

文章编号:1005-6947(2004)02-0095-03

· 实验研究 ·

抗凋亡基因 bag-1 的表达及其与肝内胆管细胞癌分化的关系

闫庆国, 王文勇, 李玉松, 胡沛臻, 黄高昇, 王文亮

(第四军医大学西京医院 病理科, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 探讨抗凋亡基因 bag-1 在原发性肝内胆管细胞癌 (ICC) 中的表达及其与肿瘤分化的关系。方法 采用免疫组织化学的方法, 检测 bag-1 基因在 ICC 组织 ($n = 48$) 及肝细胞肝癌旁胆管上皮 (对照组, $n = 25$) 中的表达情况。结果 ICC 组的 bag-1 基因表达强于对照组 ($P < 0.01$)。在 ICC 组内, 27 例中低分化胆管细胞癌中 bag-1 基因的表达强于 21 例高分化胆管细胞癌 ($P < 0.01$)。结论 bag-1 的表达在分化越低的胆管细胞癌中越强, 提示 bag-1 基因可能与其肿瘤的分化相关。

关键词: 肝肿瘤/病因学; 胆管细胞癌/病理学; 肿瘤分化; 抗凋亡基因 bag-1

中图分类号: R730.2; R735.7

文献标识码: A

The expression of anti-apoptosis gene bag-1 and its relation to the differentiation of intrahepatic cholangiocarcinoma

YAN Qing-guo, WANG Wen-yong, LI Yu-song, Hu Pei-zhen, HUANG Gao-sheng, WANG Wen-liang

(Department of Pathology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of anti-apoptosis gene bag-1 and its relation to the differentiation of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). **Methods** Immunohistochemical techniques were adopted to study the expression of bag-1 in ICC tissue ($n = 48$) and para-hepatocarcinoma bile duct (control group, $n = 25$). **Results** Expression of bag-1 in the ICC group was significantly higher than that in the control group. In the ICC group ($P < 0.01$), the expression of bag-1 in 21 cases of well differentiated ICC was significantly lower than that in 27 cases of middle and poor differentiated ICC ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of bag-1 gene increases in the middle or poor differentiated ICC tissue suggests that bag-1 gene might relate to the differentiation of ICC.

Key words: LIVER NEOPLASMS/pathol; CHOLANGIOCARCINOMA/pathol; NEOPLASMS DIFFERENTIATION;

ANTI-OPOPTOSIS GENE bag-1

CLC number: R730.2; R735.7

Document code: A

bag-1 (bcl-2 athanogene-1) 是一种编码多功能蛋白的基因, 最初克隆时发现它是一种 bcl-2 结合的抗凋亡分子^[1], 至今研究仍表明其凋亡调控作用是其诸多功能中最为重要的。肝内胆管细胞癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是原发性肝癌的一种亚型, 起源于肝内胆管上皮, 患病率占原发

性肝癌的 21.3%, 我国是其高发地区, 发病率在我国呈上升趋势。目前对肝细胞肝癌的凋亡研究较多, 而对 ICC 的凋亡研究相对较少。抗凋亡基因 bag-1 作为 bcl-2 家族中的一员, 其对 ICC 凋亡调控及其与肿瘤分化关系的研究尚未见文献报道。本研究拟通过免疫组织化学 (免疫组化) 方法, 检测 bag-1 基因在不同分化程度的 ICC 中的表达, 探讨其与肿瘤分化的关系。

收稿日期: 2002-10-21; 修订日期: 2003-03-08。

作者简介: 闫庆国 (1968-), 男, 安徽霍山人, 第四军医大学西京医院医师, 主要从事肿瘤病理学方面的研究。

1 材料和方法

1.1 标本

48例原发性 ICC 和 25例肝细胞肝癌组织来源于西安、北京、沈阳等地医院的手术标本。根据国际组织病理学分级标准, ICC 中高分化癌 21例, 中分化癌 19例, 低分化癌 8例。标本经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片贴于经 APES 处理的载玻片。

1.2 免疫组化方法

采用免疫组化 DAKO Envision 系统, 步骤如下:

(1) 切片脱蜡至水后经 3 mmol/L H_2O_2 封闭 30 min; (2) 3 mmol/L 尿素消化 30 min; (3) 滴加兔抗人 Bag-1 多克隆抗体(武汉博士德公司分装产品, 1% 正常羊血清稀释抗体至 1:50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; (4) 滴加抗兔 Envision 复合物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。以上各步后均以 pH 7.4 的 PBS 振洗 3 次, 每次 2 min; DAB- H_2O_2 显色 3 min; 苏木精衬染, 脱水透明, DPX 封固。

1.3 对照实验

将 25 例肝细胞肝癌癌旁肝组织的汇管区胆管设为对照组; 阴性对照设 PBS 替代一抗的空白对照和正常兔血清替代一抗的替代对照。

1.4 结果评定

标本无阳性反应细胞或背景同阴性对照者判定为阴性(-); 标本阳性细胞呈淡棕黄色, 或瘤组织阳性细胞率小于 50% 为弱阳性(+); 标本阳性细胞呈深棕黄色且阳性细胞率大于 50% 为强阳性(++).

1.5 统计学分析

计算标本阳性例数, 统计阳性率; Bag-1 在不同分化程度肿瘤及对照胆管上皮中的染色状况比较

用秩和检验。

2 结果

2.1 定位与分布

bag-1 阳性物质呈棕黄色颗粒状, 主要位于阳性标本的 ICC 细胞和胆管上皮细胞胞浆中, 部分细胞同时呈核阳性, 且核周阳性较强。bag-1 在中分化 ICC 中呈强阳性, 阳性物质弥漫分布于胞浆和个别胞核; 在癌组织中阳性细胞以弥漫分布为主, 部分呈局灶性分布(附图)。在对照组织中, 癌旁肝硬化的肝细胞多呈阳性反应, 核阳性者较多, 而大部分胆管上皮呈阴性。

附图 ICC 中 bag-1 呈强阳性, 分布于胞浆和个别胞核(DAKO Envision 法 $\times 400$)

2.2 Bag-1 的表达状况

48 例不同分化程度的 ICC 中, bag-1 阳性数及阳性率见附表。在阳性病例中, 中低分化的 ICC 呈强阳性者居多。bag-1 基因在 48 例 ICC 中的表达强于 25 例对照的胆管上皮($P < 0.01$); 在 27 例中低分化 ICC 中的表达强于 21 例高分化 ICC 中的表达($P < 0.01$)。

附表 bag-1 在 ICC 及对照胆管上皮中的表达及其与肿瘤分化的关系

组别	n	bag-1 表达			阳性数	阳性率(%)
		(-)	(+)	(++)		
正常对照	25	20	4	1	5	20.0
ICC	48	10 ¹⁾	23 ¹⁾	15 ¹⁾	38	79.2
高分化	21	6 ²⁾	12 ²⁾	3 ²⁾	15	71.4
中分化	19	3	6	10	16	84.2
低分化	8	1	5	2	7	87.5

注: 1) 与正常对照比较 $P < 0.01$; 2) 与中、低分化 ICC 比较 $P < 0.01$

3 讨论

bag-1 具有拮抗血小板源性生长因子和肝细胞生长因子介导的凋亡作用,可与肝细胞生长因子受体结合形成复合物,诱导凋亡后此复合物迅速增加^[2]。其次,bag-1 还可以与 Raf-1 激酶,Shiah-1,甾体类激素受体、调节分子伴侣 Hsp70 等多种蛋白发生作用。此外,bag-1 蛋白还具有与细胞骨架蛋白相互作用,促进肿瘤细胞迁移的功能^[3]。因此,对 bag-1 的研究,越来越受到重视。作者既往的研究^[4,5]发现,多种凋亡相关基因在 ICC 中的表达都与肿瘤的分化存在一定的关系,bag-1 是否在 ICC 中也有表达,其表达与肿瘤分化是否也有关,值得探讨。

bag-1 在大部分正常人体组织表达很弱或不表达,但在大多数肿瘤细胞系,如白血病、乳腺癌、前列腺癌、直肠癌等均有表达。表明 bag-1 表达与肿瘤的恶性转化密切相关^[6]。bag-1 在各种肿瘤中的表达具有不同的意义。Townsend 等^[7]研究发现 160 例乳腺癌中 92% bag-1 免疫组化阳性,大部分显示胞浆阳性,小部分核阳性。组织学分级与核阳性呈负相关,高级别的肿瘤核表达减弱,但与胞浆表达无统计相关性。Turner 等^[8]发现 bag-1 在乳腺癌中表达较正常乳腺增强,且有意义的是表达强者长期生存率高和无转移生存时间长。Rorke 等^[9]则发现 bag-1 表达与非小细胞肺癌的预后有关,胞浆强阳性者预后较好。bag-1 在喉癌中也有表达,也呈现胞核、胞浆或二者均有,有意思的是主要表达核 bag-1 阳性者,经放疗后预后更差。Yang 等^[10]发现在宫颈癌细胞系及其组织中 bag-1 过表达。Shindoh 等^[11]发现在鳞状细胞癌中转移的病例较未转移者表达高,在高级别的较低级别的表达高。

本实验中 bag-1 在 ICC 中的表达强于在对照的相对正常的胆管上皮的表达,在中低分化的 ICC 中表达又强于在高分化的 ICC 中的表达,表明细胞分化越低,bag-1 的表达越趋于增强。此结果与在乳腺癌^[8]和鳞状细胞癌^[11]中的研究是一致的。这可能由于较低分化的肿瘤恶性程度较高,相应的抗凋

亡机制也有所增强,因此抗凋亡基因的表达较强。至于 bag-1 在 ICC 中的表达是否也与肿瘤的预后和治疗存在密切的关系,尚待进一步探讨。

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] Bardelli A, Longati P, Albero D, *et al.* HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death [J]. *EMBO J*, 1996, 15(22): 6205 - 6212.
- [3] Naishiro Y, Adachi M, Okuda H, *et al.* BAG-1 accelerates cell motility of human gastric cancer cells [J]. *Oncogene*, 1999, 18(21): 3244 - 3251.
- [4] 闫庆国,王文亮,黄高昇. 促细胞凋亡 bax 在胆管癌中的表达与意义 [J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(2): 139 - 141.
- [5] 闫庆国,王文亮,黄高昇. 胆管癌中抗凋亡基因 bcl-2 的表达及意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 1997, 13(4): 194 - 196.
- [6] Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, *et al.* Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(14): 3116 - 3131.
- [7] Townsend PA, Dublin E, Hart IR, *et al.* BAG-1 expression in human breast cancer: interrelationship between BAG-1 RNA, protein, HSP70 expression and clinico-pathological data [J]. *J Pathol*, 2002, 197(1): 51 - 59.
- [8] Turner BC, Krajewski S, Krajewska M, *et al.* BAG-1: a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(4): 992 - 1000.
- [9] Rorke S, Murphy S, Khalifa M, *et al.* Prognostic significance of BAG-1 expression in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(5): 317 - 322.
- [10] Yang X, Hao Y, Ferenczy A, *et al.* Overexpression of anti-apoptotic gene BAG-1 in human cervical cancer [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 247(1): 200 - 207.
- [11] Shindoh M, Adachi M, Higashino F, *et al.* BAG-1 expression correlates highly with the malignant potential in early lesions (T1 and T2) of oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(5): 444 - 449.