

凋亡抑制基因 *BAG-1* 在甲状腺癌中的表达及临床意义

刘 钢

(鄂东医疗集团黄石市中心医院, 湖北理工学院附属医院, 湖北 黄石 435000)

摘要: [目的] 探讨凋亡抑制基因 *BAG-1* 在甲状腺癌中的表达及其临床意义。[方法] 应用免疫组化 SP 法检测 78 例甲状腺癌、62 例甲状腺腺瘤、37 例癌旁组织和 28 例正常甲状腺组织中 *BAG-1* 的表达情况, 并比较其表达差异, 分析 *BAG-1* 的表达与甲状腺癌临床病理特征的关系。[结果] 甲状腺癌、甲状腺腺瘤、癌旁甲状腺及正常甲状腺组织中 *BAG-1* 的阳性表达率分别为 74.36%, 40.32%, 16.22% 和 0。未分化型甲状腺癌(未分化癌和髓样癌)组织中的 *BAG-1* 阳性率较分化型甲状腺癌增高(100.0% vs 69.23%, $P < 0.05$); 有淋巴结转移和临床 III、IV 期病例组的 *BAG-1* 阳性率较无淋巴结转移组、临床 I、II 期病例增高(92.9% vs 64.0%, 95.8% vs 64.8%, P 均 < 0.05)。[结论] *BAG-1* 在甲状腺癌中高表达, 其过量表达可能与肿瘤的发生发展有关。

关键词: 甲状腺肿瘤; *BAG-1* 基因; 免疫组织化学

中图分类号: R736.1 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2017)04-0268-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.04.B003

Expression of Apoptosis Suppression Gene *BAG-1* and its Clinical Significance in Thyroid Carcinoma

LIU Gang

(Huangshi Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei Polytechnic University, Edong Healthcare Group, Huangshi 435000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of apoptosis suppression gene *BAG-1* in thyroid carcinoma and its clinical significance. [Methods] The expression of *BAG-1* was analyzed by immunohistochemical SP method in 72 samples of thyroid carcinoma, 58 samples of thyroid thyroid adenoma, 34 samples of cancer adjacent thyroid tissue and 26 samples of normal thyroid tissue. The positive expression rates of *BAG-1* in different thyroid tissues were compared. And the relationship of *BAG-1* expression with clinicopathological features of thyroid carcinoma was analyzed. [Results] The positive rates of *BAG-1* of thyroid carcinoma, thyroid adenoma, cancer adjacent thyroid tissues and normal thyroid tissues were 74.36%, 40.32%, 16.22% and 0 (compared to normal thyroid tissue $P < 0.05$ or $P < 0.01$), respectively. The positive rates of *BAG-1* in the non-differentiated thyroid carcinoma (undifferentiated carcinoma and medullary carcinoma) were significantly higher than that in the differentiated thyroid carcinoma (100.0% vs 69.23%, $P < 0.05$). The positive rates of *BAG-1* in thyroid cancer with positive lymph node metastases or stage III, IV carcinoma were significantly higher than that in thyroid cancer with negative lymph node metastases or stage I, II carcinoma (92.9% vs 64.0%, 95.8% vs 64.8%, all $P < 0.05$). [Conclusion] The *BAG-1* is overexpressed in thyroid carcinoma, it may be related to the carcinogenesis and development of thyroid carcinoma.

Subject words: thyroid neoplasms; *BAG-1* gene; immunohistochemistry

恶性肿瘤的发生发展与肿瘤细胞的恶性增殖及凋亡减少关系密切, 肿瘤细胞凋亡减少意味着细胞

的自我清除机制出现障碍, 肿瘤细胞凋亡的减少助长了肿瘤的恶性生长, 凋亡抑制基因在肿瘤细胞的凋亡通路上扮演着负调控角色, 对凋亡抑制基因的深入研究将有利于解除肿瘤细胞凋亡的抑制, 从而促进肿瘤细胞加速凋亡, 在肿瘤的生物治疗上具有重要的现实意义。

基金项目: 湖北省黄石市医学卫生科研立项(科技攻关项目)(黄科农发[2006]1号)

通讯作者: 刘 钢, 副主任医师, 博士; 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)甲状腺外科, 湖北省黄石市天津路 141 号(435000); E-mail: hslg06@163.com

收稿日期: 2016-12-20; 修回日期: 2017-01-09

BAG-1 是 1995 年由 Takayama 等^[1,2]在对与 Bcl-2 结合的各类蛋白进行研究时发现的另一种凋亡抑制基因, 随后的研究中提示该基因的主要功能为参与肿瘤细胞的凋亡抑制, 不仅与肿瘤的发生发展有关, 而且与肿瘤的预后及复发有关。国内外文献就 BAG-1 的凋亡抑制在消化道肿瘤、泌尿系肿瘤及淋巴造血系肿瘤中研究较多^[3-6], 但未见甲状腺癌方面的研究。本研究采用免疫组化 SP 法, 探讨 BAG-1 在甲状腺癌组织、甲状腺腺瘤组织、癌旁组织及正常甲状腺组织中的表达情况, 探讨 BAG-1 在甲状腺癌发生发展过程中的作用, 以揭示 BAG-1 与甲状腺癌的生物行为关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

取自鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)2014 年 1 月至 2015 年 12 月手术治疗的甲状腺病例标本, 其中: 甲状腺癌 78 例(男性 30 例, 女性 48 例, 平均年龄 54 岁), 甲状腺腺瘤 62 例(男性 28 例, 女性 34 例, 平均年龄 38 岁), 同时取癌旁甲状腺组织 37 例(男性 14 例, 女性 23 例, 平均年龄 49 岁, 经病理检查确诊均无甲状腺癌浸润)。78 例甲状腺癌按 WHO 标准组织学分类: 乳头状癌 65 例, 髓样癌 10 例, 未分化癌 3 例; 按 AJCC 标准临床病理分期: I 期 30 例, II 期 24 例, III 期 18 例, IV 期 6 例; 其中有淋巴结转移 28 例, 无淋巴结转移 50 例。另取正常甲状腺组织 34 例(男性 14 例, 女性 20 例, 平均年龄 46 岁)作对照检测。各组性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。标本经 10% 福尔马林液固定、石蜡包埋, 5 μ m 连续切片, 60 $^{\circ}$ C 烤片 2h, 37 $^{\circ}$ C 过夜备用。

1.2 免疫组化试剂及方法

1.2.1 试剂

BAG-1 兔抗人多克隆抗体(一抗)为武汉博士德生物工程有限公司产品, 羊抗兔 SP 免疫组化染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品, 用已知 BAG-1 阳性的扁桃体作阳性对照, 以 PHS 代替一抗作阴性空白对照。

1.2.2 免疫组化方法

切片脱蜡水化后, 用 3% H_2O_2 室温处理 15min,

微波修复抗原,

正常山羊血清室温孵育 30min, 滴加一抗, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。滴加生物素标记的二抗, 室温孵育 30min, DAB 显色。经苏木精复染后, 脱水、透明并封片。

1.2.3 结果判断

BAG-1 定位于细胞的胞浆和胞核, 以胞浆或胞核内出现棕黄色颗粒且明显高于背景染色为阳性细胞, 在放大 400 倍的显微镜下观察, 每张病理切片随机选取 10 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 取其阳性细胞计数平均值作为该张片子的阳性细胞数并计算阳性细胞所占比例。阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为阴性, 阳性细胞数 $>5\%$ 为阳性^[7]。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 22.0 统计软件包进行统计分析, 组间 BAG-1 表达数据行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BAG-1 在不同甲状腺组织中的表达情况

光镜下 BAG-1 阳性反应表现为细胞浆染成棕黄色, 在甲状腺癌及甲状腺腺瘤组织, 阳性部分局限于肿瘤上皮部分, 在癌旁甲状腺组织, 阳性部分局限于滤泡上皮, 正常甲状腺组织染色阴性(Figure 1)。甲状腺癌中 BAG-1 阳性率为 74.36%, 高于甲状腺腺瘤(40.32%)、癌旁甲状腺组织(16.22%)($P<0.01$)及正常甲状腺组织(0)(P 均 $<0.05\%$)。见 Table 1。

Table 1 The expression of BAG-1 in different thyroid tissues

Tissue type	n	BAG-1 positive expression(%)	χ^2	P
Normal thyroid	34	0(0)	18.475*	<0.01
Thyroid adjacent tissues	37	6(16.22)	11.710*	<0.01
Thyroid adenoma	62	25(40.32)	4.394*	0.002
Thyroid carcinoma	78	58(74.36)	-	-

Note: *Compared with the thyroid carcinoma tissues

2.2 BAG-1 表达与甲状腺癌临床病理特征关系

BAG-1 的表达程度与甲状腺癌组织学类型(分化型和未分化型)、淋巴结转移情况和临床病理分期显著性相关。在恶性程度较高的髓样癌及未分化癌中, BAG-1 阳性率明显高于恶性程度较低的乳头状

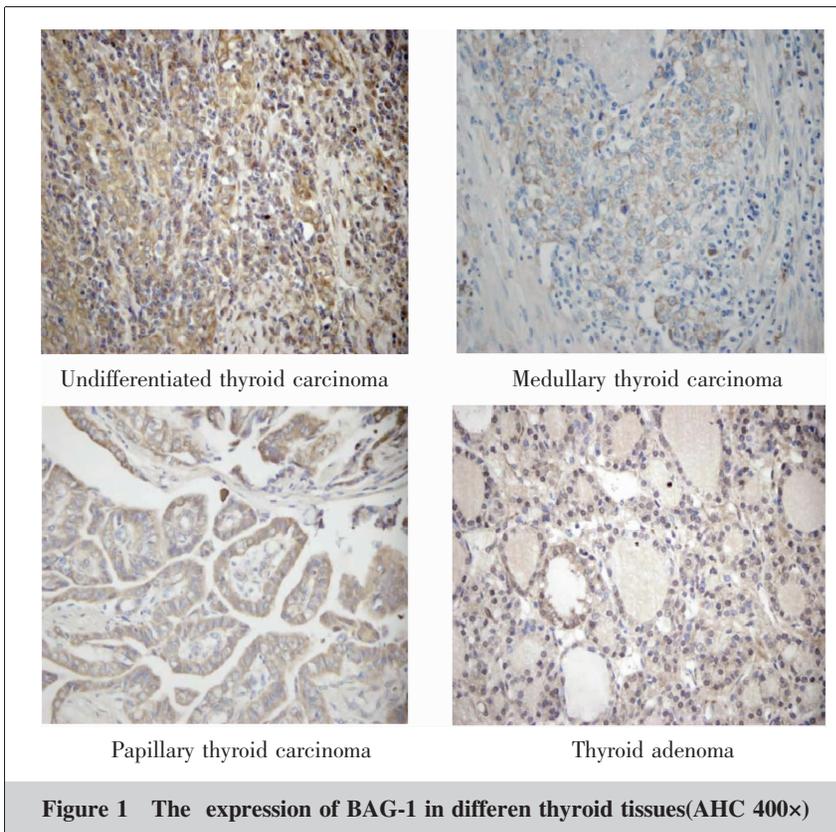


Table 2 The relationship between BAG-1 expression and clinicopathological features of thyroid carcinoma

Tissue type	n	BAG-1 positive expression(%)	χ^2	P
Differentiated thyroid carcinoma				
Papillary carcinoma	65	45(69.2)		
Follicular carcinoma	0	0(0)		
Non-differentiated thyroid carcinoma				
Medullary carcinoma	13	13(100.0)	3.887*	0.049
Undifferentiated carcinoma	10	10(100.0)	2.770 [△]	0.096
Lymph node metastasis				
Yes	3	3(100.0)	0.246 [△]	0.550
No	28	26(92.9)	6.399	0.011
Pathology staging				
I, II stage	50	32(64.0)	6.837	0.009
III, IV stage	24	23(95.8)		
Age (years)				
<45	18	13(72.2)	0.056	1.000
≥45	y60	45(75.0)		
Gender				
Male	30	22(73.3)	0.027	0.870
Female	48	36(75.0)		
Tumor size				
<1 centimeter	12	9(75.0)	0.092	1.000
≥1 centimeter	66	49(74.2)		

Note: [△]:Compared with papillary carcinoma tissues; *;Compared with differentiated thyroid carcinoma tissues

癌,在有淋巴结转移病例或临床Ⅲ、Ⅳ期病例,BAG-1 阳性率高于相应的无淋巴结转移和临床 I、II 期病例,差异均有统计学意义($P<0.05$)。乳头状癌与未分化癌及髓样癌中的 BAG-1 阳性表达率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。BAG-1 的表达程度与年龄、性别及肿块大小无关,将小于和大于 45 岁组、男性和女性组、小于和大于 1cm 组分别进行比较,BAG-1 在组间的表达差异也无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

本研究通过免疫组化方法检测甲状腺癌、甲状腺腺瘤、癌旁正常组织及正常甲状腺组织中 BAG-1 的表达差异并分析其表达水平与甲状腺瘤病理特征之间的关系,结果表明随着肿瘤恶性程度的增高,BAG-1 的表达水平也增高,髓样癌组和未分化癌组显著高于乳头状癌组,淋巴结转移组高于未转移组,Ⅲ、Ⅳ期组高于 I、II 期组。认为甲状腺癌的恶性程度与 BAG-1 的表达相关,BAG-1 表达水平可作为甲状腺癌恶性程度的判断指标,而甲状腺癌的恶性程度与其预后明显相关,未分化癌的生存时间要明显短于乳头状癌,BAG-1 表达水平也可作为甲状腺癌预后好坏的判断指标。BAG-1 的激活与表达是甲状腺癌细胞凋亡通路上的重要事件,针对 BAG-1 设计合适的干预方法对甲状腺癌进行基因治疗成为可能,针对 BAG-1 的治疗有望成为甲状腺癌基因治疗的新的靶点^[8,9]。

肿瘤的恶性生物学行为除了与肿瘤细胞的恶性增殖有关以外,还与肿瘤细胞的凋亡减少密切相关,

促进肿瘤细胞的凋亡在肿瘤的治疗中具有重要意义。在肿瘤细胞的凋亡通路上,促凋亡基因和凋亡抑制基因相互制衡的结果决定着凋亡的发展和强弱,加强凋亡抑制基因的研究,解除凋亡抑制基因对凋亡的抑制,干预凋亡抑制基因的活性,从而达到加速肿瘤细胞凋亡的目的是肿瘤治疗的需要,也是医务工作者追求的目标。

回顾国内外文献,多名专家学者对肾癌、膀胱癌、肺癌、黑色素瘤、胃癌、食管癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌、脑胶质瘤、乳腺癌、白血病、淋巴瘤等多种肿瘤中的 BAG-1 表达进行了研究^[10-14],采用的方法有免疫组化、RT-PCR、免疫印迹、流式细胞术及细胞周期分析技术等多种,结果均显示出 BAG-1 的表达水平与肿瘤的病理分期及恶性程度相关,另有研究认为 BAG-1 的凋亡抑制作用体现在正调节 Bcl-2 抗肿瘤细胞凋亡上,Bcl-2 是一种抗凋亡基因,通过抑制细胞凋亡而参与肿瘤的发生,在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等多种肿瘤研究中显示 Bcl-2 与肿瘤的分级、分期及预后有关^[15]。本研究探讨了 BAG-1 的表达与甲状腺癌的病理特征及恶性程度之间的关系,结果与先前研究基本一致,进一步丰富和完善了人们对 BAG-1 在凋亡中重要作用的认识。

从正常甲状腺到甲状腺癌,从乳头状癌到未分化癌,组织细胞的异型性体现出明显的梯度改变,肿瘤的恶性程度也逐级上升,本研究运用免疫组化方法揭示了 BAG-1 在不同甲状腺组织中表达的协同关系,表明 BAG-1 是甲状腺癌发生发展过程中的重要事件。

基于甲状腺癌中 BAG-1 在恶性程度高的组织中高表达,在恶性程度低的组织中低表达以及在正常甲状腺组织中不表达的特性,我们可以设计出针对 BAG-1 的阻断性抗体免疫治疗或反义核酸基因治疗,为甲状腺癌的免疫治疗和基因治疗提供依据^[14]。另一方面,可以利用基因转染和特异性小干扰 RNA 技术在肿瘤细胞株中构建基因沉默体系,封闭 BAG-1 基因的表达,加速凋亡的进程,从而达到促进肿瘤细胞凋亡的目的^[16]。还可以针对 BAG-1 能使某些化疗药物诱导的凋亡失活现象,设计出 BAG-1 与化疗药物的联合应用,从而解除化疗药物的凋亡抑制,进一步发挥化疗药物的抗肿瘤作用^[17]。因此以 BAG-1 为靶点的抗癌治疗有可能成为甲状腺癌治疗新的突破

口,而本文的研究结果为甲状腺癌的靶向治疗提供了理论基础。

BAG-1 基因发现的时间不长,其分泌的多功能蛋白通过多种途径发挥抗凋亡作用,某些具体机制还不清楚,对其的研究还相当有限,且目前的一些研究结果存在矛盾之处,要充分了解 BAG-1 基因及其各种亚型在甲状腺癌乃至其它更多肿瘤发生、发展中所扮演的角色,还需要进一步的研究。

综上所述,BAG-1 基因是甲状腺癌凋亡通路上的负调控基因,该基因在甲状腺癌及其相关组织中的差异性表达是针对该基因进行基因治疗的理论基础,同时该基因还可能作为甲状腺癌病理分期和预后判断的新的指标,为晚期甲状腺癌的综合治疗开辟了新的前景。

参考文献:

- [1] Puzstai L,Krishnamurti S,Perez CJ,et al. Expression of BAG-1 and Bcl-2 proteins before and after neoadjuvant chemotherapy of locally advanced breast carcinoma [J]. *Carcinoma Invest*,2004,22(2):248-256.
- [2] Takayama S,Xie Z,Reed JC. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators[J]. *J Biol Chem*,1999,274(2):781-786.
- [3] Papadakis ES,Barker CR,Syed H,et al. The Bag-1 inhibitor,Thio-2,reverses an atypical 3D morphology driven by Bag-1L overexpression in a MCF-10A model of ductal carcinoma in situ[J]. *Oncogenesis*,2016,5:e215.
- [4] Papadakis E,Robson N,Yeomans A,et al. A combination of trastuzumab and BAG-1 inhibition synergistically targets HER2 positive breast carcinoma cells[J]. *Oncotarget*,2016,7(14):18851-18864.
- [5] Huang W,Liu Z,Zhou G,et al. Magnetic gold nanoparticle-mediated small interference RNA silencing Bag-1 gene for colon carcinoma therapy[J]. *Oncol Rep*,2016,35(2):978-984.
- [6] Li P,Wang YD,Cheng J,et al. Association between polymorphisms of BAG-1 and XPD and chemotherapy sensitivity in advanced non-small-cell lung carcinoma patients treated with vinorelbine combined cisplatin regimen [J]. *Tumour Biol*,2015,36(12):9465-9473.
- [7] Ni W,Chen B,Zhou G,et al. Overexpressed nuclear BAG-1 in human hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis and resistance to doxorubicin [J]. *J Cell Biochem*,2013,114(9):2120-2130.

- [8] Aveic S, Viola G, Accordi B, et al. Targeting BAG-1: a novel strategy to increase drug efficacy in acute myeloid leukemia[J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(3):180-190, e6.
- [9] Huang B, Zhou H, Lang X, et al. Expression of BAG-1 is closely related to cell differentiation and TNM stage in esophageal carcinoma and its downregulation inhibits the proliferation and invasion of human esophageal carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(4):1441-1446.
- [10] Liu H, Lu S, Gu L, et al. Modulation of BAG-1 expression alters the sensitivity of breast carcinoma cells to tamoxifen [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(2):365-374.
- [11] Sun NF, Tian AL, Liu ZA, et al. Antiapoptotic gene BAG-1 vector structure of RNA interference and endogenous targeted screening in colon carcinoma cell lines [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(2):1057-1063.
- [12] Southern SL, Collard TJ, Urban BC, et al. BAG-1 interacts with the p50-p50 homodimeric NF- κ B complex: implications for colorectal carcinogenesis [J]. *Oncogene*, 2012, 31(22):2161-2172.
- [13] van der Zee JA, Ten HTL, Hop WC, et al. Bcl-2 associated anthanogen-1 (Bag-1) expression and prognostic value in pancreatic head and periampullary carcinoma [J]. *Eur J Carcinoma*, 2013, 49(2):323-328.
- [14] Leng XF, Chen MW, Xian L, et al. Combined analysis of mRNA expression of ERCC1, BAG-1, BRCA1, RRM1 and TUBB3 to predict prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma who received adjuvant chemotherapy [J]. *J Exp Clin Carcinoma Res*, 2012, 31:25.
- [15] Liu H, Li Y, Li Y, et al. Cloning and functional analysis of FLJ20420: a novel transcription factor for the BAG-1 promoter[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e34832.
- [16] Zhou K, Jin H, Zhou T, et al. BAG-1 expression in human meningioma and correlation with clinical characteristics[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):458.
- [17] Skeen VR, Collard TJ, Southern SL, et al. BAG-1 suppresses expression of the key regulatory cytokine transforming growth factor β (TGF- β 1) in colorectal tumour cells[J]. *Oncogene*, 2013, 32(38):4490-4499.

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须以改正或解释。

2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。

3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。

4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。

5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。

6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。

7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。

《肿瘤学杂志》编辑部