

· 论著 ·

# Fas 相关因子 1 和 Survivin 在胃癌中的表达及其与患者预后的关系

刘爱群 葛莲英 邵红 罗元 林思彤

**【摘要】** 目的 探讨 Fas 相关因子 1 (FAF1) 和 Survivin 蛋白在胃癌组织中的表达及其与肿瘤侵袭、转移及预后的关系。方法 用免疫组织化学方法检测 145 例胃癌组织石蜡切片 FAF1 和 Survivin 蛋白的表达情况,采用卡方检验、生存曲线等方法分析其表达的临床意义。结果 FAF1 表达与胃癌患者肿瘤大小、病理组织学分级、肿瘤的浸润程度、有无淋巴结转移、有无远处转移、TNM 临床分期密切相关 ( $P < 0.01$ )。Survivin 表达与组织学分级、肿瘤的浸润程度、TNM 临床分期密切相关 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。胃癌中 FAF1 表达与 Survivin 表达呈一定程度负相关 ( $r = -0.293$ ,  $P < 0.01$ )。FAF1 阴性表达者、Survivin 阳性表达者预后较差,1 年、3 年和 5 年生存率较低。结论 FAF1 的失表达和 Survivin 蛋白的过表达与胃癌的侵袭、转移及预后密切相关,对临床治疗和预后判断有一定指导意义。

**【关键词】** 胃肿瘤; Fas 相关死亡结构域蛋白质; 凋亡抑制蛋白质类; 预后

**Expression of FAF1 and Survivin and their correlations with prognosis in gastric carcinomas** LIU Ai-qun, GE Lian-ying, SHAO Hong, LUO Yuan, LIN Si-tong. Department of Endoscopy, The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: GE Lian-ying, Email: gelianying2008@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expressions of FAF1 and Survivin and their relations tumor invasion, metastasis and prognosis in tissues of gastric carcinomas. **Methods** The expression of FAF1 and Survivin were detected by immunohistochemistry in 145 cases of paraffin-embedded gastric cancer tissue. Then, the positive rates of FAF1 and Survivin were compared with the clinical pathological markers. The correlation between their expression and disease prognosis was evaluated by chi-square test and survival curve analysis. **Results** It was showed that there were close correlations between FAF1 expression and tumor size, histological grade, tumor infiltration, lymph node metastasis, distance metastasis and TNM clinical stage ( $P < 0.01$ ), and between Survivin expression and tumor histological grade, tumor infiltration, and TNM clinical stage ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). There were some degree negative correlation between the level of FAF1 protein expression and the level of Survivin protein expression in gastric cancer ( $r = -0.293$ ,  $P < 0.01$ ). The patients with negative FAF1 and Survivin expression had poor prognosis with lower one-, three- and five-year survival rates. **Conclusions** The underexpression of FAF1 and overexpression of Survivin are correlated with tumor invasion, metastasis and poor prognosis of gastric carcinomas, which may be of potential use in clinical therapy and prognosis estimation of the tumor.

**【Key words】** Stomach neoplasms; Fas-associated death domain protein; Inhibitor of apoptosis proteins; Prognosis

胃癌是世界范围内第四位最常见的恶性肿瘤,第二位最常见的癌症死因<sup>[1]</sup>。随着对胃癌发病机制研究的深入,胃癌的发生发展过程中凋亡相关基因调控水平的改变已成为当前研究的热点。Fas 相关因子 1 (Fas-associated factor 1, FAF1) 是新近发现的 Fas 死亡信号结合体 (FADD) 的成员之一,人类 FAF1 的过表达

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.21.079

基金项目: 广西自然科学基金(0728203); 博士研究生创新课题; 广西卫生厅自筹课题(Z2011214)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属肿瘤医院内镜中心

通讯作者: 葛莲英, Email: gelianying2008@163.com

会促进核浓缩,即使在缺乏任何外在死亡信号的情况下,FAF1 的过表达也会促进细胞凋亡<sup>[2]</sup>。Survivin 是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员,作用于各凋亡途径的汇集点,是迄今发现最强的凋亡抑制因子。本研究采用免疫组织化学染色方法检测这两个重要凋亡调控基因在胃癌组织中的表达,并探讨其与临床病理特征及预后的关系,为揭示胃癌的生物学特性,指导临床治疗和预后判断提供帮助。

## 材料和方法

### 一、材料

标本来自广西医科大学附属肿瘤医院 2004 年 4 月至 2007 年 12 月行胃癌根治术后外科切除的存档蜡块,选择其中临床和随访资料完整的胃癌标本 145 例,所有患者术前均未接受过化疗和放疗。随访截至 2010 年 10 月。按照 2010 年国际抗癌联盟(AJCC)制定的新 TNM 分期标准进行临床分期。取每例蜡块连续切片 4 张,厚 3~5  $\mu\text{m}$ ,其中 1 张用于常规 HE 染色,3 张用于免疫组化染色。

### 二、试剂

FAF1 单克隆抗体购自美国 SantaCruz 公司产品,兔抗人 Survivin 单克隆抗体为福州迈新公司产品。MaxVision 鼠/兔-HRT 即用型广谱快捷免疫组化试剂(KIT-5020)购自福州迈新生物技术有限公司。

### 三、方法

采用两步 MaxVision™ 方法检测组织中 FAF1 和 Survivin 的表达,具体步骤如下:(1)石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,具体步骤如下:切片二甲苯 I 脱蜡 10 min,二甲苯 II 脱蜡 10 min,二甲苯 III 脱蜡 10 min,无水乙醇 I 5 min,无水乙醇 II 5 min,95% 乙醇 5 min,80% 乙醇 5 min,75% 乙醇 5 min,65% 乙醇 5 min。PBS (pH=7.4)冲洗 3 次,每次 5 min。(2)抗原修复:加入 800~1500 ml EDTA (pH=8.0)于压力锅中,电炉加热至沸腾。脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料染色架上,放入已沸腾的缓冲液中,盖上锅盖,扣上压力阀,继续加热至喷气,从喷气开始计时,1 min 后压力锅离开热源,冷却至室温。取出玻片,先用自来水冲洗后,置放于孵育盒中。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS 液。(3)每张切片滴加 1 滴或 50  $\mu\text{l}$  0.1%~0.2% TrionX-100,室温下孵育 10 min,以增加细胞膜和胞核膜通透性。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS 液。(4)每张切片加 1 滴或 50  $\mu\text{l}$  3% 甲醇  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,室温下孵育 15 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS 液。(5)每张切片加一滴或 50  $\mu\text{l}$  一抗,一抗分别 FAF1 和 Survivin 兔抗人单克隆抗体。每批染色均设阳性对照和阴性对照,以试剂盒中提供的阳性切片做阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱孵育 60 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS 液。(6)每张切片加 50  $\mu\text{l}$  MaxVision 鼠/兔-HRT 即用型广谱快捷免疫组化试剂盒检测系统,室温孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS 液。(7)DAB 配制 850  $\mu\text{l}$  蒸馏水与 DAB 试剂中 A、B、C 各 50  $\mu\text{l}$  混匀,配制成 1 ml DAB 显色液。每张切片加 50  $\mu\text{l}$  新鲜配制的 DAB 溶液,在显微镜下观察染色情况。(8)自来水冲洗,苏木素复染 5 min,然后置于 1% 盐酸乙醇中数秒后流水振洗,放入氨水中返蓝。(9)洗片、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。显微镜下观察结果。

### 四、结果判断

胃癌的分级:所有石蜡标本均常规行 HE 染色重新评价,确认原诊断无错误,并对切片进行病理组织学分级。由两名病理科医师行双盲阅片确定。取阳性细胞表达最强染色部位,选择周边 4 个视野和中间 1 个视野,观察每个视野中阳性细胞占该视野细胞的百分率,每个视野计数 100 个上皮细胞,综合染色强度和阳性范围,对 FAF1 和 Survivin 的表达进行临床病理评分。染色强度:基本未着色、染色与背景相似者为 0 分,着色浅、略高于背景者为 1 分,中度着色明显高于背景者为 2 分,强染、着色深棕色者为 3 分;阳性范围:FAF1: <5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分;Survivin: <10% 为 0 分,10%~45% 为 1 分,46%~70% 为 2 分, >70% 为 3 分。依据两项指标的积分数分为 4 级,即阴性(-)为 0 分,弱阳性(+)为 1~2 分,阳性(++)为 3~4 分,强阳性(+++)为 5~6 分。如在一例标本中存在多个不同的评分视野,取最大值和最小值的平均值作为其临床病理评分。阳性表达率以阳性病例(包括弱阳性、阳性、强阳性)占总病例的百分数表示。

## 五、统计学分析

使用 SPSS 16.0 软件,计数资料均采用  $\chi^2$  检验及 Fisher 精确概率法处理。非参数的相关性分析采用 Spearman 相关分析。中位生存期及总生存的分析采用 Kaplan-Meier 法。

## 结 果

1. FAF1 和 Survivin 的表达情况:FAF1 阳性反应物质呈棕黄色,主要位于细胞核内,少数病例在细胞膜上亦有表达(图 1)。Survivin 蛋白主要在胃癌细胞的细胞质中着色,但也有部分细胞显示在细胞核内着色颜色从浅黄色到深棕色(图 2)。

2. FAF1 和 Survivin 蛋白表达与胃癌各临床病理特征的相关性(表 1):FAF1 表达与胃癌患者肿瘤大小、病理组织学分级、肿瘤的浸润程度、有无淋巴结转移、有无远处转移、TNM 临床分期密切相关( $P < 0.01$ )。Survivin 表达与组织学分级、肿瘤的浸润程度、TNM 临床分期密切相关( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 1 胃癌根治术患者中 FAF1 和 Survivin 的表达与临床病理学特征的相关性

临床病理特征	例数	FAF1 表达阳性			Survivin 表达阳性		
		例数	%	P 值	例数	%	P 值
性别				0.751			0.487
男	97	37	38.1		68	70.1	
女	48	17	35.4		38	79.2	
年龄				0.494			0.927
≤60 岁	86	34	37.3		64	74.4	
>60 岁	59	20	37.0		42	71.2	
肿瘤直径				0.024			0.667
<5 cm	80	36	45.0		63	78.8	
≥5 cm	65	18	27.6		43	66.2	
分化程度				<0.01			0.015
高、中	28	21	75.0		17	60.7	
低、未	117	33	28.2		89	76.1	
浸润深度				<0.01			<0.01
黏膜层及黏膜下层	9	7	77.7		2	22.2	
肌层	25	16	64.0		21	84.0	
浆膜层	67	22	32.8		49	73.1	
浆膜外	44	9	20.4		34	77.3	
淋巴转移				<0.01			0.069
阴性	59	32	54.2		44	74.6	
阳性	86	22	25.5		62	72.1	
远处转移				0.374			0.068
阴性	130	50	38.4		94	72.3	
阳性	15	4	26.6		12	80.0	
TNM 分期				<0.01			<0.01
I A + I B	27	20	74.0		18	66.7	
II A + II B	56	22	39.2		40	71.4	
III A + III B + III C	47	8	17.0		36	76.6	
IV	15	4	26.6		12	80.0	



3. FAF1 和 Survivin 蛋白表达之间的相关性:相关性分析显示:胃癌中 FAF1 表达与 Survivin 表达呈较弱的负相关( $r_s = -0.293, P < 0.01$ )。

4. FAF1 和 Survivin 表达与患者预后的关系:随着 FAF1 表达程度的增加,中位生存时间延长,见表 2。随着 Survivin 表达程度的增加,中位生存时间缩短,见表 3。FAF1 三组比较,1 年、3 年和 5 年生存率比较均有统计学差异( $\chi^2 = 209.46, \chi^2 = 208.02, \chi^2 = 209.23, P$  均  $< 0.01$ ),见图 3。Survivin 四组比较,1 年、3 年和 5 年生存率比较均有统计学差异( $\chi^2 = 308.09, \chi^2 = 336.84, \chi^2 = 305.06, P$  均  $< 0.01$ ),见图 4。

表 2 FAF1 蛋白表达对 145 例胃癌根治术患者术后中位生存时间和生存率的影响

FAF1 表达	例数	中位生存时间(月)	生存率(%)		
			1 年	3 年	5 年
-	92	26	73.9	35.2	13.3
+	45	-	84.4	64.4	51.0
++	8	-	100	100	100

表 3 Survivin 蛋白表达对 145 例胃癌根治术患者术后中位生存时间和生存率的影响

Survivin 表达	例数	中位生存时间(月)	生存率(%)		
			1 年	3 年	5 年
-	39	43.0	79.5	53.6	39.0
+	32	57.0	93.8	71.9	43.3
++	63	29.0	76.2	39.0	21.3
+++	11	14.0	63.6	9.1	0

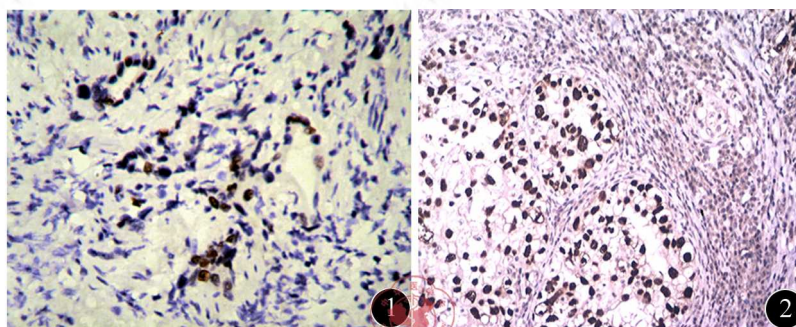


图1 FAF1在胃癌组织的表达 (MaxVision™ ×200) 图2 Survivin在胃癌组织的表达 (MaxVision™ ×200)

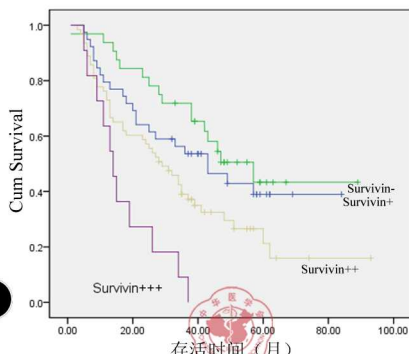
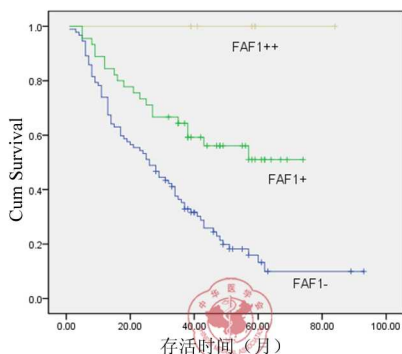


图3 胃癌组织FAF1表达与患者生存曲线 图4 胃癌组织Survivin表达与患者生存曲线

## 讨 论

研究表明,在胃癌的发生发展中不仅有细胞的过度增殖,同时存在细胞的凋亡异常,细胞增殖与凋亡的失衡是胃癌发生的生物学基础。FAF1 作为新近发现的与凋亡调控密切相关的基因之一,由于其在胃癌组织中特异性低表达<sup>[3]</sup>,在胃癌的分子靶向治疗中是否具有一定的地位,尚需结合临床因素进行进一步研究。查阅国内外文献,关于 FAF1 作为胃癌分子预后因素的研究,尚未见相关报道。我们探讨了胃癌根治术患者 FAF1 表达与临床病理学特征的相关性,明确了 FAF1 表达与胃癌患者肿瘤大小、病理组织学分级、肿瘤的浸润程度、有无淋巴结转移、有无远处转移、TNM 临床分期密切相关。本研究显示:肿瘤范围越大,FAF1 表达减少,一般认为,肿瘤大小直接关系到浸润深度和转移的有无,肿瘤侵犯范围越大,说明了恶性程度越高,侵袭能力越强,肿瘤细胞的增殖周期越短。同时,FAF1 的表达随着肿瘤分化程度的降低,浸润深度的增加、伴有淋巴转移和远处转移及 TNM 分期晚者 FAF1 明显减少,从而可以认为,FAF1 是与胃癌分化程度、浸润转移有关的抑癌基因。FAF1 蛋白表达率低的肿瘤其恶性程度较高,且具有较强的分裂增殖和转移能力,患者的预后也较差。最近 Menges 等<sup>[4]</sup>的研究也提示 FAF1 可能是一个抑癌基因。因此 FAF1 基因可能在胃癌的发生发展中起重要的作用,其可能成为监测胃黏膜癌变及判断胃癌生物学行为的有用指标,FAF1 作为影响预后的保护性因素,检测 FAF1 表达水平对判断胃癌患者术后的预后有一定的指导作用。

国内关于 Survivin 与胃癌病理特征的相关性报道的结论较多不一致。最近研究表明 Survivin 表达与多种肿瘤的预后及生存时间减少密切相关,这说明 Survivin 在肿瘤形成和发展中起着重要作用<sup>[5-7]</sup>。姬琛华等<sup>[8]</sup>在胃癌的研究中发现 Survivin 蛋白的表达与浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期密切相关,而与胃癌的病理类型和肿瘤的大小无关。赵宇等<sup>[9]</sup>的研究显示:Survivin 的表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有明显的相关性。钟琼等<sup>[10]</sup>研究表明:Survivin 在Ⅲ、Ⅳ期胃癌阳性率显著高于Ⅰ、Ⅱ期胃癌,低分化胃癌 Survivin 阳性率显著高于高、中分化胃癌。Lee 等<sup>[11]</sup>检测了 106 个胃癌手术标本,发现 Survivin 的表达与肿瘤的大小、浸润深度、淋巴结转移、肿瘤分期以及总体生存率有关。而我们的研究发现,Survivin 蛋白的表达与肿瘤组织的分化程度、浸润深度、TNM 分期密切相关:低或未分化、浸润深度达浆膜层及以外,Ⅲ期+Ⅳ期者,Survivin 的表达程度明显增高。Survivin 基因各类研究结果的异同可能与研究样本来自不同的地区、种族、不同的社会经济群体,导致他们在基因的易感性、病理类型、临床分期和预后方面的不同。同时也与研究样本量的多少,以及免疫组化半定量的敏感性等因素有关。但这些研究的结果也同时说明了一个问题:Survivin 在胃癌的发生、发展起重要作用,Survivin 过表达可能抑制胃癌细胞的凋亡,促进肿瘤细胞的增殖、生长、侵袭和转移。随着肿瘤恶性程度的增加,低或未分化胃癌患者 Survivin 表达上调更为明显,提示它与胃癌的发生相关。在肿瘤的侵袭和转移过程中,Survivin 表达水平进一步上调,临床 TNM 分期越晚,在一定程度上反映胃癌的恶性程度。Survivin 高表达是反映胃癌发生发展及生物学行为的重要标志物之一。生存分析也显示提示 Survivin 是影响患者预后的危险因素:Survivin 表达程度高的胃癌具有较强的侵袭性和预后不良。

国内在胃癌组织中联合检测 FAF1 和 Survivin 的表达和联合评估临床预后的情况还未见相关报道。本研究中发现胃癌组织中 FAF1 的表达与 Survivin 的表达呈一定程度的负相关。此研究结果提示,在胃癌的发生发展中,凋亡促进基因和抑制基因可能组成了复杂的网络调控系统,对肿瘤的生长起着促进和抑制作用,其中任何一种基因蛋白表达的异常均可使肿瘤细胞获得自主生长优势,促进恶性肿瘤细胞的浸润和转移。因此对胃癌患者进行上述两种基因蛋白的联合检测有可能成为临床上判断胃癌分化程度、浸润深度及转移潜能的一项有意义的指标,同时也可辅助预测患者的预后、指导临床治疗,且为开发新的抗癌药物和寻求新的基因治疗的靶基因提供思路。

## 参 考 文 献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55: 74-108.
- [2] Park MY, Run SW, Kim KD, et al. Fas-associated factor-1 mediates chemotherapeutic-induced apoptosis via death effector filament formation. *Int J*

Cancer, 2005, 115:412-418.

- [3] 刘爱群,葛莲英,罗元,等. FAF1 mRNA 在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的相关性. 世界华人消化杂志, 2010, 18:2422-2426.
- [4] Menges CW, Altomare DA, Testa JR. FAS-Associated Factor 1 (FAF1); diverse functions and implications for oncogenesis. Cell Cycle, 2009, 8: 2528-2534.
- [5] 刘钢,史火喜,袁又能,等. 凋亡抑制基因 Survivin 在甲状腺癌组织中的表达及意义[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5: 840-843.
- [6] 朱根海,陈春英,梁荣. 卵巢上皮癌旁不同距离组织中 survivin 及 MMP-2/TIMP-2 的表达[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5: 111-114.
- [7] 刘建刚,左宏波,管洪在. Survivin 与恶性血液病[J/CD]. 中华临床医师杂志. 电子版, 2011, 5:2659-2662.
- [8] 姬琛华,刘丽娜,吕申,等. 胃癌 Survivin、COX-2 蛋白的表达及其相关性分析. 大连医科大学学报, 2008, 30:10-13.
- [9] 赵宇,王宇令,吴琦,等. Survivin 在胃癌组织中的表达及其与 Bcl-2、Bax 表达的关系. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16:187-190.
- [10] 钟琼,钟芬梅,肖震宇,等. Survivin 表达与胃癌的生物学行为. 赣南医学院学报, 2008, 28:532-533.
- [11] Lee GH, Joo YE, Koh YS, et al. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18:957-963.

(收稿日期:2011-09-16)

(本文编辑:马超)

刘爱群,葛莲英,邵红,等. Fas 相关因子 1 和 Survivin 在胃癌中的表达及其与患者预后的关系[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5 (21):6273-6278.