

非小细胞肺癌中 survivin 蛋白的表达及其与 p53 表达的关系

王 静¹, 杨继要², 石 敏¹, 吴逸明³, 吴拥军³

Expression of survivin Protein and Its Relationship with Expression of p53 Protein in Non-Small Cell Lung Carcinoma

WANG Jing¹, YANG Ji-yao², SHI Min¹, WU Yi-ming³, WU Yong-jun³

1. Department of Respiration, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Histology and Embryology, Basic Medical College; 3. Department of Labor Health, College of Public Health

Corresponding Author: Wu Yi-ming, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

Abstract :Objective To study the expression of survivin and its relationship with the clinical pathological features of the NSCLC (non-small cell lung carcinoma). **Methods** The expression of survivin, p53 protein was detected in 80 cases of NSCLC tissues and 20 cases of normal lung tissue by immunohistochemical Streptavidin Peroxidase (SP) method. **Results** survivin was expressed in 49 of 80 (61.3%) cases of lung carcinoma and in 0 of 20 (0) cases of normal lung tissues with the expression of survivin in lung carcinoma significantly higher than that in normal lung tissues ($P < 0.05$). The positive rate of survivin in stage ~ was significantly higher than that of survivin in stage ~ ($P < 0.05$); There was no relationship between survivin gene expression and histological subtypes, differentiation, TNM stages, lymph node metastasis ($P > 0.05$), There is the positive correlation existing in the expression of Survivin, mutation-P53 in lung carcinoma. **Conclusion** survivin with only expression in the cancer tissues, not in benign lung tissues, may play an important role in lung carcinogenesis and be identified as a definite diagnostic marker and a potential therapeutic target in NSCLC. Cooperative high expression of survivin and mutation-P53 in lung cancer tissues may make lung cancer develop quickly.

Key words: NSCLC; survivin; p53; Expression

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌组织中 survivin 蛋白的表达与临床病理特征的关系及其与 p53 表达的相关性。方法 采用免疫组化的链霉菌抗生物素过氧化酶法 (Streptavidin Peroxidase, SP) 检测 80 例 NSCLC 组织和 20 例正常肺组织中 survivin、p53 蛋白表达情况。结果 80 例非小细胞肺癌组织中 survivin 蛋白阳性例数 49 例,表达率为 61.3%,在肺良性病变组织中,未阳性表达,两组比较差异有显著性 ($P < 0.05$);在 III~IV 期肺癌组织中 survivin 蛋白阳性表达率显著高于 I~II 期肺癌组织 ($P < 0.05$),而与组织学分型、分化程度、淋巴结转移与否无关 ($P > 0.05$);survivin、突变型 p53 蛋白在肺癌组织中的表达呈正相关。结论 survivin 蛋白表达与肺癌的 TNM 分期密切相关,有可能成为判断病情和评价预后后的指标,survivin 有望成为肺癌诊断的肿瘤标志物及基因治疗的新靶点;survivin、突变型 p53 蛋白在肺癌组织的协同高表达可能促使肺癌病情的恶性发展。

关键词:非小细胞肺癌; survivin; p53; 表达

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)05-0328-03

0 引言

本实验采用免疫组化方法,比较了正常肺组织

和肺癌组织中 survivin、p53 表达的差异,探讨 survivin 与非小细胞肺癌的组织学分型、分化程度、淋巴结转移的关系及其与 p53 表达的相关性,为今后可能以 survivin 基因作为靶点对非小细胞肺癌对进行基因治疗和预后评价提供理论依据。

收稿日期: 2005-04-14; 修回日期: 2006-03-15
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571552); 河南省科技攻关资助项目 (04244100083)

作者单位: 1. 450052 郑州大学第一附属医院呼吸内科, 2. 基础医学院组织学与胚胎学教研室, 3. 公共卫生学院

通讯作者: 吴逸明, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

作者简介: 王静 (1958-), 女, 在读博士, 教授, 主要从事呼吸内科临床及肺癌发病机制的研究工作

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集郑州大学第一附属医院 2001~2003 年手

术切除并经病理确诊的非小细胞肺癌(NSCLC)标本 80 例,年龄 33 ~ 79 岁,平均年龄 56.15 ± 9.09 岁,其中小于 56 岁组 30 例,大于或等于 56 岁组 50 例;鳞癌 45 例,其中高分化鳞癌 16 例,中分化鳞癌 15 例,低分化鳞癌 14 例;腺癌 35 例,其中高分化腺癌 25 例,低分化腺癌 10 例。临床分期:依据 1997 年国际抗癌联盟(UICC) TNM 分期标准^[1], + 期 30 例, + 期 50 例有淋巴结转移 44 例,无淋巴结转移 36 例。另取 20 例正常组织(肺结核 7 例,支气管扩张症 7 例,肺炎性假瘤 6 例)作对照。

1.2 方法

采用链霉菌抗生物素过氧化酶(Streptavidin-Peroxidase, SP)免疫组化法。按 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)操作说明进行试验,所有样本经 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,制成厚 4μm 的切片,60 °C 烘烤,脱蜡,3% 过氧化氢灭活内源性过氧化酶,微波修复抗原,10% 非免疫血清封闭,加入 1:50 稀释的兔抗人 survivin 多克隆抗体(美国 Neomarkers 公司)和鼠抗人 p53 单克隆抗体(美国 Zymed 公司)4 °C 过夜孵育,PBS 冲洗,滴加 1:300 生物素标记二抗,室温下 30 min,冲洗,滴加 1:40 稀释的 SP 溶液,室温下 30 min,冲洗后 DAB(武汉博士德生物工程公司)显色,苏木素—伊红(HE)复染,封片。对照染色:免疫组化染色设阳性对照,以乳腺癌阳性标本作为阳性对照;阴性对照,以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.3 免疫组化结果判定及计数方法

survivin 蛋白阳性反应为淡黄至棕黄色颗粒,定位于胞浆;p53 阳性反应为棕黄色颗粒,定位于细胞核。survivin 蛋白阳性细胞的计数:按照 Sini-crop^[2]的标准作组织化学记分:H = N × I。若 H > 1 为阳性,若 H = 1 则为阴性。阳性细胞数记分(N) 5 个高倍视野阳性细胞数的百分率。共分 5 个等级:< 5.0%;5.0% ~ 25.0%;26.0% ~ 50.0%;51.0% ~ 75.0%;> 75.0%。着色强度记分(I):1 分—弱阳性(+);2 分—中度阳性(++);3 分—强阳性(+++)。p53 染色阳性细胞的计数方法:每例标本随机选取 10 个高倍镜视野,计数 1 000 个细胞,计算阳性细胞百分率。阳性细胞百分率 ≥ 25% 为阳性,< 25% 为阴性。阳性细胞不再进一步分级。

1.4 统计学分析

应用 SPSS10.0 统计分析软件,采用 χ^2 检验,Spearman 等级相关性分析,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性的判定标准。

2 结果

2.1 survivin 蛋白在肺癌和肺良性病变组织中的表达

survivin 蛋白的阳性反应为淡黄色颗粒,表达较强时呈棕黄色,主要定位于胞浆。肺癌组织的 survivin 蛋白阳性表达率为 61.3% (49/80),但在肺良性病变组织中,未见阳性染色,两组比较差异有显著性($\chi^2 = 24.020, P < 0.05$)。

2.2 survivin 蛋白表达与肺癌病理特征的关系

在 III ~ IV 期肺癌组织中 survivin 蛋白阳性表达率 72.0% 显著高于 I ~ II 期肺癌组织 43.3% ($P < 0.05$);在无淋巴结转移(N0)组和有淋巴结转移(N1、N2)组中的阳性表达率分别与肺癌组织学分型、分化程度无关($P > 0.05$),见表 1。

表 1 survivin 蛋白表达与肺癌病理特征的关系

病理特征	例数	survivin		阳性率 (%)	χ^2	P
		阳性例数	阴性例数			
组织学类型						
鳞癌	45	25	20	55.6	1.405	> 0.05
腺癌	35	24	11	68.6		
病理分级						
鳞癌						
高分化	16	8	8	50.0	0.662	> 0.05
中分化	15	8	7	53.3		
低分化	14	9	5	64.3		
腺癌						
高分化	25	18	7	72.0	0.477	> 0.05
低分化	10	6	4	60.0		
TNM 分期						
+	30	13	17	43.3	6.492	< 0.05
+	50	36	14	72.0		
淋巴结转移						
无	36(N0)	18	18	50.0	4.161	> 0.05
有	16(N1)	10	6	62.5		
	28(N2)	21	7	75.0		

2.3 肺癌组织中 survivin 蛋白与 p53 蛋白表达的关系

在 survivin 蛋白阳性表达的 49 例标本中,p53 蛋白阳性表达 37 例,其余 12 例阴性表达;在 survivin 蛋白阴性表达的 31 例标本中,p53 蛋白阳性表达 7 例,阴性表达 24 例;经统计学检验,二者呈正相关($r_s = 0.518, P < 0.05$)。

3 讨论

survivin 基因是一种新发现的凋亡抑制基因,其表达产物 survivin 蛋白是一个由 142 个氨基酸组成的分子量大约 16.2 KD 胞浆蛋白,在人类多种肿瘤中均有表达^[3]。本研究结果显示,survivin 在肺癌组织中表达显著高于肺良性病变组织($P < 0.05$)。提示 survivin 的表达与肺癌的发生有关,这

为 survivin 作为肺癌诊断的标志物提供了理论依据。survivin 蛋白表达与肺癌组织学类型、分化程度之间无明显关系。survivin 在淋巴结转移组表达率高于无淋巴结转移组,但经处理差异无统计学意义。而 survivin 蛋白表达与肺癌 TNM 分期显著相关:survivin 蛋白在 TNM 分期 ~ 期表达率 72.0% 显著高于 ~ 期表达率 43.3% ($P < 0.05$),造成这种结果的原因可能是样本数量不够大。综合文献^[3],提示 survivin 的阳性表达预示肿瘤有较高的侵袭性和不良预后,是判断肿瘤恶性程度、病情轻重及预后的指标。

survivin 的异常表达使细胞的正常凋亡机制受损,其可能机制为:(1)通过直接抑制 caspase-3 和 caspase-7 的活性从而阻止细胞凋亡进程进而导致肿瘤的发生、发展^[4,5];(2)间接抑制 caspase-3:survivin 蛋白与细胞周期素依赖性蛋白激酶-4 (cyclin-dependent kinase4, CDK4) 形成 survivin/CDK4 复合体,导致 p21 从 p21/CDK4 复合体中释放出来并和线粒体上的 procaspase-3,形成 procaspase-3/p21 复合物使 procaspase-3 不能活化,从而阻止细胞凋亡途径,同时,p21 的解离失去了对 CDK4 的抑制作用,促使 Cyclin-CDK4 复合物的形成,使细胞通过凋亡检查点进入 S 期,细胞进入增殖周期,最终导致大量细胞无限制增殖^[6]。因此,survivin 处于细胞增殖与凋亡通路中的关键位置,如果将 survivin 作为肿瘤基因诊断治疗的靶点,将从多个方面抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。而 p53 与 p21 基因转录关系密切,当 DNA 受损伤时,野生型 p53 (wt-p53) 大量增加并可促进 p21 基因转录,使 p21 蛋白合成增

多并结合 CDK4,抑制 Cyclin-CDK4 复合物的形成,使细胞停留在 G₁ 期,以便有足够的时间使损伤的 DNA 得以修复,如果修复失败,则 wt-P53 能够启动细胞凋亡程序,阻止 DNA 损伤细胞的继续分裂,从而阻止具有癌变倾向的细胞产生。为探讨 p53 与 survivin 在 NSCLC 中的关系,本研究检测了二者的表达,结果显示,突变型 p53 (mt-P53) 与 survivin 蛋白的表达呈正相关。推测在非小细胞肺癌发生的过程中 p53 基因突变可能打破了 wt-P53 对 survivin 蛋白表达的负反馈调节机制,从而使细胞凋亡受抑引起癌变,提示二者对肺癌的发生具有协同作用,联合检测此二种标记物对判断肺癌预后有一定价值。

参考文献:

- [1] 董克伟. 临床肿瘤学[M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社, 2002. 682-683.
- [2] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127-134.
- [3] Adida C, Crotty PL, Mograth S, et al. Developmentally regulated expression of the cancer anti-apoptosis gene Survivin in human and mouse differentiation[J]. Am J pathol, 1998, 152(1): 43-49.
- [4] Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, et al. Aberrant expression of caspase cascade regulatory gene in adult T-cell Leukemia: Survivin is an important determinant for prognosis[J]. Br J Haematol, 2001, 114(1): 63-69.
- [5] 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.
- [6] 徐咏莲, 刘少阳, 江大琼. 宫颈癌中 survivin 的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(3): 145-147.

[编辑:刘红武]