

论著·临床研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.012

# 半乳糖凝集素 3 与 Bcl-2 在溃疡性结肠炎患者大肠黏膜中的应用研究<sup>\*</sup>

张启芳<sup>1</sup>, 李晓燕<sup>2</sup>, 王媛媛<sup>3</sup>, 李西融<sup>3</sup>, 陈卓琳<sup>2</sup>, 郑奕<sup>2</sup>, 何思明<sup>2</sup>, 陈勇昌<sup>2</sup>, 姜海行<sup>1△</sup>  
(1. 广西医科大学第一附属医院消化内科, 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区南溪山医院消化内科, 广西桂林 541002; 3. 广西壮族自治区南溪山医院病理科, 广西桂林 541002)

**摘要:**目的 探讨溃疡性结肠炎(UC)患者大肠黏膜组织中凋亡蛋白半乳糖凝集素 3(Gal-3)与 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)的表达及意义。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 UC 患者 60 例(UC 组)和正常对照者 20 例(对照组)大肠黏膜组织中的 Gal-3 与 Bcl-2 的表达,并分析 UC 大肠黏膜组织中 Gal-3 与 Bcl-2 表达的关系。以细胞质或细胞核中出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞,根据染色强度及阳性细胞数进行光镜下半定量分析。结果 Gal-3 与 Bcl-2 的表达均在上皮细胞的细胞质, Gal-3 在正常大肠黏膜上皮细胞中呈强阳性表达,在 UC 大肠上皮细胞的表达明显减弱,且与肠镜下病变程度相关; Bcl-2 在正常大肠黏膜上皮细胞中呈弱表达,在 UC 大肠黏膜上皮细胞的表达明显增强,主要为固有层炎性细胞表达增强,与肠镜下病变程度无明显关系。Gal-3 与 Bcl-2 的表达与患者的年龄、性别、病程均无明显相关。Pearson 相关分析显示 Gal-3 与 Bcl-2 的阳性表达程度不具有关联性。结论 Gal-3 与 Bcl-2 蛋白在 UC 的发生和发展中起重要作用,可望成为 UC 早期诊断和预后判断的指标,两者在 UC 的发病中可能独立起作用。

**关键词:**结肠炎, 溃疡性; 半乳糖凝集素 3; 免疫组织化学; B 淋巴细胞瘤-2 基因

**中图分类号:** R574.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1671-8348(2015)02-0180-03

**Application research of Galectin-3 and Bcl-2 in colorectal tissues of patients with ulcerative colitis<sup>\*</sup>**  
Zhang Qifang<sup>1</sup>, Li Xiaoyan<sup>2</sup>, Wang Yuanyuan<sup>3</sup>, Li Xirong<sup>3</sup>, Chen Zhuolin<sup>2</sup>,  
Zheng Yi<sup>2</sup>, He Siming<sup>2</sup>, Chen Yongchang<sup>2</sup>, Jiang Haixing<sup>1△</sup>  
(1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Gastroenterology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang A  
utonomous Region, Guilin, Guangxi 541002, China; 3. Department of Pathology, Nanxishan Hospital  
of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin, Guangxi 541002, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the expressions and significance of Galectin-3 and Bcl-2 in colorectal tissues of patients with ulcerative colitis(UC). **Methods** Immunohistochemical SP method was applied to detected the expression of Galectin-3 and Bcl-2 in colorectal tissues of 60 patients in UC group and 20 healthy adults in the control group, and analyzed the relationship of the expressions between Galectin-3 and Bcl-2. It was regarded as positive cell when obvious dark brown granules appeared in cytoplasm or cyteblast. Semi-quantitative analysis was used basing on the staining intensity and the amount of the staining intensity and positive cells. **Results** Galectin-3 and Bcl-2 proteins expressed in cytoplasm. Galectin-3 showed strong expression in normal colorectal epithelium but weak in UC inflammatory tissues, and it was associated with different lesion degrees under endoscopy. The expressions of Bcl-2 were weak in normal colorectal epithelium, and it enhanced significantly in UC inflammatory tissues, especially in inflammatory cells of laminae propria, and it was not associated with different lesion degrees under endoscopy. The expression of Galectin-3 and Bcl-2 was not associated with the age, sex of patients and the course of UC. Pearson correlation analysis showed that the positive expressions of Galectin-3 and Bcl-2 had no relevance. **Conclusion** Galectin-3 and Bcl-2 involved in the pathogenesis of UC. They may be able to used as markers of early diagnosis and prognosis in UC and may play the role in the pathogenesis of UC independently.

**Key words:** colitis, ulcerative; Galectin-3; immunohistochemistry; Bcl-2

半乳糖凝集素 3(Galectin-3, Gal-3)是一种生物体内通过识别特异性半乳糖配基而发挥功能的糖蛋白,参与细胞黏附、增殖、分化、血管生成、凋亡等多种生物功能<sup>[1]</sup>。B 淋巴细胞瘤-2 基因(B cell leukemia/lymphoma-2, Bcl-2)是细胞凋亡的抑制基因,它的激活和过度表达能抑制细胞的正常凋亡<sup>[2]</sup>。溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是肠道慢性非特异性炎症性疾病,其病因和发病机制至今尚未完全阐明,越来越多的证据显示细胞凋亡在 UC 组织损伤和免疫功能紊乱中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。Gal-3 与 Bcl-2 在结构上相似,可能在细胞凋亡中存在共同的凋亡途径。本文采用免疫组织化学 SP 法检测 UC 患者大肠黏膜组织中 Gal-3 和 Bcl-2 的表达,探讨两者在 UC 发病中的作用及关联性。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 选择 2009 年 1 月至 2013 年 6 月在广西壮族自治区

<sup>\*</sup> 基金项目:广西壮族自治区卫生厅科研项目(Z2011025)。 作者简介:张启芳(1968—),主任医师,在读博士,主要从事炎症性肠病的基础与临床工作方向研究。 △ 通讯作者, Tel:13978867818; E-mail:736130988@qq.com。

自治区南溪山医院及广西医科大学第一附属医院消化内科住院或门诊确诊的 UC 患者 60 例(UC 组)为研究对象,其中男 39 例,女 21 例,年龄 17~77 岁,平均(44.25±12.43)岁。健康体检例行肠镜检查者 20 例(对照组)为对照,其中男 10 例,女 10 例,年龄 20~66 岁,平均(43.60±13.18)岁。全部病例均符合中华医学会消化病分会炎症性肠病协作组制定的《对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》<sup>[4]</sup>。病变按 Riley 等分级法,根据肠镜下 UC 的表现,将病变程度分为 I 级、II 级、III 级。I 级:黏膜充血,黏膜下血管网不清,有淤斑;II 级:黏膜明显充血水肿,黏膜呈细颗粒状、质脆,有小溃疡形成;III 级:黏膜粗糙呈颗粒状,有自发性出血,浅小溃疡融合,覆有少量的黏液脓血及血性渗出物<sup>[5]</sup>。病例分为 3 组:I 级组 21 例,II 级组 20 例,III 级组 19 例。研究方案经广西壮族自治区南溪山医院及广西医科大学第一附属医院伦理委员会批准,并取得研究对象知情同意。所有标本在患者行结肠镜检查时活检留取,取乙状结肠和(或)直肠黏膜组织,10%中性福尔马林液固定,石蜡包埋保存。正常对照者在乙状结肠和(或)直肠活检。

## 1.2 方法

**1.2.1 Gal-3 与 Bcl-2 的检测** 应用免疫组织化学 SP 法检测 Gal-3 与 Bcl-2 在患者大肠黏膜组织中的表达。一抗为兔抗人 Gal-3 或 Bcl-2 多克隆抗体,购自 ABGENT 公司;二抗为辣根过氧化物酶 HRP 标记亲和纯化山羊抗兔 IgG(H+L),购自 Jackson Immunoresearch 公司。具体方法:石蜡切片常规脱蜡、水化,PBS 冲洗,灭活内源性过氧化物酶,高温高压抗原修复,PBS 冲洗,加入一抗:兔抗人 Gal-3 抗体(1:2 000)或 Bcl-2 抗体(1:100),恒温箱孵育 2 h,PBS 冲洗,加入二抗:恒温箱孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色,PBS 冲洗,苏木素复染,返蓝,脱水,烤干封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,并设空白对照。

**1.2.2 Gal-3 与 Bcl-2 结果的判断标准** 以细胞质或细胞核中出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞。光镜下半定量结果判断参照许良中等<sup>[6]</sup>的方法。染色强度分数标准:棕褐色 3 分,棕黄色 2 分,淡黄色 1 分,无着色 0 分。同样物镜下计数阳性细胞数:一个视野内着色细胞大于 75%为 4 分;>50%~75%为 3 分;>10%~50%为 2 分;≤10%为 1 分;阴性为 0 分。两项得分相乘:0~2 分为阴性,≥3 分为阳性。

**1.2.3 研究指标** 观察 Gal-3 和 Bcl-2 在 UC 和正常大肠黏膜组织的表达,并研究二者表达与 UC 不同肠镜分级间及患者临床特征的关系。讨论 UC 大肠黏膜组织 Gal-3 和 Bcl-2 表达的关联性。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计数资料用率表示,率的比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法;采用 Pearson 相关分析评价 UC 大肠组织中 Gal-3 和 Bcl-2 表达的关联性。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 Cal-3 和 Bcl-2 在 UC 和正常大肠黏膜组织的表达** Gal-3 的表达位于大肠黏膜上皮细胞的细胞质,为棕黄色颗粒。Gal-3 在正常大肠组织切片中均有较强的表达,分布较均匀,但在 UC 大肠黏膜上皮细胞的表达则显著降低,呈斑点状、不均匀,见图 1、2。Gal-3 在正常大肠黏膜上皮细胞的阳性表达率为 100%(20/20),在 UC 肠黏膜上皮细胞的阳性表达率则为 38.33%(23/60),两组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

Bcl-2 表达位于大肠黏膜上皮细胞的细胞质,为棕黄色颗粒。Bcl-2 在正常大肠黏膜上皮细胞中呈弱表达,主要表达于结肠隐窝基底,而在 UC 大肠黏膜上皮细胞的表达明显增强,主要为固有层炎性细胞(淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞)的表达增强,见图 3、4。Bcl-2 在正常大肠黏膜上皮细胞中的阳性表达率为 20.00%(4/20),而 UC 的阳性表达率为 88.33%(53/60),UC 大肠黏膜上皮的 Bcl-2 表达较正常大肠黏膜上皮明显增强,两组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

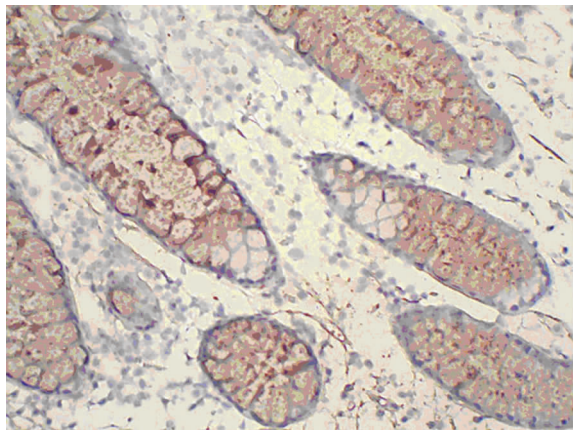


图 1 Gal-3 在正常大肠上皮细胞中的表达(SP,×400)

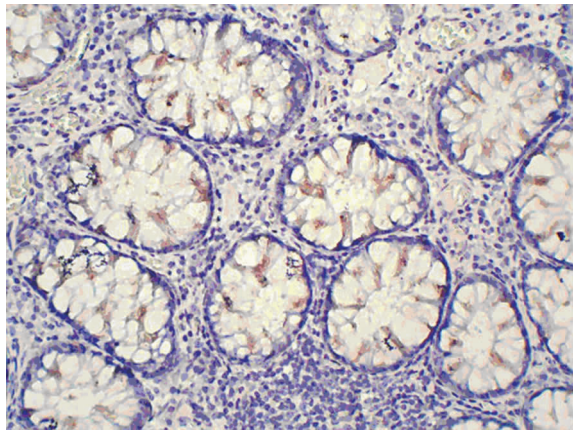


图 2 Gal-3 在 UC 大肠上皮细胞中的表达(SP,×400)

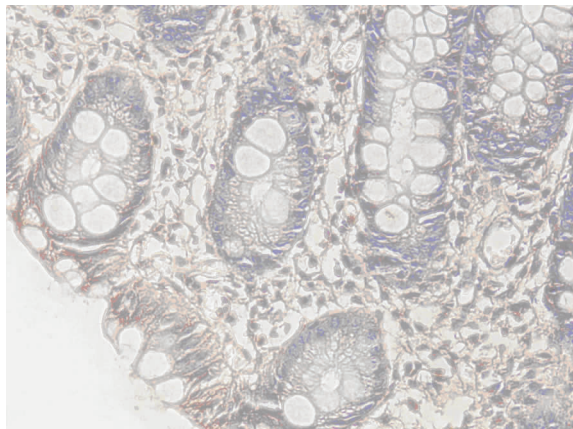


图 3 Bcl-2 在正常大肠上皮细胞中的表达(SP,×400)

**2.2 Gal-3 和 Bcl-2 表达与 UC 不同肠镜分级间及患者临床特征的关系** Gal-3 在 UC I 级与 II 级、III 级间的比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 II 级与 III 级间的比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );而不同肠镜 UC 分级间 Bcl-2 的表达差异无统



计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。Gal-3 和 Bcl-2 的表达与 UC 患者的年龄、性别、病程均无明显相关性( $P>0.05$ ),见表 2。

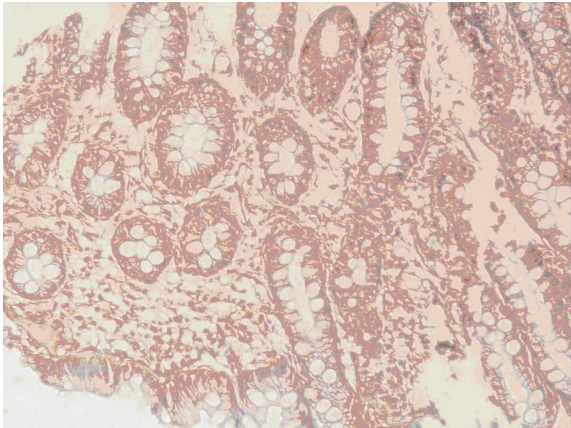


图 4 Bcl-2 在 UC 大肠上皮细胞中的表达(SP,×200)

表 1 Gal-3 和 Bcl-2 表达与 UC 不同内镜分级间的关系[n(%)]			
组别	n	Gal-3 阳性	Bcl-2 阳性
UC I 级	21	14(66.67)	15(71.43)
UC II 级	20	5(25.00) <sup>a</sup>	19(95.00)
UC III 级	19	4(21.05) <sup>a</sup>	19(100)

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与 UC I 级比较。

表 2 Gal-3 和 Bcl-2 表达与 UC 患者临床特征的关系						
临床特征	n	Gal-3 阳性 [n(%)]	$\chi^2$	P	Bcl-2 阳性 [n(%)]	$\chi^2$ P
性别			0.78	0.40		1.00 0.53
男性	39	14(35.90)			34(87.18)	
女性	21	9(42.86)			19(90.48)	
年龄(岁)			0.30	0.20		1.00 0.54
<45	29	9(31.03)			26(89.66)	
≥45	31	14(45.16)			27(87.10)	
病程(年)			1.00	0.52		0.68 0.38
≥4	35	13(37.14)			30(85.71)	
<4	25	10(40.00)			23(92.00)	

2.3 UC 大肠黏膜组织 Gal-3 和 Bcl-2 表达的关联性 UC 组中,Gal-3 与 Bcl-2 共同阳性表达的有 22 例,共同阳性表达率为 36.67%,Pearson 相关分析显示两者的阳性表达程度不具有关联性( $r=0,P>0.05$ )。

3 讨 论

Gal-3 是半乳糖凝集素的成员之一,是半乳凝集素家族中唯一的一个具有合型结构并可抑制细胞凋亡的半乳凝集素蛋白<sup>[7]</sup>,属于半乳糖凝集素蛋白家族,广泛表达于上皮细胞和免疫细胞。Bcl-2 基因位于 18 号染色体长臂,属于抑制凋亡基因家族中的一个重要成员,其主要通过抑制细胞凋亡来延长细胞存活时间,又被称为“生存基因”。正常结肠上皮细胞存在凋亡现象,主要发生在隐窝和绒毛顶部,意义在于调控进入隐窝及绒毛轴的细胞数量,通过清除衰老细胞来保持肠上皮的完整性,是肠上皮细胞更新的生理过程。同时,活化的炎性细胞较

静息细胞更容易凋亡,正常情况下,因为肠黏膜内炎性细胞处于高的激活状态,使凋亡增加,从而维持肠黏膜微环境的免疫稳定,在细胞凋亡的基因调控网络中,Bcl-2 基因家族起关键作用<sup>[8]</sup>。

Gal-3 的表达部位在大肠黏膜上皮细胞的细胞质,正常大肠黏膜上皮细胞呈强表达,而在 UC 大肠黏膜上皮细胞的表达则明显减低,其表达阳性率与肠镜下病变程度的比较显示 Gal-3 的表达阳性率与 UC 肠镜下病变程度有关,即炎症轻的 I 级组织表达高,炎症重的 II 级和 III 级组织表达低,但是与患者的年龄、性别、病史长短无明显相关性。Bcl-2 的表达部位也在细胞质,正常大肠上皮有弱表达,主要表达于结肠隐窝基底部,保证上皮细胞增生和更新,以维持结肠黏膜屏障的动态平衡;UC 患者大肠黏膜 Bcl-2 表达上调是对结肠黏膜上皮细胞损伤的一种反应性增生,可能与隐窝上皮细胞再生修复有关。本研究中,UC 患者 Bcl-2 表达明显增多,与正常对照比较差异明显,主要表现为固有层炎性细胞(淋巴细胞、浆细胞和中性粒细胞)表达明显增强,提示炎性细胞凋亡明显减慢,导致 UC 大肠黏膜炎症的持续存在。可见,大肠黏膜活检组织中凋亡调控蛋白 Gal-3 和 Bcl-2 的异常表达在 UC 的发病机制中具有重要作用。

Gal-3 与 Bcl-2 的序列相似,Gal-3 含有 4 个与 Bcl-2 基因一样的氨基酸组合,而这些组合正是 Bcl-2 抗细胞凋亡作用的关键部位,因为它们们在结构上的相似,可能在细胞凋亡中存在共同的凋亡途径<sup>[9]</sup>。国内学者庞霞等<sup>[10]</sup>研究表明在食管鳞癌组织中 Gal-3 与 Bcl-2 的表达呈正相关,两者在食管癌的发生发展中具有协同作用。但是本组资料通过关联性统计分析未能证实 Gal-3 与 Bcl-2 在 UC 大肠组织中的阳性表达程度具有关联性,提示两者在 UC 的发病中可能独立起作用,但尚需要大样本量病例进一步研究探讨。

综上所述,Gal-3 和 Bcl-2 蛋白在 UC 的发病中可能独立起作用,并在发生和发展中起重要作用,可望成为 UC 早期诊断和预后判断的指标。

参考文献:

[1] Liu FT,Rabinovich GA. Galectins:regulators of acute and chronic inflammation[J]. Ann N Y Acad Sci,2010,1183: 158-182.

[2] Serrano M,Gj H,Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 [J]. Nature,1993,366(6456):704-707.

[3] van der Woude CJ,Moshage H,Homan M,et al. Expression of apoptosis related proteins during malignant progression in chronic ulcerative colitis [J]. Clipathol,2005, 58(8):811-814.

[4] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 中华消化杂志, 2007,12(8):545-550.

[5] Riley SA,Mani V,Goodman MJ,et al. Microscopic activity in ulcerative colitis; what does it mean? [J]. Gut, 1991,32(2):174-178.

[6] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志,1996,6(4):229-231.

[7] Fukumori T,Kanayama HO,Raz A. The (下转第 185 页)

能评分的高低与 HT 的发生有密切关系。本研究发现,PH-2 型入院时 NIHSS 评分明显高于其他类型 HT,大面积脑梗死患者 HT 的发生率也相对较高,提示起病时神经功能缺损严重的脑梗死患者更容易发生严重出血性转化。

脑梗死发生至 HT 发生的时间间隔大多在 1~2 周内,3~4 周时也可发生。本研究观察发现 HT 发生时间 1 周内占 29.2%,1~2 周内占 58.3%,3 周以上占 2.1%。目前认为,HT 发生与侧支循环形成密切相关<sup>[8]</sup>。脑梗死后,脑水肿使梗死灶内及周围组织毛细血管受压而发生缺血坏死、完整性破坏,随着水肿消退,侧支循环逐步开放,已发生坏死的毛细血管破裂引起梗死灶内及周围点片状出血。因此,临床上应当密切观察,并于 2 周内复查 CT 或 MRI,尽早发现 HT,及时调整治疗方案。脑梗死面积与 HT 的发生有密切的联系<sup>[9-10]</sup>。本研究发现,继发于大面积脑梗死者占 64.6%,继发于小面积梗死者占 29.2%,继发于腔隙性梗死者占 6.3%。大面积脑梗死常伴有明显脑水肿,使周围血管受压,血管缺血缺氧、通透性增强,血流再灌后容易发生 HT。腔隙性脑梗死极少发生 HT,与其极少发生血流再灌注有关。

HT 的影像学表现各异,多以 HI 为主,梗死灶或边缘点片状出血,无占位效应,而 PH 患者梗死灶内血肿形成,有占位效应<sup>[11]</sup>。HT 好发于皮质,其原因为皮质梗死大多发生在较大动脉,有丰富的侧支循环,容易再通<sup>[12]</sup>。皮质出血由于其动脉的缓和血压作用以及皮质侧支循环对缺血半暗带的维持作用,多形成斑点或片状出血<sup>[13-14]</sup>。HI 患者少有临床症状加重,不影响临床结局,PH 患者颅内血肿形成,可能导致患者病情恶化或死亡<sup>[15]</sup>。临床对 HT 的诊断主要依赖影像学检查,故应当定期复查 CT 或 MRI 以便尽早发现 HT,从而指导临床,改善患者预后。本研究中 HT 的发生率为 48/769(6.2%)低于 HT 国外报道发生率(15%~43%),可能与部分 HT 无症状,未及时复查头部 CT 有关。作为回顾性研究,本研究样本量不大,结果可能有偏向性,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation[J]. N Engl J Med, 2009, 361(12): 1139-1151.

[2] 盛文利, 黄如训. 重视脑梗死的出血性转化[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2012, 38(2): 126-128.

[3] Beslow LA, Smith SE, Vossough A, et al. Hemorrhagic transformation of childhood arterial ischemic stroke[J].

Stroke, 2011, 42(4): 941-946.

[4] Hallström B, Norrving B, Lindgren A. Stroke in Lund-Orup, Sweden; improved long-term survival among elderly stroke patients[J]. Stroke, 2002, 33(6): 1624-1629.

[5] Yassi N, Parsons MW, Christensen S, et al. Prediction of poststroke hemorrhagic transformation using computed tomography perfusion[J]. Stroke, 2013, 44(11): 3039-3043.

[6] 尹俊雄, 曾宪容. 脑梗死出血性转化[J]. 国际脑血管病杂志, 2011, 19(12): 901-906.

[7] 陈莉, 秦新月. 缺血性卒中出血性转化相关因素分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(21): 2207-2209.

[8] 田洪, 张玉波, 刘磊. 脑梗死出血性转化的研究进展[J]. 微循环学杂志, 2012, 22(3): 61-63.

[9] Terruso V, Amelio MD, Benedetto ND, et al. Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction[J]. Neuroepidemiology, 2009, 33(3): 261-265.

[10] 钟纯正. 87 例出血性脑梗死临床分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1804, 1833.

[11] Prabhakaran S, Gupta R, Ouyang B, et al. Acute brain infarcts after spontaneous intracerebral hemorrhage: a diffusion-weighted imaging Study[J]. Stroke, 2010, 41(1): 89-94.

[12] England TJ, Bath PM, Sare GM, et al. Asymptomatic hemorrhagic transformation of infarction and its relationship with functional outcome and stroke subtype: assessment from the tinzaparin in acute ischaemic stroke trial [J]. Stroke, 2010, 41(12): 2834-2839.

[13] 张培林. 神经解剖学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 512-513.

[14] Bang OY, Saver JL, Kim SJ, et al. Collateral flow averts hemorrhagic transformation after endovascular therapy for acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2011, 42(8): 2235-2239.

[15] Berger C, Fiorelli M, Steiner T, et al. Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic? [J]. Stroke, 2001, 32(6): 1330-1335.

(收稿日期: 2014-08-11 修回日期: 2014-10-28)

(上接第 182 页)

role of galectin-3 in cancer drug resistance[J]. Drug Resistance Updates, 2007, 10(3): 101-108.

[8] Cvejic D, Selemetjev S, Savin S, et al. Apoptosis and proliferation related molecules(Bcl-2, Bax, p53, PCNA) in papillary microcarcinom versus papillary carcinoma of the thyroid[J]. Pathology, 2008, 40(5): 475-480.

[9] Hoyer KK, Pang M, Gui D, et al. An anti-apoptotic role

for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas[J]. Am J Pathol, 2004, 164(3): 893-902.

[10] 庞霞, 郑湘予, 李晟磊, 等. 食管鳞癌组织中半乳糖凝集素-3 和 Bcl-2 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 45(1): 8-11.

(收稿日期: 2014-08-01 修回日期: 2014-10-04)