基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0702-04

凋亡相关基因 bcl-2、bad 在乳腺癌中的表达及意义

陈建生,孙治君,于 冰
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨凋亡相关基因 bcl-2、bad 在乳腺癌组织中的表达及其与患者预后的关系。方法:采用免疫组化方法检测 10 例正常乳腺组织、10 例乳腺纤维瘤组织、40 例青年乳腺癌组织、40 例老年乳腺癌组织中 bcl-2、bad 基因的表达,并检测 80 例乳腺癌组织中 ER、PR 的表达。结果:bcl-2 表达随乳腺癌的组织学分级增加呈递减趋势($P<0.01$),青年乳腺癌患者 bcl-2 表达阳性率显著低于老年乳腺癌患者($P<0.05$),bcl-2 表达阳性率与腋窝淋巴结转移呈负相关($P<0.05$),与 ER、PR 表达呈正相关($P<0.05$)。bad 表达随乳腺癌的组织学分级增加也呈递减趋势($P<0.05$),青年乳腺癌患者 bad 表达阳性率显著低于老年乳腺癌患者($P<0.05$),bad 表达阳性率与腋窝淋巴结转移、ER、PR 表达无明显相关($P>0.05$)。结论:bcl-2、bad 可以作为预测乳腺癌预后的因子。检测乳腺癌组织中 bcl-2 基因表达水平,特别是联合检测 bcl-2、bad 以及 ER、PR 的表达水平,有助于个体化判断乳腺癌患者的预后,并指导治疗。

【关键词】乳腺癌;bcl-2 基因;bad 基因;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-06

Expression and implication of apoptosis related gene bcl-2, bad in human breast cancer

CHEN Jian-sheng, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the expression and significance of Bcl-2, Bad gene and its relationship with prognosis of breast cancer. *Methods*: Immunohistochemical technique was used to detect the expression of Bcl-2, Bad gene in 10 cases of normal breast tissue, 10 breast fibroadenoma tissue, 40 young human breast carcinoma tissue and 40 old human breast carcinoma tissue. The expression of ER and PR in 80 cases of human breast carcinoma tissue were also detected. *Results*: The expression of bcl-2, bad gene decreased in the development of breast cancer ($P<0.01$). The expressions of bcl-2, bad gene in young human breast carcinoma tissue were lower than that in old human breast carcinoma tissue ($P<0.05$). There was a positive correlation between the positive rate of bcl-2 and the positive rate of ER、PR ($P<0.05$). There was a negative correlation between the positive rate bcl-2 and histologic grade or the node metastasis ($P<0.05$). The expressions of bcl-2、bad gene in young human breast carcinoma tissue were lower than in old human breast carcinoma tissue ($P<0.05$). The expression of bad gene was not related to the expression of ER, PR, histologic grade and the node metastasis ($P>0.05$). *Conclusion*: The expression of bcl-2 and bad can be used as predicted factors of breast cancer. Detection of the expression level of the bcl-2 protein, in particular the combined detection of the expressions of bcl-2 and bad as well as ER and PR is helpful in forecasting the prognosis of breast carcinoma and instructing the treatment.

【Key Words】Breast cancer; bcl-2; bad; Apoptosis

乳腺癌是危害女性健康的“头号杀手”,其发生发展过程与各种凋亡因子的作用密不可分。本研究采用免疫组化方法检测乳腺癌组织中 bcl-2、bad 基因的表达情况及其与 ER、PR 表达、腋窝淋巴结转移的关系,探讨其在乳腺癌发生发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

收集我院 1998~2002 年间乳腺癌手术标本 80 例,其中

作者介绍:陈建生(1983-),男,硕士,
研究方向:内分泌肿瘤的临床研究。
通讯作者:孙治君,男,教授,E-mail:ch.sunzj@yahoo.com.cn。

青年乳腺癌（年龄<35 岁）标本 40 例，老年乳腺癌（年龄>60 岁）标本 40 例；TNM 分期Ⅰ期 11 例、Ⅱ期 47 例、Ⅲ期 19 例、Ⅳ期 3 例；组织学分级Ⅰ级 26 例、Ⅱ级 46 例、Ⅲ级 8 例。正常乳腺组织标本 10 例，乳腺纤维腺瘤标本 10 例。均制成 5μm 石蜡切片。

1.2 方法

采用免疫组化（SP 法）检测标本切片中 bcl-2、bad 基因的表达情况，石蜡切片脱蜡至水；加过氧化酶阻断溶液（试剂 A）；加非免疫性动物血清（试剂 B）；加入一抗；加生物素标记第二抗体（试剂 C）：加链霉素抗生物素蛋白－过氧化物酶溶液（试剂 D）：加 DAB 溶液，苏木素复染，中性树胶封固。每步骤间 PBS 冲洗 3 次。结果判定：依据染色阳性细胞所占细胞总数的百分数评分（A）：阳性细胞数为 0 者为 0 分，<30%为 1 分，30%～60%为 2 分，>60%为 3 分；按染色强度评分（B）：无色为 0 分，弱染色为 1 分，中染色为 2 分，强染色为 3 分；总分（A+B）≥3 分为阳性表达，<3 分为阴性表达。以已知阳性标本和 PBS 液代替一抗分别作阳性和阴性对照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件分析系统进行 χ^2 检验、Fisher 精确概率检验法统计学处理。$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 bcl-2、bad 基因在正常乳腺组织、乳腺纤维瘤、乳腺癌中的表达

bcl-2、bad 基因在乳腺癌组织中的阳性表达呈棕黄色颗粒，主要分布于胞浆，并不均匀，bcl-2 基因在乳腺癌中阳性表达见图 1，bad 基因在乳腺癌中阳性表达见图 2。在正常乳腺组织、乳腺纤维瘤、乳腺癌组织中 bcl-2 阳性率分别为 90%、80%、61.25%，正常乳腺组织组、乳腺纤维瘤组分别与乳腺癌组比较（$P<0.05$），有显著性差异。在正常乳腺组织、乳腺纤维瘤、乳腺癌组织中 bad 阳性率分别为 80%、70%、47.5%，正常乳腺组织组、乳腺纤维瘤组分别与乳腺癌组比较，其差异有显著性（$P<0.05$），见表 1。

2.2 bcl-2、bad 在青年乳腺癌、老年乳腺癌组织中的表达

在青年乳腺癌组和老年乳腺癌组中 bcl-2 阳性率为 47.5%、75%，其差异有统计学意义（$P<0.05$）；bad 阳性率分别为 30%、65%，差异有显著性（$P<0.05$）。见表 2。

表 1 bcl-2、bad 在乳腺癌、乳腺纤维瘤、正常乳腺组织中的表达

例数		bcl-2		阳性率	bad		阳性率
		阳性	阴性		阳性	阴性	
正常乳腺组	10	9	1	90.00%*	8	2	80.00%*
纤维瘤组	10	8	2	80.00%*	7	3	70.00%*
乳腺癌组	80	49	31	61.25%	38	42	47.50%

注：* 组分别与乳腺癌组比较，$P<0.05$

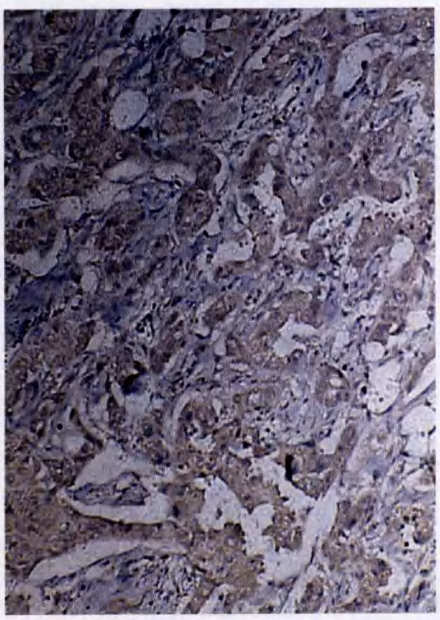


图 1 Bcl-2 在乳腺癌组织中的阳性表达 (SP×200)

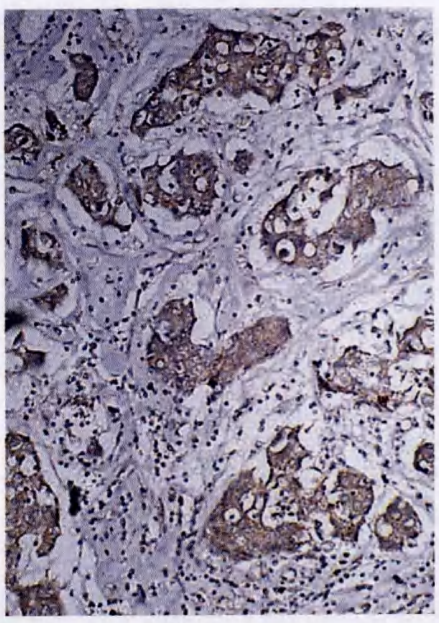


图 2 Bad 在乳腺癌组织中的阳性表达(SP×200)

表 2 Bmi-1、Caspase-8 蛋白在良恶性卵巢肿瘤组织中的表达

	例数	bcl-2		阳性率	bad		阳性率
		阳性	阴性		阳性	阴性	
青年组	40	19	21	47.5%	12	28	30%
老年组	40	30	10	75%	26	14	65%

2.3 bcl-2、bad 表达与乳腺癌组织学分级、临床 TNM 分期、腋窝淋巴结转移的关系

bcl-2 在乳腺癌组织学分级Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级中表达阳性率分别为 84.61%、58.69%、12.50%，两两比较其差异有显著性(P<0.01)；在乳腺癌组织学分级Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级中 bad 表达呈下降趋势，但统计学分析差异无显著性($P>0.05$)。在青年乳腺癌中组织学分级Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级 bcl-2 阳性率分别为 87.5%、44.4%、0.0%，其表达呈递减趋势，差异有显著性($P<0.01$)，bad 基因阳性表达率分别为 50.0%、29.6%、0.0%，其表达差异无统计学意义($P>0.05$)。老年乳腺癌中组织学分级Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级 bcl-2 阳性率分别为 88.9%、73.7%、0.0%，bad 阳性表达率分别为 61.1%、68.4%、33.3%，表达差异均无显著性($P>0.05$)。在青年乳腺癌中 TNM 分期由Ⅰ期到Ⅳ期 bcl-2 阳性率分别为 66.7%、48.8%、37.5%、0.0%，bad 阳性率分别为 33.3%、32.0%、25.0%、0.0%，TNM 分期由Ⅰ期到Ⅳ期 bcl-2、bad 阳性表达均呈递减趋势，但差异无显著性($P>0.05$)。在老年乳腺癌中 TNM 分期由Ⅰ期到Ⅳ期 bcl-2 阳性率分别为 80.0%、77.3%、72.7%、50.0%，bad 阳性率分别为 80.0%、68.2%、54.5%、0.0%，TNM 分期由Ⅰ期到Ⅳ期 bcl-2、bad 阳性表达差异均无显著性($P>0.05$)。青年乳腺癌中腋窝淋巴结转移阳性组 bcl-2 阳性率为 15.8%，阴性组 bcl-2 阳性率为 76.2%，差异有显著性($P<0.01$)；腋窝淋巴结转移阳性组和阴性组 bad 阳性率分别为 31.6%、28.6%，其差异无显著性($P>0.05$)。老年乳腺癌腋窝淋巴结转移阳性组 bcl-2 阳性率为 20.0%，阴性组 bcl-2 阳性率为 93.3%，差异有统计学意义($P<0.01$)。腋窝淋巴结转移阳性组和阴性组 bad 阳性率分别为 50.0%、66.7%，其差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

2.4 乳腺癌组织中 bcl-2、bad 表达与 ER、PR 表达的关系

在 bcl-2(+)bad(+)的 9 例组织中 ER(+)PR(+)占 6 例(66.7%)、ER(+)PR(-)占 2 例(22.2%)、ER(-)PR(+)占 1 例(11.0%)、ER(-)PR(-)为 0，ER(+)PR(+)时 bcl-2、bad 同时阳性率明显高于其他 3 组，差异有显著性($P<0.05$)。在 bcl-2(+)bad(-)的 40 例组织中 ER(+)PR(+)占 18 例(45.0%)、ER(+)PR

表 3 青、老年乳腺癌中 bcl-2、bad 的表达与乳腺癌组织学分级、临床 TNM 分期、腋窝淋巴结转移的关系

例数		组织学分级			临床 TNM 分期				腋窝淋巴结	
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	阳性	阴性
青年乳腺癌	40	8	27	5	6	25	8	1	19	21
Bcl-2 阳性	19	7	12	0	4	12	3	0	3	16
Bcl-2 阴性	21	1	15	5	2	13	5	1	16	5
阳性率	47.5%	87.5%[1]	44.4%	0.0%	66.7%[3]	48.0%	37.5%	0.0%	15.8%[4]	76.2%
Bad 阳性	12	4	8	0	2	8	2	0	6	6
Bad 阴性	28	4	19	5	4	17	6	1	13	15
阳性率	30.0%	50.0%[2]	29.6%	0.0%	33.3%[3]	32.0%	25.0%	0.0%	31.6%[5]	28.6%
老年乳腺癌	40	18	19	3	5	22	11	2	10	30
Bcl-2 阳性	30	16	14	0	4	17	8	1	2	28
Bcl-2 阴性	10	2	5	3	1	5	3	1	8	2
阳性率	75.0%	88.9%[2]	73.7%	0.0%	80.0%[3]	77.3%	72.7%	50.0%	20.0%[4]	93.3%
Bad 阳性	25	11	13	1	4	15	6	0	5	20
Bad 阴性	15	7	6	2	1	7	5	2	5	10
阳性率	62.5%	61.1%[2]	68.4%	33.3%	80.0%[3]	68.2%	54.5%	0.0%	50.0%[5]	66.7%

注：组织学分级Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组两两比较中，1.$P<0.01$，2.$P>0.05$；临床 TNM 分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组两两比较 3.$P>0.05$；腋窝淋巴结阴性组与阳性组比较，4.$P<0.01$，5.$P>0.05$

表 4 乳腺癌组织中 bcl-2、bad 表达与 ER、PR 表达的关系(%)

	例数	ER(+)PR(+)	ER(+)PR(-)	ER(-)PR(+)	ER(-)PR(-)
bcl-2(+)bad(+)	9	6(66.7%)[1]	2(22.2%)[2]	1(11.0%)[3]	0(0.0%)[4]
bcl-2(+)bad(-)	40	18(45.0%)	10(25.0%)	7 (17.5%)	5 (12.5%)
bcl-2(-)bad(+)	22	6(27.3%)	7(31.8%)	8(36.4%)	1(4.5%)
bcl-2(-)bad(-)	9	0(0.0%)[5]	1(11.1%)[6]	0(0.0%)[7]	8(88.9%)[8]

注:1 分别与 2.3.4 比较 $P<0.05$;8 分别与 5.6.7 比较 $P<0.05$

(-)占 10 例(25.0%)、ER(-)PR(+)占 7 例(17.5%)、ER(-)PR(-)占5 例(12.5%),ER、PR 同时阳性组高于其他 3 组但差异无统计学意义($P>0.05$)。bcl-2(-)bad(+)的 22 例中 ER(+)PR(+)占 6例(27.3%)、ER(+)PR(-)占 7 例(31.8%)、ER(-)PR(+)占 8 例(36.4%)、ER(-)PR(-)占 1 例(4.5%),四组比较未见明显相关性。bcl-2(-)bad(-)的 9 例中ER(+)PR(+)占 0 例(0.0%)、ER(+)PR(-)占 1 例(11.1%)、ER(-)PR(+)占 0 例(0.0%)、ER(-)PR(-)占 8 例(88.9%),ER、PR 同时阴性时 bcl-2、bad 同时阴性率明显高于其他 3 组($P<0.05$)。见表 4。

3 讨 论

bcl-2 是凋亡抑制基因,其抑制细胞凋亡机制可能与影响 Ca^{2+} 进入细胞,从而调节细胞内信号转导有关[1]。bad 基因与 bcl-2 基因同属 bcl-2 基因家族,其作用是促进细胞凋亡,bad 基因的促凋亡作用是通过其表达产物与 bcl-2 基因表达产物形成异二聚体,抑制 bcl-2 的抗凋亡作用而实现的[2]。在胃肠肿瘤、肾脏肿瘤等的研究中都发现 bcl-2 高表达细胞凋亡受抑制、肿瘤生长加速、预后差、对治疗的反应也较差[3,4],本研究发现乳腺癌中 bcl-2、bad 表达较正常乳腺组织、乳腺纤维瘤显著降低。

青年乳腺癌较老年乳腺癌其恶性程度更高,侵袭性更强、转移率更高,预后更差[5]。在研究中发现在青年乳腺癌组织中 bcl-2、bad 表达较老年乳腺癌组织要显著降低;在乳腺癌组织学分级Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级中随恶性程度增加 bcl-2 表达呈递减趋势,差异有显著性,bad 在此过程中表达也逐渐降低;在乳腺癌患者腋窝淋巴结转移阳性组与腋窝淋巴结转移阴性组乳的对照研究中发现青、老年乳腺癌中有淋巴结转移组 bcl-2 阳性率显著低于无淋巴结转移组,bad 的表达与腋窝淋巴结转移情况无明显的相关性;在乳腺癌不同临床 TNM 分期 bcl-2、bad 表达未见有明显差异。说明二者在乳腺癌发生、发展的过程中起了重要的作用,且其变化在乳腺癌的发生中是较早期的事件。

本研究显示 bcl-2 的表达与 ER、PR 的表达有明显的正相关性,ER、PR 阳性组 bcl-2 表达水平明显高于其阴性组。但 bad 的表达与 ER、PR 的表达无明显相关性;bcl-2 阳性的组织中时 ER、PR 阳性率显著大于其阴性组织,且 bcl-2、bad 同时阳性的组织中 ER、PR 阳性率更高。Milella 等[6]也认为 bcl-2 的表达是由雌激素调节的,此蛋白表达多局限于 ER 阳性的乳腺癌细胞中,而 ER 阳性是内分泌治疗的必要条件,bcl-2 高表达预后好可能是其对内分泌治疗敏感。bcl-2、bad 的表达可以作为预测乳腺癌预后的因子。检测乳腺癌组织中 bcl-2 基因表达水平,特别是联合检测 bcl-2、bad 以及 ER、PR 的表达水平,有助于个体化判断乳腺癌患者的预后,并指导治疗。

参 考 文 献

[1] Chami M, Prandini A. Bcl-2 and bax exert opposing effects on Ca^{2+} signaling, which do not depend on their putative pore-forming region[J]. Biol. Chem, 2004, 79(52):54581-54589.

[2] Datta S R, Katsov A, Hu L, et al. 14 - 3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation[J]. Mol. Cell, 2000, 6: 41-51.

[3] Kim R, Emi M. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for patients with gastric carcinoma[J]. Journal of Clinical Oncology, 2005, 23(16S): 4050.

[4] Molto L, Rayman P. The bcl-2 transgene protects T cells from renal cell carcinoma-mediated apoptosis[J]. Clinical Cancer Research, 2003, 9(11) 4060-4068.

[5] Mans A, Olle S, Karen O, et al. C-erbB-2 overexpression and survival in early onset breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 63(1):23-29.

[6] Milella M, Trisciuoglio D, Bruno T, et al. Down-regulates bcl-2 expression and potentiates apoptosis induction by bcl-2/bcl-XL bispecific *antisense oligonucleotides in HER-2 gene-amplified* breast cancer cells [J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(7):7747-7756.

(责任编辑:冉明会)