

肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义

陈涛, 贾玉容, 田伏洲, 蔡忠红, 李广阔

陈涛, 贾玉容, 田伏洲, 蔡忠红, 李广阔, 成都军区总医院全军普通外科中心
四川省成都市 610083

陈涛, 男, 1970-11-05 生, 四川省成都市人, 汉族, 1994 年第二军医大学本科毕业, 2002 年第三军医大学博士毕业, 主治医师. 主要从事消化系统肿瘤研究. 项目负责人: 陈涛, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院全军普通外科中心. chentttt@yahoo.com

电话: 028-86570353

收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2002-10-30

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Fu-Zhou Tian, Zhong-Hong Cai, Guang-Kuo Li

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Fu-Zhou Tian, Zhong-Hong Cai, Guang-Kuo Li, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province China

Correspondence to: Dr. Tao Chen, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province China. chentttt@yahoo.com

Received: 2002-10-08 Accepted: 2002-10-30

Abstract

AIM: To investigate the expression of survivin protein in human hepatocellular carcinoma (HCC) and its relationship with clinical features and prognosis of patients with HCC.

METHODS: The expression of survivin protein and the proliferation of tumor cells marked by PCNA in 48 cases of HCC were assessed by immunohistochemical method. TUNEL method was used to detect apoptosis.

RESULTS: The survivin protein was expressed in 31 of 48 cases of HCC (64.6%). Expression of survivin protein was significantly higher in those of Edmondson grade - than in those of grade - (88.0% vs 39.1%, $P=0.013$). The ratio of proliferative index to apoptotic index was significantly higher in HCC with positive survivin expression than that with negative survivin expression (1.8 vs 1.1, $P=0.045$). The survival rate of three years of patients with positive survivin expression was significantly lower than that of patients with negative survivin expression (70.6% vs 35.5%, $P=0.011$).

CONCLUSION: The expression of survivin may play an important role in breaking the balance of proliferation and apoptosis of HCC cells and is closely associated with prognosis of patients with HCC.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK. Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4): 411-414

摘要

目的: 研究 survivin 蛋白在人肝癌组织中的表达与临床病理特征及预后的关系.

方法: 应用免疫组织化学染色对 48 例肝癌中 survivin 蛋白与增生细胞核抗原(PCNA)的表达情况进行检测, 采用 TUNEL 方法检测细胞凋亡, 结合临床病理特征及预后进行分析.

结果: 48 例肝癌中 survivin 蛋白表达阳性率为 64.6%. Edmondson 分级 - 级患者 survivin 蛋白表达明显低于 - 级患者 (39.1% vs 88.0%, $P=0.013$). survivin 蛋白表达阳性者肝癌细胞增生凋亡比显著高于表达阴性者 (1.8 vs 1.1, $P=0.045$). survivin 蛋白表达阴性患者与表达阳性患者比较, 1 a 生存率差异无显著意义, 但 3 a 生存率前者显著高于后者 (70.6% vs 35.5%, $P=0.011$).

结论: survivin 蛋白对破坏肝癌细胞增生凋亡平衡、促进肝癌细胞快速增生具有重要作用, survivin 蛋白的表达可以作为预后不良的重要指标.

陈涛, 贾玉容, 田伏洲, 蔡忠红, 李广阔. 肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):411-414

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/411.htm>

0 引言

细胞增生与凋亡的异常与肿瘤的发生发展密切相关^[1-5]. survivin 是新近发现的一种 IAP 家族成员, 特异性地表达于胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞^[6-9], 通过特异性地抑制凋亡信号转导过程中最下游的效应分子 caspase-3 的活性而阻断凋亡的发生过程, 在促进肿瘤的发生发展过程中具有重要的作用^[10-13]. 我们采用原位末端标记法(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)、免疫组织化学染色技术检测肝癌组织中细胞增生与凋亡及 survivin 表达, 并结合临床病理特征进行分析, 以探讨 survivin 在肝癌组织中的表达与肝癌细胞增生与凋亡异常的关系及其临床病理学意义.

1 材料和方法

1.1 材料 1994/1996 年手术切除肝癌标本 48 例, 男 39 例, 女 9 例; 年龄 16-81(平均 48.7)岁; 肿瘤直径 2.6-21(平均 8.9) cm, 其中 ≥ 5 cm 34 例(70.8%), < 5 cm 14 例(29.2%); 合并门静脉癌栓或肝内转移者 22 例(45.8%); Edmondson 级 5 例(10.4%), 级 14 例(29.2%),

级 19 例(39.6 %), 级 10 例(20.8 %);临床病理 期 6 例(12.5 %), 期 14 例(29.2 %), 期 28 例(58.3 %). 标本均经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μ m 连续切片. 羊抗人 survivin 多克隆抗体(Santa Cruz, USA); 鼠抗人增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体(武汉博士德); SP 试剂盒、DAB 试剂盒(北京中山); 细胞凋亡原位检测试剂盒(in situ cell death detection kit, AP, roche, USA)

1.2 方法 肝癌组织细胞凋亡的原位检测—TUNEL 染色按照 TUNEL 试剂盒说明进行, 以不含末端脱氧核苷酸转移酶的标记液(Bottle 2:Label solution)代替 TUNEL 反应液作阴性对照; 以 DNase 预处理 10 min 再接 TUNEL 染色步骤作阳性对照. 光镜下观察 TUNEL 染色切片的显色反应, 结合形态学改变确定凋亡细胞. 随机选择 5 个肿瘤区内 200 倍(20 \times 10 倍)视野, 计数癌细胞数及凋亡细胞数, 计算凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数/癌细胞数) \times 100 %. 肝癌组织 PCNA 蛋白表达的免疫组织化学染色按照 SP 法常规操作进行, 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 正常兔血清代替一抗作替代对照. 光镜下观察免疫组化染色切片的显色反应, 随机选择 5 个肿瘤区内 200 倍(20 \times 10 倍)视野, 计数癌细胞数及染色阳性细胞数, 计算增生指数(PI)=(PCNA 染色阳性细胞数/癌细胞数) \times 100 %. 计算细胞增生凋亡比 = PI/AI. 肝癌组织 survivin 蛋白表达的免疫组织化学染色按照 SP 法常规操作进行, 阳性对照参照 Santa Cruz 公司提供的阳性对照片. 光镜下观察免疫组化染色切片的显色反应, 随机选择 5 个肿瘤区内 200 倍(20 \times 10 倍)视野, 计数癌细胞数及染色阳性细胞数, 以百分率表示, 阳性细胞数 \geq 10 % 判为阳性, 阳性细胞数 < 10 % 判为阴性.

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验和 t 检验分析.

2 结果

2.1 肝癌组织自发性细胞凋亡与增生 肝癌组织中 PCNA 阳性产物呈棕黄色颗粒状, 定位于肝癌细胞核, 细胞质未见着色. PCNA 阳性细胞在肝癌组织内呈散在分布(图 1). 凋亡细胞胞质浓缩, 细胞体积较小, 核呈红色或粉红色着色, 呈碎点状, 结构消失, 形态不规则, 大小不一致(图 2). 肝癌组织中细胞增生凋亡比与肿瘤分化程度有关, 而与其他临床病理特征如患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期及门静脉癌栓或肝内转移均无关. 肿瘤分化较好者, 肝癌细胞增生凋亡比明显低于分化较差者, 在 Edmondson 分级 - 级和 - 级患者肝癌细胞增生凋亡比分别为 0.8 ± 0.4 和 2.3 ± 1.4 , 二者差异极显著($P < 0.001$).

2.2 肝癌组织 survivin 蛋白表达情况 survivin 蛋白主要表达于肝癌细胞质, SP 染色可见胞质内棕黄色颗粒, 阳性细胞在肝癌组织内呈散在分布(图 3). 48 例肝细胞癌中 31 例 survivin 蛋白表达阳性, 阳性表达率为 64.6 %.

survivin 蛋白表达及细胞增生凋亡比与肿瘤分化程度有关, 而与其他临床病理特征如患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期及门静脉癌栓或肝内转移均无关. 肿瘤分化较差者, survivin 蛋白表达率及细胞增生凋亡比明显高于分化较好者, 在 Edmondson 分级 - 级和 - 级患者 survivin 蛋白表达率分别为 39.1 % 和 88.0 % 二者差异极显著($P < 0.001$).

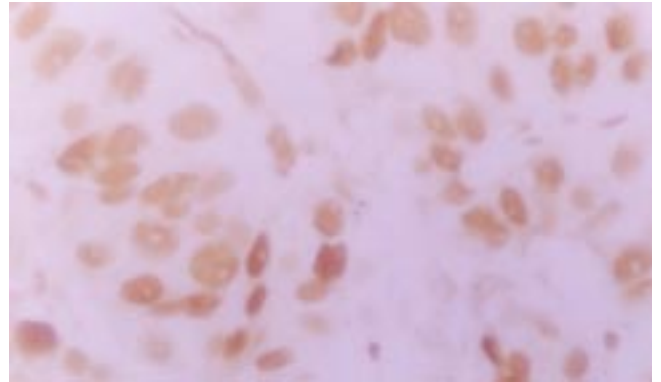


图 1 肝癌 PCNA 蛋白表达阳性呈棕黄色, 定位于细胞核, 散在分布. SP \times 400

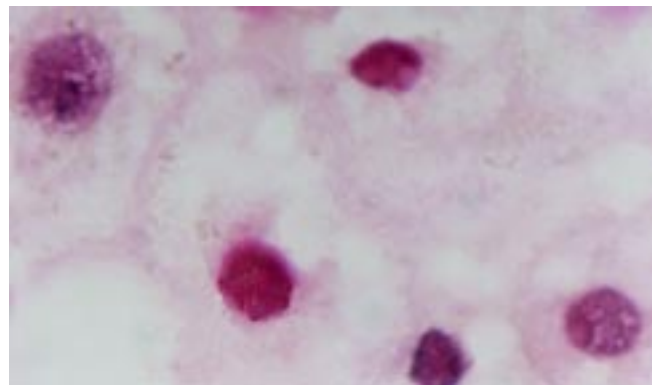


图 2 肝癌凋亡细胞及散在的凋亡小体. TUNEL \times 1 000(AP 染色)



图 3 肝癌 Survivin 蛋白表达阳性, 细胞内棕黄色细颗粒状阳性产物. SP \times 1 000

2.3 肝癌组织 survivin 蛋白表达与细胞增生凋亡比及预后的关系 在 survivin 蛋白表达阳性及阴性患者, 肝癌细胞增生凋亡比分别为 1.8 ± 1.3 和 1.1 ± 1.0 , 二者差异显著, survivin 蛋白表达阳性患者增生凋亡比显著高于表达阴性者($P < 0.05$). 同时, survivin 表达阴性患者与表达阳性患者比较, 1 a 生存率无显著差异, 但 3 a

生存率显著高于后者, 两组分别为 70.6 % 和 35.5 % ($P < 0.05$, 表 1).

表 1 Survivin 蛋白表达与术后生存率关系

Survivin 表达	n	增生指数	凋亡指数	增生/凋亡比 (PI/AI)	1 a 生存率 (%)	3 a 生存率 (%)
阴性组	17	4.9 ± 5.0	5.5 ± 2.5	1.1 ± 1.0	88.2 %	70.6 %
阳性组	31	10.9 ± 9.6 ^b	6.3 ± 3.3	1.8 ± 1.3 ^a	67.7 %	35.5 % ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 阴性组.

3 讨论

肝癌的发生发展取决于细胞增生和死亡相互作用的结果^[14-18]. 我们采用免疫组化方法及 TUNEL 染色方法结合细胞形态学观察对肝癌组织中肝癌细胞 PCNA 的表达及肝癌细胞凋亡进行了研究. 首次尝试了将细胞增生率与凋亡率之比作为反映肝癌组织中细胞增生与凋亡的平衡的指标. 结果发现, 原发性肝癌组织中细胞增生率与凋亡率之比能够较好地反映细胞增生与凋亡的动态平衡的破坏, 他与肿瘤分化程度有关, 而与其他临床病理特征如患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期及门静脉癌栓或肝内转移均无关. Edmonson 分级 - 级患者, 细胞增生/凋亡比显著低于 Edmonson 分级 - 级患者. 同时在 survivin 表达阳性的患者其细胞增生/凋亡比较表达阴性患者明显升高, 相应的 3 a 生存率也显著降低. 这与 Yamamoto et al^[19-22]的研究发现随着肝癌分化程度的降低, 肝癌细胞凋亡率逐渐增高, 同时细胞增生率的增高更加显著的结果是一致的.

Ito et al^[23]研究了 survivin 在人肝癌细胞株的表达及功能, 发现在所检测的 4 株肝癌细胞株中均有 survivin 表达, 并能够促进肝癌细胞增生, 但 survivin 在肝癌组织中的表达的研究至今未见报道. 我们采用免疫组织化学染色的方法观察了 48 例肝癌组织中 survivin 的表达, 结果发现 31 例 (64.6 %) 的肝癌中有 survivin 表达, 与既往在其他类型肿瘤组织中对 survivin 表达的研究结果相类似^[24-28]. 统计学分析表明, 除肿瘤细胞分化程度外, survivin 与其余临床病理因素均无显著相关性, 在 Edmonson 分级 - 级患者, 其表达显著低于 Edmonson 分级 - 级患者, 这可能是分化较差的肝癌组织中 survivin 基因表达上调的结果, 但其表达与年龄、性别、肿瘤大小、临床分期以及门静脉癌栓及肝内转移无关, 表明肝癌是一种多因素、多阶段、长期相互作用的结果, 是一个多基因、多步骤的生物学行为改变的过程, 是癌基因的激活和抑癌基因的失活共同作用的结果, 也是细胞增生与凋亡的动态平衡失调的结果, survivin 基因在其发生发展过程中的某一方面发挥了作用. 与 survivin 在其他肿瘤中的研究情况不同的是, 我们发现在肝癌组织中 survivin 基因的表达与肝癌细胞凋亡指数并无明显关系, 这可能是由于在肝癌组织中影响细胞凋亡的因素太多^[29-34], 导

致 survivin 的作用被掩盖. 但进一步的分析表明, survivin 的表达与肝癌组织细胞增生/凋亡比有关, survivin 表达阴性者肝癌细胞增生/凋亡比显著低于表达阳性者. 由于肝癌的发生可以视为肿瘤细胞增生活跃以及凋亡抑制打破了细胞增生与死亡的动态平衡, 从而导致细胞的无限增生与恶性转化所致^[30-34], 而组织细胞的增生/凋亡比能够更好地反映细胞增生与死亡之间的动态平衡的状态从而更好地体现其生物学行为特性, 这一结果也表明了 survivin 在破坏肝癌细胞增生与凋亡间平衡, 使肿瘤细胞获得生长优势中发挥了重要作用. 分化较好的肝癌细胞 survivin 表达较低, 这说明低分化肝癌细胞逃避凋亡并快速增生的功能至少部分地通过 survivin 的表达而获得. survivin 表达阴性患者与表达阳性患者比较, 1 a 生存率无显著差异, 但 3 a 生存率显著高于后者. 这些结果都提示 survivin 在肝癌的生长过程中发挥了重要的作用, survivin 的表达可以作为预后不良的重要指标.

4 参考文献

- Kyriazanos ID, Tachibana M, Dhar DK, Shibakita M, Ono T, Kohno H, Nagasue N. Expression and prognostic significance of S100A2 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Rep* 2002;9:503-510
- Wu K, Li Y, Zhao Y, Shan YJ, Xia W, Yu WP, Zhao L. Roles of Fas signaling pathway in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:982-986
- Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002;8:580-585
- Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Koutras DA, Mitsiades N. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 2002;161:643-654
- Wu MY, Liang YR, Wu XY, Zhuang CX. Relationship between Egr-1 gene expression and apoptosis in esophageal carcinoma and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2002;8:971-975
- Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002;117:738-744
- Nasu S, Yagihashi A, Izawa A, Saito K, Asanuma K, Nakamura M, Kobayashi D, Okazaki M, Watanabe N. Survivin mRNA expression in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2002;22:1839-1843
- Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87:91-97
- Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:886-892
- Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000;7:602-608
- Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000;46:645-650
- Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134
- Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H,

- Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, K aneko Y, Nakagawara A. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000;19:617-623
- 14 Shan CM, Li J. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:247-252
- 15 Kalogeraki A, Garbagnati F, Santinami M, Zoras O. DNA fragmentation and cell proliferation correlated with tumor grade in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;96:301-305
- 16 Rocken C, Carl-McGrath S. Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001;19:269-278
- 17 Kalogeraki A, Garbagnati F, Santinami M, Zoras O. DNA fragmentation and cell proliferation correlated with tumor grade in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;96:301-305
- 18 Park YN, Chae KJ, Kim YB, Park C, Theise N. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis. *Cancer* 2001;92:2733-2738
- 19 Tannapfel A, Geissler F, Kockerling F, Katalinic A, Hauss J, Wittekind C. Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 1999;187:439-445
- 20 Yamamoto K, Takenaka K, Kajiyama K, Shimada M, Shirabe K, Taketomi A, Maeda T, Sugimachi K. Cell proliferation and cell loss in nodule-in-nodule hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:813-819
- 21 Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Monden M. Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 81:747-751
- 22 Hino N, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Tsuji T. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1996; 16:123-129
- 23 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takas K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-1085
- 24 Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA. Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104:105-109
- 25 Dong Y, Sui L, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications. *Anticancer Res* 2002;22:2377-2383
- 26 Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:886-892
- 27 Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2002;184:105-116
- 28 Wakana Y, Kasuya K, Katayanagi S, Tsuchida A, Aoki T, Koyanagi Y, Ishii H, Ebihara Y. Effect of survivin on cell proliferation and apoptosis in gastric cancer. *Oncol Rep* 2002;9:1213-1218
- 29 Jiang S, Song MJ, Shin EC, Lee MO, Kim SJ, Park JH. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Hepatology* 1999;29:101-110
- 30 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-1062
- 31 Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:1938-1945
- 32 Garcia EJ, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Hepatocellular carcinoma and markers of apoptosis (bcl-2, bax, bcl-x): prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:210-217
- 33 Paiva C, Oshima CT, Lanzoni VP, Forones NM. Apoptosis, PCNA and p53 in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1058-1061
- 34 Lambole C, Bringuier AF, Camus E, Lardeux B, Groyer A, Feldmann G. Overexpression of the mouse Fas gene in human Hep3B hepatoma cells overcomes their resistance to Fas-mediated apoptosis. *J Hepatol* 2002;36:385-394

世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品 (第 16 类), 获得商标注册。

世界华人消化杂志® 注册有效期限自公元 2002-11-14 至 2012-11-13 止。商标注册证第 2001071 号。

World Journal of Gastroenterology® 注册有效期限自 2002-11-14 至 2012-11-13 止。商标注册证第 2001158 号。

(世界胃肠病学杂志社 2002-12-18)