴结转移	50	19 (38.00)	1.719	>0.05	39 (78.00)	0.466	>0.05
有	10	2 (20.00)			7 (70.00)		
无	40	17 (42.50)			32 (80.00)		

讨 论

细胞凋亡通路主要包括内源性的线粒体通路和外源性的死亡受体通路,其异常参与诸多疾病包括恶

性肿瘤的发生发展过程。Bcl - 2 家族主要通过线粒体通路发挥其促凋亡或抑凋亡活性,包括促凋亡蛋白亚家族 (Bax、Bak 等)、抑凋亡蛋白亚家族 (Bcl - 2、

Bcl-2 等)以及仅含 BH3 区域的促凋亡蛋白亚家族 (Bid、Bad 等)。促凋亡和抑凋亡蛋白的比例决定细胞对死亡信号的反应。Bcl-2 定位于线粒体膜上而 Bax 和 Bid 定位于胞质。死亡信号启动后 Bax 从胞质易位到线粒体膜上与 Bcl-2 形成异源二聚体或自身形成同源二聚体^[2]。目前研究支持当线粒体膜上 Bcl-2 家族同源二聚体多于异源二聚体时,线粒体膜通透性孔道开放并释放线粒体膜间的 Cyt-C,然后逐级激活下游效应 caspases 而发挥促凋亡作用。Bid 主要通过死亡受体通路中激活的 caspase8 将其切割为有活性的 tBid 而参与线粒体通路促凋亡效应。

本实验发现 Bcl-2 和 Bax 在 PHC 组较对照组的表达均呈下降趋势,而位于 Bcl-2 家族下游的 Cyt-C 表达无明显改变。本文分析其中机制可能为:(1)在 PHC 的发生发展过程中,Bax 表达下调抑制肿瘤细胞凋亡,但这一信号的快速启动有可能反馈性地激活机体的促凋亡信号其中 Bcl-2 表达下调可能是促凋亡信号的一部分。研究表明乌头碱可以通过线粒体通路发挥其对肝癌细胞株的促凋亡活性即 Bcl-2 表达下调而 Bax 表达上调,Bcl-2/Bax 比值降低,从而改变线粒体膜电位促进 Cyt-C 释放发挥促凋亡作用。姜黄素通过上调 Bcl-2 表达且下调 Bax 表达,Bcl-2/Bax 比值升高来有效的抑制神经细胞凋亡^[3]。由此可见 Bcl-2/Bax 比例高低决定了细胞凋亡的方向即抑制凋亡或是促进凋亡^[4]。虽然本文中 Bcl-2 和 Bax 表达均下调,但是并非同步,结合肿瘤细胞的生物学特性我们推测 PHC 组织中 Bcl-2/Bax 比值可能升高,有待进一步研究证实。(2)即使 Bcl-2/Bax 比值能够引起 Cyt-C 释放减少而发挥凋亡抑制作用,Cyt-C 也可能只是线粒体膜间和膜外的分布不同而没有量的异常,另一方面肿瘤细胞内源性凋亡通路因线粒体发育不成熟受到抑制^[5],这一过程并非凋亡途径依赖的。我们认为前者的可能性更大。

本研究还发现随着 PHC 分化程度的降低,Cyt-C 表达呈现一定的下调趋势,提示在 PHC 发展过程中,Cyt-C 不仅可能存在分布异常,还存在表达量的变化。因 Cyt-C 表达降低导致促凋亡活性减弱,从而使 PHC 细胞获得旺盛的生长增生能力。本文分析

其中机制可能是低分化 PHC 细胞异型性大,细胞器发育不良,线粒体储存和释放 Cyt-C 功能障碍,凋亡受抑制,细胞得以恶性增生,这与其生物学行为相吻合。目前关于促凋亡蛋白 Bid 在肿瘤发生发展中作用仍存争论。结合目前研究结果 Bid 可能具有以下功能即促进肿瘤细胞增生作用;肿瘤免疫逃避效应;促进细胞凋亡作用等^[6-8]。本课题实验中 PHC 组 Bid 阳性表达率低于对照组。Bid 在 PHC 组低表达,使 PHC 细胞促凋亡信号启动减弱,间接促进了 PHC 细胞的恶性增生。有研究表明 Bax 的转位和插入都依赖于 Bid 的活化^[9,10],PHC 组 Bid 表达降低,导致 Bax 的转位和插入功能受限,线粒体膜上 Bax 同源二聚体形成减少,内源性线粒体通路难以激活。若能通过分子生物学技术上调 PHC 细胞中 Bid 的表达,进而使得线粒体膜上 Bcl-2 家族的同源二聚体多于异源二聚体,促进线粒体膜通透性孔道开放,释放线粒体膜间的 Cyt-C,从而激活促凋亡作用,则有望成为 PHC 治疗的新靶点。

参考文献

- 1 张友会,刘复生,刘彤华,等.中国肿瘤病理学分类(下卷)[M].北京:科学技术文献出版社出版,2001:230
- 2 金琳芳,陈同钰. Bcl-2 基因蛋白家族与细胞凋亡[J].医学综述,2005,11(5):446-447
- 3 廖涛,王飞,张占军,等.姜黄素对痴呆模型小鼠学习记忆能力的改善作用及对细胞凋亡的影响[J].中国药理学通报,2009,25(10):1359-1363
- 4 Bartek J, Lukas J. Cell biology. Balancing life - or - death decisions [J]. Science,2006,314(5797):261-262
- 5 陈乃玲,陈昊,白玲,等.细胞色素 C 在结肠癌组织中的表达及其与细胞线粒体超微结构改变的关系[J].实用医学杂志,2008,24(23):4037-4039
- 6 白莉,毛高平,曹传平.促凋亡蛋白 Bid 在 PHC 发生发展过程中的作用[J].胃肠病学和肝病学杂志,2006,15(6):603-605
- 7 Huber V, Fais S, Iero M, et al. Human Colorectal Cancer Cells Induce T - Cell Death Through Release of Proapoptotic Microvesicles; Role in Immune Escape [J]. Gastroenterology,2005,128(7):1796-1804
- 8 陈昊,陈乃玲,白玲,等.促凋亡蛋白 FasL, Bid 在结肠癌组织表达的临床意义[J].中国实验诊断学,2008,12(6):757-760
- 9 白莉,曹传平,张映辉,等.促凋亡蛋白 Bid 诱导肝细胞凋亡的机制[J].中国生物化学与分子生物学报,2004,20(5):670-674
- 10 Bleicken S, Classen M, Padmavathi PV, et al. Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion [J]. J Biol Chem, 2010,285(9):6636-6647

(收稿:2010-07-13)