

# Bcl-2、Bax、Fas 在大肠癌脾胃虚弱证病人舌苔脱落细胞表达及其相关性研究

海 日,师建平\*,赵 敏,张 锁,荣宝山,党 赢,焦雨琦,李月炜,包领芝

(内蒙古医科大学 中医学院,内蒙古 呼和浩特 010059)

**摘要:**目的:探讨舌苔脱落细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Fas 表达水平与大肠癌脾胃虚弱证的关联性。方法:用免疫组化方法,检测舌苔脱落细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Fas 的阳性表达率。结果:三组间 Bcl-2、Bax 蛋白阳性表达率有统计学意义,  $P < 0.05$ ; Fas 蛋白阳性表达率无统计学意义,  $P > 0.05$ 。结论:Bcl-2 蛋白高表达,抑制细胞凋亡, Bax 蛋白低表达,使细胞凋亡能力减弱,共同作用使舌苔细胞的生存期延长,细胞凋亡速率减慢,这可能是导致肿瘤细胞增殖与凋亡失衡,引发细胞恶性增殖而发为癌症的主要原因。

**关键词:**Bcl-2; Bax; Fas; 大肠癌; 免疫组化

**中图分类号:** R273

**文献标识码:** B

**文章编号:** 2095-512X(2021)01-0030-04

大肠癌,是消化道常见恶性肿瘤。流行病学调查显示,其发病率依性别差异,位列世界恶性肿瘤谱的 2、3 位<sup>[1]</sup>(女性男性分别排 2、3 位)。近年癌证与舌苔脱落细胞相关的理化性质、蛋白表达、基因检测等研究屡见不鲜。中医舌象之所以与现代医学所研究的舌苔脱落细胞相关,是因为正常的薄润舌苔,在细胞层面上,由及时脱落的舌角化层细胞堆积而成。形成舌苔的过程,涉及细胞的凋亡,即形成了舌苔脱落细胞。舌苔脱落细胞,由鳞、柱状上皮细胞等舌上皮细胞,及红、白细胞等非上皮细胞组成。舌上皮细胞的正常细胞增殖过程及稳定的口腔 pH 值,是正常薄白苔的关键。中医所讲的正常舌象是淡红舌,薄白苔。而舌象,直观的反映于舌质及舌苔,古人称其为脾胃的“探针”,故中医认为消化系统的疾病变化可经舌象体现出来。而众多现代医学研究者认为,若细胞增殖紊乱、代谢异常等细胞活性的改变可影响角化层细胞脱落延迟亦或使角化不全,细胞脱落受阻,细胞大量堆积于舌面,形成厚苔。

近年来,现代医学的研究者从血清肿瘤标志物、蛋白表达、基因等层面对大肠癌进行了研究,尽管研究如此多样化,但其与中医的研究缺乏关联性<sup>[2]</sup>。中医学者从病因病机方面对大肠癌进行了深

入研究,认为该病病位虽在大肠,但随着病情进展,病邪可累及脾胃、肝、肾等脏腑。研究认为,大肠癌的主要病机是“脾虚”<sup>[3,4]</sup>,脾虚即后天之本失充,食物精微化生乏源,水谷精微不升反降,因为浊邪,下迫肠腑,加之正气不足,合而发病。故本课题选取则之“脾虚”的大肠癌脾胃虚弱证。以中医舌诊为立足点,借助现代实验方法,应用舌苔脱落细胞,对大肠癌脾胃虚弱证病人的舌苔脱落细胞进行研究,探索抑制凋亡蛋白 Bcl-2、促进凋亡蛋白 Bax、Fas 表达水平与大肠癌的关联性,为大肠癌的早期筛查提供参考,也为中医客观化研究提供实验支撑,进而更好地为临床服务。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择 2017-03 ~ 2017-11 期间就诊于我校一附院的病人。其中大肠癌组最终入组的 60 例病人,经由结直肠癌术后,且无癌细胞转移的,中医辨证为大肠癌脾胃虚弱证的,年龄分布在 40 ~ 73 岁区间,平均 57.40 岁。非癌组的 20 例,均为检查后排除大肠癌,经辨证为脾胃虚弱证的其他肠道疾病病人,年龄分布在 26 ~ 70 岁区间,平均 51.40 岁。选择同

收稿日期: 2020-09-18; 修回日期: 2020-12-29

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究重点项目(NJZZ18097); 内蒙古自治区自然科学基金(2019MS08162); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万人才工程”第四批全国中医(临床、基础)优秀人才研修项目(No.J20184832009)

作者简介: 海日(1990-),女,蒙古族,内蒙古医科大学中医学院助教。

通讯作者: 师建平,教授,硕士研究生导师, E-mail: sjp4321@126.com 内蒙古医科大学中医学院, 010059

期来医院体检的健康人20例,年龄分布在29~62岁区间,平均49.35岁,记为正常对照组。各组年龄、性别构成比例无显著性差异。

### 1.2 主要试剂和仪器

Bcl-2抗体(bs-0032R),Bax抗体(bs-4564R),Fas抗体(bs-0215R),液基细胞保存液,95%乙醇,二甲苯,DAB显色试剂盒,SP试剂盒,液基细胞超薄制片机,光学显微镜等。

### 1.3 实验方法

用一次性压舌板,刮取舌中部舌苔,后存于液基细胞保存液中,再经制片,制得玻片标本。对本标本采用免疫组化法处理,步骤简述如下:固定→水化→孵育→加A液→抗原修复→加B液→一抗孵育→加C液→加D液→显色→复染→脱水→封片→结果判定。其中,阴性对照组采用PBS缓冲液代替一抗,其他步骤及方法不变<sup>[5]</sup>(见图4)。光镜下(400倍镜)观察Bcl-2、Bax、Fas三种蛋白的表达情况。

### 1.4 结果判定

在光镜下,Bcl-2、Bax、Fas蛋白的阳性表达为细

胞浆和或细胞膜附着棕色或栗色,阴性表达为细胞浆和或细胞膜附着紫色。在参照Reimer<sup>[6]</sup>实验判断标准的基础上,将本实验的结果判定标准定为,Bcl-2、Bax、Fas蛋白的阳性细胞数>10%为阳性(+),≤10%为阴性(-)。注:每张玻片随机取5个视野观察,综合判别。

### 1.5 统计学处理

采用Excel整理数据,采用SPSS 20.0进行统计分析和统计描述。计量资料的统计描述采用均数±标准差或中位数(四分位间距)表示。计数资料的统计描述采用率或构成比表示,多组间的比较采用行×列表卡方检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 三组间Bcl-2表达的比较

大肠癌组病人舌苔脱落细胞Bcl-2蛋白的阳性表达显著高于其他两组,各组间Bcl-2蛋白的表达有统计学差异( $P < 0.05$ )(见表1)。

表1 三组间Bcl-2表达的比较

分组	n	Bcl-2表达		$\chi^2$ 值	P值
		阳性(%)	阴性(%)		
正常对照组	20	1(5.0)	19(95.0)	27.350	0.000
非癌组	20	6(30.0)	14(70.0)		
大肠癌组	60	41(68.3)	19(31.7)		

### 2.2 三组间Bax表达的比较

大肠癌组病人舌苔脱落细胞Bax蛋白的阳性表达显著低于其他两组,各组间Bax蛋白的表达有统

计学差异(析 $P < 0.05$ )。这可能是具同源性的,同属Bcl-2基因家族的,Bax蛋白和Bcl-2蛋白,效应相悖的表现(见表2)。

表2 三组间Bax表达的比较

分组	n	Bax表达		$\chi^2$ 值	P值
		阳性(%)	阴性(%)		
正常对照组	20	19(95.0)	1(5.0)	21.944	0.000
非癌组	20	16(80.0)	4(20.0)		
大肠癌组	60	25(41.7)	35(58.3)		

### 2.3 三组间Fas表达的比较

大肠癌组、非癌组、正常对照组中,Fas蛋白的

阳性表达差异不大,尚不能认为各组间Fas的表达有统计学差异( $P > 0.05$ )(见表3)。

表3 三组间Fas表达的比较

分组	n	Fas表达		$\chi^2$ 值	P值
		阳性(%)	阴性(%)		
正常对照组	20	14(70.0)	6(30.0)	0.356	0.837
非癌组	20	15(75.0)	5(25.0)		
大肠癌组	60	46(76.7)	14(23.3)		

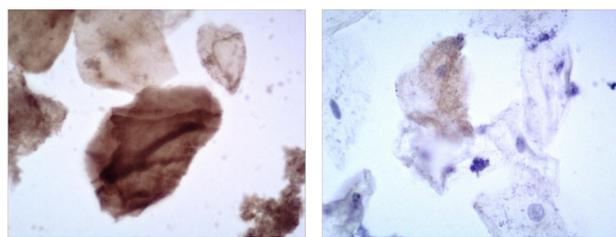


图1 Bcl-2阳性大肠癌组(×400) 图2 Bax阳性大肠癌组(×400)

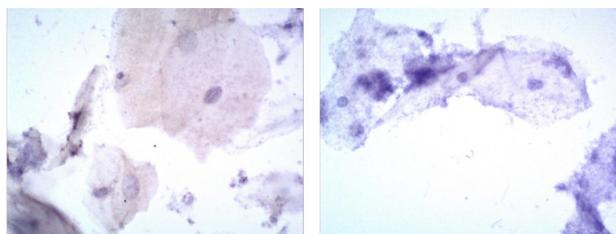


图3 Fas阳性大肠癌组(×400) 图4 PBS免疫组化阴性对照(×400)

### 3 讨论

#### 3.1 舌象特征

舌诊,是中医学的特色诊法之一,亦为中医诊断学的重要内容之一,传统医学认为,望舌即望舌质和望舌苔。从现代医学的解剖位置上讲,舌与胃肠相通,故胃肠疾患可以很好的反映于舌,舌象又通过司外揣内以探知胃肠的情况。故而,本课题研究发现,大肠癌组的舌象特征为淡白舌,腻苔。我认为形成此舌象的原因可能是本组病患脾胃两虚,后天之本失充,食物化生乏源,舌体缺乏充养,故舌色浅淡。又因病变本身的疫疠邪气凝集于肠腑,术后病人病灶已除,痰、火、瘀、毒等有形实邪不复,故舌色只比正常舌色浅淡。正如古人所讲:“脾胃为中土,邪入胃则生苔,如地上生草也”。腻苔,理论上讲为湿浊痰邪停聚、阳气被遏。本组病患脾胃虚弱,腻苔则可能由邪气阻滞肠腑,手术伤及阳气至其升散不及所致。

#### 3.2 相关蛋白检测指标

研究结果显示,各组间 Bcl-2 蛋白的表达有统计学差异。细胞凋亡是逐渐被人类认识到的,由多基因调控、多种酶介导的,不同于细胞坏死的一种细胞死亡。在大肠癌组,大肠癌病人舌苔脱落细胞的凋亡途径中,抗凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 结合,形成稳定的异二聚体,以抑制 Bax 蛋白的活性。而在标本中,过量表达的 Bcl-2 蛋白,介导抑制细胞 DNA 的断裂<sup>[7,8]</sup>,以使凋亡受抑制,从而延长细胞的生命周期,保护细胞以达到永久存活的目的,

故大肠癌组的 Bcl-2 蛋白表达量较高(见图 1)。有文献报道<sup>[9]</sup>, Bcl-2 蛋白的阳性表达率与癌症的转移、多药耐药及临床病例分期有关。

研究结果显示,各组间 Bax 蛋白的表达有统计学差异。现代研究认为, Bax、Bcl-2 两种蛋白,通过拮抗作用对肿瘤的发生发展起重要作用,但与基因调控不同的是, Bax、Bcl-2 蛋白通过调控凋亡途径,以调节肿瘤细胞<sup>[10]</sup>,亦可维持正常细胞的周期。这两个凋亡调控蛋白通过线粒体途径发生作用,正常的健康细胞中 Bax 蛋白以无生物活性形式存在,此时不能被 Bcl-2 抑制性结合。当细胞接收到凋亡信号, Bax 蛋白释放一种物质,这种具有生物活性的物质,能通过改变线粒体外膜通透性,促进细胞凋亡的发生<sup>[11,12]</sup>。舌苔脱落细胞受到凋亡信号刺激后, Bax 蛋白与高表达的 Bcl-2 蛋白结合,形成稳定的异二聚体,使得细胞凋亡被抑制,延长细胞生存期,细胞不能凋亡脱落。故 Bax 蛋白在大肠癌组病人舌苔脱落细胞中呈现低表达(见图 2)。

实验所得大肠癌组病人的舌苔脱落细胞的 Fas 蛋白阳性表达(见图 3),尚不能认为各组间 Fas 的表达有统计学差异。分析其原因:首先,参考的研究标本是归属组织学的大肠癌组织,本课题的研究标本则是归属细胞学的舌苔脱落细胞,这可能是形成 Fas 表达差异的原因;其次,本课题研究范围小、样本少,可能是造成统计学差异的原因。Fas 蛋白在正常健康人的组织细胞中也有阳性表达,当阳性表达量的增加到一定程度时, Fas 系统开始诱导凋亡。研究显示<sup>[13]</sup> Fas 在大肠癌组织细胞中表达下调,这是由于肿瘤细胞的恶性增殖使细胞凋亡减少,基因调控抑制死亡受体的表达。

### 4 总结

综上所述,本文通过观察大肠癌脾胃虚弱证病人舌象特征及检测舌苔脱落细胞凋亡,发现大肠癌组的舌象特征为淡白舌、腻苔。在舌苔脱落细胞凋亡蛋白中,大肠癌组病人由于疾病病理病性等因素的影响,舌苔细胞凋亡受到抑制,使得 Bcl-2 蛋白高表达, Bax 蛋白低表达。这种由于细胞凋亡与增殖失衡状态下一系列基因和多酶介导的细胞内环境变化而引发的恶变,可能是癌症发生发展的原因。本课题将中医舌诊与现代化的西医检测手段结合起来,为中医舌诊与大肠癌之间的关联性提供客观化实验依据。  
(下转第 36 页)

对于便秘的诊疗过程有着独特的见解。(1)气阴两虚为老年性便秘的主要病机,夹杂肝郁脾虚、湿热血瘀等,治疗上应肝脾肺肾同调,滋阴润肠,益气养血,宣肺气通腑气。还需切记诊疗时需常常顾护气血津液,不可妄用寒凉之品损耗脾胃之气、耗伤津液,临证不可单一通腑,需纵观全局,以通调全身之气机为根本;用药不可过猛,依据病情转归及时调整用药;(2)老年性便秘易反复难愈,平时除药物治疗以外,心身调养及饮食调护同样重要;(3)马万千主任医师将自己多年经验总结归纳的体质影响疾病发展及转归理念带到治疗老年性便秘当中,根据不同的体质建议不同的饮食。

### 参考文献

[1]刘屹.便秘贴对功能性便秘实秘治疗的临床及实验研究[D].长春:长春中医药大学,2016  
 [2]中华中医药学会脾胃病分会.便秘中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中医杂志,2017;58(15):1345-1350  
 [3]周仲瑛.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社,2003:261-263  
 [4]彭丽萍.益血润肠汤治疗老年功能性便秘津亏血少证的临

床疗效观察[D].长沙:湖南中医药大学,2017  
 [5]黄岩.基于“肺与大肠相表里”的理论治疗功能性便秘(肠道气滞证)的临床观察[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2016  
 [6]吴宛蔚.湿热型便秘患者的症状特点与治疗研究[D].北京:北京中医药大学,2014  
 [7]田田,赵鲁卿,张声生.张声生教授治疗老年性便秘经验撷菁[J].中国中西医结合消化杂志.2017;4(25):303-305,307  
 [8]孟澍江.温病学[M].上海:上海科技出版社,1985:190  
 [9]颜正华.颜正华中药学讲稿[M].北京:人民卫生出版社,2009:246-249  
 [10]郝红,李伟广,李书渊.火麻仁的生药学研究[J].中国医药指南.2015;10(27):83-85  
 [11]Georgiev L, Chochkova M, Ivanova G, et al. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines[J]. Riv Ital Sost Grasse, 2012;89(1):91-102  
 [12]鄢伟伦,王帅帅.白术对小鼠肠道菌群调节作用的实验研究[J].山东中医杂志.2013;30(6):417-419  
 [13]王洁,李明玥,王栩芮,等.曹吉勋教授治疗老年阴虚型便秘临证经验[J].四川中医,2019;37(5):3-5  
 [14]张新东,余在先.余在先治疗老年性便秘经验探析[J].山西中医,2019;35(6):8-9  
 [15]张亨林,夏韵.养阴润肠方治疗老年性便秘疗效观察[J].实用中医药杂志,2019;35(4):405

(上接第32页)

### 参考文献

[1]Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015;65(2):87-108  
 [2]胡梦奕,陈培丰.舌诊在恶性肿瘤中的应用[J].中医学报,2018;33(07):1190-1193  
 [3]陶灵佳,靖琳,臧明泉,等.中医“治未病”与结直肠肿瘤的防治[J].吉林中医药,2018;38(8):897-900  
 [4]郑翔,郭勇.郭勇辨治大肠癌经验[J].江西中医药大学学报,2016;28(3):17-20  
 [5]雷文珍.免疫组化染色法及肿瘤标志物检测在结直肠癌患者中的诊断价值[J].检验医学与临床,2019;16(19):2898-2900  
 [6]Reimer T, Herring C, Koczan D, et al. FasL, FasLigation—a prognostic factor in breast carcinomas[J]. Cancer Res, 2000;60(2):822-828  
 [7]钟文洲,林松挺,陈正义,等.溃疡性结肠炎中 Gal-3 与 BCL-2 表达的意义[J].临床与实验病理学杂志,2017;33(12):1328-1332  
 [8]张怡,高维娟.Bcl-2/Beclin1 复合物对细胞凋亡与自噬的调节作用[J].承德医学院学报,2019;36(04):335-340

[9]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  
 [10]冯俊伟,张志勇,王爱军,等.结直肠癌组织中 TAZ 表达与 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的关系及临床意义[J].中国老年学杂志,2014;34(19):5419-5420  
 [11]Raghav Pawan Kumar, Kumar Rajesh, Kumar Vinod, et al. Docking-based approach for identification of mutations that disrupt binding between Bcl-2 and Bax proteins:Inducing apoptosis in cancer cells.[J]. Molecular genetics & genomic medicine, 2019;7(11):223-225  
 [12]Mina Hanifeh Ahagh, Gholamreza Dehghan, Maryam Mehdipour, et al. Synthesis, characterization, anti-proliferative properties and DNA binding of benzochromene derivatives: Increased Bax/Bcl-2 ratio and caspase-dependent apoptosis in colorectal cancer cell line[J]. Bioorganic Chemistry, 2019;5(12):231-232  
 [13]曲利娟,余英豪,谈景旺,等.大肠癌组织中 Fas/FasL 系统、nm23 表达与转移的关系[J].临床与实验病理学杂志,2002;18(2):153-155