DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.041
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
96 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0096-04

胆管癌组织中自发性细胞凋亡和 bcl-2/bax 表达的状况及意义

张丰深,马宽生,何振平,董家鸿 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 研究胆管癌组织中自发性细胞凋亡和 bcl-2/bax 基因表达的状况及意义。方法 TUNEL 法原位检测凋亡细胞,免疫组化检测 bcl-2 和 bax 蛋白表达。结果 40 例胆管癌标本自发性细胞凋亡指数(AI)的中位值为 7.89%,高/中分化和无淋巴结转移胆管癌 AI 分别高于低分化和淋巴结转移者($P<0.01$);胆管癌组织 bcl-2 和 bax 蛋白表达率分别为 72.5%(29/40)和 57.5%(23/40),与癌旁正常胆管壁组织比较差异显著($P<0.01$),高/中分化胆管癌 bcl-2 蛋白表达率高于低分化胆管癌($P<0.01$);bcl-2 表达阳性胆管癌 AI 低于阴性、bax 阳性高于阴性($P<0.01$)。结论 胆管癌细胞仍保留有凋亡机制,bcl-2 凋亡途径参与了胆管癌的发生、发展过程,AI 和 bcl-2 蛋白表达可作为判断胆管癌恶性程度的指标。

关键词:胆管癌;细胞凋亡;bcl-2;bax
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.8 文献标识码:A

Spontaneous apoptosis and bcl-2/bax expressions in cholangiocarcinoma and their significance

ZHANG Feng-shen, MA Kuan-sheng, HE Zhen-ping, Dong Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the spontaneous apoptosis and expressions of bcl-2/bax in cholangiocarcinoma and their significance. Methods TUNEL technique and immunohistochemistry were carried out to determine apoptotic cells *in situ* and the expressions of bcl-2/bax proteins respectively in 40 specimens of cholangiocarcinoma tissues with pathological confirmation. Results The median of spontaneous apoptotic indices (AIs) was 7.89% in 40 cases of cholangiocarcinomas. The AIs of the cases well/moderately differentiated and without lymph node metastasis were significantly higher than those in cases poorly differentiated and with lymph node metastasis respectively ($P<0.01$). bcl-2 protein was expressed in 29/40 (72.5%) of carcinoma samples and 0/12 in paracancerous normal bile ducts, while the positive rate of bax protein was 57.5% (23/40) for the former and 83.3% (10/12) for the latter ($P<0.01$). Furthermore, well/moderately differentiated carcinomas more frequently expressed bcl-2 compared with poorly differentiated cases ($P<0.01$). Finally, bcl-2 expression was inversely, and bax expression was positively related to AI ($P<0.01$). Conclusion Apoptosis mechanism remains in cholangiocarcinoma cells, and the bcl-2-mediated apoptotic pathway plays a role in the occurrence and progression of this carcinoma. AI and bcl-2 expression are useful to predict the malignant grade of cholangiocarcinoma.

Key words: cholangiocarcinoma; apoptosis; bcl-2; bax

细胞凋亡是机体胚胎发育和组织更新过程中清除累赘细胞的主要机制,凋亡机制障碍与肿瘤发生和发展密切相关;凋亡是受基因控制的细胞主动死亡过程,其中最为重要、研究最深入的是 bcl-2 家族基因,bcl-2 家族蛋白可能作用于细胞凋亡最终通路而对多种形式的细胞凋亡有调控作用,bcl-2 和 bax 基因产物的水平及相互作用又可能是 bcl-2 凋亡调控途径的中心,bcl-2/bax 蛋白比例是调节细胞凋亡的重要"开关"[1~3]。细胞凋亡障碍(尤其是 bcl-2 凋亡途径异常)在胆管癌生和发展中的作用已开始受到关注[4,5],但胆管癌组织的自发性细胞凋亡现象尚缺乏研究,bcl-2 家族基因表达的研究在为数不多的文献[6,7]报道中也存在极大差异。本研究应用 TUNEL 染色和免疫组化分别对胆管癌组织中自发性细胞凋亡和 bcl-2/bax 表达的状况进行观察,并探讨其相互关系和临床病理学意义。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670711)
作者简介:张丰深(1968-),贵州省遵义市人,博士,主治医师,主要从事胆胰肿瘤的研究。电话:(023)65309177
收稿日期:2001-07-30;修回日期:2001-12-06

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集本所 1995-1998 年胆管癌切除标本 40 例,详情见表 1,同时收集 12 例癌旁正常胆管作对照。标本经 10%福尔马林固定,石蜡包埋,4μm 连续切片,HE 染色病理证实癌细胞分布。

1.2 凋亡细胞的原位检测

原位细胞凋亡检测试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit, POD)购自 Boehringer Mannhiem,按试剂盒说明书进行 TUNEL 染色,以不含 TdT 的标记液替代 TUNEL 反应液作阴性对照,切片经 DNase I 预处理 10 min 作阳性对照。

光镜下观察切片显色反应、结合形态学变化确定凋亡细胞,随机选择 5 个以上癌区高倍视野,计数 500 个癌细胞中的凋亡细胞数,以百分数表示,即凋亡指数(Apoptotic Index, AI)。

1.3 bcl-2、bax 蛋白免疫组化染色

bcl-2、bax 多抗及免疫组化试剂盒为 Santa Cruz 产品,抗原微波修复,抗体稀释度 1∶100,染色按 S-P 法操作常规,以 PBS 替

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

代一抗作空白对照, 正常血清替代一抗作替代对照, 阳性对照片由厂家提供。

光镜下观察切片显色反应, 随机选择 5 个以上癌区高倍视野, 计数 500 个癌细胞中的阳性细胞数, 用百分率表示, 阳性细胞数＜10%判为阴性, ≥10%判为阳性。

1.4　统计学方法

t 检验、χ^2 检验、秩相关及直线相关分析。

2　结果

2.1　凋亡细胞 TUNEL 染色的形态学特点

凋亡细胞核TUNEL 染色呈棕黄色, 核固缩, 染色质边聚, 凝集成块; 胆管癌组织中凋亡细胞呈异质性分布, 并可见散在的棕色凋亡小体, 见图 1。

2.2　自发性细胞凋亡与临床病理的关系

40 例胆管癌标本中自发性 AI 的中位值为 7.89%。AI 与胆管癌分化程度和淋巴结转移密切相关, 而与患者性别、年龄、肿瘤部位、大小及组织学类型无明显关系, 见表 1。

表 1　胆管癌组织中自发性细胞凋亡指数与临床病理参数的关系

Tab 1　Relationship of spontaneous apoptosis index and clinical pathology in cholangiocarcinoma

Factors	n	AI(%, $\bar{x}\pm s$)
Sex		
Male	26	7.44±2.66
Female	14	8.44±1.40
Age(years)		
＜50	27	7.73±2.71
≥50	13	7.94±2.14
Position		
Perihilar	27	8.53±2.18
Middle	3	8.05±3.27
Distal	10	7.63±2.64
Size		
＜5 cm	30	7.86±3.10
≥5 cm	10	8.65±3.33
Histological type		
Adenocarcinoma	33	8.05±2.53
Papillary adenocarcinoma	3	9.25±0.35
Mucinous adenocarcinoma	2	7.17±1.92
Adenosquamous carcinoma	2	9.06±0.75
Differentiation		
Well/moderately	29	9.41±1.44**
Poorly	11	5.45±1.46
Lymph node metastasis		
Yes	23	6.65±2.10△△
No	17	9.94±1.74

**: $P<0.01$ *vs* Poorly differentiated group; △△: $P<0.01$ *vs* Group without Lymph node metastasis

2.3　bcl-2/bax 蛋白表达与临床病理的关系

bcl-2、bax 蛋白免疫组化染色阳性产物呈棕黄色, 主要位于胞浆, 核内偶也表达, 阳性细胞在胆管癌组织中呈异质性分布。12 例癌旁正常胆管壁组织 bcl-2 蛋白表达均为阴性, 10/12 例(83.3%)表达 bax 蛋白, 见图 2、3。

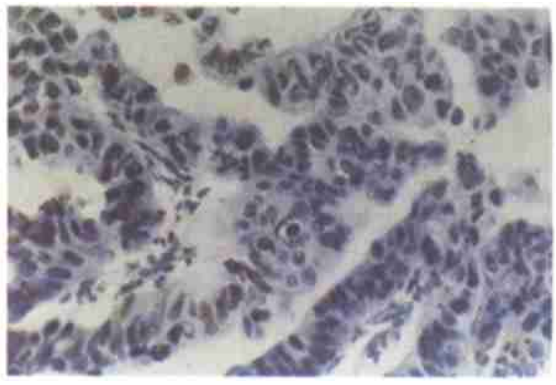


图 1　肝门部高分化胆管癌细胞凋亡的形态学特点　(TUNEL× 400)

Fig 1　Morphological features of apoptotic cells in well differentiated perihilar cholangiocarcinoma　(TUNEL× 400)

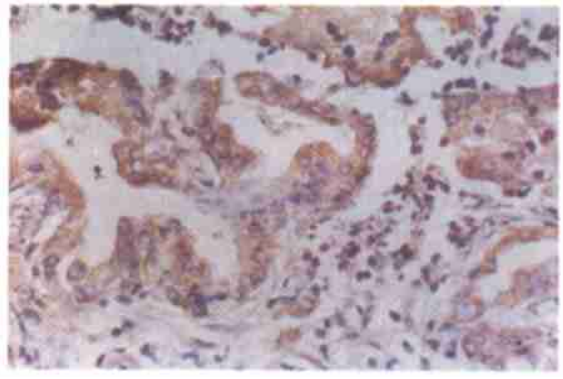


图 2　肝门部高分化胆管癌 **bcl-2** 蛋白染色强阳性　(S-P× 400)

Fig 2　bcl-2 protein strongly expressed in well differentiated perihilar cholangiocarcinoma　(S-P× 400)

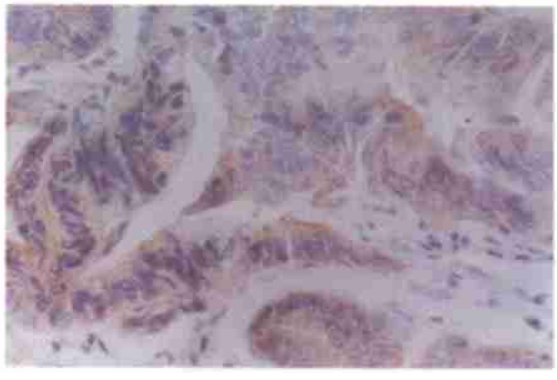


图 3　肝门部高分化胆管癌 **bax** 蛋白染色阳性　(S-P× 400)

Fig 3　bax protein strongly expressed in well differentiated perihilar cholangiocarcinoma　(S-P× 400)

胆管癌组织中 bcl-2 蛋白表达率为 72.5%(29/40)、bax 蛋白表达率为 57.5%(23/40), 与癌旁正常胆管壁组织差异显著($P<0.01$)。47.5%(19/40)的胆管癌标本同时表达 bcl-2 和 bax 蛋白, 一致性 χ^2 检验表明两者无明显相关。

bcl-2 蛋白表达与胆管癌分化程度密切相关, 与肿瘤大小、

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

组织学类型、淋巴结转移等无明显关系。bax 蛋白表达与临床病理无明显关系，见表 2。

表 2 bcl-2/bax 蛋白表达与胆管癌临床病理参数的关系

Tab 2 Relationship of bcl-2/bax expressions and clinical pathology in cholangiocarcinoma

Factors	n	bcl-2 protein		Rate(%)	bax protein		Rate (%)
		−	+		−	+	
Sex							
Male	26	8	18	69.23	11	15	57.69
Female	14	3	11	78.57	6	8	57.14
Age(years)							
＜50	27	7	20	74.07	11	16	59.26
≥50	13	4	9	69.23	6	7	53.85
Position							
Perihilar	27	8	19	70.37	10	17	62.96
Middle	3	1	2	66.67	1	2	66.67
Distal	10	2	8	80.00	6	4	40.00
Size							
＜5 cm	30	9	21	70.00	13	17	56.67
≥5 cm	10	2	8	80.00	4	6	60.00
Histological type							
Adeno-	33	9	24	72.72	14	19	57.58
Papillary adeno-	3	1	2	66.67	2	1	33.33
Mucinous adeno-	2	1	1	50.00	0	2	100.00
Adenosquamous	2	0	2	100.00	1	1	50.00
Differentiation							
Well/moderately	29	3	26	89.66**	13	16	55.17
Poorly	11	8	3	27.27	4	7	63.64
Lymph node metastasis							
Yes	23	4	19	82.61	10	13	56.52
No	17	7	10	58.82	7	10	58.82

**：$P<0.01$ *vs* Poorly differented group

2.4 bcl-2/bax 蛋白表达与细胞凋亡的关系

bcl-2 蛋白表达阳性组 AI 低于其阴性组、bax 蛋白表达阳性组 AI 高于其阴性组，秩相关分析显示二者分别与 AI 呈显著负相关（$r=-0.694$，$P<0.01$）和正相关（$r=0.449$，$P<0.01$）。结合两者分析，AI 在不同组合方式间有显著差异。直线相关分析发现，bcl-2/bax 比值与 AI 呈负相关（$P<0.01$），见表 3。

表 3 bcl-2/bax 蛋白表达与胆管癌细胞凋亡的关系

Tab 3 Relationship of bcl-2/bax expressions and apoptosis of cholangiocarcinoma cell

bcl-2/bax status	n	AI(%, $x\pm s$)
bcl-2(+)	29	7.34±2.25**
bcl-2(−)	11	10.68±2.14
bax(+)	23	9.88±1.91△△
bax(−)	17	6.68±2.71
bcl-2(+)bax(−)	10	7.06±2.27
bcl-2(+)bax(+)	19	9.13±1.85□□
bcl-2(−)bax(+)	4	13.36±3.21++
bcl-2(−)bax(−)	7	8.09±2.66

**：$P<0.01$ *vs* bcl-2(−)；△△：$P<0.01$ *vs* bax(−)；□□：$P<0.01$ *vs* bcl-2(+)bax(−)；++：$P<0.01$ *vs* bcl-2(+)bax(−)，bcl-2(+)bax(+)，bcl-2(−)bax(−)

3 讨论

3.1 胆管癌组织中自发性细胞凋亡的意义

胆管癌是一种常见的消化道肿瘤，但研究进展相对缓慢，发病机制远未明了，临床治疗甚为棘手，预后较差，是消化外科的一大难点[8]。凋亡已成为肿瘤研究的重要模型，对肿瘤自发性细胞凋亡现象的研究揭示，癌细胞仍保留有对抗失控性生长的凋亡机制，而且自发性细胞凋亡频率与肿瘤类型、分化、分期、转移及预后等密切相关，为利用凋亡治疗肿瘤、判断疗效、评估预后等奠定了理论基础[1,9]。合适的实验模型与研究技术的出现使人们对胆管细胞的生物学特性和病理学意义有了新的认识，尤其是对胆管细胞凋亡的研究发现，凋亡机制不仅在胆管缺乏、复旧等良性过程中有重要作用，而且凋亡异常与胆管癌发生和演进也密切相关[4,5,7]。然而，对胆管癌中的自发性细胞凋亡现象尚缺乏研究。

本研究利用 TUNEL 技术研究发现，胆管癌具有较高的自发性细胞凋亡频率（AI），可能是其生长缓慢的原因之一；AI 与胆管癌分化程度和淋巴结转移明显相关，低分化和有转移潜能的胆管癌细胞可能具备逃避凋亡的机制，可作为判断胆管癌恶性程度的指标。

3.2 bcl-2/bax 基因在胆管癌中异常表达并参与细胞凋亡的调控

bcl-2 家族基因产物的水平及相互作用是细胞凋亡调控的仲要“开关”，其中 bcl-2/bax 蛋白比例尤为重要，检测 bcl-2/bax 表达对肿瘤的机制研究、诊断、治疗及疗效观察、预后评估等均有重要意义[2,3]。胆管癌 bcl-2/bax 表达在为数不多的文献报道中存在较大差异。Charlotte 等[10]对肝胆及其肿瘤 bcl-2 表达的免疫组化研究显示，肝内胆小管（Bile ductules）和小胆管（Small bile duct）上皮 bcl-2 蛋白表达阳性，肝细胞、肝内大胆管及肝外胆道均为阴性，72.7%（8/11）的胆管癌表达阳性，肝转移腺癌阳性率为 42.8%（6/14），15 例肝细胞癌均为阴性，提出胆管细胞是肝胆祖细胞、bcl-2 蛋白表达是胆管癌的特征性标志。Ito 等[7,11]报道，bcl-2 蛋白表达率在胆管细胞癌为 31.7%（13/41）、肝外胆管癌为 44.7%（17/38），bcl-2 蛋白表达与胆管癌分化呈正相关，与分期和浸润转移呈负相关，是判断胆管癌恶性程度的有益指标。而 Arora 等[6]检测 28 例胆管癌均未见 bcl-2 蛋白表达。

本研究发现，胆管癌组织 bcl-2 蛋白表达率高达 72.5%（29/40）、bax 蛋白表达率 57.5%（23/40），与癌旁正常胆管壁组织有显著差异，提示 bcl-2/bax 异常表达与胆管癌发生有关；bcl-2 蛋白表达与分化程度呈正相关，是胆管癌分化良好的标志；bcl-2/bax 蛋白参与了胆管癌细胞凋亡过程的调控，bcl-2 抑制凋亡、bax 促进凋亡，调节 bcl-2/bax 表达可能是胆管癌治疗的有效途径之一。

参考文献：

[1] Gastman B R. Apoptosis and its clinical impact[J]. Head &Neck, 2001, 23(5): 409−425.

[2] Giatromanolaki A, Stathopoulos G P, Koukourakis M I, *et al*. Angiogene-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

sis and apoptosis-related protein (p53, bcl-2, and bax) expression versus response of gastric adenocarcinomas to paclitaxel and carboplatin chemotherapy[J]. Am J Clin Oncol, 2001, 24(3): 222-226.
[3] Mirjolet J F, Barberi-Heyob M, Didelot C, *et al*. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status[J]. Br J Cancer, 2000, 83(10): 1 380-1 386.
[4] Celli A, Que F G. Dysregulation of apoptosis in the cholangiopathies and cholangiocarcinoma[J]. Semin Liver Dis, 1998, 18(2): 177-185.
[5] Harnois D M, Que F G, Celli A, *et al*. Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line[J]. Hepatol, 1997, 26(4): 884-890.
[6] Arora D S, Ramsdale J, Lodge J P, *et al*. p53 but not bcl-2 is expressed by most cholangiocarcinomas: a study of 28 cases[J]. Histopathology, 1999, 34(6): 497-501.
[7] Ito Y, Takeda T, Sakon M, *et al*. Expression and clinical implications of bcl-2 in extrahepatic bile duct carcinoma: its relationship with biological features[J]. Anticancer Res, 2000, 20(5C): 3 891-3 895.
[8] 黄志强. 肝门部胆管癌外科治疗观念的转变[J]. 消化外科, 1999, 1(1): 5-9.
[9] Staunton M J, Gaffney E F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis[J]. Am J Clin Pathol, 1995, 103: 300.
[10] Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, *et al*. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver[J]. Am J Pathol, 1994, 144 (3): 460-465.
[11] Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, *et al*. Bcl-2 expression in cholangiocellular carcinoma is inversely correlated with biologically aggressive phenotypes [J]. Oncology, 2000, 59(1): 63-67.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2002)01-0099-01

个案与短篇

多发性骨髓瘤 30 例临床分析

Clinical analysis of 30 cases of multiple myeloma

常 城, 王庆余, 孔佩艳, 刘 林, 史占忠 (第三军医大学附属新桥医院血液内科, 重庆 400037)

多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)是一种骨髓浆细胞异常增生的恶性肿瘤。现将我科 1984 年 5 月至 1998 年 8 月收治的 30 例 MM 临床病历资料总结如下。

1 临床资料

男性 22 例, 女性 8 例, 年龄 31~69 岁, 均符合诊断标准[1]。首发症状: 头昏、乏力 22 例, 骨痛 13 例, 肾脏病变 9 例, 肺部感染 6 例, 鼻出血 4 例, 皮疹 1 例, 单纯球蛋白增高 1 例。血沉均增高。据 Durie 和 Salmon 分期标准: Ⅰ期 4 例、Ⅱ期 18 例、Ⅲ期 8 例。65 岁以上 13 例, 给予 VMCP 或 MP 方案化疗。65 岁以下 17 例, 给予 CTHPOP 方案化疗。以骨痛缓解、肾功能好转、异常免疫球蛋白降低、瘤细胞比例降低作为疗效判断指标。完全缓解 3 例、显效 19 例、有效 8 例, 总有效率达 100%。中位生存期(月)。CTOP 组为: Ⅰ期 118、Ⅱ期 75、Ⅲ期 11, 总中位生存期 44。VMCP、MP 组为: Ⅰ期 132、Ⅱ期 58、Ⅲ期 9, 总中位生存期 32。两组经 t 检验, 无明显差异($P>0.05$)。

2 讨论

MM 是一种较少见的血液系统恶性肿瘤, 好发于中老年, 男性多于女性。早期症状无特异性, 容易误诊、漏诊。早期诊断、治疗能提高患者对化疗的耐受性、减轻主要脏器的器质性损害, 是提高生活质量、延长生存期的关键。这对于器官功能减退的老年患者更重要。30 例患者全部出现血沉加快, 对于高危人群中不明原因血沉增高要引起重视。文献[2]报道在可疑人群中外周血细胞培养发现典型的浆细胞者, 在以后的一段时间内相继发病。外周血浆细胞培养是否可以作为一种筛选诊断而用于临床尚待进一步研究。

MM 的治疗主要依靠联合化疗, 辅助以大剂量 INF-α。Fermand[3] 报道无论是大剂量化疗、加用或不加用大剂量 INF-α, 还是造血干细胞移植, OS(Overallsurvival)均无明显延长, 但 EFS(Event free survival)可不同程度延长。Boccadoro 所作的回顾性总结显示: 近 10 年来, MM 患者的 OS 有延长趋势, 主要原因是由于各种并发症处理手段的提高, 而与不同治疗方案的选择无明显关系[4]。本组资料显示, 两种化疗方案患者的中位生存期无明显差异。Ⅰ期患者中位生存期明显长于Ⅱ、Ⅲ期患者, 提示早期诊断, 可以争取治疗时间, 提高治疗效果, 减少并发症, 延长生存期。公认吡喃阿霉素较阿霉素毒性更小, 患者更易耐受, VTHPA 替代 VAD 方案治疗 MM 取得了更好的疗效。我们使用 CTOP 加 INF-α 治疗方案, 有效率达 100%, 未出现明显的药物性器官功能障碍, 说明 THP 为主的化疗方案用于 MM 有其更大的优势。

关键词: 多发性骨髓瘤; 诊断; 治疗
中图法分类号: R733.3 文献标识码: B

参考文献:

[1] 张之南, 沈 悌. 血液学诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 373-379.
[2] Liu P, Oken M, Van Ness B. Interferon-alpha protects myeloma cell lines from dexamethasone-induced apoptosis[J]. Leukemia, 1999, 13(3): 473-480.
[3] Fermand J P, Ravaud P, Chevret S, *et al*. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation inmultiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial[J]. Blood, 1998, 92(9): 3 131-3 136.
[4] Boccadoro M, Palumbo A, Argentino C, *et al*. Conventional induction treatments do not influence overall survival in multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 1997, 96(2): 333-337.

(编辑 汪勤俭)

作者简介: 常 城(1972-), 男, 云南省昆明市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事白血病诊断、治疗方面的研究。电话: (023)68755000-74609

收稿日期: 2000-06-18; 修回日期: 2000-10-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net