

放疗前后宫颈鳞癌组织凋亡指数与 bcl-2、bax 基因表达的相关性研究

郭万峰¹ 郭国祯¹ 韩良辅² 丁桂荣¹ 惠延平³ 郭 燕² 马海昕²

¹ (第四军医大学放射医学教研室 西安 710032);

² (第四军医大学西京医院放疗科 西安 710033);

³ (第四军医大学西京医院病理科 西安 710033)

摘要 检测了宫颈鳞癌患者放疗前和放疗中凋亡指数(AI)及 bcl-2、bax 的基因表达,探讨了宫颈癌组织中基因表达与凋亡之间的关系。采用免疫组化SABC法检测 bcl-2 和 bax 基因的表达,TUNEL法检测宫颈鳞癌活体组织的细胞凋亡水平。在此基础上分析 bcl-2 和 bax 基因表达的细胞阳性率与凋亡指数的关系。结果表明,X射线照射 10Gy 后,宫颈癌组织 bax 基因表达增强($p < 0.05$),凋亡指数亦明显增加($p < 0.01$), bcl-2 基因表达的细胞阳性率水平无明显改变($p > 0.05$)。照射前宫颈癌组织 bcl-2 和 bax 的基因综合表达细胞阳性率与自发凋亡相关性较差($p > 0.05$, $r = 0.3703$,其上界为 0.7071),而 10Gy 照射后,宫颈癌组织中 bcl-2 和 bax 的综合表达细胞阳性率与辐射诱导的凋亡具有明显的相关性($p < 0.05$, $r = 0.5264$,其上界为 0.7071)。

关键词 宫颈鳞癌, 凋亡指数(AI), bcl-2 基因, bax 基因

中图分类号 R815.2

在我国,约 70% 的肿瘤患者需要放射治疗,但放射治疗对多数肿瘤的治愈率仍较低。宫颈癌是人类多发性恶性肿瘤,严重危害中、老年女性的健康。近年来,随着对细胞凋亡基因的了解以及放射线诱导细胞凋亡研究的逐渐深入,人们认识到放射线诱导的凋亡和放射敏感性具有相关性^[1,2]。文献[3]报道,bcl-2 基因家族的 bcl-2 和 bax 对于细胞凋亡具有调节作用。本工作探讨宫颈鳞癌患者样品中 bcl-2 和 bax 基因表达的变化与凋亡的关系,有助于确定宫颈癌患者的辐射敏感性,为基因治疗和放疗的联合应用提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

28 例宫颈癌患者,均为 2000.7—2000.12 在本校西京医院放疗科进行放疗者,年龄 34—78 岁,平均年龄 51 岁。8 Mv—X 线照射前及照射 10 Gy 时分别取材一次,所取标本置 4% 甲醛液中固定。常规制片,HE 染色,临床和组织学诊断为鳞状细胞癌。按 FIGO 分期:Ⅱa 4 例,Ⅱb 10 例,Ⅲa 5 例,Ⅲb 9 例,按 WHO 分级:Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 级分别为 9 例、12 例和 7 例。一般状况良好,能承受放疗。

1.2 治疗方法

患者在模拟定位机下定位,照射范围上界在髂嵴水平,下界在闭孔下,两侧界在股骨头中线处,前后野照射。Philip SL—14 型直线加速器 8Mv—X 线体外照射,单次剂量 2.0Gy,每周

教育部课题 回国人员启动基金 (Hg98001)资助
第一作者:郭万峰,男,1974 年出生,1996 年毕业于苏州医学院,放射医学专业,硕士研究生
收稿日期:初稿 2001—06—18, 修回 2001—09—17

5 次, Dt 40Gy 后, 前后野中线挡铅 4cm, 外照射加至 Dt 55—60Gy, 同时加腔内¹⁹²Ir 后装照射, A 点剂量 3.0—3.5Gy/4—5 次。照射期间每日冲洗阴道, 并积极处理并发症。全部患者均顺利完成治疗, 照射后 1 个月后体检和组织活检, 观察放疗效果。

1.3 免疫组化

采用武汉博士德公司生产的兔抗人 Bcl-2(SA2015)和 Bax(SA2030)试剂盒。操作步骤如下: (1)连续切片, 脱腊至水。(2)用蒸馏水配置 3% H_2O_2 100mL, 室温下用 3% H_2O_2 处理切片 10min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 5min $\times$ 3 次。(3)微波加热后修复抗原: 将切片浸入 0.01mol/L, pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液中, 微波炉加热至 100℃, 持续 25min 后室温冷却进行下一步。(4)滴加抗原修复液, 室温 10min, 蒸馏水洗 5 min $\times$ 3 次。(5)滴加封闭液, 室温 10min, 甩去多余液体, 不洗。(6)滴加适当稀释的一抗, 4℃过夜。0.01mol/L PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。(7)滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37℃放置 20min。0.01mol/L PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。(8)滴加试剂 SABC, 37℃放置 20min。0.01mol/L PBS 洗 5 min $\times$ 5 次。(9)DAB 显色: 使用 DAB 显色试剂盒(ED1022)。取 1mL 蒸馏水, 加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片。室温显色, 反应时间为 5min, 蒸馏水洗涤。(10)脱水、透明、封片, 显微镜观察。

1.4 凋亡检测

石蜡切片进行 HE 和 TUNEL 染色。TUNEL 染色采用武汉博士德公司生产的原位标记试剂盒(MK1020), 其步骤为: (1)组织切片常规脱腊至水; (2)新鲜配制 3% H_2O_2 100mL, 并用此处理切片室温 10min; (3)标本切片滴加 TBS 1:400 新鲜稀释的 Proteinase K, 37℃消化 5min, 蒸馏水洗涤 2min $\times$ 3 次; (4)标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer), 20 μL /片, 以保持切片湿润。按每张切片 TdT 和 DIG-dUTP 各 1 μL , 标记缓冲液 18 μL 的比例配制标记液, 混匀。甩去切片上多余液体后加标记液, 20 μL /片。置样品于湿盒中, 37℃标记 2h; (5)加封闭液 50 μL /片, 室温 30 min, 甩掉封闭液, 不洗; (6)用封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体, 50 μL /片加至标本上。置样品于湿盒中, 37℃反应 30min。TBS 洗 2 min $\times$ 3 次; (7)用 TBS 1:100 稀释 SABC; 取 1mLTBS 加 SABC10 μL , 混匀后加至切片。37℃反应 30min。TBS 洗 5min $\times$ 4 次。(8)DAB 显色, 苏木素轻度复染。TBS 洗, 蒸馏水洗。脱水, 透明, 封片。显微镜下观察, 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡的细胞, 并结合 HE 染色, 排除坏死的细胞。

1.5 统计学分析

应用 SPLM(第四军医大学统计教研室)统计软件, 采用 w 检验进行正态性检验; 配对 t 检验研究照射前后凋亡指数的改变; χ^2 检验照射前后 bcl-2 和 bax 基因表达; Pearson 列联系数分析 bcl-2 和 bax 基因表达与凋亡指数之间的关系。

2 结果

2.1 免疫组化结果

在光学显微镜下 Bcl-2 和 bax 蛋白染色阳性者细胞浆呈黄褐色, (见图 1 a、b)。随机选择 5 个高倍视野, 计数 1000 个肿瘤细胞, 当阳性细胞占总数的 41%—100% 时定为 ++; 当阳性肿瘤细胞占总数的 11%—40% 时定为 +; 当阳性细胞占总数的 0%—10% 时定为 -。经 χ^2 检验, 照射前后 bax 基因表达有明显的统计学差异($\chi^2=6.8489$, $p=0.033$), 照射前后 bcl-2 基因表达改变不明显($\chi^2=1.981$, $p=0.3714$)(见表 1)。

Tab.1 bcl-2 and bax gene expression rates in the samples from cervical squamous cell carcinoma before and after irradiation

Group	n	bcl-2			bax		
		++	+	-	++	+	-
Before irradiation	28	4	9	15	2	12	14
After irradiation	28	2	6	20	10	9	9

2.2 TUNEL 染色结果

每例患者活检组织阳性切片,随机计数 1000 个分布清晰的细胞,计算其阳性细胞的指数 (Apoptotic index AI= 凋亡细胞/1000×100%)。阳性标记位于细胞核,多在核膜周边,表现出凋亡细胞的形态特征。也有一些形态学上并不具有明显凋亡细胞特征的宫颈癌细胞也表现为 TUNEL 阳性,推测这些细胞可能正处于凋亡的早期(见图 1c)。照射前与照射 10Gy 后宫颈癌细胞凋亡指数的改变,经配对 *t* 检验进行统计学分析(*t* =7.2, *p* <0.01)(见图 2),说明照射前后宫颈癌组织的细胞凋亡水平有明显差异。

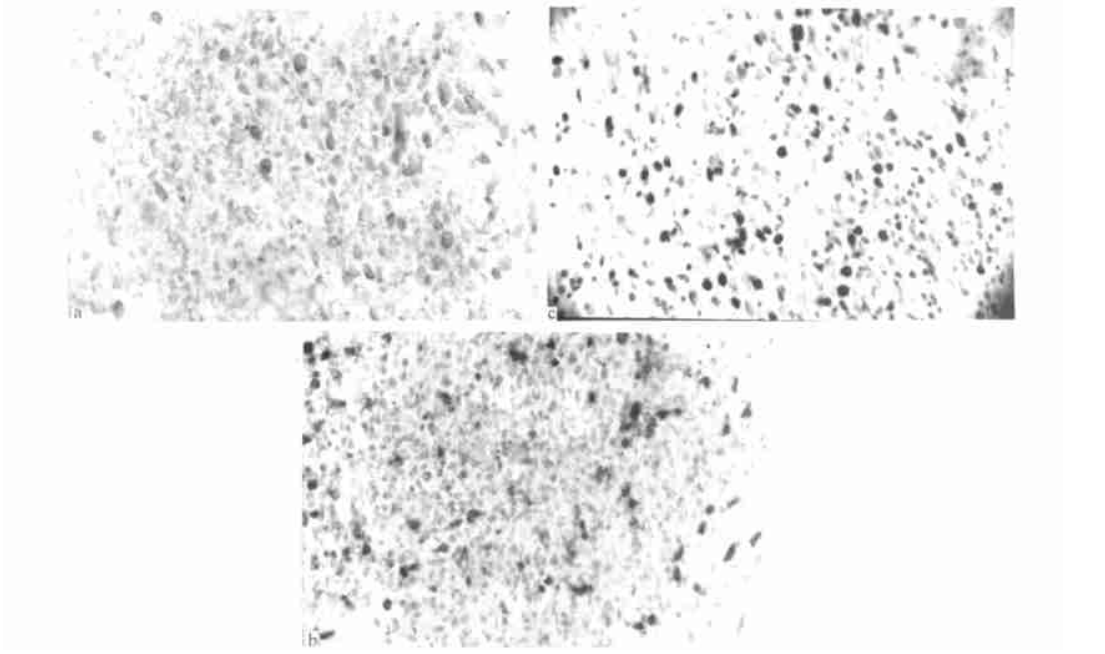


Fig.1 a. Immunohistochemical staining for bcl-2. (SABC ×400)
b. Immunohistochemical staining for Bax . (SABC ×400)
c. Apoptotic cells in the cervical carcinoma (TUNEL ×400)

2.3 bcl-2 和 bax 基因表达与凋亡指数之间的关系

根据 TUNEL 染色结果,将凋亡指数以其中位数 3%(照射前)和均值 28.2%(照射 10Gy)进行分组。对于宫颈癌组织 bcl-2 和 bax 基因表达的切片,当阳性肿瘤细胞为 ++,bax 评 3 分,bcl-2 评 1 分;当阳性肿瘤细胞为 +,bax 评 2 分,bcl-2 评 2 分;当阳性肿瘤细胞为 -,bax 评 1 分,bcl-2 评 3 分。综合表达强度为同一癌组织 bax 及 bcl-2 基因蛋白表达强度评

分之和,最高分为 6 分,最低分为 2 分。由表 2、3 可见,照射前 AI₀ 与 bcl-2、bax 基因表达之间的关系为: $\chi^2=4.45$, $p=0.3485$; Pearson 列联系数 $r=0.3703$ (列联系数上界为 0.7071),照射后的 AI₁₀ 与 bcl-2、bax 基因表达之间的关系为: $\chi^2=10.7318$, $p=0.0297$, $r=0.5264$ 。上述结果显示,照射后的 AI₁₀ 与 bcl-2、bax 基因表达具有明显相关性($p<0.05$, $r=0.5264$)。

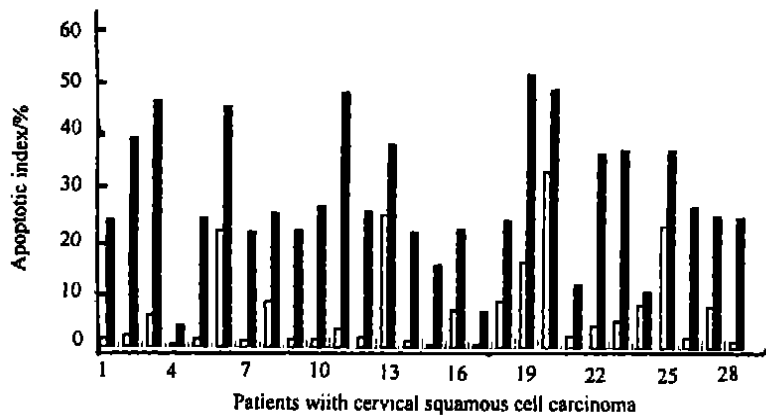


Fig-2 Apoptotic index of cervical carcinoma before and after 10Gy irradiation ($n=28$)
□ Before irradiation, ■ After irradiation

Tab.2 Correlation of bcl-2 and bax gene cooperative expression rates with spontaneous apoptotic index (AI₀) in the samples from cervical squamous cell carcinoma

Group	n	bcl-2 and bax gene cooperative expression before irradiation				
		6 scores	5 scores	4 scores	3 scores	2 scores
AI ₀ >3%	14	1	3	9	1	0
AI ₀ <3%	14	0	2	7	3	2

Tab.3 Correlation of bcl-2 and bax gene cooperative expression rates with radiation-induced apoptotic index (AI_R) in the samples from cervical squamous cell carcinoma

Group	n	bcl-2 and bax gene cooperative expression before irradiation				
		6 scores	5 scores	4 scores	3 scores	2 scores
AI _R >28.2%	10	5	4	1	0	0
AI _R <28.2%	18	1	5	10	1	1

3 讨论

放疗中的理想情况是射线引起肿瘤细胞的死亡,而正常细胞不受影响。许多实验室希望以肿瘤组织自发凋亡和放疗过程中的凋亡指数作为临床放疗的预测及评估指标^[3,4]。目前,辐射诱导肿瘤细胞凋亡的机制是公认的,Verheij^[5]等综述了辐射诱导凋亡的机制和这种死亡模式下分子生物学和放射治疗的重要内容。Levine等^[6]报道了对于宫颈癌患者,照射前的自发凋亡是预测放疗敏感性的有用指标。Olive^[7]等也认为放射治疗后产生速发型凋亡的组

织,其辐射敏感性相对较高。我们以凋亡为生物标志,研究在宫颈癌组织中凋亡指数的变化和其基因表达的关系,发现照射后凋亡指数明显增加,放疗后的凋亡指数与其 bcl-2 和 bax 基因的综合表达具有明显的相关性。这与 Yuki^[8]研究照射前后 IIIB 期宫颈癌的细胞凋亡及相关基因表达的结果一致。

bcl-2 基因这一名称起源于 14:18 染色体易位的 B 细胞淋巴瘤,定位于人染色体 18q21,含 3 个外显子,全长 230kb,是细胞凋亡抑制基因。而 bax 基因是一种凋亡促进基因,属 bcl-2 基因家族,bax 基因不但拮抗 bcl-2 的抑制凋亡作用,而且有直接促进细胞凋亡的功能。当 bax 在细胞内过度表达时,可形成 bax-bax 同源二聚体,此时与 p53 基因产物一样,bax 是促进细胞凋亡的。bcl-2 通过与 bax 的结合才能发挥其作用,当 bcl-2 与 bax 的结合点断裂(disrupted),则 bcl-2 对细胞的保护性消失。BCL2 与 BAX 蛋白量的比率决定异二聚体(BCL2/BAX)与同二聚体(BAX/BAX)的比值,这对决定细胞凋亡的易感性起关键作用。一般而言,bcl-2 的过度表达产物与 BAX 形成异二聚体而阻抑凋亡。

许多研究证实,电离辐射可调控 bcl-2 家族基因表达,其依赖于野生型 p53 的 bcl-2 与 bcl-X_L的表达下调及 bax 表达上调。Kariya^[9]等指出 bcl-2 表达增强拮抗辐射诱导的细胞凋亡,而 bax、bcl-X_s 高表达则增强肿瘤辐射敏感性。bcl-2 家族抗凋亡成员如 bcl-2 与 bcl-X_L及促凋亡成员 bax、bak 及 bid 等促、抗凋亡蛋白数量变化可调节细胞对凋亡刺激的反应,在一定程度上也反映了肿瘤的辐射敏感性^[10]。我们的研究证实,在照射 10Gy 后,bax 基因表达明显增强,而 bcl-2 基因表达有所下降,表明两者在宫颈癌细胞凋亡的调控中均起着重要作用。这与 Katsuji Kokawa^[11]等对 7 例浸润性宫颈鳞癌患者放射治疗凋亡及其 bax 基因表达动态研究的结果一致,但对 bcl-2 基因表达的研究结果相反,可能与其研究例数较少有关。

随着分子生物学的发展,基因治疗技术有了重要突破。Arafat^[12]等用腺病毒把促凋亡 bax 基因转移入人卵巢肿瘤细胞,发现放射疗效明显增强。研究 bcl-2 家族基因在宫颈癌组织中的表达对细胞凋亡的调节,将为基因治疗结合放射治疗提供重要的理论依据。

参 考 文 献

- 1 Guo G Z, Sasai K, Oya N *et al.* Int J Radiat Biol, 1998, **73**(3): 297-302
- 2 Guo G Z, Sasai K, Oya N *et al.* Int J Radiat Biol, 1999, **75**(7): 857-864
- 3 王丽平,梁克. 国外医学.放射医学核医学分册,2000,**24**(2):75-78
WANG L P, LIANG K. Foreign Med Sci. Sec Radiat Med Nucl Med, 2000,**24**(2):75-78
- 4 朱光旭,王小华. 国外医学.放射医学核医学分册,2000,**24**(2):78-81
ZHU G X, WANG X H. Foreign Med Sci. Sec Radiat Med Nucl Med, 2000,**24**(2):78-81
- 5 Verheij M, Bartelink H. Cell Tissue Res 2000, **301**(1): 133-142
- 6 Levine E L, Davidson S E, Robert S A *et al.* Lancet, 1994, **344**: 472
- 7 Olive P L, Durand R E. Int J Radiat Bio, 1997, **71**: 695-707
- 8 Yuki H, Fujimura M, Yamakawa Y *et al.* Jpn J Cancer Res, 2000, **91**(1): 127-34
- 9 Kariya S, Ogawa Y, Yoshida S *et al.* Int J Mol Med, 1999, **3**(2): 145-152
- 10 Reed J C. Oncogene, 1998, **17**(25): 325-336
- 11 Katsuji Kokawa, Toshihiko Shikone, Tsutomu Otani *et al.* Cancer, 1999, **86**: 79-87
- 12 Arafat W O, Gomez-Navarro J, Xiang J *et al.* Mol Ther, 2000, **1**(6): 545-554

THE RELATIONSHIP OF APOPTOTIC INDEX AND $bcl-2$, BAX GENE EXPRESSION FOLLOWING RADIOTHERAPY IN CERVICAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

GUO Wanfeng¹ GUO Guozhen¹ HAN Liangfu² DING Guirong¹
HUI Yanping³ GUO Yan² MA Haixin²

¹(Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

²(Department of Radiotherapy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033)

³(Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033)

ABSTRACT The aim of this paper was to observe $bcl-2$ and bax gene expression and apoptosis and to study the correlation between $bcl-2$ and bax gene expression and apoptotic index in the samples from patients with cervical squamous cell carcinoma following radiotherapy. Apoptosis was detected with TUNEL method. It was found that the bax gene expression and apoptotic index in cervical carcinoma significantly increased ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) after ^{10}Gy irradiation compared with those of pre-therapy. However, the $bcl-2$ gene expression had no obvious change ($p > 0.05$). Our data suggested that the $bcl-2$ and bax gene cooperative expression was related unobviously with spontaneous apoptosis, but obviously with radiation-induced apoptosis ($p < 0.05$, $r = 0.5264$) in patients with cervical squamous cell carcinoma.

KEYWORDS Cervical squamous cell carcinoma, Apoptotic index (AI), $bcl-2$ gene, Bax gene

CLC R815.2