

非小细胞肺癌中 survivin、bcl-2 和 bax 蛋白与多药耐药基因的表达及其相关性

张娜,熊永炎,李莉

The Relationship between Expression of survivin, bcl-2, bax and Multidrug Resistance Gene in Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Na, XIONG Yong-yan, LI Li

Department of Pathology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding Author: XIONG Yong-yan, E-mail: Xiong 4409@hotmail.com

Abstract: **Objective** To investigate the expression of apoptosis proteins survivin, bcl-2, bax and the multidrug resistance (MDR) associated genes MDR1mRNA, MRPmRNA in non-small cell lung cancer (NSCLC), their relationship and significance. **Methods** The expression of MDR1mRNA and MRPmRNA in 113 NSCLC specimens were detected by in situ hybridization, and the expression of survivin, bcl-2 and bax in the same specimens were detected by immunohistochemistry. **Results** The positive rates of 113 NSCLC samples for MDR1 mRNA, MRP mRNA, survivin, bcl-2 and bax were 51.3%, 80.5%, 79.6%, 59.3% and 54.9%, respectively. The correlation was observed among the expression of survivin, bax and carcinoma cell differentiation ($P < 0.05$). The expression of bcl-2 was associated with histological types ($P < 0.05$). The expressions were significantly related between MDR1mRNA and MRPmRNA ($P < 0.01$), survivin and MDR1mRNA ($P < 0.01$), bcl-2 and MRPmRNA ($P < 0.05$). **Conclusion** The high expression of survivin and overexpression of bcl-2 may be important causes of primary multidrug resistance in NSCLC. It's important to detect survivin and bcl-2 for clinical reversing MDR of NSCLC.

Key words: Lung carcinoma; MDR; Apoptosis; In situ hybridization; Immunohistochemistry

摘要: **目的** 检测非小细胞肺癌(NSCLC)中凋亡蛋白 survivin、bcl-2、bax 与多药耐药有关基因 MDR1mRNA 和 MRPmRNA 的表达,探讨其相互关系及意义。**方法** 选取 113 例 NSCLC 病例,采用原位分子杂交检测 MDR1 和 MRP 基因 mRNA 的表达,SP 免疫组化法检测 survivin、bcl-2、bax 蛋白的表达。**结果** 113 例 NSCLC 中,MDR1mRNA、MRPmRNA 及 survivin、bcl-2、bax 蛋白的检出率分别为 51.3%、80.5%、79.6%、59.3%、54.9%。survivin 和 bax 的表达与肿瘤分化程度有关($P < 0.05$),bcl-2 的表达与肿瘤组织学类型有关($P < 0.01$)。MDR1mRNA 与 MRPmRNA ($P < 0.01$)、survivin 与 MDR1mRNA ($P < 0.05$)、bcl-2 与 MRPmRNA ($P < 0.05$) 表达之间存在明显相关性。**结论** 凋亡抑制蛋白 survivin 的高表达和 bcl-2 的过表达可能是导致 NSCLC 原发耐药的重要因素,检测 survivin 和 bcl-2 对临床逆转 NSCLC 多药耐药性具有指导意义。

关键词: 肺肿瘤;多药耐药;细胞凋亡;原位杂交;免疫组织化学

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)03-0168-03

0 引言

多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是影响非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)化疗效果的主要原因。大量研究表明,多药耐药机制是多因素作用、多基因改变的复杂过程。

近年来,除经典的耐药途径外,细胞凋亡抑制与多药耐药的关系日益受到重视。本实验选取了 113 例未经治疗的 NSCLC 病例,用原位杂交法检测 MDR1 和 MRPmRNA 的表达,SP 免疫组化法检测 3 种凋亡相关蛋白(survivin、bcl-2 和 bax)的表达,旨在观察 NSCLC 中多药耐药与细胞凋亡的关系并进一步探讨多药耐药产生的其他机制。

1 资料与方法

1.1 资料

收集武汉大学中南医院病理科 1996~2000 年间手术切除并经病理确诊的 NSCLC 共 113 例,所

收稿日期:2005-03-23;修回日期:2005-08-10

基金项目:湖北省科技攻关计划资助项目(2002AA304B13);湖北省自然科学基金资助项目(2002AB145)

作者单位:430071 武汉大学中南医院病理科

通讯作者:熊永炎, E-mail: Xiong 4409@hotmail.com

作者简介:张娜(1980-),女,硕士,主要从事肿瘤病理研究

有病例术前均未经放化疗。其中男性 91 例,女性 22 例。年龄 34~77 岁,均龄 56 岁。鳞癌 39 例,腺癌 61 例(含细支气管肺泡癌 16 例),腺鳞癌 13 例。高分化 43 例,中分化 47 例,低分化 23 例。根据 1997 年肺癌国际分期修正系统公布的 TNM 分期标准, 期 52 例, 期 26 例, 期 11 例, 期 1 例, 23 例无记录。有淋巴结转移者 37 例,无淋巴结转移者 53 例,23 例无记录。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色切片用于 NSCLC 组织学分类及分化程度、转移状态的判断。

1.2.2 原位杂交所用地高辛标记 MDR1、MRP 寡核苷酸探针及检测试剂盒购于武汉博士德生物公司,其操作按试剂盒说明书进行,以阳性片作阳性对照,PBS 代替杂交液作阴性对照。

1.2.3 SP 免疫组化染色按试剂盒说明操作,所用兔抗人 survivin 多克隆抗体、鼠抗人 bcl-2 和 bax 单克隆抗体购于福州迈新生物公司,均为即用型。以已知阳性片作阳性对照。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

原位杂交染色中 MDR1 和 MRPmRNA 以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞。免疫组化染色中 survivin、bcl-2 和 bax 以胞浆呈棕黄色为阳性细胞。每例取 10 个高倍视野(×400),每个视野计数 100 个细胞,计算阳性细胞所占百分比。阳性细胞数 5% 为阳性表达,<5% 为阴性表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件分析数据,结果采用 ² 检验。 $P < 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 NSCLC 中 MDR1 mRNA 和 MRP mRNA 的表达及相互关系

113 例 NSCLC 中,MDR1 mRNA 阳性表达率为 51.3% (58/113),MRPmRNA 阳性表达率为 80.5% (91/113)。二者表达与肿瘤组织学类型、分化程度、TNM 分期和有无淋巴结转移等临床病理因素均无明显关系 ($P > 0.05$),但二者表达之间具有显著相关性 ($\chi^2 = 13.72, P < 0.01$),见表 1。

2.2 3 种凋亡相关蛋白的表达及相互关系

2.2.1 113 例 NSCLC 中 survivin、bcl-2 和 bax 蛋白的阳性表达率分别为 79.6% (90/113)、59.3% (67/113) 和 54.9% (62/113)。

2.2.2 survivin 和 bax 蛋白的表达与肿瘤细胞分化程度明显相关 ($\chi^2 = 6.74, P < 0.05$; $\chi^2 = 16.39, P$

表 1 113 例 NSCLC 中 MDR1 和 MRP mRNA 表达之间的关系

MDR1 mRNA	MRP mRNA		合计
	+	-	
+	55	3	58
-	36	19	55
合计	91	22	113

< 0.01)。survivin 表达随着肿瘤分化程度的降低而递增,bax 表达则呈相反趋势。2 种蛋白表达与肿瘤组织学类型、TNM 分期和有无淋巴结转移之间均无明显相关 ($P > 0.05$)。

2.2.3 bcl-2 蛋白在不同组织学类型肿瘤中的表达顺序依次为鳞癌 > 腺鳞癌 > 腺癌,差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 13.06, P < 0.01$)。但 bcl-2 与肿瘤分化程度、TNM 分期和有无淋巴结转移之间差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

2.2.4 survivin、bcl-2 和 bax 蛋白三者表达之间未见明显相关 ($P > 0.05$)。

2.3 多药耐药基因与凋亡相关蛋白表达间的关系

2.3.1 survivin 蛋白与 MDR1 mRNA 的表达之间呈显著正相关 ($\chi^2 = 6.15, P < 0.05$),survivin 阳性表达率在 MDR1 mRNA 阳性组中较高,见表 2,其表达与 MRP mRNA 表达间无相关性 ($P > 0.05$)。

表 2 113 例 NSCLC 中 survivin 和 MDR1 mRNA 表达之间的关系

survivin	MDR1		合计
	+	-	
+	52	38	90
-	6	17	23
合计	58	55	113

2.3.2 bcl-2 与 MRP mRNA 表达之间存在明显正向关系 ($\chi^2 = 4.64, P < 0.05$),在 bcl-2 呈阳性表达的病例中,MRP mRNA 也多数呈阳性表达,见表 3,其表达与 MDR1 mRNA 表达间无相关性 ($P > 0.05$)。

表 3 113 例 NSCLC 中 bcl-2 和 MRP mRNA 表达之间的关系

bcl-2	MRP		合计
	+	-	
+	49	18	67
-	42	4	46
合计	91	22	113

2.3.3 bax 表达与多药耐药基因 MDR1 mRNA、MRPmRNA 表达之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

NSCLC 原发性耐药是治疗中的棘手问题,其产生涉及多种复杂过程。MDR1 和 MRP 编码的膜糖蛋白介导的药物外排泵是传统的耐药机制。细胞凋亡抑制参与多药耐药形成是近年来研究的热点问题。许多抗肿瘤药物是细胞凋亡的诱导剂,其效应可能主要是触发了肿瘤细胞程序化死亡通路。凋亡有可能是大多数化疗药物作用的最终共同途径,肿瘤细胞的耐药可能是细胞凋亡的抑制。survivin 是目前所知的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中最小的成员,也是迄今发现的最强的凋亡抑制因子之一。研究发现,survivin 普遍表达于大多数肿瘤细胞,但在成人组织一般不表达或低表达。在有丝分裂中,survivin 特异地结合 caspase-3 和 caspase-7,直接抑制后两者的活性,阻断细胞的凋亡过程^[1]。Olie 等^[2]用 survivin 的反义寡核苷酸导入肺腺癌 A549 细胞中,封闭 survivin 基因的表达,发现肺癌细胞对化疗药物诱导的细胞凋亡敏感性增加。Joseph 等^[3]报道,survivin 能降低肺癌细胞对化疗的敏感性。在胰腺癌^[4]、白血病^[5]和卵巢癌^[6]等恶性肿瘤中也证实 survivin 的高表达与肿瘤细胞的耐药有关。本组 NSCLC 中 survivin 的阳性率为 79.6%,并与 MDR1 mRNA 的表达之间呈显著正相关,提示 survivin 高表达可能是 NSCLC 患者对初次化疗不敏感的原因之一。从分子水平分析,survivin 基因位于染色体 17q25,MDR1 基因位于染色体 7q21,两基因位点并不一致,推测在肿瘤细胞内,二者之间可能存在转录活化的协同诱导机制,促使这两个基因产物共同表达。

bcl-2 和 bax 属于同一基因家族,在细胞凋亡通路上起正负调节作用,二者的比率被认为是调节凋亡易感性的重要因素。有研究发现 bcl-2 蛋白过表达参与 NSCLC 中 MDR 形成。可能由于肿瘤细胞中 bcl-2 蛋白表达量增加,导致凋亡阻断作用过强,因此抑制了药物诱导的细胞凋亡,同时也降低了细胞对化疗药物的敏感性^[7]。本组 NSCLC 中 bcl-2 蛋白表达率为 59.3%,且其表达与 MRP mRNA 表达呈正向关系,显示 bcl-2 可能是通过介导 MRP mRNA 的高表达,成为参与 NSCLC 原发耐药的重

要因素之一,二者之间具体的调节机制仍有待于深入研究。bax 通过抑制 bcl-2 而致细胞凋亡,其是否与肺癌耐药有关仍有不同看法。本研究中 bax 与 MDR1 mRNA、MRP mRNA 表达无关,推测 bax 可能不是影响 NSCLC 原发耐药的因素。本文结果还提示,MDR1 mRNA 和 MRP mRNA 在不同组织学类型、分化程度、TNM 分期和淋巴结转移状态的 NSCLC 中的表达差异无显著性,但 survivin 和 bax 的表达与肿瘤分化程度有关,bcl-2 与组织学类型有关,检测它们的表达,对判断肿瘤的发展及其转归有一定的价值。

NSCLC 原发性多药耐药的形成机制是一个复杂的体系。本研究结果显示,凋亡抑制蛋白 survivin 的高表达和 bcl-2 的过表达可能是导致 NSCLC 原发耐药的重要因素,检测 survivin 和 bcl-2 的阳性率对临床逆转 NSCLC 多药耐药性具有一定指导意义。

参考文献:

- [1] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and 7[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117-1123.
- [2] Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11): 2805-2809.
- [3] Joseph B, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Role of apoptosis in the response of lung carcinomas to anti-cancer treatment[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 926: 204-216.
- [4] Sarela AL, Verbeke CS, Ramasdale J, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(6): 886-892.
- [5] Wang L, Zhang GM, Feng ZH. Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60/ADR cell line[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(12): 1235-1240.
- [6] 张淑兰, 姜涛, 林蓓, 等. 卵巢癌细胞系 CAOV3 体外化疗后 survivin mRNA 表达的变化[J]. *中华妇产科杂志*, 2004, 39(7): 482-485.
- [7] 王洁, 刘叙仪, 蒋薇, 等. 非小细胞肺癌耐药相关基因表达与细胞凋亡相关性及其临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2001, 28(1): 14-17.

[编辑: 贺文]