

恶性肿瘤实验室研究专题 · 论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.004

Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 在胃癌变过程中的表达及与细胞凋亡的相关性研究

熊 见¹, 魏宇燕^{1△}, 李 亮², 段 松³

重庆大学附属三峡医院:1. 医学检验科;2. 消化内科;3. 病理科, 重庆 404000

摘 要:目的 研究在胃癌变过程中细胞凋亡率及相关调控基因 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和凋亡细胞相关抗体(Apo2.7)的表达情况和临床意义。**方法** 应用流式细胞术和免疫组化染色检测对比分析 364 例组织标本的细胞凋亡率及细胞凋亡调控基因 Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 在胃癌及胃癌前组织中的表达情况。**结果** 在正常胃黏膜(NOR)、慢性浅表性胃炎(CSG)、慢性萎缩性胃炎(CAG)、肠上皮化生(IM)、黏膜上皮异型增生(GIN)、胃癌中,细胞凋亡率以及 Caspase-3、Apo2.7 的表达率在胃黏膜癌变进展中呈下降趋势,Bcl-2 表达率呈上升趋势;胃癌组与 IM、CAG、CSG、NOR 组 Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 免疫组化阳性率差异均有统计学意义($P < 0.05$),NOR 组与 CAG、IM、GIN、胃癌组 Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 免疫组化阳性率差异均有统计学意义($P < 0.05$),免疫组化染色阳性率与流式细胞术所示进展趋势一致。**结论** Bcl-2 的过度表达和 Caspase-3、Apo2.7 的表达下调,使细胞凋亡受抑,从而促进胃癌的发生和发展;应用流式细胞术和免疫组化染色检测胃黏膜组织的细胞凋亡率以及 Bcl-2、Caspase-3 和 Apo2.7 的表达可对胃部病变进行早期诊断和进程分期。

关键词: 胃癌; 胃癌前病变; 细胞凋亡; B 淋巴细胞瘤-2 基因; 半胱氨酸蛋白酶-3

中图法分类号:R735.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)15-2155-04

Expressions of Bcl-2, Caspase-3 and Apo2.7 and their correlation with cellular apoptosis during gastric carcinogenesis process

XIONG Jian¹, WEI Yuyan^{1△}, LI Liang², DUAN Song³

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Gastroenterology; 3. Department of Pathology, Affiliated Three Gorges Hospital, Chongqing University, Chongqing 404000, China

Abstract: **Objective** To study the cellular apoptosis rate, expressions of related regulatory genes Bcl-2, Caspase-3 and Apo2.7 and clinical significance in gastric carcinogenesis process. **Methods** The flow cytometry and immunohistochemical staining were used to detect and comparatively analyze the cellular apoptosis rate and expressions of cellular regulatory genes Bcl-2, Caspase-3 and Apo2.7 in gastric cancer (GC) and precancerous tissues of 364 tissue samples. **Results** The apoptosis rate and expression rates of Caspase-3 and Apo2.7 in normal gastric mucosa (NOR), chronic superficial gastritis (CSG), chronic atrophic gastritis (CAG), intestinal metaplasia (IM), mucosal epithelial dysplasia (GIN) and GC showed a decreasing trend in the progression of gastric mucosal carcinogenesis and the expression rate of Bcl-2 showed the increasing trend; the immunohistochemical positive rate of Bcl-2, Caspase-3, and Apo2.7 showed the significant difference between the GC group with the IM, CAG, CSG and NOR groups ($P < 0.05$), and the positive rate of Bcl-2, Caspase-3, Apo2.7 had significant difference between the NOR group with the CAG, IM, GIN, and GC groups ($P < 0.05$). The positive intensity of immunohistochemical staining was consistent with the progress trend showed by flow cytometry. **Conclusion** Bcl-2 overexpression and downregulation of Caspase-3 and Apo2.7 inhibit the cell apoptosis, thus promote the occurrence and development of gastric cancer. Using the flow cytometry and immunohistochemical staining to detect the apoptosis rate and the expression rates of Bcl-2, Caspase-3 and Apo2.7 in gastric mucosal tissue can conduct the early diagnosis and process staging of gastric lesions.

Key words: gastric cancer; precancerous lesion; apoptosis; Bcl-2; Caspase-3

目前,胃癌是世界上常见的恶性肿瘤,全世界每年有超过 120 万新发胃癌病例,我国约占 40%,病死

作者简介:熊见,男,副主任技师,主要从事流式细胞诊断与研究。△ 通信作者, E-mail:23984015@qq.com。

本文引用格式:熊见,魏宇燕,李亮,等. Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 在胃癌变过程中的表达及与细胞凋亡的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(15): 2155-2158.

率居第 2 位^[1]。胃癌的发生是由多因素参与的复杂过程,在正常情况下,胃黏膜上皮细胞的增殖和凋亡之间保持动态平衡,细胞调控机制的紊乱与胃癌的发生关系密切^[2-4]。B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和凋亡细胞相关抗体(Apo2.7)是细胞凋亡基因中的重要成员,在细胞凋亡机制网络中居中心地位^[5-6],目前对其研究多采用免疫组化的方法,以定性和半定量为主,而流式定量检测较为少见。由于免疫组化染色方法的局限性,其阴性结果对疾病进程的诊断不及定量方法明确。本研究选取不同类型的凋亡调控相关基因,采用流式细胞术检测其在胃癌变过程中的表达情况,结合对照免疫组化染色阳性表达情况,研究其与胃癌进程的相关性,探讨其在胃癌早期诊断中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2019 年 10 月至 2020 年 6 月在重庆大学附属三峡医院进行胃镜检查的 364 例受检者的 364 例标本,其中男 204 例,年龄 35~84 岁,中位年龄 51 岁;女 160 例,年龄 29~81 岁,中位年龄 59 岁;经病理诊断^[7]为正常胃黏膜(NOR)73 例,慢性浅表性胃炎(CSG)80 例,慢性萎缩性胃炎(CAG)67 例,肠上皮化生(IM)35 例,黏膜上皮异型增生(GIN) 48 例,胃癌 61 例。

1.2 仪器与试剂 免疫组化染色兔抗人 Bcl-2、Caspase-3 及 Apo2.7 单克隆抗体均采用美国 Santa Cruz 公司产品;流式细胞抗体 PE Caspase-3(美国 BD,克隆:19/Caspase-3/CP32,分类号:610322);PE Bcl-2(美国 BD,克隆:N46-467,分类号:562532);PE Apo2.7(法国 Immunotech S. A. S);FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(美国 BD,分类号:556421);组织匀浆仪(美国 BD-GINimachine-90 250);流式细胞仪(美国 BD FACSCanto II)。

1.3 方法

1.3.1 单细胞悬液制备 消化内窥镜下取新鲜或冷冻组织(1~2 mm),用磷酸盐缓冲液(PBS)浸湿。将组织和 1 mL PBS 放入已预洗过的匀浆盘中,将匀浆盘插入组织匀浆仪中进行组织粉碎 1 min。用 7 μ m 孔径滤器过滤并用 PBS 冲洗滤器获得细胞悬液,洗下的细胞放于试管内,250 $\times$ g 离心细胞悬液 5 min。弃上清液用 PBS 重悬细胞沉淀,调节细胞水平至 5 $\times$ 10⁵~1 $\times$ 10⁶/mL。

1.3.2 流式标本制备 (1)100 μ L 单细胞悬液冷破膜后分别加入 20 μ L Bcl-2、Caspase-3 抗体及同型对照,2~8 $^{\circ}$ C 孵育 15~30 min,加 2 mL PBS(2~8 $^{\circ}$ C)后 250 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液,0.5 mL PBS 重悬细胞沉淀备检。(2)Apo2.7 检测:取 100 μ L 细胞悬液各加在 2 支试管中,然后加 100 μ g/mL 的 Digitonin 冰浴透膜 20 min,2 mL PBS 250 $\times$ g 离心 5 min 弃上

清液,各加 20 μ L Apo2.7-PE 单抗及同型对照,室温暗处孵育 30 min 后 PBS 洗涤,加入含 2.5% 小牛血清的 PBS 0.5 mL 重悬置冰浴中备检。(3)细胞凋亡检测管加入 5 μ L 的 FITC-Annexin V 和 5 μ L 的 PI 工作液及 100 μ L 单细胞悬液,室温暗处孵育 15 min,0.4 mL PBS 重悬备检。

1.3.3 免疫组化染色 运用免疫组化染色 SP 法检测所有标本 Bcl-2、Caspase-3 及 Apo2.7 的表达。主要步骤:(1)将 4 μ m 切片脱蜡,梯度乙醇脱水;(2)将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0),微波热修复 10 min;(3)3% H₂O₂ 去离子水室温孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶活性,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;(4)除去 PBS,滴加非免疫性血清,室温下孵育 10 min,滤纸吸干;(5)滴加 50 μ L 第一抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;(6)依次加第二、第三抗体,室温下各孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;(7)每张切片加入 100 μ L 二氨基联苯胺显色液;(8)自来水冲洗,苏木素复染;(9)自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明;(10)干燥封片。

1.3.4 免疫组化结果判定 细胞质内出现棕黄色颗粒显像判为阳性反应。根据阳性细胞的百分率分成 4 个等级:阴性(-),无阳性细胞;+,阳性细胞百分率<30%;++,阳性细胞百分率为 30%~70%;+++,阳性细胞百分率>70%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料以 χ^2 检验,组间比较采用 χ^2 检验,检验标准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测结果比较 在由 CSG 向胃癌演变的过程中,细胞凋亡率及 Caspase-3、Apo2.7 表达率逐渐降低,而 Bcl-2 则在这一演变的过程中表达率逐渐增加,至胃癌期到达高峰。除 GIN 组的细胞凋亡率及 Apo2.7 表达率与胃癌组比较差异无统计学意义($P>0.05$)外,其余各组与胃癌组间细胞凋亡率及 Apo2.7 表达率差异均有统计学意义($P<0.05$);CAG、IM、GIN、胃癌组与 NOR 组比较,细胞凋亡率及 Caspase-3、Apo2.7 表达率差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组 Bcl-2、Caspase-3 和 Apo2.7 表达率及细胞凋亡率见表 1,变化趋势见图 1。

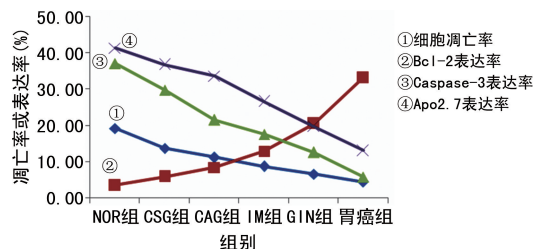


图 1 Bcl-2、Caspase-3 和 Apo2.7 表达率及细胞凋亡率在 各组病变中的变化趋势

2.2 Bcl-2、Caspase-3 及 Apo2.7 的表达率与细胞凋亡率的相关性分析 Bcl-2 表达率与细胞凋亡率呈负相关($r=-1.198, P<0.05$), Caspase-3、Apo2.7 的表达率与细胞凋亡率呈正相关($r=0.852, 0.867, P<0.05$)。

2.3 免疫组化结果比较 不同组间 Bcl-2、Caspase-3 和 Apo2.7 的免疫组化阳性率见表 2。各基因型表达

阳性程度和免疫组化阳性率同流式细胞表达率趋势较一致。除 GIN 组的 Apo2.7 免疫组化阳性率与胃癌组比较差异无统计学意义($P>0.05$)外,其余各组与胃癌组 Apo2.7 免疫组化阳性率差异均有统计学意义($P<0.05$), CAG、IM、GIN、胃癌组与 NOR 组比较, Bcl-2、Caspase-3 和 Apo2.7 的免疫组化阳性率差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况及 Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 表达情况($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	细胞凋亡率	Bcl-2 表达率	Caspase-3 表达率	Apo2.7 表达率
NOR 组	73	19.21±7.52 [△]	3.47±1.66 [△]	37.04±5.38 [△]	41.32±6.38 [△]
CSG 组	80	13.66±5.25 [△]	5.82±2.44 [△]	29.75±5.23 ^{*△}	36.75±4.93 [△]
CAG 组	67	11.20±4.27 ^{*△}	8.43±2.34 ^{*△}	21.53±5.44 ^{*△}	33.59±6.17 ^{*△}
IM 组	35	8.65±4.77 ^{*△}	12.88±4.08 ^{*△}	17.53±4.75 ^{*△}	26.54±4.59 ^{*△}
GIN 组	48	6.55±4.01 [*]	20.49±5.07 ^{*△}	12.54±3.94 ^{*△}	19.68±5.35 [*]
胃癌组	61	4.39±3.89 [*]	33.16±6.85 [*]	5.73±3.44 [*]	16.02±5.28 [*]

注:与 NOR 组比较, $^* P<0.05$;与胃癌组比较, $^{\Delta} P<0.05$ 。

表 2 各组 Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 免疫组化结果比较

组别	<i>n</i>	Bcl-2			Caspase-3			Apo2.7		
		-(<i>n</i>)	+~++++(<i>n</i>)	阳性率(%)	-(<i>n</i>)	+~++++(<i>n</i>)	阳性率(%)	-(<i>n</i>)	+~++++(<i>n</i>)	阳性率(%)
NOR 组	73	68	5	6.8 [△]	25	48	65.8 [△]	19	54	74.0 [△]
CSG 组	80	55	25	31.3 ^{*△}	30	50	62.5 [△]	27	53	66.3 [△]
CAG 组	67	48	19	28.4 ^{*△}	37	30	44.8 ^{*△}	25	42	62.7 ^{*△}
IM 组	35	24	11	31.4 ^{*△}	22	13	37.1 ^{*△}	20	15	42.9 ^{*△}
GIN 组	48	21	27	56.3 ^{*△}	34	14	29.2 ^{*△}	37	11	22.9 [*]
胃癌组	61	12	49	80.3 [*]	51	11	18.0 [*]	49	12	19.7 [*]

注:与 NOR 组比较, $^* P<0.05$;与胃癌组比较, $^{\Delta} P<0.05$ 。

3 讨 论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其中腺癌在胃的恶性肿瘤中占 95%。胃癌早期症状和体征不典型,出现明显症状和体征时已属中晚期,我国每年胃癌新发病例约为 67.9 万,同期死亡人数更高达 49.8 万^[8]。研究表明,“慢性胃炎—胃黏膜萎缩—IM—异型增生—胃癌”为胃癌的病理学发展模式,胃黏膜细胞凋亡率的进行性下降导致细胞持续增殖并呈高增生状态,过度增殖状态的细胞更易受到致癌物质的损伤,从而增加了 DNA 畸变的风险,最终可能导致胃癌的发生。研究表明 Bcl-2 和 Caspase-3 是重要的两种凋亡抑制基因,其表达与肿瘤的发生、发展存在密切的关系^[9-10]。Bcl-2 是 TSUJIMOTO 等最早从伴有 t(14;18)(q32;q21)染色体易位的 B 细胞淋巴瘤中发现的原癌基因,而 Caspase-3 是 Caspase 系统中导致细胞凋亡的关键成分,它是细胞线粒体依赖凋亡途径的重要因素,处于凋亡级联反应的下游,是细胞凋亡效应期的重要中心分子。Apo2.7 最早是由 ZHANG 等^[11]报道的新的细胞凋亡标志物,有促进细胞凋亡的

作用,主要通过线粒体途径介导细胞凋亡,在凋亡检测中极具前景,是凋亡细胞的一个早期反应。线粒体结构和功能障碍是各种刺激因素诱导细胞凋亡的中心事件,单抗能与线粒体膜蛋白特异性结合,并由此导致线粒体内凋亡因子释放,参与细胞凋亡的调控。Apo2.7 参与该调节,与 Bcl-2 密切相关。

本研究显示, Bcl-2、Caspase-3 及 Apo2.7 的表达与细胞凋亡率亦存在相关性,通过 Bcl-2 的高表达及 Caspase-3 和 Apo2.7 基因的表达下调,使细胞凋亡过程受到抑制,细胞凋亡率呈趋势性下降,细胞凋亡与增殖比例失调可致癌变概率增大,这与刘爱群等^[12]或杨静等^[13]通过免疫组化方法检测胃病变组织中 Bcl-2 及 Caspase-3 的研究结果一致。同时本研究也发现, Bcl-2、Caspase-3 及 Apo2.7 的免疫组化阳性率进展与流式细胞表达率趋势一致, Bcl-2 阳性率渐行性增高, Caspase-3 和 Apo2.7 渐行性降低,其蛋白表达阳性程度亦与其阳性率趋势相符。流式细胞术检测各指标可在胃黏膜病变中全程量化,而免疫组化染色各指标只能半定量监测,各病变期仍存在阴性标本,特

异性不足,体现了流式细胞术相对于免疫组化方法在临床应用中的一大优势。

本研究资料显示了在胃癌变过程中,细胞凋亡率、Bcl-2、Caspase-3 及 Apo2.7 的量变关系,通过分析其变化趋势可对胃癌的早期诊断及病程监测提供参考,亦说明了细胞凋亡调控在胃黏膜细胞异常增殖及癌变过程中所起的作用。监测细胞凋亡率以及 Bcl-2、Caspase-3、Apo2.7 在胃黏膜组织中的定量表达情况,可推断其疾病进展情况。

参考文献

[1] 常敏,张久聪,周琴,等. 胃癌流行病学研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2017,26(9):966-969.

[2] 陈伟霞,牛垚飞,王同明,等. 中药诱导胃癌细胞凋亡的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2020,38(2):57-61.

[3] CHEN H Y, ZHENG Y M, LIU M H. Expression of gab2 gene in gastric cancer and its effect on proliferation, apoptosis, migration and ex-pression of AKT, p-AKT, Bax and Bcl-2 in gastric cancer cells[J]. Cancer Prog, 2017,15(3):262-266.

[4] WANG Y, YIN B, LI D, et al. GSDME GINiates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018,495(1):1418-1425.

[5] 梁凯,曹秉振. 线粒体调控的细胞凋亡研究进展[J]. 生物医学工程与临床,2014,18(5):501-505.

[6] 李敏,林俊. 细胞凋亡途径及其机制[J]. 国际妇产科学杂

志,2014,41(2):103-107.

[7] 慢性胃炎及上皮性肿瘤胃黏膜活检病理诊断共识[J]. 中华病理学杂志,2017,46(5):289-293.

[8] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(6):394-424.

[9] 肖丽娜,周先华,张青华. Caspase-3 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系[J]. 检验医学与临床,2019,16(14):2034-2036.

[10] LI Q, LI J, LIU Y, et al. Anagliptin prevents apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by modulating NOX-4 signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2018,103:1623-1631.

[11] ZHANG C, AO Z, SETH A, et al. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells[J]. J Immunol, 1996,157(9):3980-3987.

[12] 刘爱群,葛莲英,罗元,等. 胃癌变过程中 Hp 感染与凋亡基因 Bcl-2 表达相关性研究[J]. 广东医学,2011,32(4):444-446.

[13] 杨静,王明娟,程玉,等. 胃癌组织中 Caspase3、Caspase9 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(10):1159-1161.

(收稿日期:2020-09-16 修回日期:2021-05-05)

(上接第 2154 页)

identification in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2019,120(3):356-367.

[3] BU Q, WANG S, MA J, et al. The clinical significance of FAM19A4 methylation in high-risk HPV-positive cervical samples for the detection of cervical (pre)cancer in Chinese women[J]. BMC Cancer, 2018,18(1):1182-1185.

[4] NEERJA B, DAISUKE A, DAYA N S, et al. Cancer of the cervix uteri[J]. Int J Gynecol Obstet, 2018,143 (Suppl 2):S22-S36.

[5] 茅娅男,尤志学. ASCCP 2019 共识指南子宫颈癌前病变管理解读[J]. 现代妇产科进展,2020,29(12):936-941.

[6] 罗媛华. 基于 TCT、HPV 基因分型与 DNA 定量检测的宫颈癌及癌前病变筛查方法[J]. 解放军预防医学杂志, 2020,38(3):84-87.

[7] 武丽蕊,王兰朋,李红霞,等. 免疫细胞及肿瘤标志物与高危型 HPV 感染宫颈癌患者 HPV 水平的相关性及与预后的关系[J]. 癌症进展,2019,17(11):1342-1346.

[8] 张慧琦,陈群. 宫颈癌前病变和宫颈癌高危型 HPV 分布特点[J]. 医学临床研究,2019,36(9):1841-1843.

[9] 李桐,张灿,宋芳,等. 基因甲基化在宫颈癌中的研究进展[J]. 癌症进展,2019,17(20):2375-2380.

[10] 王三锋,布俏雯,张亮,等. 宫颈脱落细胞中 FAM19A4 基因启动子甲基化的检测分析[J]. 中华医学杂志,2019,99 (25):1963-1967.

[11] 布俏雯. FAM19A4 基因启动子甲基化在宫颈癌及其癌前病变诊断中的作用研究[D]. 广州:广州医科大学, 2018.

[12] 伍恒英,彭苏珺,布俏雯,等. FAM19A4 基因启动子甲基化在高危型 HPV 阴性宫颈癌诊断中的作用[J]. 实用医学杂志,2019,35(5):683-687.

[13] 布俏雯,张亮,王三锋,等. FAM19A4 基因启动子甲基化检测在宫颈癌组织中的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2018,34(9):1541-1544.

[14] MANAWAPAT-KLOPFER A, WANG L, HAEDICKE-JARBOUI J, et al. HPV16 viral load and physical state measurement as a potential immediate triage strategy for HR-HPV-infected women; a study in 644 women with single HPV16 infections[J]. Am J Cancer Res, 2018,8 (4):715-722.

[15] 张睿怡. 基因甲基化修饰对宫颈癌病变影响的研究进展[J]. 中国计划生育学杂志,2018,26(7):639-642.

[16] MARTÍNEZ-PUENTE D H, PÉREZ-TRUJILLO J J, GUTIÉRREZ-PUENTE Y, et al. Targeting HPV-16 antigens to the endoplasmic reticulum induces an endoplasmic reticulum stress response[J]. Cell Stress Chaperones, 2019,24(1):149-158.

(收稿日期:2021-01-20 修回日期:2021-05-24)