



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.02.013

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201302186.pdf>

Survivin 在类风湿关节炎中的表达及意义

陈进伟, 刘明, 毛妮, 曾艳

(中南大学湘雅二医院风湿免疫科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 探讨存活素(survivin)与类风湿关节炎(RA)发生发展的关系, 以及与难治性类风湿关节炎(RRA)多药耐药的相关性。方法: 按照入组标准收集正常人15例、RA初诊未治组35例, 治疗有效组20及难治组25例。采用免疫细胞化学法检测外周血淋巴细胞上survivin的表达。结果: 外周血淋巴细胞中survivin阳性表达率RA初诊未治组明显升高, 与正常对照组相比差异有统计学意义($\chi^2=29.59$, $P<0.01$); RA治疗有效组稍有升高, 与正常对照组相比差异无统计学意义($\chi^2=1.591$, $P>0.05$); RA难治组明显升高, 与正常对照组($\chi^2=26.53$, $P<0.01$)和RA治疗有效组($\chi^2=24.35$, $P<0.01$)相比差异均有统计学意义, 与初诊未治组比差异无统计学意义($\chi^2=0.014$, $P>0.05$)。结论: Survivin可能参与了类风湿关节炎的发病过程, 可能参与难治性RA多药耐药, 是难治性RA多药耐药形成机制之一。

[关键词] 类风湿关节炎; 多药耐药; 存活素

Expression of survivin in rheumatoid arthritis

CHEN Jinwei, LIU Ming, MAO Ni, ZENG Yan

(Department of Rheumatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: To detect the correlation between survivin and rheumatoid arthritis (RA) to determine the possible mechanism of RA and multidrug resistance in refractory rheumatoid arthritis (RRA).

Methods: We collected 15 normal controls, 35 early untreated RA patients, 20 effectively treated RA patients and 25 RRA patients according to selection standard. The expression of survivin in the peripheral blood lymphocytes was detected by immunocytochemical method.

Results: There was significant difference in the survivin expression in the peripheral blood lymphocytes between the early untreated and normal control group ($\chi^2=29.59$, $P<0.01$). The survivin expression in the peripheral blood lymphocytes of effectively treated RA group slightly elevated, but had no significant difference with the normal control group ($\chi^2=1.591$, $P>0.05$). The survivin expression in the peripheral blood lymphocytes of the RRA group was significantly stronger than in the effectively treated RA group ($\chi^2=24.35$, $P<0.01$), and normal control group ($\chi^2=26.53$, $P<0.01$), with no significant difference compared with early untreated group ($\chi^2=0.014$,

收稿日期 (Date of reception): 2012-02-10

作者简介 (Biography): 陈进伟, 教授, 主任医师, 主要从事难治性风湿性疾病多药耐药的研究。

通信作者 (Corresponding author): 陈进伟, Email: jinwei73104@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81172850)。 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81172850).

$P > 0.05$).

Conclusion: Survivin has an influential role in the occurrence and development of rheumatism arthritis. Survivin might be involved in refractory multidrug resistance of RA and be one of the multidrug resistance mechanism of RRA.

KEY WORDS

rheumatoid arthritis (RA); multidrug resistance (MDR); survivin

存活素 (survivin) 是迄今发现最强的凋亡抑制因子, 它具有抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖的作用, 还参与调节细胞有丝分裂以及血管形成。主要分布于胚胎及未分化成熟的组织中, 在成人体内除胸腺、生殖腺中微量表达外, 所有分化成熟的组织中均无表达^[1-2]。新近有研究^[3-4]发现 survivin 也可以通过抑制炎症细胞的凋亡而在炎症反应中发挥重要作用。

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是对称性多关节炎为主要表现的全身性免疫性疾病。本病致残率较高, 未经系统治疗的患者, 2 年致残率约为 50%, 3 年致残率约为 70%^[5]。其发病机制不明。目前非甾体抗炎药 (NSAIDs)、改善病情药 (DMARDs) 和生物制剂的联合用药已提高了 RA 的治疗效果, 但仍有少部分 RA 患者治疗效果差。这些经正规足疗程治疗病情仍不能缓解, 或反复发作、出现进行性关节破坏的 RA 临床通常称为难治性 RA (refractory rheumatoid arthritis, RRA)^[6]。难治的可能原因较多, 其中耐药因素是 RA 产生难治的重要原因^[7]。RA 患者的滑膜细胞存在异常的凋亡过程, 与凋亡相关基因如 fas, bcl-2 等促凋亡基因以及某些癌基因表达异常有关^[8]。Survivin 作为一种凋亡抑制基因是否也在类风湿关节炎发生和发展以及细胞异常凋亡导致的多药耐药中起重要作用, 目前国外研究^[9-10]甚少, 国内仍未见相关报道。本研究拟采用免疫细胞化学法检测外周血淋巴细胞上 survivin 的表达, 探讨 survivin 与 RRA 多药耐药的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

正常对照组 15 例取自 2009 年 10 月中南大学湘雅二医院体检中心健康志愿者。RA 初发未治组血液样本 35 例、治疗有效组 20 例和难治组 25 例, 均来源于我院 2009 年 1 月至 10 月风湿免疫科病房及门诊病人, 其中男性 19 例, 女性 61 例, 男女之比约为 1:3, 年龄 20~50 (31.5±4.5) 岁, 病程 10~84 (26±2.4) 个月。入组 RA 患者均以甲氨蝶呤、

来氟米特为基础药物治疗, 未使用生物制剂及激素。所有受试标本的采集均获得受试对象的知情同意以及中南大学湘雅二医院伦理学委员会的批准。RA 患者均符合 1987 年 ACR 的诊断标准。RA 治疗有效组标准符合美国风湿协会类风湿关节炎缓解标准 ACR20 临床改善指征。RRA 诊断标准: 1) 符合 1987 年美国风湿病学会的 RA 诊断标准; 2) 病程 1 年以上; 3) 经非甾体类抗炎药或小剂量 (20 mg/d) 激素或联合应用两种以上 DMARDs (基本包括甲氨蝶呤、来氟米特) 治疗半年以上无效, 病情仍处于活动状态, 不能正常学习或工作, 自理生活困难^[6]。

1.2 主要试剂

兔抗人 survivin 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, SP 免疫组织化学试剂盒 (HE 染色) 购自北京中杉金桥生物技术有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 样本采集与储存

所有病例和对照均于晨起空腹采肘静脉血 5 mL 于肝素抗凝管中, 采用梯度密度离心法分离外周血淋巴细胞, 无菌冻存管分装后置于液氮罐中。

1.3.2 Survivin 的表达及免疫细胞化学法

取 10 μ L 细胞悬液作细胞涂片, 干燥后浸入 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min, 加入 3% H_2O_2 于玻片上, 反应 2 min, 再加山羊血清孵育 20 min 后弃孵育液, 加一抗 (survivin 抗体) 4 $^{\circ}C$ 过夜。再加相应的二抗, 25 min 后加入的辣根酶标记链霉卵白素工作液 37 $^{\circ}C$ 孵育 25 min, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察。细胞染成棕黄色为 survivin 阳性。计算阳性细胞占细胞总数的百分率。凡显色强度与背景无明显差别者为阴性, 阳性细胞数 <10% 为 (+), 阳性细胞数在 10%~50% 之间为 (++) , 阳性细胞数 >50% 为 (+++) , 若两者判断结果相差 10 个百分点, 则结果重新判断。

1.4 统计学处理

所有数据经 SPSS13.0 统计软件分析处理, 率的比较用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法, $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

在光学显微镜下观察各实验组细胞的 *survivin* 的表达结果显示: 外周血淋巴细胞 *survivin* 表达 RA 初诊未治组高于正常对照组 ($\chi^2=18.90$, $P<0.01$); RA 治疗有效组稍高于正常对照组, 但差异无统计

学意义 ($\chi^2=1.591$, $P>0.05$); RA 初诊未治组高于 RA 治疗有效组 ($\chi^2=16.60$, $P<0.01$) 和正常对照组 ($\chi^2=18.90$, $P<0.01$); RA 难治组明显高于正常对照组 ($\chi^2=26.53$, $P<0.01$) 和 RA 治疗有效组 ($\chi^2=24.35$, $P<0.01$)。RA 难治组稍高于 RA 初诊未治组, 但差异无统计学意义 ($\chi^2=2.291$, $P>0.05$; 表 1, 图 1)。各组阳性率如表 1。

表 1 各组外周血淋巴细胞 *survivin* 表达阳性率

Table 1 Expression of *survivin* on peripheral blood lymphocyte of the 4 groups

组别	例数	Survivin				阳性率 / %
		-	+	++	+++	
正常对照组	15	15	0	0	0	0
RA 初诊未治组	35	12	5	9	9	65.71 ^{**$\Delta\Delta$}
RA 治疗有效组	20	18	1	1	0	10.00
RA 难治组	25	4	5	7	9	84.00 ^{**$\Delta\Delta$}

与正常对照组比较, ^{**} $P<0.01$; 与 RA 治疗有效组比较, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$ 。

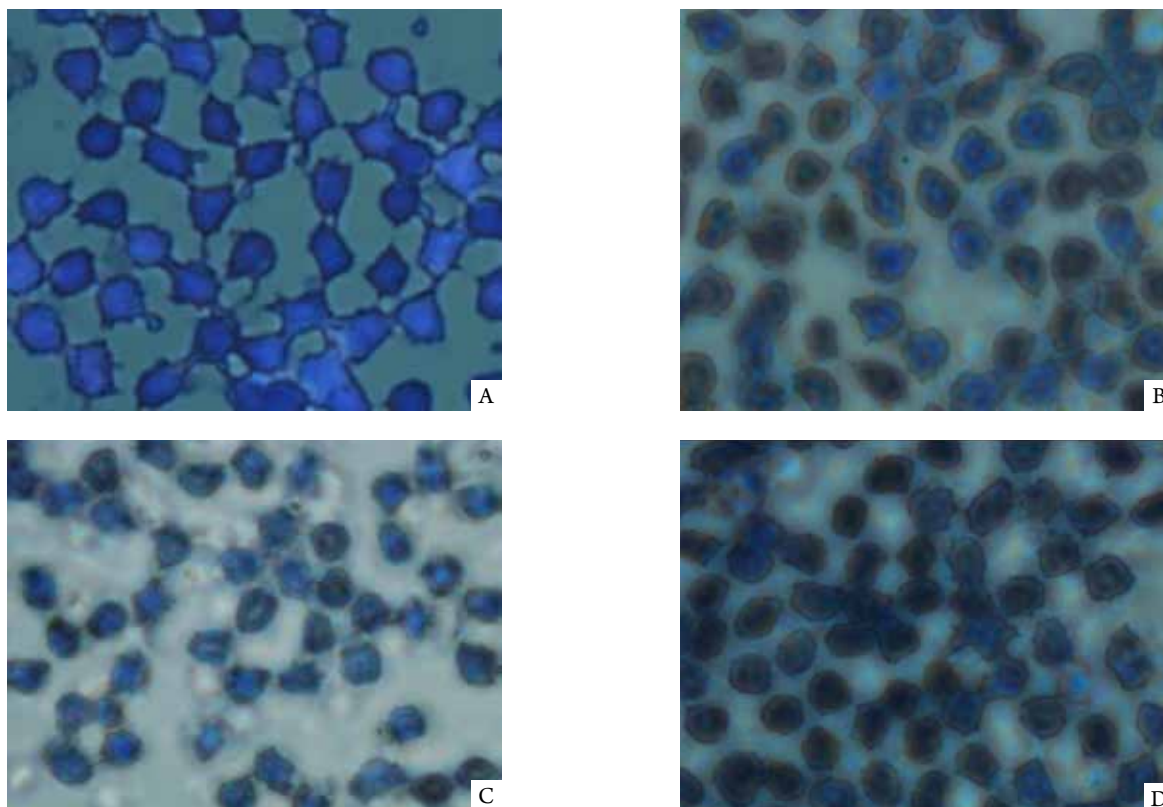


图 1 正常对照组和 RA 各组外周血淋巴细胞 *survivin* 表达 ($\times 400$)。A: 正常对照组; B: RA 初诊未治组; C: RA 治疗有效组; D: RA 难治组。

Figure 1 Immunohistochemistry staining showing the expression of *survivin* on peripheral blood lymphocyte of the 4 groups ($\times 400$). A: Healthy control group; B: Early untreated RA group; C: Effectively treated RA group; D: Refractory RA group.

3 讨论

RA 患者的滑膜细胞存在异常的凋亡过程, survivin 作为一种凋亡抑制基因, 与 RA 患者血清中 survivin 的表达对患者关节侵蚀度和治疗效果有一定的预测性, 其高表达与 RA 的骨侵蚀密切相关^[11-13]。本研究发现: 与正常对照组相比, RA 患者中 survivin 均呈过量表达, 提示 survivin 可能参与了 RA 的发病过程; 而初诊未治组患者 survivin 的表达明显高于治疗有效组, 提示甲氨蝶呤和 / 或来氟米特可能抑制 survivin 的表达, 促进细胞凋亡; RA 难治组 survivin 阳性表达率明显高于正常对照组和 RA 治疗有效组, 与初发未治组比较虽无统计学意义, 但有明显升高趋势, 提示骨侵蚀可能与 survivin 的高表达抑制滑膜细胞的程序性凋亡而出现滑膜异常增生和血管翳的形成有关, survivin 可能参与 RA 的耐药。其可能的机制为: survivin 主要抑制凋亡终末效应器 caspase-3 和 caspase-7 的活性或干扰 caspase-9 的活性, 阻断各种刺激诱导的下游细胞凋亡的共同通路, 导致凋亡耐受。RRA 患者外周血单个核淋巴细胞中 survivin 的过表达可能通过以上机制使外周血淋巴细胞、单核细胞的存活时间延长, 以使它们能够维持持续活化和浸润状态, 使 RA 产生凋亡耐受, 导致耐药。此外, survivin 启动子区域有 3 个 NF- κ B 的结合点, survivin 可通过诱导 TNF 受体介导的信号转导中核因子 NF- κ B 的活化, 降低 NF- κ B 抑制蛋白作用, 使细胞免于凋亡^[14]。本课题组前期关于 K562/AO2 细胞 NF- κ B 活性测定和 survivin 的表达研究结果显示 K562/AO2 耐药株的 NF- κ B 的活性和 survivin 的表达明显高于 K562(人红白血病多药耐药细胞系)非耐药细胞株^[15]。长期一定浓度的阿霉素杀伤白血病细胞(K562)的同时也活化 NF- κ B, 上调下游耐药、抗凋亡基因 p-gp, survivin 等的表达, 是 K562/AO2 耐药形成的机制之一^[16]。RA 的基础治疗药物如甲氨蝶呤既是 DMARDs 药, 也是抗肿瘤药, 而 RA 炎性滑膜生长活跃、代谢旺盛和具有侵袭性的特点, 与肿瘤组织的生长特点极其相似。推测在 RA 治疗过程中长期使用甲氨蝶呤(MTX), 在抑制活化的 T 淋巴细胞增殖的同时也激活了 NF- κ B, 上调 survivin 的表达, 导致耐药。

总之, 本研究证实 RA 患者外周血淋巴细胞 survivin 呈过量表达, 甲氨蝶呤、来氟米特在治疗 RA 的同时, 可诱导患者外周血淋巴细胞上的 survivin 表达升高, survivin 可能参与 RA 的发病过程以及与难治性 RA 多药耐药有关, 是难治性 RA 多药耐药的形成机制之一。

参考文献

1. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene Survivin expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.
2. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(1): 61-70.
3. Frank A, Sibylla M, Shida Y, et al. Inflammation-associated cell cycle in dependent block of apoptosis by survivin interminally differentiated neutrophils[J]. *Exp Med*, 2004, 199(10): 1343-1354.
4. Cheung CH, Chen HH, Kuo CC, et al. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers[J]. *Mol Cancer*, 2009, 8(1): 43.
5. 任彬, 杨敏. 云克治疗难治性类风湿性关节炎32例临床观察[J]. *黑龙江医学*, 2008, 12(35): 928-929.
REN Bin, YANG Min. Clinical observation on refractory rheumatic arthritis treated with Yunke[J]. *Helongjiang Medical Journal*, 2008, 12(35): 928-929.
6. Kurosaka D, Hirai K, Nishioka M, et al. Correlation between synovial blood flow signals and serum vascular endothelial growth factor levels in patients with refractory rheumatoid arthritis[J]. *Mod Rheumatol*, 2009, 19(2): 187-191.
7. Starovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, 65(1): 95-106.
8. 刘继红, 李卫东, 林志彬. 类风湿关节炎细胞凋亡的研究现状[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2003, 8(2): 232-236.
LIU Jinhong, LI Weidong, LIN Zhibin. Advances in study of fibroblast apoptosis in rheumatoid arthritis[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2003, 8(2): 232-236.
9. Isgren A, Forslind K, Erlandsson M, et al. High survivin levels predict poor clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2012, 41(5): 652-657.
10. Yin Q, Shen J, Chen L, et al. Overcoming multidrug resistance by 10-delivery of Mdr-1 and survivin-targeting RNA with reduction-responsible cationic poly (β -amino esters)[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(27): 6495-6506.
11. Svensson B, Hafstrom L, Forslind K, et al. Increased expression of proto-oncogene survivin predicts Joint destruction and persistent disease activity in early rheumatoid arthritis[J]. *Ann Med*, 2010, 42 (1): 45-54.
12. Ahn JK, Oh JM, Lee J, et al. Increased extracellular survivin in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: fibroblast-like synoviocytes as a potential source of extracellular survivin[J]. *Inflammation*, 2010, 33(6): 381-388.
13. Bokarewa M, Lindblad S, Bokarewa D, et al. Balance between survivin, a key member of the apoptosis inhibitor family and its specific antibodies determines erosivity in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res*

Ther, 2005, 7(2): R3492-3581.

14. Che XF, Zheng CL, Owatari S, et al. Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines[J]. Blood, 2006, 107(12): 4880-4887

15. 陈进伟, 骆容, 张广森, 等. K562/AO2 耐药细胞NF-κB活性测定及葛根素部分逆转耐药效应的初步研究[J], 中华血液学杂志, 2006, 27(7): 482-484.

CHEN Jinwei, LUO Rong, ZHANG Guangsen, et al. Detection of NF-κB activity on K562/AO2 cells and effect of puerarin in reversing the multidrug resistance of K562/AO2 cell[J]. Chinese Journal of Hematology, 2006, 27(7): 482-484.

16. 陈进伟, 陶师, 骆容. Puerarin逆转K562/AO2耐药的分子机制[J]. 中南大学学报: 医学版, 2008, 3(33): 216-221.

CHEN Jinwei, TAO Shi, LUO Rong, et al. The Puerarin suppresses

K562 and K562/AO2 cells growth and reverse the multidrug resistance of K562/AO2[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2008, 3(33): 216-221.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 陈进伟, 刘明, 毛妮, 曾艳. Survivin 在类风湿关节炎中的表达及意义[J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(2): 186-190. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.02.013

Cite this article as: CHEN Jinwei, LIU Ming, MAO Ni, ZENG Yan. Expression of survivin in rheumatoid arthritis[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2013, 38(2): 186-190. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.02.013

本刊常用词汇英文缩写表

从 2012 年第 1 期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	纤连蛋白	FN
Toll 样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心电图	ECG
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	心脏监护病房	CCU
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC 法	血管紧张素 II	AngII
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管内皮生长因子	VEGF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC 法	血管性血友病因子	vWF
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血红蛋白	Hb
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP 法	绿色荧光蛋白	GFP	血肌酐	SCr
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血尿素氮	BUN
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血小板	PLT
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血压	BP
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素 / 脂多糖	LPS	血氧饱和度	SO ₂
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	严重急性呼吸综合征	SARS
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮	NO
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	一氧化氮合酶	NOS
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙酰胆碱	ACh
二甲基亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒	HBV
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	异硫氰酸荧光素	FLTC
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	原位末端标记法	TUNEL
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	杂合性缺失	LOH
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	增强化学发光法	ECL
环氧化酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	肿瘤坏死因子	TNF
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	重症监护病房	ICU
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	转化生长因子	TGF
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	自然杀伤细胞	NK 细胞
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	Tbil
计算机 X 线断层照相技术	CT				