基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0501-03

血管内皮生长因子和 bcl-2 在肾母细胞瘤中的表达及意义

陈 健[1],高明太[1],蒋 敏[2],赵成基[1],刘登瑞[1],赵玉元[1]
(1. 兰州大学第一医院小儿外科,兰州 730000;2. 兰州大学第一医院病理科,兰州 730000)

【摘 要】目的:探讨细胞凋亡抑制基因 B- 淋巴瘤细胞 -2(B- cell lymphoma/leuke mia- 2,bcl-2)和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)在肾母细胞瘤中的表达及其相互关系。方法:用免疫组织化学和原位杂交方法研究 bcl-2 和 VEGF 蛋白及 mRNA 在 17 例肾母细胞瘤和 7 例瘤旁正常肾组织的表达。结果:bcl-2 蛋白在肾母细胞瘤组织中的表达(82.4%)高于瘤旁正常肾组织(28.5%);VEGF 蛋白在肾母细胞瘤组织中的表达(58.8%)高于瘤旁正常肾组织(14.3%);bcl-2 mRNA 和 VEGF mRNA 在肾母细胞瘤的表达率分别为 88.2%和 82.4%;bcl-2 和 VEGF 的表达之间存在正相关关系(r_s=0.633, P<0.01)。结论:bcl-2 和 VEGF 在小儿肾母细胞瘤发生发展中起重要作用。

【关键词】肾母细胞瘤;bcl-2;血管内皮生长因子(VEGF)
【中国图书分类法分类号】R726 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

Expression and significance of bcl-2 and vascular endothelial growth factor in nephroblastoma

CHEN Jian, et al
(*Department of Infant Surgery, the First Affiliated Hospital, Lanzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and B- cell lymphoma/leuke mia- 2 (bcl-2) in nephroblastoma and to evaluate the relationship between VEGF and bcl-2. *Methods*: With mouse anti-human VEGF and bcl-2 monoclonal antibody, immunohistochemistry was used to examine 6)the expression of VEGF protein and bcl-2 protein in 17 cases of nephroblastoma and 7 cases of normal tissue as contrast. VEGF mRNA and bcl-2 mRNA expression was examined by in situ hybridization. *Results*: The positive expressions of bcl-2 protein in nephroblastoma (82.4%) were significantly higher than those in normal tissues (28.5%). The positive expressions of VEGF protein in nephroblastoma (58.8%) were significantly higher than those in normal tissues (14.3%). The rate of bcl-2, VEGF mRNA in nephroblastoma was 88.2%, 82.4%, respectively. The expression of bcl-2, VEGF mRNA was increased significantly in nephroblastoma compare with control. VEGF expression and bcl-2 in nephroblastoma were positively related (rs=0.633, P<0.01). *Conclusion*: The expression of bcl-2 and VEGF plays an important role in the oncogenesis and development of nephroblastoma.

【Key words】Nephroblastoma; B- cell lymphoma/leuke mia- 2 (bcl-2); Vascular endothelial growth factor

肾母细胞瘤起源于未分化的后肾胚胎,是小儿腹部最常见的恶性肿瘤之一,占小儿泌尿系肿瘤的首位。B- 淋巴瘤细胞 -2 (B- cell lymphoma/leuke mia- 2,bcl- 2)是该基因家族中重要的凋亡抑制基因。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是目前研究较多的与多种肿瘤的发生、发展和预后有关的因子。为探讨细胞凋亡抑制基因 bcl-2 蛋白及 mRNA 和 VEGF 蛋白及 mRNA 在肾母细胞瘤中的表达,我们采用免疫组化技术与原位杂交技术对 17 例肾母细胞瘤组织中 bcl-2 和 VEGF 进行了研究。

作者介绍:陈 健(1968-),男,副主任医师,副教授,硕士,研究方向:小儿外科肿瘤基础与临床研究。

基金项目:甘肃省科学技术厅科技攻关项目(编号:GS002-A43-046)。

1 材料与方法

1.1 标本来源,筛选及临床病理资料

收集兰州大学第一医院病理科及兰州大学基础医学院病理教研室 1993 年 ~ 2007 年肾母细胞瘤手术标本 17 例。所有病例术前均未行放疗、化疗和生物治疗。另取瘤旁正常肾组织 7 例作对照。标本由 10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,连续组织切片,厚约 4 μm。病理诊断结果经 2 名病理科医生确认。

1.2 免疫组织化学染色

采用免疫组化 SP 法。鼠抗人 bcl-2,VEGF 单克隆抗体,SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限

公司。切片脱蜡至水后，经 H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 15 min。正常山羊血清封闭细胞中非特异性蛋白 30 min。加入第一抗体鼠抗人 bcl-2，VEGF 单克隆抗体，湿盒内 4℃孵育过夜。PBS 冲洗，加入第二抗体生物素化山羊抗鼠 IgG20 min。随后加入辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素 20 min。PBS 冲洗后，DAB 显色，苏木素复染，常规脱水、透明、封片。阴性对照用 PBS 代替一抗，阳性对照用已知阳性片。

1.3 bcl-2 mRNA 及 VEGF mRNA 原位杂交检测

地高辛标记的 bcl-2 寡核苷酸探针和地高辛标记的 VEGF 寡核苷酸探针，原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。切片脱蜡至水，3%H_2O_2 室温 10 min，3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 37℃15 min，滴加预杂交液，37℃~40℃恒温箱 3 h，甩去多余液体，加入杂交液，置 40℃~42℃恒温箱杂交过夜，杂交后 SSC 洗涤，滴加封闭液 37℃ 30 min，甩去多余液体，滴加生物素化鼠抗地高辛 37℃ 60 min，SABC 37℃ 20 min，生物素化过氧化物酶 37℃ 20 min，BCIP/NBT 显色。常规脱水、透明、封片。用已知的阳性切片作阳性对照，以不含 VEGF 探针，bcl-2 探针和不含 Anti-DIG-AP 的切片作为阴性对照。

1.4 结果判定

bcl-2、VEGF 蛋白染色的阳性表达为淡黄色，棕黄色或棕褐色着色，定位于细胞膜或细胞浆内，原位杂交 bcl-2 mRNA 和 VEGF mRNA 阳性表达为蓝紫色颗粒，定位于胞浆。每张切片随机选取 5~10 个高倍视野，计数至少 1 000 个细胞中阳性细胞染色数。根据阳性细胞数占计数细胞总数的百分比分级：阳性细胞瘤细胞表达数 <5%为阴性(-)，6%~25%为弱阳性(+)，26%~50%为中度阳性(++)，>50%为强阳性(+++)。

1.5 统计学方法

应用 STATA9 统计软件，对实验结果用 Fisher 确切概率法计算分析，两指标间的关系采用 Spearman 等级相关分析，$P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学及原位杂交结果

bcl-2 蛋白在肾母细胞瘤中的表达率为 82.4%，阳性反应主要定位于细胞浆，呈棕黄色颗粒(图 1)。7 例瘤旁正常组织表达率为 28.5%。VEGF 蛋白在肾母细胞瘤中表达率为 58.8 %，阳性着色部位主要为瘤细胞浆(图 2)。7 例瘤旁正常组织表达率为 14.3%。bcl-2mRNA 及 VEGF mRNA 在肾母细胞瘤的表达率分别为 88.2%和 82.4%，阳性信号主要为定位于细胞浆的蓝紫色颗粒(图 3、图 4)。经统计学分析，bcl-2 蛋白和 bcl-2mRNA 及 VEGF mRNA 在瘤组织表达均较瘤旁正常肾组织高，且差异具有显著性，$P<0.05$(表 1)。

2.2 VEGF 与 bcl-2 的关系

VEGF 蛋白表达为阳性的组织中 bcl-2 表达阳性者 9 例和阴性 1 例，VEGF 蛋白表达为阴性的组织中 bcl-2 表达阴性 5 例和阳性 2 例，经采用 Spearman 相关分析，结果提示二者间有正相关关系，相关系数 $r_s=0.633$，$P<0.01$。

3 讨 论

随着先天性畸形及感染性疾病病死率的不断下降，恶性实体瘤逐渐成为儿童的主要死亡原因。肾母细胞瘤又叫 Wilms 瘤，是间质组织和上皮细胞组成的恶性混合瘤，是最常见的小儿恶性实体瘤之一[1]，主要见于 1~5 岁小儿。

bcl-2 基因是目前研究较为深入的细胞凋亡相关基因，是从小鼠 B 细胞淋巴瘤中分离出的一种原癌基因，位于 18q21，由 3 个外显子组成，其产物为分子量 26 kD 的蛋白质。bcl-2

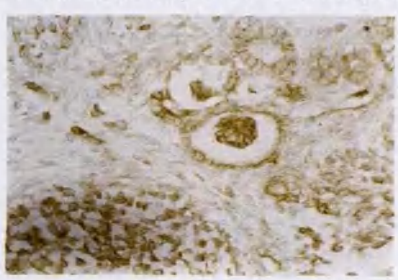


图 1 肾母细胞瘤 bcl-2 蛋白阳性表达（免疫组织化学染色 ×400）

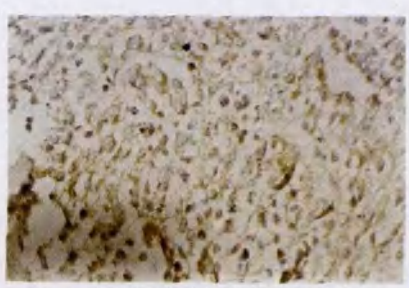


图 2 肾母细胞瘤 VEGF 蛋白阳性表达（免疫组织化学染色 ×400）

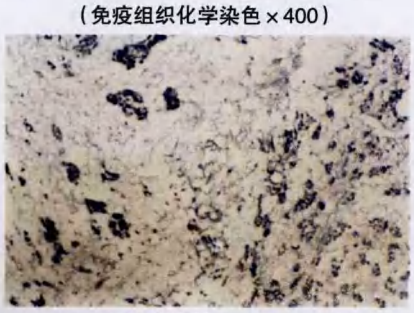


图 3 肾母细胞瘤 bcl-2 mRNA 阳性表达（原位杂交 ×200）

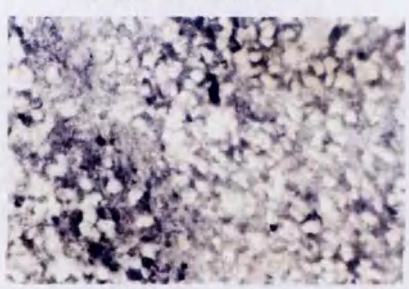


图 4 肾母细胞瘤 VEGF mRNA 阳性表达（原位杂交 ×200）

表 1 肾母细胞瘤及瘤旁正常肾组织 bcl-2,VEGF 蛋白及 mRNA 的表达

组别	例数	阳性结果[例数(百分率)]			
		bcl-2	bcl-2mRNA	VEGF	VEGF mRNA
肿瘤组织	17	14(82.4%)	15(88.2%)	10(58.8%)	14(82.4%)
瘤旁正常组织	7	2(28.5%)	3(42.9%)	1(14.3%)	2(28.5%)
P 值		0.021	0.038	0.078	0.021

表 2 肾母细胞瘤中 VEGF 与 bcl-2 之间的关系

VEGF 蛋白表达	bcl-2 蛋白表达	
	阳性	阴性
阳性	9	1
阴性	2	5

r_s=0.633, P=0.006(P<0.01)

基因产物对细胞的增殖速度不产生影响,而是通过抑制多种形式的细胞死亡,使细胞寿命延长,导致细胞数目增多,而且使遗传物质的突变率增加,从而增加了肿瘤发生的机会,促进了肿瘤的发生、发展[2]。bcl-2 又有凋亡抑制基因之称。国内外研究发现 bcl-2 基因产物在淋巴造血组织、神经胶质瘤、食道癌、胃癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌等肿瘤中均有表达[3-5]。

VEGF 是一种肝素亲和外分泌二聚体糖蛋白,在调节血管生成的诸多因子中作用显著,而肿瘤组织内新生血管是肿瘤细胞生长、侵袭和转移的基础。VEGF 通过多种生物学功能决定了其在肿瘤生长、发展、侵袭、转移中的作用,而成为研究的热点。肿瘤细胞可以合成与分泌 VEGF,VEGF 在肿瘤组织中的表达水平比肿瘤组织周围的正常组织要高,并与肿瘤的恶性程度相关。由于 VEGF 的大片段 VEGFs 在新生血管生长中所起作用重要,因此与肿瘤发生有着不可分割的联系,快速增长的肿瘤组织常伴有新血管生成,以保证营养和氧气的供应,并及时带走代谢废物。VEGFs 的表达水平和肿瘤组织的血管密度及恶性程度呈明显正相关,横纹肌肉瘤,肺癌,肝癌,前列腺癌,卵巢癌,恶性神经胶质瘤,胃癌,肝癌,肾癌等都有 VEGF 的高表达[6-8]。

本研究结果显示,bcl-2 蛋白和 mRNA 在肾母细胞瘤的阳性率分别为 82.4%,88.2%,明显高于瘤旁正常肾组织,差异有显著性,P<0.05。bcl-2 并不促进肿瘤细胞的增殖,主要是通过抑制细胞的程序死亡,使应该凋亡的细胞长期存活,染色体和基因的稳定性降低,对致癌物质的易感性升高,增加恶变机会。VEGF 蛋白和 mRNA 在肾母细胞瘤的阳性率分别为 58.8%和 82.4%。VEGF 是维持实体瘤快速生长、促进其播散转移的重要细胞因子。有研究发现,在高转移的肾母细胞瘤细胞中 VEGF 过表达,用抗 VEGF 抗体能够成功地抑制肿瘤的生长和转移[9]。VEGF 高表达常提示预后差,bcl-2 基因可能通过调节细胞的凋亡而参与肿瘤的发生发展。本研究经相关性分析,bcl-2 与 VEGF 有正相相关关系,相关系数为 0.633,<0.01;提示 VEGF 的表达可以上调 bcl-2 的表达,bcl-2 的表达也可诱导 VEGF 的表达,从而抑制肾母细胞瘤细胞的凋亡及促进肿瘤血管的生成。已有研究证明在恶性黑色素瘤中 bcl-2 过表达能够诱导 VEGF 的表达,并且促进血管的形成[10];VEGF 也能诱导 bcl-2 磷酸化从而调节细胞凋亡[11]。VEGF、Bcl-2 基因对于调控细胞凋亡起着重要的作用,VEGF 及 bcl-2 的表达可使 DNA 受损的细胞持续生存,增加了基因变异的机率,进而促使肿瘤的发生。随着肿瘤生物学的进一步发展,对肾母细胞瘤的传统治疗失败后,VEGF,bcl-2 抑制剂将有可能成为一种新的可行的治疗策略,在肾母细胞瘤的防治上起重要作用。

参 考 文 献

[1] Ghanem M A, van Steenbrugge G J, Nijman R J, et al. Prognostic markers in nephroblastoma[J]. Urology, 2005, 65(6): 1047-1054.

[2] Moon D O, Kim M O, Choi Y H, et al. Bcl-2 overexpression attenuates SP600125-induced apoptosis in human leukemia U937 cells[J]. Cancer Lett, 2008, 264(2): 316-325.

[3] Emi M, Kim R, Tanabe K, et al. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(6): 940-952.

[4] Vlachos K, Siafakas N, Karameris A, et al. Esophageal squamous cell carcinomas and expression of p53, Bcl-2, and Bcl-X (L)[J]. Int Surg, 2008, 93(2): 63-71.

[5] Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and bcl-2 levels in advanced stage non-small cell lung cancer[J]. Cancer Invest, 2006, 24(6): 576-580.

[6] Kawamura T, Kanno R, Fujii H, et al. Expression of liver-type Fatty-Acid-binding protein, Fatty Acid synthase and vascular endothelial growth factor in human lung carcinoma[J]. Pathobiology, 2005, 72(5): 233-240.

[7] 万美珍,周林艳,袁 焱,等. HIF-1α、VEGF 在胃癌中的表达及关系[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(5): 549-553.

[8] Li M, Qi S Y, Wang Y, Feng S X, et al. Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, and Bcl-2 in borderline ovarian tumors[J]. Arch Gynecol Obstet, 2005, 272(1): 48-52.

[9] Rowe D H, Huang J Z, Kayton M L, et al. Anti-VEGF antibody suppresses primary tumor growth and metastasis in an experimental model of Wilms' tumor[J]. J Pediat Surg, 2000, 35(1): 30-33.

[10] Iervolino A, Trisciuoglio D, Ribatti D, et al. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity[J]. FASEB J, 2002, 16(11): 1453-1455.

[11] Wang L, Chen L, Benincosa J, et al. VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli[J]. Leukemia, 2005, 19(3): 344-353.

(责任编辑:冉明会)