

人类骨肉瘤中 P53、Bcl-2、Bax 蛋白的表达和临床特征

李征¹ 李强² 李瓦里³

(1. 辽宁省人民医院, 辽宁 沈阳 110015; 2. 沈阳市东陵区中医院, 沈阳; 3. 天津中医学院第一附属医院, 天津)

【摘要】 目的 研究 P53、Bcl-2 和 Bax 蛋白在骨肉瘤中的表达情况, 探讨 P53、Bcl-2 和 Bax 基因在骨肉瘤发生和发展中的作用, 研究三者与骨肉瘤组织学分级之间的关系。方法 采用 S-P 免疫组化方法观察 42 例骨肉瘤中 P53 蛋白、Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的表达情况。结果 1. 在骨肉瘤中 P53 蛋白、Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的阳性率分别为 61.9%、66.7%、61.9%。2. 骨肉瘤 I~III 级中 P53 蛋白阳性率分别为 41.7%、53.3%、85.7%, 在 I 级与 III 级之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。3. 骨肉瘤 I~III 级中 Bcl-2 蛋白阳性率分别为 41.7%、62.5%、92.9%。在 II 级与 III 级之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 在 I 级与 III 级之间存在显著性差异 ($P < 0.01$)。Bax 蛋白阳性率在各级间无显著性差异 ($P > 0.05$)。4. 在骨肉瘤 P53 蛋白表达阴性组中 Bcl-2 蛋白的阳性率显著低于 P53 蛋白表达阳性组 ($P < 0.01$)。5. 在骨肉瘤 Bcl-2 蛋白表达阴性组中 Bax 蛋白的阳性率显著低于 Bcl-2 蛋白表达阳性组 ($P < 0.05$)。结论 利用 S-P 免疫组化法检测骨肉瘤中 P53、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达具有较高的敏感性及临床实用价值。

【关键词】 骨肿瘤; 免疫组织化学; 蛋白

Expression and clinical significance of P53、Bcl-2 and Bax protein in human osteosarcoma LI Zheng. People Hospital of Liaoning Province (Liaoning Shenyang, 110015)

【Abstract】 **Objective** To study the expression of P53, Bcl-2 and Bax protein in osteosarcoma, and discuss the function of P53, Bcl-2 and Bax gene in the occurrence and development of human osteosarcomas, to study the relation between the expression of the three proteins and the pathological classification in osteosarcomas. **Methods** 42 cases of osteosarcoma have been examined with the method of S-P immunohistochemistry. **Results** 1. The expression rate of P53, Bcl-2 and Bax protein in osteosarcoma was respectively 61.9%, 66.7% and 61.9%. 2. The expression rate of P53 protein in osteosarcoma grade III was higher than that in osteosarcoma grade I ($P < 0.05$). 3. The expression rate of Bcl-2 protein in osteosarcoma grade III was higher than that in osteosarcoma grade I ($P < 0.01$), but the expression rate of Bax protein had no significant difference ($P > 0.05$). 4. The expression rate of Bcl-2 protein in cases with negative P53 protein expression was lower than that in cases with positive P53 protein expression ($P < 0.01$). 5. The expression rate of Bax protein in cases with negative Bcl-2 protein expression was lower than that in cases with positive Bcl-2 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Expression of P53, Bcl-2 protein is related to the pathological classification and can reflect the malignant degree of osteosarcoma. S-P immunohistochemistry method has a higher sensitivity and clinical value.

【Key Words】 Bone tumor; Immunohistochemistry; Protein

骨肉瘤是恶性骨肿瘤中常见的一种, 是当今医学界十分重视的难题之一。近年来, 国内外学者对于骨肉瘤的原癌基因及抑癌基因作深入的研究, 取得了很多成果。本研究利用 S-P 免疫组化法检测 42 例骨肉瘤蜡块标本中 P53、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达, 探讨三种蛋白在骨肉瘤中表达的敏感性以及临床实用价值。

1 材料和方法

1.1 标本 收集中国医科大学附属第一、第二临床学院骨科 1985~1998 年间, 手术切除骨肉瘤标本 42 例, 所有病例术前均未经过化疗、放疗。以上标本均经 10% 福尔马林固定、石蜡包埋、常规连续切片, 厚约 5 μ m, 分别作 HE 染色与免疫组化染色。所有 HE 染色石蜡切片均请两位病理专家重新审阅。骨

肉瘤分级按 Price 等^[1]的标准明确病理分级,分为 I~III 级。

骨肉瘤患者临床资料:骨肉瘤患者共 42 例,年龄 14~53 岁,平均 26.7 岁;男 31 例,女 11 例,男女之比为 2.82:1。

1.2 主要试剂 ①鼠抗人 P53 蛋白单克隆抗体购自北京中山公司,工作浓度为 1:50。②鼠抗人 Bcl-2 蛋白单克隆抗体购自北京中山公司,工作浓度为 1:50。③兔抗人 Bax 蛋白单克隆抗体购自北京中山公司,工作浓度为 1:50。④S-P 试剂盒(即用型)购至中山公司,工作浓度为 1:50。

1.3 方法、原理

1.3.1 方法 免疫组织化学链霉菌素亲生物素—过氧化物酶法(S-P 法)。

1.3.2 原理 利用抗原和抗体特异性结合,采用生物素标记的第二抗体与链霉菌素亲生物素蛋白连接的过氧化物酶及基质色素混合液来测定组织和细胞中的抗原,研究组织和细胞中抗原的定位,将免疫学和组织学融为一体。

1.4 操作步骤

1.4.1 石蜡切片高温抗原修复 ①组织切片脱蜡、水化后,3% H₂O₂ 甲醇处理 10 分钟。②蒸馏水洗切片 3 次,每次 2 分钟。③将 1500~3000ml 0.01M pH6.0 的枸橼盐缓冲液注入不锈钢压力锅中加热至沸腾。切片置于金属架上,放入锅内,切片位于液面以下。当液体开始沸腾(约加热 5~6 分钟后),计时 1~2 分钟。然后将压力锅端离热源,冷水冲至室温后,取出切片,蒸馏水洗后,PBS 洗 3×2 分钟。

1.4.2 S-P 免疫组化染色 ①每张切片加 1 滴过氧化物酶阻断溶液,以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 10 分钟。②PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟。③每张切片加一滴 5%~10% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,37℃ 下孵育 10 分钟,减少非特异性背景,不必冲洗,只需吸去多余的液体。④倾去血清,每张切片滴加 1:50 稀释的第一抗体,37℃ 下孵育 60 分钟。⑤PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟。⑥每张切片加一滴生物素标记的第二抗体,37℃ 下孵育 30 分钟。⑦PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟。⑧每张切片加一滴辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃ 下孵育 30 分钟。⑨PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟。⑩每张切片加 2 滴新鲜配制的显色剂(DAB)显色,显微镜下观察 3~10 分钟。⑪自来水冲洗,苏木素复染,中性树胶封固。注:①阳性对照为已检出的 P53、Bcl-2、Bax 蛋白阳性片。②PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.5 结果判定 P53 蛋白染色为骨肉瘤标本细胞核内出现深浅不一、粗细不等的颗粒状、棕褐色染色;Bcl-2 蛋白及 Bax 蛋白染色为骨肉瘤标本细胞浆内出现均匀、颗粒状、棕褐色染色。含有 1/3 以上(含 1/3)免疫组化染色阳性细胞的肿瘤标本定为染色阳性,阳性细胞 < 1/3 者定为免疫组化染色阴性。对于每一张肿瘤切片,选取 10 个高倍视野(×200 或 ×400),计算该肿瘤的阳性细胞平均百分比。按肿瘤阳性细胞百分比将肿瘤染色结果分为 3 级:阳性细胞百分比小于 1/3 为阴性,介于 1/3 和 2/3 之间为弱阳性,大于 2/3 为强阳性。

1.6 统计方法 本实验采用 χ^2 检验进行实验数据的分析和处理。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果 P53 蛋白染色在骨肉瘤标本表现

为细胞核内深浅不一、粗细不等的颗粒状、棕褐色染色,细胞浆未见明显着色,阳性细胞多呈弥漫性或局灶性分布;Bcl-2 蛋白及 Bax 蛋白染色在骨肉瘤标本表现为细胞浆内均匀、颗粒状、棕褐色染色,细胞核未见明显着色,阳性细胞多呈弥漫性或局灶性分布。

2.2 P53 蛋白、Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白在骨肉瘤中的表达情况 在 42 例骨肉瘤蜡块标本中 P53 蛋白、Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白的阳性率分别为 61.9%、66.7%、61.9%,三种蛋白的表达无显著差异($P > 0.05$),见表 1、2、3。其中 P53 蛋白弱阳性为 19 例,强阳性为 7 例,Bcl-2 蛋白弱阳性为 10 例,强阳性为 18 例,Bax 蛋白弱阳性为 9 例,强阳性为 17 例。

表 1 P53 蛋白在骨肉瘤的表达情况

病理分级	例数	P53 蛋白表达情况			阳性率 (%)
		-	+	++	
骨肉瘤	42	16	19	7	61.9
I 级	12	7	4	1	41.7
II 级	16	7	7	2	56.3
III 级	14	2	8	4	85.7

在 I 级与 II 级间无显著性差异($\chi^2 = 0.608, P > 0.05$) 在 II 与 III 级间无显著性差异($\chi^2 = 3.11, P > 0.05$),在 I 与 III 级之间存在显著性差异($\chi^2 = 5.55, P < 0.05$)。

表 2 Bcl-2 蛋白在骨肉瘤的表达情况

病理分级	例数	Bcl-2 蛋白表达情况			阳性率 (%)
		-	+	++	
骨肉瘤	42	14	10	18	66.7
I 级	12	7	2	3	41.7
II 级	16	6	4	6	62.5
III 级	14	1	4	9	92.9

在 I 级与 II 级间无显著性差异($\chi^2 = 1.198, P > 0.05$), 在 II 与 III 级间无显著性差异($\chi^2 = 3.85, P < 0.05$),在 I 与 III 级之间存在显著性差异($\chi^2 = 7.977, P < 0.01$)。

表 3 Bax 蛋白在骨肉瘤中的表达情况

病理分级	例数	Bax 蛋白表达情况			阳性率 (%)
		-	+	++	
骨肉瘤	42	16	9	17	61.9
I 级	12	3	3	6	75.0
II 级	16	5	4	7	68.8
III 级	14	8	2	4	42.9

骨肉瘤中在 I 级与 II 级间无显著差异($\chi^2 = 0.1861, P > 0.05$),在 II 与 III 级间无显著差异($\chi^2 = 2.037, P > 0.05$),在 I 与 III 级之间无显著差异($\chi^2 = 2.7359, P > 0.05$)。

将骨肉瘤患者根据 P53 蛋白的表达情况分为 P53 表达阳性组和 P53 表达阴性组,比较二组中 Bcl-2 蛋白表达情况。26 例 P53 蛋白表达阳性的骨肉瘤中,Bcl-2 蛋白阳性例数为 22 例,Bcl-2 蛋白阳性率为 84.6%;16 例 P53 蛋白表达阴性的骨肉瘤中,Bcl-2 蛋白阳性例数为 6 例,Bcl-2 蛋白阳性率为 37.5%;在骨肉瘤 P53 蛋白表达阳性组中 Bcl-2 蛋白阳性率显著高于 P53 蛋白表达阴性组($\chi^2 = 7.89, P < 0.01$)。

将骨肉瘤患者根据 Bcl-2 蛋白的表达情况分为 Bcl-2 表

达阳性组和 Bcl-2 表达阴性组,比较二组中 Bax 蛋白表达情况。28 例 Bcl-2 蛋白表达阳性的骨肉瘤中, Bax 蛋白阳性例数为 21 例, Bax 蛋白阳性率为 75.0%; 14 例 Bcl-2 蛋白表达阴性的骨肉瘤中, Bax 蛋白阳性例数为 5 例, Bax 蛋白阳性率为 35.7%; 在骨肉瘤 Bcl-2 蛋白表达阳性组中 Bax 蛋白阳性率显著高于 Bcl-2 蛋白表达阴性组 ($\chi^2=4.556, P<0.05$)。

3 讨论

3.1 三种蛋白在骨肉瘤中表达之间的相互关系 本实验表明在 P53 蛋白表达阳性的骨肉瘤中 Bcl-2 蛋白的阳性率明显高于 P53 蛋白表达阴性的骨肉瘤。说明在骨肉瘤中, P53 蛋白的表达与 Bcl-2 蛋白的表达有一定的相关性。

Bax 蛋白与 Bcl-2 具有密切的同源性(21%), 说明 Bax 与 Bcl-2 有着密切的关系, 同时也可能参与调节细胞凋亡。为证实这一点, Oltvai 等将 Bax 蛋白在细胞中高表达, 结果发现 Bax 的高表达还可以加速细胞的凋亡。另外, Bcl-2 与 Bax 的比率不同可影响系统的凋亡, 可能在决定细胞生存抑或死亡的命运中起关键性作用^[2]。

本实验还表明在骨肉瘤不同病理级别中, 随着病理分级的升高, Bax 蛋白表达的阳性率呈下降趋势, 但各级别间无显著性差异。Bax 蛋白表达的阳性率不能完全反映骨肉瘤的恶性程度。同时 Bcl-2 蛋白表达阳性的骨肉瘤中 Bax 蛋白的阳性率显著高于 Bcl-2 蛋白表达阴性的肿瘤 ($P<0.01$)。可以认为, Bax 蛋白在骨肉瘤中的表达与 Bcl-2 蛋白密切相关。

3.2 展望 近年来, 随着分子生物学, 肿瘤学及基因治疗学的进展, 肿瘤基因水平的研究逐渐为人们所重视。同时基因治疗的开展也为人类攻克肿瘤开辟了新的途径。P53 基因的进一步深入研究以及 Bcl-2 及 Bax 作为新的肿瘤基因的发现, 为人们研究恶性肿瘤提供了新的思路。因此, 今后在骨肉瘤的研究中要考虑到原癌基因和抑癌基因以及 Bcl-2 和 Bax 等的综合细胞凋亡机制的作用。

在临床治疗上, 抗肿瘤治疗效果是同癌细胞生成反应的内在能力密切相关的, 而恶性变是肿瘤细胞丧失自发 PCD 反应能力的最终结果。在骨肉瘤的治疗中, 增加野生型 P53 基因表达水平能够加速诱导肿瘤细胞 PCD。所以将野生型 P53 导入骨肉瘤细胞中进行基因治疗具有广阔的前景。还可以通过降解促进细胞增殖基因的 mRNA (如 Bcl-2、mtP53 突变型), 阻滞其肽键的形成, 使野生型 P53 在诱导 PCD 中的作用充分体现。由于 P53 基因能与 Bcl-2、Bax 等多种基因相互作用, 其共同调控 PCD, 提示可以将 P53 基因与它们有机地结合应用, 以便发挥更为有效的治疗作用。

参考文献

- 1 Price CHG. The prognosis of osteosarcoma. Br J Radiol, 1996, 39, 181-188.
- 2 Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, et al. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. J Biol Chem, 1995, 270: 11962

(收稿: 2001-11-22 编辑: 李为农)

· 病例报告 ·

陈旧性踝关节前脱位一例

蒋兴粒 姜世平 陈宏贤

(深圳市红岗路武警深圳医院, 广东 深圳 518029)

患者, 男, 26 岁, 1 月前因车祸致伤头部, 左踝关节, 入院诊断: 重度颅脑外伤, 硬膜外血肿; 左踝关节前脱位并内踝骨折。经脑外科行颅内血肿清除术, 左踝关节闭合手法复位、骨牵引, 踝关节脱位未纠正, 现脑外科情况稳定而转入我科。查体: 左踝关节前凸畸形, 压痛, 纵向叩痛, 伸屈活动均受限, 无皮肤裂伤。X 线示: 左踝关节前脱位, 左内踝骨折, 左胫腓下联合分离, 如图 1 示。



图 1 治疗前 X 线片

图 2 治疗后 X 线片

治疗: 入院后行手术切开复位, 常规作左踝前外侧切口, 见胫骨下端前唇骨质劈裂骨折, 距骨向前滑出, 屈膝关节, 足背伸进行牵引, 推距骨向下向后, 不能复位; 故行左踝内后方

纵切口, 经探查见胫后肌腱、神经、血管嵌入踝穴中, 并有大量肉芽组织充填, 不能复位; 分离胫骨后肌腱、趾长屈肌腱、胫后血管、神经、腓长屈肌腱, 保护并牵开, 切除踝穴内肉芽组织, 将距骨回踝穴, 斯氏针固定胫距关节、螺栓固定复位后的下胫腓联合。术后拍片: 骨折及复位均较满意, 如图 2 示。

讨论

本例患者因踝穴内嵌入胫后肌腱、血管、神经, 不能早期闭合手法复位; 又因脑外科的情况危重, 耽误了踝关节手术, 成为极少见的陈旧性踝关节前脱位。此时行手术切开复位, 常规前外侧切口不能完全暴露踝穴, 不能复位; 而本例采用后内方切口, 踝穴结构暴露充分, 见踝管内结构已嵌入踝穴中, 并广泛粘连, 手术较容易地分离踝管结构, 切除瘢痕组织, 成功复位, 不失为一种较好的手术显露途径。类似软组织嵌顿性踝关节脱位应尽量争取早期手术, 早期手术优点在于: ①手术中易复位, 成功率高; ②距骨是全身骨骼中唯一无肌肉起止附着的骨骼, 早期手术能减少距骨头缺血坏死的发生; ③最大限度地恢复踝关节功能, 减少创伤性关节炎的发生。

(收稿: 2001-01-19 编辑: 李为农)