

Bcl-2、Bax、Ki67 在原发性翼状胬肉组织中的表达研究

李娟, 李宁, 王剑锋, 李娜

作者单位: (233000) 中国安徽省蚌埠市, 蚌埠医学院第一附属医院眼科

作者简介: 李娟, 毕业于蚌埠医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜疾病与屈光。

通讯作者: 王剑锋, 毕业于蚌埠医学院, 硕士, 主任医师, 研究方向: 白内障、屈光、小儿斜弱视. 7852978@qq.com

收稿日期: 2017-12-21 修回日期: 2018-04-11

Expressions of Bcl-2, Bax and Ki67 in the primary pterygium

Juan Li, Ning Li, Jian-Feng Wang, Na Li

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China

Correspondence to: Jian-feng Wang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China. 7852978@qq.com

Received: 2017-12-21 Accepted: 2018-04-11

Abstract

• **AIM:** To research the expressions of B-cell lymphoma gene 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X-protein (Bax) and Ki67 (proliferating cell marker) in the primary pterygium and normal bulbar conjunctiva, to explore the pathogenesis of pterygium.

• **METHODS:** Thirty pterygium were surgically removed and 5 normal bulbar conjunctivas were also obtained. Formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues were analyzed by immunohistochemistry with Bcl-2, Bax, Ki67.

• **RESULTS:** The mean positive expression of Bcl-2, Bax and Ki67 in the primary pterygium was 14.73%, 7.00% and 12.73%, respectively 4.00%, 6.00% and 0 in normal conjunctiva group. The expression of Bcl-2 and Ki67 in the head of primary pterygium was higher than that of neck and body.

• **CONCLUSION:** Bcl-2 and Ki67 have highly expressions in the primary pterygium, the expressions in the head of primary pterygium is the highest, the expressions in normal bulbar conjunctiva is low or no. There is no significant difference in the expression of Bax in the primary pterygium and normal bulbar conjunctiva. Apoptosis imbalance and abnormal proliferation of cells may be one of the mechanisms for the occurrence and development of the primary pterygium.

• **KEYWORDS:** primary pterygium; Bcl-2; Bax; Ki67

Citation: Li J, Li N, Wang JF, et al. Expressions of Bcl-2, Bax and Ki67 in the primary pterygium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(5):960-962

摘要

目的: 观察 Bcl-2、Bax、Ki67 在原发性翼状胬肉和正常球结膜组织中的表达。

方法: 将手术切除的原发性翼状胬肉和正常球结膜组织进行固定、石蜡包埋、切片, 利用免疫组织化学染色方法分析 Bcl-2 (B 细胞淋巴瘤-2)、Bax (与 Bcl-2 相关的 X 蛋白)、Ki67 (细胞核相关抗原) 在其中的表达情况。

结果: Bcl-2、Bax、Ki67 在原发性翼状胬肉组织中的阳性表达率分别为 14.73%、7.00%、12.73%, 在正常球结膜组织阳性表达率分别为 4.00%、6.00%、0, 其中 Bcl-2、Ki67 在原发性翼状胬肉组织头部上皮中的表达明显高于颈部和体部。

结论: Bcl-2、Ki67 在原发性翼状胬肉组织中呈高表达, 且在胬肉头部表达最高, 在正常球结膜组织中呈低表达; Bax 在原发性翼状胬肉和正常球结膜组织中表达无明显差异, 提示细胞凋亡失衡和异常增殖可能是原发性翼状胬肉发生发展的机制之一。

关键词: 原发性翼状胬肉; Bcl-2; Bax; Ki67

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.5.49

引用: 李娟, 李宁, 王剑锋, 等. Bcl-2、Bax、Ki67 在原发性翼状胬肉组织中的表达研究. *国际眼科杂志* 2018;18(5):960-962

0 引言

翼状胬肉是眼科常见病, 临床表现为与结膜相连的纤维血管组织向角膜表面生长^[1]。翼状胬肉不仅影响美观, 引起眼红和刺激症状, 严重的可限制眼球运动, 损害视力^[2-3]。翼状胬肉发生发展的危险因素主要包括炎症刺激、病毒感染、年龄、遗传因素、紫外线照射时间等^[4]。从组织病理学分析, 翼状胬肉的发生是由于多种细胞因子联合作用引起上皮间充质细胞移行, 并刺激成纤维细胞新生血管化而导致^[5]。翼状胬肉具有患病率高、复发率高的特点, 有研究认为翼状胬肉是一种类肿瘤的良性增生性疾病^[6]。细胞增殖和凋亡失衡是肿瘤发生的重要因素, 研究发现翼状胬肉组织中也有某些调控细胞增殖与凋亡的关键基因异常表达^[6-7]。为此, 我们对原发性翼状胬肉和正常球结膜组织中的 Bcl-2、Bax 和 Ki67 表达情况进行检测, 以期进一步探讨原发性翼状胬肉的发病及复发机制, 为预防和治疗翼状胬肉提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2014-01/2015-10 于蚌埠医学院第一附属医院住院手术的原发性翼状胬肉患者 30 例 30 眼作为

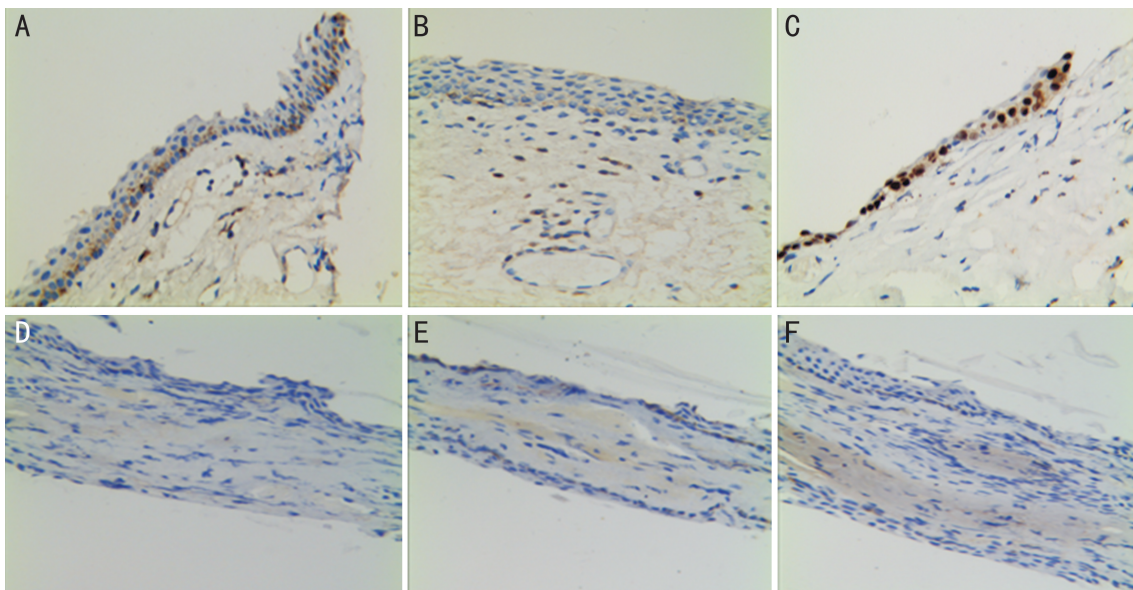


图 A~C 原发性翼状胬肉组织中 Bcl-2、Bax、Ki67 的表达 ($\times 200$)。

图 D~F 正常球结膜组织中 Bcl-2、Bax、Ki67 的表达 ($\times 200$)。

原发性翼状胬肉组,其中男 12 例 12 眼,女 18 例 18 眼;平均年龄 58 ± 13 岁。正常结膜组患者 5 例 5 眼,其中白内障手术患者 3 例 3 眼,斜视手术患者 2 例 2 眼;平均年龄 55 ± 10 岁。纳入标准:(1)原发性翼状胬肉患者翼状胬肉组织均生长于鼻侧角膜缘,且侵及角膜约 2~4mm;(2)两组患者近期均无角、结膜疾病史及眼部用药史。本研究经本院伦理委员会审批通过,患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 取材 原发性翼状胬肉组:术中沿翼状胬肉头部外约 1mm 透明角膜处开始浅层剖切,尽量不破坏翼状胬肉头、颈、体部表面的上皮组织,完整切除后沿翼状胬肉头、颈、体方向平铺于纸板上并做好标记,迅速放入甲醛溶液中固定。正常结膜组:在进行白内障、斜视手术时垂直切取鼻侧球结膜 2mm \times 5mm,平铺于纸板上并做好标记,鼻侧角膜缘部作为头部,迅速放入甲醛溶液中固定。所有标本取材均由同一位术者操作。

1.2.2 切片制作 标本经过中性福尔马林(10%)溶液固定 24h 后进行脱水、透明、浸蜡,石蜡包埋,沿翼状胬肉组织头、颈、体标记方向及正常球结膜组织标记方向垂直连续切片,每张切片厚度约 4~5 μ m,每块组织切片 4~6 张,进行免疫组织化学染色。

1.2.3 免疫组织染色方法 (ELivision 法) 石蜡切片经二甲苯脱蜡,酒精梯度脱水,组织修复,分别采用鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体、鼠抗人 Bax 单克隆抗体、鼠抗人 Ki67 单克隆抗体(1:100)和相应二抗孵育,PBS 溶液作空白对照,根据即用型快捷免疫组化试剂盒操作说明分别滴加试剂 A/B,DAB 显色,苏木素复染,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,封片,晾干后观察。Bcl-2、Bax、Ki67 在组织中阳性表达主要表现为棕黄色着色,Bcl-2、Bax 着色主要见于胞浆和胞膜,Ki67 着色主要见于细胞核。在光镜($\times 200$)下观察并计数每 100 个细胞中 Bcl-2、Bax、Ki67 的阳性细胞表达数。本研究所使用的所有抗体均购于福州迈新生物科技有限公司。

统计学分析:采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

免疫组织染色结果显示,Bcl-2、Bax、Ki67 在原发性翼状胬肉组织中的阳性表达率分别为 14.73%、7.00%、12.73%,在正常球结膜组织的阳性表达率分别为 4.00%、6.00%、0,其中 Bcl-2、Ki67 在原发性翼状胬肉组织头部分布的表达明显高于颈部和体部。原发性翼状胬肉和正常球结膜组织中 Bcl-2 阳性细胞数分别为 14.74 ± 5.92 、 4 ± 1.87 个,差异有统计学意义($t = 7.850$, $P < 0.001$);Bax 阳性细胞数分别为 7 ± 1.45 、 6 ± 1.58 个,差异无统计学意义($t = 1.412$, $P = 0.167$);Ki67 阳性细胞数分别为 12.73 ± 2.24 、0 个,差异有统计学意义($t = 31.074$, $P < 0.001$)。原发性翼状胬肉组织头、颈、体部 Bcl-2 阳性细胞数分别为 25.4 ± 12.54 、 10.8 ± 6.73 、 8.0 ± 2.94 个,差异有统计学意义($F = 37.216$, $P < 0.001$);Bax 阳性细胞数分别为 10.2 ± 3.16 、 6.8 ± 2.38 、 4.0 ± 1.6 个,差异有统计学意义($F = 47.688$, $P < 0.001$);Ki67 阳性细胞数分别为 20.2 ± 4.92 、 12 ± 2.97 、 6.0 ± 2.49 个,差异有统计学意义($F = 116.458$, $P < 0.001$)。

3 讨论

翼状胬肉发病机制复杂,至今仍然存在很多争议。近年来,大量研究发现翼状胬肉具有许多肿瘤样特性,如局部浸润性、复发率高等^[8]。肿瘤与细胞凋亡的关系是近年来研究的热点。正常的上皮组织中细胞增殖和凋亡处于动态平衡状态,平衡失调是引起组织器官病理损害的主要因素,如干燥综合征、唾液腺变性和恶性肿瘤等^[9]。Bcl-2 和 Bax 是研究较多的凋亡相关基因,Bcl-2 抑制凋亡,Bax 促进凋亡,但 Bcl-2 必需与 Bax 形成异源二聚体才能抑制凋亡,两者的比例高低决定细胞接受凋亡信号后存活与否^[10]。Tan 等^[11]通过对翼状胬肉组织标本与正常球结膜

组织进行免疫组织化学染色,观察 P53、Bcl-2、Bax 的表达情况,发现 Bcl-2、Bax 在翼状胬肉组织上皮细胞的基底部均有明显表达,而 Bcl-2 在正常球结膜中未见表达,Bax 在正常球结膜组织上皮细胞层有阳性表达。本研究发现,Bcl-2 在原发性翼状胬肉和正常球结膜组织中表达存在显著差异,而 Bax 在两种组织中表达无明显差异,Bcl-2/Bax 在正常球结膜组织中表达比率约 2/3,而在原发性翼状胬肉组织中的比率约为 2/1,说明 Bcl-2 和 Bax 在原发性翼状胬肉组织中表达失衡,过量表达的 Bcl-2 抑制了 Bax 的作用,使得增生、分化活跃的上皮基底细胞的凋亡受到抑制。

Ki67 蛋白位于细胞核内,在细胞周期 G1、G2、M、S 期均有表达,其中在 G2、M 期表达最强,G0 期不表达。研究发现,Ki67 反义寡核苷酸能抑制 EM-9 细胞系的增殖,提示 Ki67 可能是保持细胞增殖所必需的^[12]。Ki67 是目前较为肯定的细胞增殖标记物,其高表达说明细胞的增殖活性高,细胞增殖旺盛,Ki67 在淋巴瘤、白血病、肺癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤组织中均有较高的表达^[13]。多项 Meta 分析发现,Ki67 是一个独立且非常重要的预后因子,Ki67 指数的高低常提示疾病所处的阶段^[14]。有学者提出,Ki67 表达的高低可能与疾病的复发率相关^[15]。Garfias 等^[16]研究发现,Ki67 可能是翼状胬肉组织的主要增殖指标。Sebastiá 等^[15]研究发现,Ki67 在翼状胬肉组织上皮细胞核中呈阳性表达,且翼状胬肉组织上皮细胞具有异常的增殖能力。本研究发现,Ki67 在胬肉组织上皮细胞中大量表达,尤其在术前充血明显、处于活动期的患者中更甚,而 Ki67 在正常球结膜组织中呈低表达。术后对 30 例原发性翼状胬肉患者进行随访(随访最长时间 2a)发现,Ki67 阳性表达强的患者与阳性表达弱的患者相比,术后复发率无明显差异,提示原发性翼状胬肉患者胬肉组织中 Ki67 表达的强弱可能与术后复发并无明显关系。此外,本研究对 Bcl-2、Bax 和 Ki67 在原发性翼状胬肉组织不同部位的表达情况进行统计分析发现,Bcl-2、Bax 和 Ki67 均在胬肉头部阳性表达较强,提示原发性翼状胬肉头部是上皮细胞凋亡失衡最严重的部位,且具有较强的增殖活性。

综上所述,原发性翼状胬肉的发生发展与 Bcl-2、Bax、Ki67 关系密切,可能是在多种诱因作用下导致的细胞凋亡失衡及细胞异常增殖共同作用的结果。

参考文献

- 1 Kaufman SC, Jacobs DS, Lee WB, et al. Options and adjuvants in surgery for pterygium: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2013;120(1):201-208
- 2 Han SB, Jeon HS, Kim M, et al. Quantification of astigmatism induced by pterygium using automated image analysis. *Cornea* 2016; 35(3): 370-376
- 3 Twelker JD, Bailey IL, Mannis MJ, et al. Evaluating pterygium severity: a survey of corneal specialists. *Cornea* 2000;19(3):292-296
- 4 Threlfall TJ, English DR. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve. *Am J Ophthalmol* 1999;128(3):280-287
- 5 Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, et al. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(2):195-228
- 6 郑卫东,徐国兴,胡建章,等. 翼状胬肉中细胞增殖与凋亡相关基因蛋白的表达及其意义. *中国实用眼科杂志* 2003;21(9):649-651
- 7 颜美荣,李正贤,刘庚勋,等. PCNA、Bcl-2 和 Bax 在翼状胬肉中的表达及其意义. *临床军医杂志* 2007;35(2):180-182
- 8 Kria L, Ohria A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem* 1996;98(2):195-201
- 9 DeLong MJ. Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Ann N Y Acad Sci* 1998;842:82-90
- 10 Kimura T, Nishino T, Maruyama N, et al. Expression of bcl-2 and Bax in hypokalemic nephropathy in rats. *Pathobiology* 2001;69(5):237-248
- 11 Tan DT, Tang WY, Liu YP, et al. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(2):212-216
- 12 Ciulla MM, Acquistapace G, Toffetti L, et al. ki67 cytoplasmic expression: observation in normal tissue from heart atrial appendages of healthy rats. *Cell Cycle* 2009;8(13):2125
- 13 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182(3):311-322
- 14 Aaltomaa S, Lipponen P, Vesalainen S, et al. Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. *Eur Urol* 1997; 32(4):410-415
- 15 Sebastiá R, Ventura MP, Solari HP, et al. Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium. *Diagn Pathol* 2013;8:32
- 16 Garfias Y, Bautista-De Lucio VM, García C, et al. Study of the expression of CD30 in pterygia compared to healthy conjunctivas. *Mol Vis* 2009;15:2068-2073