

Bcl-xL基因在正常皮肤血管组织、增生及退化期血管瘤组织中的表达****

游浩¹, 高劲松², 陈方舟¹, 朱胜文¹, 吴磊¹

Expression of *Bcl-xL* gene in normal skin and the proliferating and degenerating hemangioma tissues

You Hao¹, Gao Jin-song², Chen Fang-zhou¹, Zhu Sheng-wen¹, Wu Lei¹

Abstract

BACKGROUND: *Bcl-xL* gene can suppress cell apoptosis and may participate in angiopoiesis. However, more studies concerning *Bcl-xL* gene in malignant tumor, few are reported in hemangioma.

OBJECTIVE: To study the expression of *Bcl-xL* gene in normal skin vessels, hyperplasia and degeneration hemangioma tissues using immune-histochemical technique.

METHODS: Specimens were obtained from 40 cases of dermal hemangioma by exauresis, comprising 22 cases with proliferating hemangiomas and 18 with degenerating hemangiomas. In addition, normal skin tissues around hemangiomas from 5 cases were also chosen for controls. Immunohistochemical stainings were performed to detect the expression of *Bcl-xL* in those three groups. Endothelial cells were identified by expressing factor VIII-related antigen. The average absorbance and the rate of positive area of expression of *Bcl-xL* were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: There were plenty of brown particles in the cytoplasm of proliferating endothelial cells, which strongly positive expressed *Bcl-xL*. There were few and no brown particles in endothelial cells cytoplasm of the degenerating hemangiomas or normal skins. The expression of *Bcl-xL* were weakly and no expression. Compared with the normal skins, the average absorbance and rate of *Bcl-xL* positive expression were higher in the proliferative and degenerating hemangiomas ($P < 0.01$). *Bcl-xL* is an anti-apoptosis gene and was highly expressed in the proliferative phase, which promoted proliferation of blood vessel endothelial cells and participated in hyperplasia of hemangiomas.

You H, Gao JS, Chen FZ, Zhu SW, Wu L. Expression of *Bcl-xL* gene in normal skin and the proliferating and degenerating hemangioma tissues. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(7): 1245-1248.
[http://www.crter.cn http://en.zgclcf.com]

摘要

背景: 有文献报道*Bcl-xL*基因能抑制细胞凋亡, 并可能参与血管形成, 但目前*Bcl-xL*基因在恶性肿瘤中的研究较多, 而在血管瘤的研究较少。

目的: 应用免疫组织化学染色法检测增生期和退化期血管瘤和正常皮肤血管组织中*Bcl-xL*基因的表达。

方法: 收集有完整临床和病理资料的40例皮肤血管瘤手术切除标本, 包括增生期血管瘤22例, 退化期血管瘤18例。另取瘤组织周围正常皮肤组织5例作为对照。采用免疫组织化学染色方法检测*Bcl-xL*在各组中的表达, 并结合VIII因子相关抗原的免疫组织化学染色证实表达*Bcl-xL*阳性表达的细胞为血管瘤组织中的内皮细胞, 并测定*Bcl-xL*在各组中的平均吸光度和平均阳性面积率。

结果与结论: 增生期血管瘤内皮细胞胞浆内可见较多的棕黄色颗粒沉积, *Bcl-xL*表达呈强阳性; 退化期血管瘤和正常皮肤组织内皮细胞胞浆内可见少量的棕黄色颗粒或无棕黄色颗粒, *Bcl-xL*表达弱或无表达。增生期血管瘤与退化期血管瘤和正常皮肤组相比, *Bcl-xL*阳性表达的平均吸光度和阳性面积率明显增高($P < 0.01$)。结果显示, *Bcl-xL*为抗凋亡基因, 在增生期时呈高表达, 其促进了血管内皮细胞的增殖, 参与了血管瘤的增生。

关键词: 血管瘤; *Bcl-xL*基因; 凋亡; 免疫组织化学; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.07.023

游浩, 高劲松, 陈方舟, 朱胜文, 吴磊. *Bcl-xL*基因在正常皮肤血管组织、增生及退化期血管瘤组织中的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(7):1245-1248. [http://www.crter.org http://cn.zgclcf.com]

¹Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan Fifth Hospital, Wuhan 430050, Hubei Province, China; ²Department of Basic Medicine, Changsha Medical College, Changsha 410219, Hunan Province, China

You Hao★, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan Fifth Hospital, Wuhan 430050, Hubei Province, China
yourenyouyou2010@yahoo.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30271345*; the Science and Technology Department of Hubei Province, No. 2004AA301c107*; the Health Department of Hubei Province, No. JXIB075*

Received: 2010-09-05
Accepted: 2010-12-09

0 引言

血管瘤是最常见的良性肿瘤之一, 根据血管瘤内皮细胞的生物学特点并结合临床, 将血管瘤的自然病程分为增生期、退化期和退化完成期^[1-2]。有文献报道*Bcl-xL*能抑制细胞凋亡, 促进细胞的增殖, 参与调节细胞的有丝分裂, 并可能参与血管形成^[3-4]。

为进一步探讨*Bcl-xL*基因在血管瘤中发

生、发展及其退化过程中的作用机制, 实验应用免疫组织化学技术检测了增生期、退化期血管瘤组织和正常皮肤组织血管中*Bcl-xL*基因的表达。

1 材料和方法

设计: 病例对照研究。

时间及地点: 于2006/2007-06在武汉市第五人民医院病理科实验室完成。

¹ 武汉市第五医院, 江汉大学第二附属医院骨科, 湖北省武汉市 430050; ² 长沙医学院基础部, 湖南省长沙市 410219

游浩★, 男, 1969年生, 硕士, 湖北省人, 2006年武汉大学医学院毕业, 汉族, 副主任医师, 主要从事研究工作脊柱疾病和骨肿瘤的研究。
yourenyouyu
2010@yahoo.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)07-01245-04

收稿日期: 2010-09-05
修回日期: 2010-12-09
(20100604016/WJ-Z)

材料: 收集武汉市第五人民医院病理科2002/2006皮肤血管瘤存档蜡块40例, 其中男性20例, 女性20例, 最小年龄2个月, 最大年龄18岁。这些血管瘤所在的部位有头皮、前额、眼睑、耳背、颈部、背部、上臂、大腿、手和足部的皮肤等。患者术前均未做任何辅助性治疗。

常规苏木精-伊红染色和免疫组织化学SP法检测增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 按Mulliken分类标准并结合PCNA的表达进行分组: 增生期血管瘤22例, 退化期血管瘤18例, 另从前40例患者中随机抽出5例, 取瘤组织周围正常皮肤组织。

根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》^[5]: 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
即用型鼠抗人PCNA单克隆抗体, 即用型兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体, 浓缩型兔抗人 <i>Bcl-xL</i> 基因多克隆抗体	北京中山生物技术有限公司
显微镜成像系统	日本 Olympus 公司

实验方法:

苏木精-伊红染色: 各组组织先进行苏木精伊红染色, 包括取材、固定、脱水、包埋、切片、染色及封固等步骤。

免疫组织化学S-P法检测 *Bcl-xL*, PCNA和Ⅷ因子相关抗原的表达: 组织切片5 μm, 常规脱蜡至水, 蒸馏水洗; 体积分数3%过氧化氢, 37℃孵育10 min以抑制内源性过氧化物酶活性, PBS洗4次, 5 min/次; 正常羊血清37℃孵育10 min以减少非特异性反应; *Bcl-xL* (*Bcl-xL*: 1:50; PCNA: 1:150; Ⅷ因子: 1:50) 37℃孵育1 h, PBS洗4次, 5 min/次; 生物素标记的DAB显色试剂盒, 37℃孵育10 min, PBS洗4次, 5 min/次; 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物37℃孵育10 min, PBS洗4次, 5 min/次; DAB显色液显色, 自来水冲洗终止反应, 苏木精复染, 脱水, 透明, 封固。用PBS代替 *Bcl-xL* 作为阴性对照, 人扁桃体间质细胞作为和 *Bcl-xL* 的阳性对照, 人正常皮肤血管作为PCNA的阳性对照。

结果判定: *Bcl-xL* 是以细胞浆或胞核出现棕黄色颗粒为阳性反应, PCNA以细胞核出现出

现棕黄色颗粒为阳性反应, 第Ⅷ因子相关抗原以胞膜和胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应。阴性对照组除细胞核染成蓝色, 无棕黄色反应物。

采用HPIAS-2000高清晰度彩色病理图文报告管理系统(同济千屏影像公司)对 *Bcl-xL* 的表达进行定量分析, 每张切片随机选取5个完整而不重叠的高倍镜视野(×400), 测定每个视野下阳性反应的平均吸光度、阳性反应面积和所有细胞总面积, 计算阳性面积率。以每例5个视野的平均吸光度、阳性面积率的平均值作为该例的测量值。

$$\text{阳性面积率} = \frac{\text{单位面积中阳性反应的总面积}}{\text{单位面积中细胞的总面积}} \times 100\%$$

主要观察指标: 各组血管瘤组织形态, *Bcl-xL*, PCNA和Ⅷ因子相关抗原的表达。

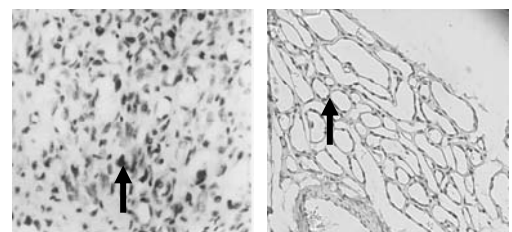
统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 11.5软件对数据进行统计学分析, 组间差异比较采用单因素方差分析和SNK-*q* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 受试者数量分析 受试者40例均进入结果分析, 无中途退出者。

2.2 血管瘤组织形态 增生期血管瘤组织中可见内皮细胞增生呈团索状, 内皮细胞核肥大而淡染; 内皮细胞有的围成血管腔, 有的不围成血管腔而呈团块状。退化期血管瘤组织中可见内皮细胞数量减少, 内皮细胞核扁平; 血管腔增大, 血管间结缔组织增多。有时在同一个标本中, 可以同时见到典型的增生期和退化期区域。

2.3 *Bcl-xL*, PCNA和Ⅷ因子相关抗原的表达 见图1。

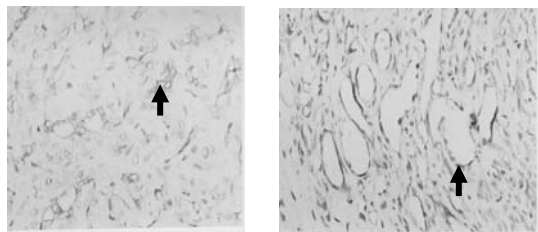


a: Proliferating hemangioma b: Degenerating hemangioma

Figure 1 PCNA expression in proliferating and degenerating hemangioma (Arrow: PCNA positive expression cells; immunohistochemical S-P staining, ×200)
图1 增生期和退化期血管瘤 PCNA 的表达(免疫组织化学 S-P 染色, ×200)

增生期血管瘤内皮细胞核肥大, 核内弥漫分布棕黄色颗粒, *PCNA*表达较强, 见图1a。退化期血管瘤内皮细胞核扁平, 大多数细胞核被苏木精染成蓝色, 少数胞核内有少量棕黄色颗粒, *PCNA*表达较弱, 见图1b。

增生期和退化期血管瘤内皮细胞胞浆内弥漫分布棕黄色Ⅷ因子相关抗原的表达颗粒, 见图2。

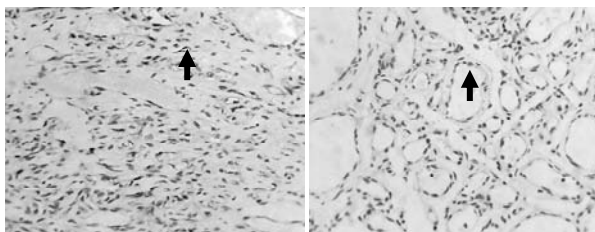


a: Proliferating hemangioma b: Degenerating hemangioma

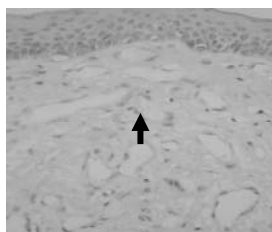
Figure 2 Factor VIII-related antigen expression in proliferating and degenerating hemangioma (Arrow: factor VIII-related antigen positive expression cells; immunohistochemical S-P staining, $\times 200$)

图2 增生期和退化期血管瘤Ⅷ因子相关抗原的表达(免疫组织化学 S-P 染色, $\times 200$)

增生期血管瘤内皮细胞胞浆内棕黄色*Bcl-xL*的表达颗粒较多, *Bcl-xL*表达较强, 见图3a。退化期血管瘤正常皮肤组织内皮细胞胞浆内可见少量的棕黄色颗粒或无棕黄色颗粒, *Bcl-xL*表达较弱或无表达, 见图3b, c。



a: Proliferating hemangioma b: Degenerating hemangioma



c: Normal skin

Figure 3 *Bcl-xL* expression in hemangioma (Arrow: Factor *Bcl-xL* positive expression cells; immunohistochemical S-P staining, $\times 200$)

图3 各组血管瘤 *Bcl-xL* 的表达(免疫组织化学 S-P 染色, $\times 200$)

图像分析结果显示, 增生期组*Bcl-xL*的平均吸光度及阳性面积率高于退化期组和正常皮肤组($P < 0.01$), 退化期组与正常皮肤组之间平均吸光度及阳性面积率

的差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 血管瘤不同时期 *Bcl-xL* 表达的平均吸光度和阳性面积率

Table 1 Average absorbance and the rate of positive area of *Bcl-xL* expression at different period of hemangiomas ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Average absorbance	Rate of positive area (%)
Proliferating	22	0.16 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.05
Degenerating	18	0.06 $\pm$ 0.01 ^a	0.13 $\pm$ 0.00 ^a
Normal skin	5	0.06 $\pm$ 0.02 ^a	0.13 $\pm$ 0.02 ^a

^a $P < 0.01$, vs. proliferating group

3 讨论

血管瘤是一种血管生成性疾病, 根据其内皮细胞的行为特点将其分为增生期和退化期。*PCNA*是真核细胞DNA聚合酶 δ 的一种辅助因子, 是细胞DNA合成所必需的蛋白。Takahashi等^[6]的研究结果显示增生期血管瘤内皮细胞增殖旺盛, *PCNA*表达最高; 退化期*PCNA*表达较低; 退化完成期内皮细胞增殖基本停止, *PCNA*表达最低。因此, 本课题根据Mulliken分类标准并结合*PCNA*的表达对血管瘤进行分期, 使研究结果更为准确可靠。另外, 由于血管瘤组织中除主要的内皮细胞外, 其他细胞成份也较多, 如成纤维细胞和肥大细胞。因此, 实验运用Ⅷ因子相关抗原的免疫组织化学染色鉴定内皮细胞, 以证实表达*Bcl-xL*的这些细胞确实是内皮细胞。

如果细胞凋亡失控, 将直接影响组织器官甚至整个机体的功能, 产生严重后果^[7-9]。凋亡是细胞在一定条件下, 通过启动其自身内部机制, 引起内源性DNA内切酶的激活而发生细胞的自然死亡。凋亡作为一种对宿主本身无害的程序性细胞死亡, 是按照一定的固有模式对体内损伤的、死亡的以及多余的各种细胞进行有效地清除^[10]。

而*Bcl-xL*属于抑凋亡基因, 是比较重要的癌基因, 在细胞凋亡过程中有着重大影响; 近来有研究发现*Bcl-xL*与血管生成有一定关系^[11-12]。有研究认为*Bcl-xL*蛋白在部分肿瘤中可能接替了*Bcl-2*的功能^[13-15], 在一定条件下, 该蛋白显示比*Bcl-2*更强的抑制凋亡作用, 提示其在细胞转化的过程中发挥了关键性作用。实验结果发现, 在增生期血管瘤内皮细胞呈高表达, 在退化期血管瘤内皮细胞呈低表达, 图像分析结果显示增生期组与退化期组之间、增生期组与正常皮肤组之间, *Bcl-xL*的平均吸光度及阳性面积率差异有显著性意义, 退化期组与正常皮肤组之间平均吸光度及阳性面积率的差异无显著性意义。*Bcl-xL*在增生期血管瘤内皮细胞呈高表达, 是由于*Bcl-xL*是抑凋亡基因, *Bcl-xL*使血管瘤内皮细胞凋亡相对受到抑制, 打破了增殖和凋亡的相对平衡, 血管瘤内皮细胞在体内无限增殖, 使血管瘤内皮细胞有在体内不断增加,

导致血管瘤组织不断增殖,也就是说*Bcl-xL*通过抑制血管瘤内皮细胞凋亡而促进了血管瘤的增生。

课题组以往关于血管瘤与凋亡因子之间的关系研究主要是促凋亡因子,因此在实验中的血管瘤主要是这些因子对退化期血管瘤组织中血管内皮细胞的凋亡,从而导致血管瘤退化。而本课题研究的是抑凋亡基因。有文献报道*Bcl-xL*蛋白的抑制凋亡作用比*Bcl-2*更强,而且抑凋亡基因的作用是抑制细胞凋亡^[16-18],因此在实验研究的血管瘤分类中主要是与增生期血管瘤有关,因为要采用有效的方法治疗血管瘤,不仅是要促使血管瘤退化,更重要的是要抑制血管瘤的增生,血管瘤的形成的过程有一个由增生到退化的演变过程,但大部分是不能自行退化,从而继续生长,最后导致严重后果,如果实验能寻找到一种在血管瘤的增生过程中起主要作用的因子的话,将可以采用基因治疗的方法来抑制血管瘤的不断生长。从实验的研究结果也说明*Bcl-xL*基因在增生期血管瘤中对血管瘤内皮细胞的抑制凋亡作用较强,从而为实验如何有效的抑制血管瘤的增生提供有力的实验依据。

实验研究血管瘤退化过程中参与内皮细胞凋亡的基因和蛋白及其作用机制,可以为抗肿瘤的血管生成治疗的研究提供参考和指导,从而寻找一种更有效和安全的抑制、阻断肿瘤血管生成的途径。

4 参考文献

- [1] Jinnin M, Ishihara T, Boye E, et al. Recent progress in studies of infantile hemangioma. *J Dermatol*. 2010;37(4):283-298.
- [2] Boye E, Olsen BR. Signaling mechanisms in infantile hemangioma. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(3):202-208.
- [3] Fernandez-Flores A, Valerdiz S. Study of the immunoexpression of Bcl-2 by a cutaneous granular cell tumor. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2010;19(3):11-18.
- [4] Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *J Immunol*. 2010;185(7):3788-3799.
- [5] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.
- [6] Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HP, et al. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J Clin Invest*. 1994;93(6): 2357-2364.
- [7] Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, et al. How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. *Crit Rev Immunol*. 2009; 29(2):111-130.

- [8] Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*. 2008;15(2):243-250.
- [9] Kinchen JM. A model to die for: signaling to apoptotic cell removal in worm, fly and mouse. *Apoptosis*. 2010;15(9):998-1006.
- [10] Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*. 2010;140(5):619-630.
- [11] Fortner KA, Bouillet P, Strasser A. Apoptosis regulators Fas and Bim synergistically control T-lymphocyte homeostatic proliferation. *Eur J Immunol*. 2010;40(11):3043-3053.
- [12] Pore MM, Hiltermann TJ, Krut FA. Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Lett*. 2010.
- [13] Fotsop DF, Roussi F, Leverrier A, et al. Biomimetic Total Synthesis of Melogynin A, an Inhibitor of Bcl-xL and Bak Interaction. *J Org Chem*. 2010;75(21):7412-7415.
- [14] Zohny SF, El-Shinawi M. Significance of survivin and Bcl-2 homologous antagonist/killer mRNA in detection of bone metastasis in patients with breast cancer. *Med Oncol*. 2010.
- [15] Watts TH. Staying alive: T cell costimulation, CD28, and Bcl-xL. *J Immunol*. 2010;185(7): 3785-3787.
- [16] Dalafave DS, Prisco G. Inhibition of Antiapoptotic BCL-XL, BCL-2, and MCL-1 Proteins by Small Molecule Mimetics. *Cancer Inform*. 2010;9:169-177.
- [17] Rudner J, Elsaesser SJ, Jendrossek V, et al. Anti-apoptotic Bcl-2 fails to form efficient complexes with pro-apoptotic Bak to protect from Celecoxib-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2010.
- [18] Zheng JY, Boustany NN. Alterations in the characteristic size distributions of subcellular scatterers at the onset of apoptosis: effect of Bcl-xL and Bax/Bak. *J Biomed Opt*. 2010;15(4):045002.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 课题受国家自然科学基金(30271345), 湖北省科技厅(2004AA301c107)和湖北省卫生厅(JXIB075)资助。

作者贡献: 游浩进行实验设计, 实验实施为高劲松, 实验评估为陈方舟, 资料收集为朱胜文、吴磊、游浩成文, 游浩审阅, 游浩对文章负责。

致谢: 感谢武汉大学解剖与组织胚胎教研室张端莲教授的指导和帮助。

利益冲突: 该课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验中各患者及监护人均签署了“知情同意书”, 治疗或试验方案均获伦理委员会批准。参入该研究的全体医务人员均具备资质。

本文创新性:

创新点说明: 本课题应用免疫组织化学技术检测了增生期、退化期血管瘤组织和正常皮肤组织血管中 *Bcl-xL* 的表达, 以期对血管瘤的基因治疗提供更多理论依据。