

· 论 著 ·

# Bcl-2 基因多态性及其蛋白表达与甲状腺乳头状癌的关系研究

肖晓岚<sup>1</sup>, 陈集敏<sup>1</sup>, 陈献珊<sup>2</sup>

1. 海南省人民医院病理科, 海南 海口 570311; 2. 海南省人民医院颈胸外科, 海南 海口 570311

**摘要:** **目的** 分析 Bcl-2 基因多态性及其蛋白表达与甲状腺乳头状癌的关系, 探寻 Bcl-2 基因多态性在甲状腺乳头状癌发病风险及预后评价中的可能作用。 **方法** 选取 2010 年 3 月至 2012 年 8 月收治的 78 例甲状腺乳头状癌患者作为病例组; 选取 92 例健康志愿者作为健康对照组。观察分析 Bcl-2 基因-938C/A 位点基因型分布频率、Bcl-2 基因与病例组甲状腺乳头状癌临床病理之间的关系, 以及 Bcl-2 基因-938C/A 多态性与其在甲状腺乳头状癌组织中表达水平的关系。 **结果** Bcl-2 基因-938C/A 位点基因型分布频率: 病例组 A/A 基因型频率明显低于健康对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 C/C 基因型以及 A/C 基因型分布频率两组间差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。对 Bcl-2 基因与甲状腺乳头状癌临床病理关系的分析显示, 在有淋巴结转移的患者中 Bcl-2 基因高表达率明显高于无淋巴结转移的患者 (77.19% vs 52.38%,  $P < 0.05$ )。Bcl-2 基因-938C/A 多态性与其在甲状腺乳头状癌组织中表达水平的关系分析显示, C/C、A/C 以及 A/A 基因型甲状腺乳头状癌患者中 Bcl-2 蛋白的高表达率分别为 76.19%、68.18%、35.71%, 呈依次递降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** Bcl-2 蛋白高表达与甲状腺乳头状癌是否发病、有无淋巴结转移存在关联, A/A 基因型患者甲状腺乳头状癌组织中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低。Bcl-2 基因多态性能否成为甲状腺乳头状癌发病风险及预后评价的指标, 有待进一步深入研究。

**关键词:** 甲状腺乳头状癌; 临床病理; 预后; Bcl-2 基因多态性; Bcl-2 基因-938C/A 位点

**中图分类号:** R 736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)04-0433-04

## Association of Bcl-2 gene polymorphism and Bcl-2 protein expression with thyroid papillary carcinoma

XIAO Xiao-lan\*, CHEN Ji-min, CHEN Xian-shan

\* Department of Pathology, Hainan Province People's Hospital, Haikou, Hainan 570311, China

**Abstract:** **Objective** To analyze the association of Bcl-2 gene polymorphism and Bcl-2 protein expression with thyroid papillary carcinoma and explore the potential effect of Bcl-2 gene polymorphism in the onset risk of thyroid papillary carcinoma and evaluation of prognosis. **Methods** A total of 78 patients with thyroid papillary carcinoma treated in Hainan Province People's Hospital from March 2010 to August 2012 were selected as case group, and 92 healthy volunteers were served as control group. The genotype distribution frequency of Bcl-2 gene -938C/A locus was observed. The relationship between Bcl-2 gene with the clinical pathology of papillary thyroid carcinoma and the relationship between Bcl-2 gene -938C/A polymorphism and Bcl-2 protein expression level in the tissues of papillary thyroid carcinoma in case group were analyzed. **Results** For Bcl-2 gene -938C/A locus genotype distribution frequency, A/A genotype frequency in case group was significantly lower than that in control group ( $P < 0.05$ ), while there were no significant differences in C/C genotype frequency and A/C genotype frequency (all  $P > 0.05$ ). The analysis on the relationship between Bcl-2 gene and clinical pathology of papillary thyroid carcinoma showed that Bcl-2 protein high-expression rate of patients with lymph node metastasis was higher than that of the patients without lymph node metastasis (77.19% vs 52.38%,  $P < 0.05$ ). The analysis on relationship between Bcl-2 gene -938C/A polymorphism and Bcl-2 protein expression level in tissues of papillary thyroid carcinoma showed that Bcl-2 protein expression rates in papillary thyroid carcinoma of C/C, A/C and A/A genotypes decreased in turn (76.19%, 68.18%, 35.71%,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** High expression of Bcl-2 protein is related to onset of papillary thyroid carcinoma and lymph node metastasis, and Bcl-2 protein expression in papillary thyroid carcinoma tissues of A/A genotype patients decreased significantly. It remains to be further studied that whether Bcl-2 gene polymorphism can be

served as an indicator for the onset risk and prognostic evaluation of thyroid papillary carcinoma.

**Key words:** Thyroid papillary carcinoma; Clinical pathology; Prognosis; Bcl-2 gene polymorphism; Bcl-2 gene-938C/A locus

甲状腺癌是一种较为常见的甲状腺恶性肿瘤,在近些年其发病率出现上升的趋势<sup>[1]</sup>。据甲状腺流行病学研究表明,甲状腺癌在全世界的发病率约为 3.1/10 万人,其男女发病率比为 1:2.5~3,在青壮年人群中的发病率最高<sup>[2]</sup>。甲状腺癌分为甲状腺乳头状癌、甲状腺髓样癌、滤泡状甲状腺癌以及未分化性甲状腺癌,其中甲状腺乳头状癌约占甲状腺癌的 85%,是甲状腺癌中最为常见的一种,其临床症状大多表现为颈部肿块、疼痛、声音嘶哑、吞咽困难及呼吸困难等症状,对患者的身体健康水平造成了严重的影响。有关资料表明,甲状腺乳头状癌在任何年龄都能发病,但在儿童以及年轻女性人群中较为常见<sup>[3]</sup>。目前甲状腺乳头状癌临床治疗大多采用手术治疗及甲状腺激素治疗的方式,虽然取得了一定效果,但由于甲状腺乳头状癌的恶性程度高,而且大多数甲状腺乳头状癌患者在早期并无明显临床症状,多由患者自己发现甲状腺肿大才进行诊治,从而错过了最佳的治疗时机,往往达不到令人满意的疗效。有学者认为,细胞的凋亡以及失衡与甲状腺乳头状癌疾病的发生和发展具有非常密切的关系<sup>[4]</sup>。Bcl-2 基因家族作为细胞凋亡调节的最后部分,对于甲状腺乳头状癌影响重大。本研究选取 78 例甲状腺乳头状癌患者作为研究对象,观察 Bcl-2 基因多态性及其蛋白表达与甲状腺乳头状癌的关系,探寻 Bcl-2 基因多态性在甲状腺乳头状癌发病风险及预后评价中的可能作用。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 选取我院在 2010 年 3 月至 2012 年 8 月收治的 78 例甲状腺乳头状癌患者作为研究对象(病例组),另外选取 92 例健康志愿者作为健康对照组。两组患者性别、年龄、吸烟史、饮酒史、受教育情况、经济情况、每日面对电脑时间等资料比较差异无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ )。见表 1。

**1.2 纳入及排除标准** 纳入标准:(1)病例组患者均通过甲状腺穿刺活检或者超声影像确诊为甲状腺乳头状癌<sup>[5]</sup>;(2)病例组患者均进行甲状腺癌切除术,并且其临床资料无丢失;(3)病例组患者均不合并其他恶性肿瘤;(4)健康对照组志愿者均进行全身检查,确保无甲状腺类疾病;(5)所有患者均对此研究知情,并自愿签署同意书,配合治疗。排除标准:(1)不符合纳入标准者;(2)有放射线暴露史患者;

表 1 两组患者一般资料比较

| 一般资料                          | 病例组<br>( $n=78$ ) | 健康对照组<br>( $n=92$ ) | $P$ 值   |
|-------------------------------|-------------------|---------------------|---------|
| 性别(例)                         |                   |                     |         |
| 男                             | 29                | 31                  | $>0.05$ |
| 女                             | 49                | 61                  |         |
| 饮酒史(例)                        |                   |                     |         |
| 有                             | 41                | 40                  | $>0.05$ |
| 无                             | 37                | 52                  |         |
| 吸烟史(例)                        |                   |                     |         |
| 有                             | 40                | 43                  | $>0.05$ |
| 无                             | 38                | 49                  |         |
| 受教育情况(例)                      |                   |                     |         |
| 高中及以下                         | 43                | 45                  | $>0.05$ |
| 高中以上                          | 35                | 47                  |         |
| 婚姻(例)                         |                   |                     |         |
| 未婚                            | 33                | 42                  | $>0.05$ |
| 已婚                            | 45                | 53                  |         |
| 经济情况(例)                       |                   |                     |         |
| <5000 元/月                     | 36                | 49                  | $>0.05$ |
| >5000 元/月                     | 42                | 43                  |         |
| 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )       | 41.13 $\pm$ 11.02 | 42.15 $\pm$ 11.12   | $>0.05$ |
| 面对电脑时间(h/d, $\bar{x} \pm s$ ) | 4.13 $\pm$ 1.05   | 4.05 $\pm$ 1.11     | $>0.05$ |

(3)重大残疾性疾病患者;(4)不配合治疗患者。

## 1.3 研究方法

**1.3.1 外周血基因组 DNA 的提取** (1)留取病例组患者及健康对照组志愿者外周静脉血 2 ml,通过 EDTA 抗凝之后,将其放置于  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱中;(2)将 300  $\mu\text{l}$  抗凝全血 + 900  $\mu\text{l}$  无菌双蒸水混匀,进行离心 1 min 之后,保留其下层的白细胞,再通过加入 1 ml-DNAzol 进行反复吹打一直到混匀为止;(3)通过 10 000 g 离心 10 min 得到上清,并将其转入新管;(4)每一次使用 1 ml-DNAzol 时,均应加入 100% 乙醇 0.5 ml,通过颠倒离心管对其进行混匀,一直到 DNA 出现沉淀为止;(5)通过 0.8~1 ml 75% 乙醇对 DNA 进行漂洗 2 次,然后用移液器将残余的乙醇祛除,在将其晾干几秒之后,立即采用 8 mM NaOH 进行溶解,并将提取的基因组 DNA 贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱中。

**1.3.2 Bcl-2 基因多态性的检测** 采用聚合酶链式反应(PCR)扩增包含 Bcl-2 基因-938 位点的基因片段,PCR 反应体系的配制为:将上述溶液混合后,采用离心机进行离心,并将装有 50  $\mu\text{l}$  反应体系的 0.2 ml EP 反应管放置在 PCR 扩增仪中进行扩增。最后将 PCR 扩增的产物 10  $\mu\text{l}$  和 6  $\times$  上样缓冲液 5  $\mu\text{l}$  进行混合,并采用 0.8% 琼脂糖凝胶向槽内加入

0.5 × TBE 缓冲液, 控制电压在 60 ~ 80 V, 电流在 40 mA; 待溴酸蓝条带移动到距凝胶前沿大约 2 cm 时, 停止电泳, 最后在波长为 254 nm 的长波长紫外透色仪下进行观察, 最后通过对 Bcl-2 基因进行 PCR 扩增得出 Bcl-2 基因-938C/A 位点包括 A/A 基因型、A/C 基因型、C/C 基因型。

1.3.3 免疫组化染色方法 对所有手术切除甲状腺乳头状癌标本均首先给予中性甲醛固定, 同时给予常规脱水、包埋, 接着连续 4 μm 切片并进行 SP 染色, 即采用 3% 过氧化氢温育除去内源性过氧化物酶活性, 并给予抗原热修复, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素复染。上述操作均严格按照 SP 试剂盒说明书进行操作。

1.4 观察指标 观察分析 Bcl-2 基因-938C/A 位点基因型分布频率、Bcl-2 基因与病例组甲状腺乳头状癌临床病理之间的关系, Bcl-2 基因-938C/A 多态性与其在甲状腺乳头状癌组织中表达水平的关系。

1.5 免疫组化结果判定 采用免疫组化两步法常规操作技术, Bcl-2 蛋白阳性部位为细胞浆, 少量为核膜, 结果判定方法主要采用 Thomas 综合计分法进行分析: 选取 5 个视野计数阳性细胞的平均数, 其中没有阳性细胞计分为 0 分, 阳性细胞在 10% 以下计分为 1 分; 阳性细胞在 10% ~ 35% 计分为 2 分; 阳性细胞在 36% ~ 70% 计分为 3 分; 阳性细胞在 70% 以上计分为 4 分。染色强度主要以阳性细胞呈现的染色特性进行计分: 没有染色为 0 分, 呈现淡黄色为 1 分, 呈现棕黄色为 2 分, 呈现棕褐色为 3 分。最后将染色强度和阳性细胞数两项计分相乘, 以中位数作为低表达和高表达的截断值。上述判断为两位病理科专业医师在不知病历资料的情况下进行判断。

1.6 统计学方法 应用软件 SPSS 18.0 进行数据分析。计数资料频数和用百分率表示, 采用四格表  $\chi^2$  检验和行 × 列表  $\chi^2$  检验; 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用独立样本 *t* 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Bcl-2 基因-938C/A 位点基因型分布频率 对 Bcl-2 基因-938C/A 位点基因型分布频率进行分析, 两组在 C/C 基因型以及 A/C 基因型方面差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 而病例组 A/A 基因型频率明显低于健康对照组 (P < 0.05)。见表 2。

2.2 Bcl-2 蛋白表达与甲状腺乳头状癌临床病理的关系 Bcl-2 蛋白高表达率在性别、年龄、包膜浸润、肿瘤大小以及多中心性方面差异无统计学意义

(P 均 > 0.05), 而在淋巴结转移方面差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 3。

2.3 Bcl-2 基因-938C/A 多态性与甲状腺乳头状癌组织 Bcl-2 蛋白表达水平的关系 C/C、A/C 及 A/A 基因型甲状腺乳头状癌组织的 Bcl-2 蛋白高表达率分别为 76.19%、68.18%、35.71%, 差异具有统计学意义 (P < 0.05)。见表 4。

表 2 Bcl-2 基因-938C/A 位点基因型分布频率 例 (%)

| 基因型 | 病例组 (n = 78) | 健康对照组 (n = 92) | P 值   |
|-----|--------------|----------------|-------|
| C/C | 35 (44.87)   | 28 (30.43)     | 0.075 |
| A/C | 22 (28.21)   | 21 (22.83)     | 0.121 |
| A/A | 21 (26.92)   | 43 (46.74)     | 0.030 |

表 3 Bcl-2 蛋白表达与甲状腺乳头状癌临床病理的关系 例 (%)

| 临床病理特征 |        | Bcl-2 蛋白   |            | P 值    |
|--------|--------|------------|------------|--------|
|        |        | 高表达        | 低表达        |        |
| 性别     | 男      | 15 (51.72) | 14 (48.28) | > 0.05 |
|        | 女      | 25 (51.02) | 24 (48.98) |        |
| 年龄     | < 40 岁 | 19 (48.72) | 20 (51.28) | > 0.05 |
|        | ≥ 40 岁 | 18 (46.15) | 21 (53.85) |        |
| 包膜浸润   | 有      | 17 (47.22) | 19 (52.78) | > 0.05 |
|        | 无      | 22 (52.38) | 20 (47.62) |        |
| 肿瘤大小   | < 20mm | 13 (48.15) | 14 (51.85) | > 0.05 |
|        | ≥ 20mm | 35 (68.62) | 16 (31.38) |        |
| 多中心性   | 有      | 21 (51.22) | 20 (48.78) | > 0.05 |
|        | 无      | 18 (48.65) | 19 (51.35) |        |
| 淋巴结转移  | 有      | 44 (77.19) | 13 (22.81) | < 0.05 |
|        | 无      | 11 (52.38) | 10 (47.62) |        |

表 4 Bcl 基因-938C/A 多态性与其在甲状腺乳头状癌组织表达水平的关系 例 (%)

| 基因型 | 例数 | Bcl-2 蛋白表达 |            |
|-----|----|------------|------------|
|     |    | 高表达        | 低表达        |
| C/C | 42 | 32 (76.19) | 10 (23.81) |
| A/C | 22 | 15 (68.18) | 7 (31.82)  |
| A/A | 14 | 5 (35.71)  | 9 (64.29)  |
| P 值 |    | < 0.05     |            |

## 3 讨论

甲状腺乳头状癌作为一种恶性上皮细胞肿瘤, 是由滤泡细胞通过分化产生的, 具有乳头状的特征<sup>[6-7]</sup>。有报道表明, 甲状腺乳头状癌的发病率在世界范围内以每年 4% 的速度逐年上升, 已经位于常见肿瘤的前列, 其中女性终身患病的几率为 0.8%, 高于男性的 0.3%<sup>[8]</sup>。其病因大多与激素、遗传以及环境因素有关。有学者认为, 甲状腺乳头状癌的发病率上升不仅和诊断技术的提高及环境的不断恶化有关, 也与遗传因素有关<sup>[9]</sup>。目前甲状腺乳头状癌临床治疗大多采用手术治疗以及激素治疗, 但其疗效并不能令人满意。随着近些年来对肿瘤基因的研究水平不

断深入,对甲状腺乳头状癌的发病机制也有了更多的认识。另有学者经过研究表明,基因变异以及细胞凋亡失衡在甲状腺乳头状癌的发生和发展中起着非常重要的作用<sup>[10]</sup>。Bcl-2 基因在细胞凋亡以及调节细胞失衡的过程中处于终末位置,它可以通过对细胞色素 C 等物质的释放进行介导,进而有效地调节细胞的凋亡和平衡<sup>[11-12]</sup>。有文献表明,Bcl-2 基因与甲状腺癌的分化程度有关,随着甲状腺癌的分化程度增加,Bcl-2 基因的蛋白表达能力明显加强,而且其表达水平也与甲状腺乳头状癌细胞的凋亡状况呈负相关<sup>[13]</sup>。因此,Bcl-2 基因作为一种凋亡抑制基因,一方面能够通过延长肿瘤细胞的存活时间来提高甲状腺乳头状癌的治疗难度;另一方面也会对患者 DNA 的修复过程造成强烈的干扰,增加甲状腺乳头状癌的治疗不稳定因素<sup>[14-15]</sup>。所以,了解分析甲状腺乳头状癌预后风险与 Bcl-2 基因多态性之间的关系,对于患者的诊治具有一定的意义。本研究表明,病例组患者与健康对照组比较,Bcl-2 基因-938A/A 基因型频率明显较低;而且,在有淋巴结转移的患者中 Bcl-2 基因蛋白高表达率明显高于无淋巴结转移的患者,也证实了上述观点。故进一步探索 Bcl-2 基因多态性在甲状腺乳头状癌治疗中的作用,或可在提高甲状腺乳头状癌的疗效方面获益。

综上所述,Bcl-2 基因多态性与甲状腺乳头状癌是否发病、有无淋巴结转移之间存在关联,A/A 基因型患者甲状腺乳头状癌组织中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低。Bcl-2 基因多态性能否成为甲状腺乳头状癌发病风险及预后评价的一项指标,从而为患者的治疗提供途径,尚需进一步深入研究。

#### 参考文献

[1] Ahn HS, Welch HG. South Korea's Thyroid-Cancer "Epidemic" - Turning the Tide[J]. N Engl J Med, 2015, 373(24): 2389 - 2390.

- [2] 朱有志,陈祥锦,张惠灏,等. 不同碘营养水平地区分化型甲状腺癌的流行病学研究[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(11): 1450 - 1455.
- [3] 钱碧云,何敏,陈可欣,等. 天津城市居民甲状腺乳头状癌发病率和构成比的长期时间趋势分析[J]. 中国实用外科杂志, 2011, 31(5): 420 - 422.
- [4] 孙亚楠,刘晓虹,毛晓韵,等. 甲状腺乳头状癌组织 Bag-1、Bcl-2 蛋白表达变化及意义[J]. 山东医药, 2015, 55(31): 11 - 13.
- [5] 李旺英,柳黔忠,张华珍,等. 高频超声和 CT 诊断甲状腺乳头状癌合并钙化的临床价值[J]. 医学影像学杂志, 2015, 25(7): 1149 - 1151, 1156.
- [6] Yılmaz E, Karşıdağ T, Tatar C, et al. Serum Galectin-3; diagnostic value for papillary thyroid carcinoma[J]. Ulus Cerrahi Derg, 2015, 31(4): 192 - 196.
- [7] Alhashemi A, Goldstein DP, Sawka AM. A systematic review of primary active surveillance management of low-risk papillary carcinoma [J]. Curr Opin Oncol, 2016, 28(1): 11 - 17.
- [8] 傅碧绿,廖珊,邓戈湛. 2003 年至 2012 年甲状腺癌前后 5 年病例分析[J]. 中国病案, 2013, 14(10): 55 - 56.
- [9] 赵亚萍,王鑫. 甲状腺乳头状癌的超声图像特征与病理分析[J]. 医学影像学杂志, 2012, 22(2): 274 - 275.
- [10] 郭民英,邢永川,陈卫伶,等. Bcl-2、p53 和 ki-67 在甲状腺癌中的表达及其临床意义的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(6): 1294 - 1297.
- [11] 熊少伟,王玲,赵洋,等. 甲状腺癌组织中 P53、Bcl-2 和 TPO 的表达及临床意义[J]. 中国医药导报, 2011, 8(4): 19 - 21.
- [12] 李南林,董文鹏,易军,等. Survivin 和 Bel-2 蛋白在甲状腺癌中的表达及其意义[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(9): 1654 - 1656.
- [13] 宋晓环,孙冬梅,王忠超,等. 凋亡抑制基因环氧化酶-2 及 Bcl-2 在甲状腺癌组织中的表达[J]. 中国老年学杂志, 2015, 25(7): 1933 - 1935.
- [14] 彭宏峰,王元杰,董伟,等. 甲状腺乳头状癌中 Bcl-2 和 hTERT 的表达[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(11): 1292 - 1294.
- [15] 王刚平,周瑞玲,张作峰,等. 多灶性乳头状甲状腺癌中 Ki-67、Cyclin D1 和 Bcl-2 的表达与转移复发的关系[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(12): 3518 - 3522.

收稿日期:2015-12-25 修回日期:2016-01-04 编辑:周永彬