

乳腺癌端粒酶活性与 bcl-2 和 bax 蛋白表达的相关性研究

郭华雄¹, 余龙江², 周治兰³, 赵洋¹, 肖昌蔚⁴, 何正源¹, 杨勇¹

摘要:目的 探讨端粒酶检测在乳腺癌诊断中的作用及其在乳腺癌发生中与 bcl-2 和 bax 蛋白表达的相关性。方法 用原位杂交方法检测端粒酶的表达及其活性,采用免疫组织化学技术 SABC 法检测 bcl-2 和 bax。结果 端粒酶在乳腺癌中的表达率明显高于癌前病变 ($P < 0.01$) 和乳腺良性肿瘤。端粒酶活性与 bcl-2 表达负相关,与 bax 表达显著负相关,与 bcl-2/bax 比值明显正相关。结论 bcl-2/bax 表达失衡(比值增大)可能是端粒酶激活的重要途径之一。

关键词:乳腺肿瘤;癌;端粒酶;细胞凋亡;基因表达

中图分类号: R737.9;R730.231

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2002)02-0112-02

Relationship among telomerase activity and bcl-2 and bax in breast cancer

GUO Hua-xiong, YU Long-jiang, ZHOU Zhi-lan, et al

Department of Pathology, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434100, China

Abstract: Objective To investigate the role of detection of telomerase activity in breast cancer diagnosis and the correlation of telomerase and bcl-2 and bax in the genesis of breast cancer. **Methods** Within situ hybridization to detect the expression and activity of telomerase, bcl-2 and bax were studied by streptavidin-Biotin Complex immunohistochemistry (SABC). **Results** The expression rate of telomerase in breast cancer was significantly higher than that in precancerous breast ($P < 0.01$) and in breast benign tumors. The bcl-2 and the bax had negative relation with the expression of telomerase, but there was positive relation between telomerase and bcl-2/bax ratio. **Conclusion** The increase of the ratio of bcl-2/bax may be one of the important pathways by which telomerase is activated.

Keywords: Breast neoplasm; Carcinoma; Telomerase; Apoptosis; Gene expression

bcl-2 与 bax 是调控细胞凋亡的重要基因,在多种肿瘤的发生发展中起重要作用,端粒酶激活可使端粒延长,使细胞获得永生而导致肿瘤。在肝癌等肿瘤中 bcl-2 与端粒酶之间存在着一定相互关系^[1],但在乳腺癌端粒酶激活与 bcl-2 和 bax 蛋白异常表达之间亦是否有关,目前尚未见报道。我们采用原位杂交和免疫组织技术检测乳腺良、恶性病变组织中的端粒酶活性和 bcl-2 及 bax 蛋白的表达,以探讨 bcl-2 和 bax 与端粒酶活性的之间的相互关系及其在乳腺癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集我院肿瘤外科 1999 年 2 月~2000 年 5 月手术切除未经放疗且资料完整的乳腺癌标本 53 例(其中乳腺粉刺癌 6 例,浸润性导管癌

36 例,髓样癌 8 例,硬癌 2 例,粘液癌 1 例),伴有异型增生的乳腺纤维囊肿病 12 例及乳腺纤维腺瘤 8 例;患者均为女性,年龄 30~65 岁,平均 46 岁。所有标本均在离体后迅速用 4% 的多聚甲醛固定,固定时间 8h,常规脱水石蜡包埋切片。

1.1.2 试剂 端粒酶原位杂交试剂盒及免疫组织化学检测试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,bcl-2 及 bax 蛋白为 Sigma 公司产品,工作浓度 1:100。

1.2 方法

1.2.1 端粒酶原位杂交反应 杂交探针为地高辛标记的多相寡核苷酸探针序列为: 5'-AGTCA GGCTGGGCTCAGAGAGCTGAGTAGGAAGG-3'; 5'-GCATGTACGGCTGGAGGTCTGTCAA GGTAGAGACG-3'; 5'-TGCACACCGTCTGGA GGCTGTTCACCTGCAAATCC-3'。操作步骤按试剂盒说明书进行。采用缓冲液代替杂交液作阴性对照。

1.2.2 免疫组化染色 采用 SABC 法

1.2.3 结果判断 bcl-2、bax 蛋白及端粒酶阳性信号

收稿日期:2001-05-08;修回日期:2001-09-18

作者单位:1.434100 荆州市中心医院病理科;2.华中科技大学生命科学与技术学院;3.荆州市中心医院检验科;4.肿瘤科

均为棕色颗粒,不显色为阴性;阳性分级:弱阳性+,阳性细胞数 <25%, 阳性 ++, 阳性细胞数为 26% ~ 50%, 强阳性 +++, 阳性细胞数 >50%。

1.2.4 统计学处理 χ^2 检验和等级相关分析。

2 结果

2.1 端粒酶在乳腺良、恶性病变中的表达情况

端粒酶在乳腺癌中的表达率为 86.7%, 在乳腺纤维囊肿病为 25%、乳腺纤维腺瘤无表达(见表 1),前者与纤维囊肿病的表达率有显著差异($P < 0.01$);阳性信号在乳腺癌主要位于细胞浆,少量位于胞核,亦有胞核与胞浆同时着色者;囊肿病端粒酶阳性信号位于细胞质(图略)。

表 1 端粒酶、bcl-2 及 bax 在乳腺良、恶性病变中的表达

组别	例数	端粒酶 + (%)	bcl-2 + (%)	bax + (%)	bcl-2/bax
乳腺纤维腺瘤	8	0	100	100	1
纤维囊肿病	12	25	83.3	91.6	1.09
乳腺癌	53	86.7*	56.6	32.1	1.74

* 与前一组比较 $\chi^2 = 20.07, P < 0.01$

2.2 bcl-2 及 bax 在乳腺良、恶性病变中的表达

bcl-2 及 bax 在乳腺良、恶性病变组织中均有不同程度的表达,见表 1,两者的阳性颗粒均在细胞浆内,为胞浆型。良性病变阳性信号均匀分布,乳腺癌阳性细胞呈局灶性分布,少部分呈弥漫分布。一些乳腺癌病例中 bcl-2 阳性表达区域 bax 失表达(图略)。

2.3 端粒酶活性与 bcl-2、bax 及 bcl-2/bax 的关系

表 1 显示在乳腺纤维腺瘤、纤维囊肿病、乳腺癌的形成和发展过程中,端粒酶的表达率逐渐增加,而 bcl-2 及 bax 的表达率却逐渐降低;端粒酶与 bcl-2 及端粒酶与 bax 之间均呈完全负相关,而端粒酶表达与 bcl-2/bax 比值呈明显正相关。在各阳性信号表达的形态学特征上,3 例伴不典型增生的纤维囊肿病和大部分乳腺癌的端粒酶表达在细胞浆,与 bcl-2 及 bax 的表达部位基本相同。

3 讨论

端粒酶为一种核糖核蛋白酶,它能以自身的 RNA 为模板在 DNA 末端合成端粒,维持端粒长度,从而保持细胞分裂增殖能力^[2]。多数恶性肿瘤中都有较强的端粒酶活性,在乳腺癌端粒酶活性明显增强,表达率为 80% ~ 92%^[3-5]。但端粒酶在乳腺癌中的激活机制目前尚不清楚,且其与 bcl-2 及 bax 之间的关系亦未见报道。

本研究采用原位杂交技术在石蜡切片中检测到乳腺癌端粒酶活性为 86.7%, 结果与众多采用聚合酶链反应—端粒末端重复序列技术(PCR-TRAP)研究

结果一致;观察到端粒酶主要存在于细胞浆和极少数细胞核内,端粒酶的表达在乳腺癌与纤维囊肿病和腺瘤之间有显著差异($P < 0.01$),提示在石蜡切片中检测端粒酶可作为乳腺癌诊断的一个有效指标。

bax 与 bcl-2 是调节细胞凋亡的一组相对应的基因,在细胞内以二聚体的形式存在,bcl-2/bax 比率是影响细胞凋亡的关键^[6]。本研究显示在乳腺良性病变至恶性肿瘤的转化过程中,bcl-2 表达率逐渐降低,bax 的表达率明显低于 bcl-2,bcl-2/bax 比值增高,这样 bcl-2 在结合了所有 bax 之后,余下 bcl-2 就形成 bcl-2/bcl-2 同二聚体,从而发挥其抑制凋亡的作用,导致肿瘤的发生。

Mandal 等^[7] 研究认为单纯 bcl-2 的过度表达可激活端粒酶,本课题在对乳腺癌发生中的端粒酶与 bcl-2/bax 的相关性研究中发现 bcl-2 在乳腺良性肿瘤至恶性肿瘤的转化过程中表达率逐渐降低,而端粒酶活性却逐渐增强,呈明显负相关,这同文献中对肝癌端粒酶与 bcl-2 关系的研究结论相反^[1],似乎显示在乳腺癌的发生中端粒酶的激活与 bcl-2 无关,但我们同时检测了 bax 在相同病例中的表达,发现 bax 在乳腺良性肿瘤、癌前病变和乳腺癌中的表达率呈明显递减趋势,其与端粒酶活性亦呈负相关;随着 bcl-2/bax 比值的增加,端粒酶活性增加,两者呈明显正相关($P < 0.01$),且 bcl-2/bax 比值变化似乎早于端粒酶活性的改变;同时我们也观察到 bcl-2 与多数端粒酶的表达具有相同的细胞形态学特征,为全浆型或以核周型为主,而这一部位也正好是 bax 失表达部位。研究结果提示端粒酶的激活可能与 bcl-2/bax 的表达失衡即 bcl-2/bax 比值增大有重要关系。

参考文献:

- [1] 冯德云,郑晖,程瑞雪,等. 肝细胞癌及癌旁组织中 bcl-2 和 p53 蛋白表达与端粒酶活性的相关性研究[J]. 临床与实验病理学杂志,1999,15 (4):287-289.
- [2] 吴珊,刘宗石,吴秉铨. 端粒和端粒酶与癌症[J]. 中华病理学杂志,1998,27 (5):386-387.
- [3] 金顺钱,张伟,腾茂方,等. 乳腺癌细针穿刺标本中端粒酶检测的诊断意义[J]. 中华病理学杂志,1999,28 (5):334-336.
- [4] 吴珊,刘宗石,孙宏明,等. 人乳腺浸润性导管癌端粒酶活性的检测[J]. 中华医学杂志,1998,78 (7):515-516.
- [5] Poremba C, Shroyer KR, Frost M, et al. Telomerase is a highly sensitive and specific molecular marker in fine needle aspirates of breast lesions[J]. J Clin Oncol, 1999, 17 (7):2020.
- [6] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74 (4):609-619.
- [7] Mandal M, Kumar R. Bcl-2 modulates telomerase activity[J]. J Biol Chem, 1997, 272 (22):14183-14187.

(安 风校对)