



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.025
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4082.shtml

· 简要论著 ·

大肠癌中抑制基因 BCL-2、p53 与 Beclin-1 的表达及其与肠癌生物学行为的关系

张海洋, 厉冰, 杨玉兵, 宋展, 王耿泽

(河南省南阳市中心医院 普通外科, 河南 南阳 473009)

摘要

目的: 探讨 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白在大肠癌中的表达意义及其与肠癌生物学行为的关系。

方法: 采用免疫组化法检测 20 例正常大肠黏膜、38 例大肠黏膜异型增生和 92 例结直肠癌组织中 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白的表达水平, 并结合结直肠癌的生物学行为和患者的生存率进行分析。

结果: Beclin-1 蛋白在病变大肠组织中的表达率显著高于正常大肠黏膜 ($P < 0.05$), 但其与结直肠癌 Dukes 分期、肿瘤分化程度和淋巴结转移均无明显关系 ($P > 0.05$); BCL-2 和 p53 蛋白在病变大肠组织中的阳性表达率较高, 但在正常大肠黏膜中几乎不表达 ($P < 0.05$); BCL-2 和 p53 的表达还与结直肠癌 Dukes 分期及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); 相关性分析显示, Beclin-1 与 p53 蛋白的表达呈正相关 ($r = 0.342, P < 0.05$), 且 p53 蛋白阴性表达的患者 5 年生存率较阳性表达者高 ($P < 0.05$)。

结论: 在大肠组织中, Beclin-1 与 BCL-2、p53 基因相互协作, 对其异常及癌变起到重要作用, 三者的表达情况可作为大肠癌病程进展及预后的参考指标。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1429-1433]

关键词

结直肠肿瘤 / 病理学; Beclin-1 蛋白; BCL-2 蛋白; p53 蛋白

中图分类号: R735.3

大肠癌包括直肠癌和结肠癌, 是消化道常见的恶性肿瘤, 在全球范围内有较高的发病率和病死率。大肠癌的发病与遗传因素、环境因素、大肠腺瘤和饮食方式等关系密切^[1-2]。自噬是吞噬自身受损细胞器或细胞质蛋白, 并与溶酶体融合降解的过程, 从而实现某些细胞器的更新和满足细胞自身的代谢需求。自噬不仅在细胞生长分化和受损时发挥作用, 还参与了肿瘤等多种疾病的发生和发展^[3-5]。细胞凋亡是指细胞主动、有序的死亡, 其涉及一系列凋亡相关基因的激活、表达和调控, 有利于维持内环境的稳定^[6]。Beclin-1 属于自噬基因, 参与形成自噬体, 而 BCL-2 和 p53 是与凋亡有关的基因, 它们可能在肿瘤的分化和临床分期中起到重要作用, 本组研究采用免疫组化法检测其在大肠癌中的表达水平, 并分析其与肠癌生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集我院 2010 年 7 月—2012 年 6 月期间进行肠镜活检和外科手术的标本共 150 例, 其中 20 例正常大肠黏膜、38 例大肠黏膜异型增生和 92 例结直肠癌组织。38 例大肠黏膜异型增生均经病理检查确诊, 其中男 23 例, 女 15 例, 年龄 40~71 岁, 平均年龄 (59.42 ± 10.78) 岁; 轻度 12 例、中度 12 例、重度 14 例。92 例结直肠癌均经病理检查确诊, 其中男 55 例, 女 37 例, 年龄 38~73 岁, 平均年龄 (61.42 ± 11.36) 岁; 按照国际改良 Dukes 分期标准划分: A、B 期 59 例, C、D 期 33 例; 肿瘤高、中、低分化程度分别为: 10, 74, 8 例; 淋巴结转移 33 例, 无淋巴结转移 59 例。20 例正常大肠黏膜组织取于距肿瘤边缘 5 cm 以上的组织。

1.2 免疫组化法

1.2.1 试剂 兔抗人 Beclin-1 抗体购于美国 Santa Cruz 生物技术公司, 鼠抗人 BCL-2 单克隆抗、鼠抗人 p53 单克隆抗体、DAB 显色剂和免疫组化超

收稿日期: 2014-04-15; 修订日期: 2014-09-08。

作者简介: 张海洋, 河南省南阳市中心医院主治医师, 主要从事普通外科方面的研究。

通信作者: 张海洋, Email: 2965363353@qq.com

敏 SP 试剂盒均购于上海 elisa 生物技术有限公司。

1.2.2 染色方法 本组研究采用免疫组化 SP 法。所有组织均经 10% 甲醛的水溶液固定、常规脱水和石蜡包埋，连续 3 μm 切片。用微波抗原修复，按照顺序滴加以下溶液，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育：过氧化物酶阻断液、非免疫动物血清、一抗工作液（按 1:50 比例稀释）、生物素标记的二抗。DAB 显色与苏木素复染。以 PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

由 2 位经验丰富的病理医师进行盲法阅片，Beclin-1 蛋白以及 BCL-2 蛋白的阳性反应发生位置均为细胞质，p53 蛋白的阳性反应发生位置则在细胞核内^[7]。高倍镜下，每个标本选取 5 个视野（100 个细胞 / 视野），当定位的细胞质或细胞核呈淡黄色至棕褐色颗粒即为阳性表达。阳性细胞占总细胞数的百分率：阳性细胞 <20% 为阴性， $\geq 20\%$ 为阳性。

1.4 统计学处理

数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理，计

数资料之间比较采用 χ^2 检验，多组资料之间比较使用 F 检验，Beclin-1 与 BCL-2 和 p53 蛋白表达的相关性采用 Spearman 秩相关检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白在不同组织中阳性表达

Beclin-1 和 BCL-2 蛋白的阳性染色反应发生位置均为细胞质，颗粒呈淡黄色至棕褐色。p53 蛋白的阳性染色主要在细胞核中，颗粒呈淡黄色至棕褐色（图 1）。Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白在结肠直肠癌组织中的阳性表达率均最高，其次为大肠黏膜异型增生组织，而正常大肠黏膜阳性表达率最低，不同组织中阳性表达比较差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），且 p53 蛋白在正常大肠黏膜中几乎不表达（表 1）。

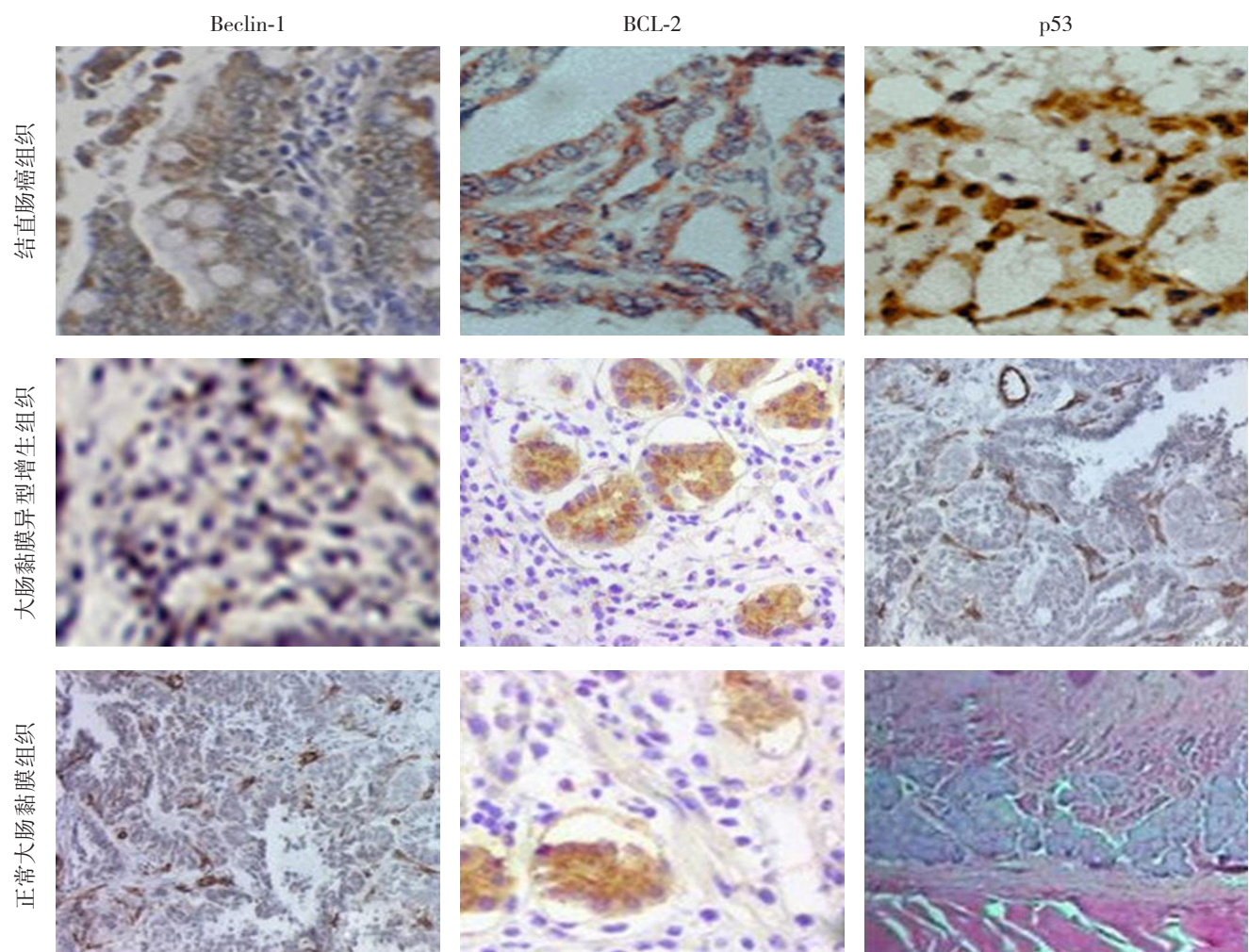


图 1 不同组织 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白表达的免疫组化图（ $\times 100$ ）

表 1 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白在不同组织中阳性表达情况比较 [n (%)]

组织类型	n	Beclin-1	BCL-2	p53
正常大肠黏膜	20	10 (50.00)	2 (10.00)	0 (0)
大肠黏膜异型增生组织	38	28 (76.68) ¹⁾	12 (31.57) ¹⁾	13 (34.21) ¹⁾
结直肠癌组织	92	91 (98.91) ^{1), 2)}	63 (68.48) ^{1), 2)}	50 (54.35) ^{1), 2)}

注: 1) 与正常大肠黏膜比较, $P < 0.05$; 2) 与大肠黏膜异型增生组织比较, $P < 0.05$

2.2 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白在结直肠癌中阳性表达与患者临床病理因素的关系

Beclin-1 蛋白表达阳性率与性别、年龄、肿瘤大小、Dukes 分期、肿瘤分化程度及淋巴结转移情况无关 ($P > 0.05$); BCL-2 和 p53 蛋白表达阳性率与结直肠癌淋巴结转移情况以及 Dukes 分期相关 ($P < 0.05$), 但与患者性别、年龄、肿瘤大小以及分化程度关系不明显 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白在结直肠癌中阳性表达与肠癌临床病理因素的关系 [n (%)]

项目	n	Beclin-1	P	BCL-2	P	p53	P
性别							
男	55	52 (94.55)	0.548	37 (67.27)	0.473	32 (58.19)	0.589
女	37	36 (97.30)		24 (64.86)		21 (56.76)	
年龄 (岁)							
< 55	30	28 (93.33)	0.406	18 (60.00)	0.162	18 (60.00)	0.387
≥ 55	62	60 (96.77)		43 (69.35)		35 (56.45)	
肿瘤直径 (cm)							
< 3	12	11 (91.67)	0.338	8 (66.67)	0.897	6 (50.00)	0.255
≥ 3	80	77 (96.25)		53 (66.25)		47 (58.75)	
Dukes 分期							
A~B	59	55 (93.22)	0.172	34 (57.63)	0.023	24 (40.68)	0.011
C~D	33	33 (100.00)		27 (81.82)		29 (87.88)	
组织学类型							
高	10	10 (100.00)		7 (70.00)		7 (70.00)	
中	74	71 (95.95)	0.634	48 (64.86)	0.285	40 (54.05)	0.093
低	8	7 (87.50)		6 (75.00)		6 (75.00)	
淋巴结转移							
有	33	33 (100.00)	0.172	27 (81.82)	0.023	29 (87.88)	0.011
无	59	55 (93.22)		34 (57.63)		24 (40.68)	

2.3 自噬相关基因 Beclin-1 与凋亡相关基因 BCL-2、p53 的关系

Spearman 秩相关分析显示, Beclin-1 蛋白与 BCL-2、p53 蛋白的表达呈正相关 ($r = 0.298$ 、 0.342 , $P < 0.05$)。

2.4 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白的表达与结直肠癌预后的关系

本组研究中 76 例结直肠癌患者有完整的随访资料, 其生存率分析显示, Beclin-1、BCL-2 和 p53 蛋白表达与结直肠癌患者的 3、5 年生存率均具有明显相关性 ($P < 0.05$); 其中阴性表达组患者

3、5 年生存率明显增高, 且显著高于阳性表达组, 两组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。具体情况见表 3。

表 3 Beclin-1 与 BCL-2、p53 蛋白的表达与结直肠癌预后的关系

组别	3 年生存率		5 年生存率	
	DukesA-B	DukesC-D	DukesA-B	DukesC-D
Beclin-1				
阳性	76.36(42/55)	30.30(10/33)	58.18(32/55)	21.21(7/33)
阴性	100(3/3) ¹⁾	100(1/1) ¹⁾	66.67(2/3) ¹⁾	100(1/1) ¹⁾
BCL-2				
阳性	70.59(24/34)	59.26(16/27)	58.82(20/34)	44.44(12/27)
阴性	90.00(18/20) ¹⁾	72.73(8/11) ¹⁾	75.00(15/20) ¹⁾	54.55(6/11) ¹⁾
p53				
阳性	70.83(17/24)	58.62(17/29)	62.50(15/24)	35.89(14/29)
阴性	88.00(22/25) ¹⁾	71.43(10/14) ¹⁾	72.00(18/25) ¹⁾	57.14(8/14) ¹⁾

注: 1) 阴性组与阳性组比较, $P < 0.05$

3 讨论

自噬是通过溶酶体融合降解某些蛋白质和细胞内源性底物, 并参与受损细胞的死亡及肿瘤的发生和发展。有报道^[8]指出, 自噬是一把双刃剑, 过度的吞噬效应能引起自噬性死亡, 起到抑制肿瘤的效果, 同时其也能保护肿瘤细胞避免电离辐射或化疗所致的损伤。Beclin-1 是调控细胞自噬的基因之一, 检测其蛋白质能用于反映细胞的自噬情况。细胞凋亡是一种死亡方式, 但与细胞坏死或自噬性死亡不一样。有报道^[9-10]显示, 肿瘤细胞凋亡失衡与细胞增殖失控及分化异常同为肿瘤发生发展的重要因素, BCL-2 和 p53 是调控细胞凋亡的相关基因, 其蛋白质与肿瘤关系密切。

Beclin-1 是酵母自噬基因 ATG6/vps30 的同源基因, 它对肿瘤和自噬的调节非孤立的, 它能与 Class III PI-3K 相互作用, 形成复合体而发挥作用。Ahn 等^[11]研究指出, Beclin-1 单等位基因缺失出现于过半数的前列腺癌与卵巢癌等癌症中。本组研究发现, Beclin-1 蛋白在病变大肠组织和正常大肠黏膜中的阳性率差异显著, 提示了自噬活性的增加

在大肠癌的发生发展中发挥一定作用, 机制可能是 Beclin-1 单等位基因缺失, 致使机体的自噬失衡, 受损细胞及细胞内源性底物积聚, 成为致癌因素。

BCL-2 基因是在人类滤泡状淋巴瘤中分离出来的, 是目前研究最广泛深入的凋亡调控基因之一^[12]。BCL-2 蛋白家族十分特别, 此家族中的同源蛋白成员有些促进细胞凋亡, 有些成员则阻止细胞凋亡。BCL-2 蛋白在细胞凋亡信号转导途径发挥着重要作用, 它能够阻止细胞色素 C 从线粒体中泄露, 从而延长细胞寿命^[13-15]。本组研究结果显示, BCL-2 蛋白在病变大肠组织中的表达异常, 提示细胞凋亡能力削弱过程贯穿在大肠癌的发生发展过程中。机制可能是 BCL-2 蛋白的过度表达, 抑制了肠组织正常细胞的凋亡, 细胞增殖与凋亡的平衡被打破, 致使癌变发生。在结直肠癌 C、D 期 Dukes 分期患者中, BCL-2 蛋白表达阳性率显著高于 A、B 期患者, 与此同时, 发生淋巴结转移者阳性率也更高, 可能是失衡后肿瘤细胞经淋巴道到其他部位继续生长而实现转移。

p53 基因是定位于人类染色体 17q13.1 上的抑癌基因, 野生型 p53 蛋白含量很少而较难检出, 当其基因突变后表达量增高, 因此可以采用免疫组化法检测。突变型 p53 蛋白失去正常的调控功能, 并且将此遗传至后代, 最终形成肿瘤^[15-17]。本组研究结果显示, 突变型 p53 蛋白在正常大肠黏膜中几乎不表达, 而在病变的大肠组织中呈阳性, 机制可能是 p53 基因突变后, p53 蛋白不仅无法抑制细胞增殖, 反而促进细胞恶性转化, 抑癌基因 p53 转变为原癌基因。在结直肠癌 A、B 期的 Dukes 分期中, p53 蛋白表达阳性率最低, 与此同时, 无淋巴结转移者的阳性率也较低, 可能是原发癌细胞未随着淋巴引流转转移。提示了在大肠上皮黏膜恶性转化进程中, p53 基因的突变具有重要意义, 这与相关研究保持一致^[18]。目前, 有不少研究均观察到自噬与凋亡之间存在某种联系, 经相关性分析显示, Beclin-1 蛋白与 p53 蛋白的表达呈正相关, 提示在大肠癌的病理过程中, 自噬与凋亡相关基因关系密切, 与文献报道结果一致^[19-20]。本组研究中, Beclin-1、BCL-2 与 p53 蛋白阳性表达的患者, 其 3 年生存率与 5 年生存率明显低于阴性表达的患者, 两组间生存率的比较, 差异均具有统计学意义, 提示三者表达程度在一定程度上可作为预后评

估的一项指标, 其相关分子机制的研究还有待进一步深入。

综上所述, Beclin-1 与 BCL-2、p53 在大肠癌的发生发展中起着相互协调的作用, 联合检测有助于大肠癌的早期诊断治疗与预后评估。

参考文献

- [1] Gurzu S, Szentirmay Z, Popa D, et al. Practical value of the new system for Maspain assessment, in colorectal cancer[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(4):373-383.
- [2] Ma XL, Ye JX, Su J, et al. A modified GEWF solution is cost-saving and effective for lymph node retrieval in resected colorectal carcinoma specimens[J]. *Pathol Res Pract*, 2014, 210(9):543-547.
- [3] 胡万乐, 王玲琴, 陈苏苹, 等. 3-甲基腺嘌呤对人耐药大肠癌 SW480 细胞增殖及自噬活性的影响 [J]. *温州医学院学报*, 2014, 44(3):189-192.
- [4] Park JM, Huang S, Wu TT, et al. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(2):100-107.
- [5] Kazem A, Sayed KE, Kerm YE. Prognostic significance of COX-2 and β -catenin in colorectal carcinoma[J]. *Alexand J Med*, 2014, 50(3):211-220.
- [6] 吴又明, 丁彦青, 李纳, 等. 结直肠锯齿状腺瘤、传统腺瘤及结直肠癌中端粒酶、p53 及 Ki-67 的表达比较 [J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(7):519-523.
- [7] 张黎黎, 张洁, 张林, 等. p53、bcl-2、caspase-3 在非小细胞肺癌组织中的表达及相关性分析 [J]. *天津医药*, 2014, 42(7):670-673.
- [8] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia[J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(8):1209-1214.
- [9] 王日玮. 自噬基因 Beclin1 与乳腺癌的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(5):591-596.
- [10] 李晓凤, 巴彩霞, 袁海清, 等. B7-H1 和 Bcl-2 在人结直肠癌中表达及其临床意义 [J]. *肿瘤*, 2012, 32(7):555-558.
- [11] Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, et al. Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers[J]. *APMIS*, 2007, 115(12):1344-1349.
- [12] 兰涛, 张金生, 任俊华, 等. Bcl-2 和 Bag-1 在结肠癌组织中的表达及其意义 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14(12):1314-1317.
- [13] 刘源, 白洁, 耿东华, 等. Livin mRNA 及 Bcl-2, p53 蛋白在胰腺癌中的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(9):870-873.
- [14] Liu HT, Lu CL. Effect of silencing Bcl-2 expression by small interfering RNA on radiosensitivity of gastric cancer BGC823 cells[J].



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.026
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4083.shtml

· 简要论著 ·

层粘连蛋白在先天性巨结肠的表达及意义

周小琴¹, 牛丽文², 陶强²

(1. 南昌大学医学院研究生院, 江西 南昌 330006; 2. 江西省儿童医院 外科, 江西 南昌 330006)

摘要

目的: 观察先天性巨结肠(HD)不同节段肠壁层粘连蛋白(LN)的表达, 探讨LN与HD发病的关系。
方法: 收集30例手术切除HD标本, 分别行LN免疫组化研究和实时荧光定量PCR, 观察其分布情况, 并行统计学处理。
结果: LN染色面积及染色强度从狭窄段到正常段依次减弱, 差异有统计学意义($P < 0.05$); LN基因在狭窄段的表达是正常段的2.15倍, 其表达水平狭窄段 > 移行段 > 正常段。
结论: HD中LN的分布出现异常, 是HD发病的重要原因。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1433-1436]

关键词

Hirschsprung病/病因学; 层粘连蛋白; 儿童, 学龄前
中图分类号: R656.9

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)是新生儿常见的消化系统疾病, 占消化道畸形的第2位, 发病率为1/5 000, 男多于女^[1]。HD的发病机制尚无定论, 一些学者认为HD的形成是因为肠道神经嵴细胞的异常迁移及死亡^[2-3], 另一些学者则认为细胞外基质如层粘连蛋白(Laminin, LN)的异常表达才是HD发病的根本原因^[4]。本

研究通过免疫组化及实时荧光定量PCR等方法观察分析LN在HD不同节段的表达, 以探讨LN与HD发病的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料

标本来自江西省儿童医院普外科30例经病理证实为HD的患儿(各段定义以术中观察病变段及术后病理分析所得), 年龄4个月至5岁, 平均1.3岁(其中2例<6月), 体质量4.3~19.5 kg, 平均11.6 kg, 身高52.5~114.5 cm, 平均74.8 cm。取新鲜标本保存于-80℃冰箱, 用于实时荧光定

基金项目: 江西省重大攻关计划资助项目(20094010)。
收稿日期: 2014-07-09; **修订日期:** 2014-09-04。
作者简介: 周小琴, 南昌大学医学院研究生院硕士研究生, 主要从事小儿普通外科方面的研究。
通信作者: 牛丽文, Email: niuliwen1969@126.com

- [16] 张美云, 杨永岩, 王新花, 等. Bcl-2、PD-L1在大肠癌组织中的表达及意义[J]. 四川大学学报: 医学版, 2012, 43(6):827-829.
- [17] 邹瀛波, 郭伟, 蒋耀光. 野生型p53诱导基因1研究进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(5):538-540.
- [18] 迟元卫, 陈健, 刘亮, 等. 结肠癌中hTERT和P53蛋白表达及临床意义[J]. 山东大学学报: 医学版, 2011, 49(4):115-117.
- [19] Garimella V, Hussain T, Agarwal V, et al. Clinical response to primary letrozole therapy in elderly patients with early breast cancer: possible role for p53 as a biomarker[J]. Int J Surg, 2014, 12(8):821-826.
- [20] Baspinar S, Bircan S, Orhan H, et al. The relation of beclin 1 and bcl-2 expressions in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and

prostate adenocarcinoma: a tissue microarray study[J]. Pathol Res Pract, 2014, 210(7):412-418.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 张海洋, 厉冰, 杨玉兵, 等. 大肠癌中抑制基因BCL-2、p53与Beclin-1的表达及其与肠癌生物学行为的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1429-1433. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.025

Cite this article as: ZHANG HY, LI B, YANG YB, et al. The relationship of expression of the suppressor genes BCL-2, p53 and Beclin-1 with biological behavior in colorectal carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(10):1429-1433. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.025