

凋亡抑制蛋白 survivin 与子宫腺肌瘤关系的研究

刘萍¹, 罗新^{2*}, 史玉霞¹

The Relativity of survivin and Adenomyosis

LIU Ping¹, LUO Xin^{2*}, SHI Yu-xia¹

1. Department of Obstetrics and Gynaecology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Department of Obstetrics and gynaecology, The First Affiliated Hospital of Jilin University (* Corresponding Author)

Abstract: Objective To investigate the expression of survivin in normal human endometrium, and adenomyosis in order to study the function and relative of apoptosis, cell proliferation and angiogenesis in the course of adenomyosis. **Methods** Specimens of normal endometrium, ectopic endometrial tissue and endometrial tissue in adenomyosis were obtained for immunohistochemical survivin, PCNA and endoglin analyses. **Results** The expression of survivin and microvessel density in ectopic endometrial tissue of adenomyosis was significantly higher than that of normal endometrium and endometrial tissue in adenomyosis ($P < 0.01$), survivin expression was significantly associated with endoglin expression in endometrium of proliferative phase and secretory phase ($r = 0.612$, $P < 0.01$). **Conclusion** The overexpression of survivin and survivin-collected apoptosis and angiogenesis mechanism might play a pathogenic role in the development of adenomyosis.

Keywords: Adenomyosis; survivin; Inhibitor of apoptosis protein; Angiogenesis

摘要:目的 探讨凋亡抑制蛋白 survivin 在子宫腺肌瘤在位内膜、异位内膜的表达, 研究以 survivin 为核心的细胞凋亡、增殖及血管生成机制与子宫腺肌瘤发病的相关性。方法 采用免疫组化法检测子宫腺肌瘤在位内膜、异位内膜及正常对照组内膜中 survivin, PCNA, endoglin 蛋白表达。结果 子宫腺肌瘤异位内膜组 survivin 蛋白的表达和微血管密度显著高于在位内膜组和异位内膜组 ($P < 0.01$), 增殖期内膜、分泌期内膜 survivin 蛋白表达与 endoglin 蛋白表达呈显著相关性。结论 survivin 的过度表达可能参与了子宫腺肌瘤的发病过程, 以其为核心的细胞凋亡和血管生成机制与子宫腺肌瘤的发病关系密切。

关键词: 子宫腺肌瘤; survivin; 凋亡抑制蛋白; 血管生成

中图分类号: R737.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)07-0400-03

0 引言

子宫内膜异位性疾病是一种良性疾病, 但具有局部播散、远处转移的恶性行为。子宫腺肌瘤是内膜异位性疾病之一, 是指具有生长功能的子宫内膜和间质侵入子宫肌层, 但其病因至今不明。近年来研究表明, 细胞凋亡及血管生成可能在子宫内膜异位症及子宫腺肌瘤的发病过程中起重要作用。survivin (SVV) 作为凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的一个新成员, 越来越受到学者们的重视。SVV 选择性的表达于常见恶性肿瘤, 而在癌旁正常组织和成人分化组织中不表达, 是一个肿瘤特异性的凋亡抑制因子。国外对于 SVV 与良性疾病的相关性研究较少, 而 SVV 与子宫腺肌瘤关

系的研究尚未见报道。本研究探讨 SVV 蛋白在子宫腺肌瘤的表达, 研究以 SVV 为核心的细胞凋亡、细胞增殖及血管生成机制在子宫腺肌瘤发病过程中的作用及其相关性, 其中细胞增殖指标选用增殖细胞核抗原 (proliferative cell nuclear antigen, PCNA), 血管生成指标选用 endoglin。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2002 年 8 月 ~ 2003 年 5 月在我院妇产科因子宫腺肌瘤行子宫切除的住院病人共 22 例, 收集其在位内膜及异位内膜, 两组分别有增殖期内膜 14 例, 分泌期内膜 8 例。对照组内膜取自因非内膜疾病而行刮宫及子宫切除术的患者共 16 例, 其中增殖期内膜 10 例, 分泌期内膜 6 例。所有病例平均年龄 (43.6 ± 6.3) 岁, 月经周期 26 ~ 35 天, 实验组与对照组在年龄、月经周期、孕产次、宫内操作次数方面均无显著性差异 ($P > 0.05$), 且术前 3

收稿日期: 2004-02-20; 修回日期: 2004-04-16

作者单位: 1. 430060 武汉大学人民医院妇产科; 2. 暨南大学附属第一医院妇产科 (* 通讯作者)

个月内无内分泌药物治疗、宫内节育器携带、妊娠及哺乳史,所有标本均以病理诊断作为诊断标准。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂 兔抗人多克隆抗体 SVVAb -6 (Cat.#AP -9003) 及鼠抗人单克隆抗体 endoglin (Cat.#AP -9006) 均购自美国 Neomarker 公司。即用型 PCNA 试剂盒 (MAB-0145) 及免疫组化 SP 试剂盒由福州迈新生物技术开发公司提供。

1.2.2 实验方法 免疫组化 SP 法按迈新公司提供的说明步骤进行。三组内膜经 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋,4μm 厚连续切片。经脱蜡、脱水及微波抗原修复后,分别以 SVV、PCNA 及 endoglin 抗体为一抗行免疫组化染色。实验中一抗除 PCNA 为即用型抗体外,SVV 与 endoglin 分别为 1:250 及 1:25 稀释度。实验以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知阳性片为阳性对照。

1.3 结果判定

1.3.1 免疫组化结果判定 SVV、PCNA、endoglin 的表达效应产物均为棕黄色或褐色颗粒。SVV 主要定位于胞浆,PCNA 分布于胞核,endoglin 分布于新生血管内皮细胞及上皮细胞的胞浆。用高清晰度彩色全自动细胞图象分析系统进行阳性细胞积分光度测定。

1.3.2 子宫内膜新生微血管密度 (MVD) 参照 Weidner 等^[1] 微血管密度计数方法,并加以改进,先在低倍视野内 (40 ×, 100 ×) 选取微血管密度最高的区域,然后在高倍视野内 (400 ×) 计数微血管数目,凡在内膜组织中与临近微血管、腺体组织分界清楚的任何一个染色呈棕色的细胞或细胞丛均被认为是一个新生血管,只要结构不相连,其分支结构也作为一个血管计数,管腔结构形成并不作为判定微血管的必要条件。分辨不清或染色模糊的细胞不计入计数结果。两名病理医生采用双盲法分别对同一切片计数,取两者计数中较高的数据作为该切片的 MVD。对照组在子宫内层内或子宫内层与肌层交界处选择血管染色集中部位计数 MVD。

1.4 统计学分析 多组均数比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。所有数据均输入 SPSS 11.0 软件包分析。

2 结果

2.1 子宫腺肌瘤异位组、在位组及正常对照组内膜中 SVV 的表达

SVV 在 3 组内膜中均有表达,主要表达于内膜腺上皮细胞的胞浆中,切片经高清晰度彩色全自动细胞图象分析系统进行半定量测定后,SVV 在各组

内膜中表达的积分光度值见表 1,各数值均用均数 ± 标准差表示。经统计学分析,子宫腺肌瘤异位内膜中 SVV 的表达显著高于在位内膜及正常内膜 ($P < 0.05$),且这种表达的差异主要体现在增殖期子宫内膜 ($P < 0.05$),而在位内膜与正常内膜比较,SVV 差异无显著性意义 ($P > 0.05$),见图 1~3。

表 1 异位组、在位组和正常组子宫内膜 SVV 的表达

	异位组	在位组	正常组
增殖期	0.41 ± 0.09	0.17 ± 0.11 *	0.14 ± 0.08 *
分泌期	0.20 ± 0.04	0.22 ± 0.07	0.30 ± 0.07
总计	0.33 ± 0.13	0.19 ± 0.10 *	0.20 ± 0.11 *

* 与异位组内膜比较, $P < 0.05$

2.2 子宫腺肌瘤异位组、在位组及正常对照组内膜中 PCNA 的表达

PCNA 在子宫腺肌瘤异位内膜和在位内膜中的表达低于正常对照组内膜 ($P < 0.05$),且这种表达的差异主要体现在分泌期子宫内膜 ($P < 0.05$),而增殖期内膜 PCNA 的表达无显著性差异。腺肌病异位内膜与在位内膜比较,PCNA 表达的差异无显著性 ($P > 0.05$),见图 4; 积分光度值,见表 2。

表 2 异位组、在位组和正常组子宫内膜 PCNA 的表达

	异位组	在位组	正常组
增殖期	0.54 ± 0.12	0.50 ± 0.14	0.56 ± 0.06
分泌期	0.37 ± 0.13 *	0.47 ± 0.04 *	0.69 ± 0.01
总计	0.48 ± 0.15 *	0.49 ± 0.11 *	0.61 ± 0.08

* 与正常组内膜比较, $P < 0.05$

2.3 子宫腺肌瘤异位组、在位组及正常对照组内膜中 endoglin 的表达及 MVD 的变化

endoglin 是新生血管内皮细胞的特异性标记物,在本研究中主要表达于内膜间质及邻近子宫肌层中的新生血管内皮细胞及上皮细胞的胞浆,见图 5。在高倍镜下测定新生微血管密度 (MVD),结果表明,无论增殖期还是分泌期,子宫腺肌瘤异位内膜中新生微血管密度均显著高于在位内膜及正常内膜 ($P < 0.05$),而正常子宫内膜与腺肌病在位内膜新生微血管计数无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 异位组、在位组及正常对照组内膜中 MVD 的变化

	异位组	在位组	正常组
增殖期	27.07 ± 2.62	16.50 ± 2.18 *	13.80 ± 1.23 *
分泌期	18.25 ± 1.28	13.75 ± 1.39 *	13.17 ± 1.47 *
总计	23.86 ± 4.86	15.50 ± 2.32 *	13.56 ± 1.31 *

* 与异位组内膜比较, $P < 0.05$; 与正常组内膜比较, $P < 0.05$

2.4 SVV、PCNA 与 MVD 的相关性分析

SVV 阳性细胞积分光度值较高的组织,其新生微血管密度也较高,SVV 表达水平与 MVD 呈显著正相关($r = 0.612$, $P < 0.01$),而 PCNA 与 SVV 及 MVD 无显著相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

SVV 是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的一个新成员,能抑制细胞凋亡,促进细胞的增殖,参与调节细胞的有丝分裂,并可能参与血管生成^[2,3]。本研究采用 SVV 多克隆抗体,检测了子宫腺肌瘤在位组、异位组及正常组子宫内膜 SVV 的表达。Konno 等^[4]研究认为,异位内膜基质细胞 SVV 表达均为阴性,而本研究发现,不仅异位内膜,在位内膜、部分腺体周围基质细胞及血管内皮细胞胞浆中亦有 SVV 的表达。Jones 等^[5]报道 bcl-2 在基质细胞表达上调,可能阻止在位内膜细胞凋亡。因此,在位内膜基质细胞表达 SVV 可能拮抗 caspase-3 介导的细胞凋亡,并刺激异位内膜的生长,参与子宫腺肌瘤的发病过程。

在 PCNA 的表达上,于子宫内膜的增殖期,三组内膜 PCNA 的表达无显著性差异,而 Keshava 等^[6]研究子宫内膜异位症时发现,异位内膜 PCNA 的表达显著高于在位内膜,提示子宫腺肌瘤与子宫内膜异位症的细胞增殖特性不同。结合 SVV 的表达,表明子宫腺肌瘤异位内膜的细胞凋亡减弱,细胞增殖不受影响,使得异位内膜细胞的生存能力增强。

本研究表明,子宫腺肌瘤中,异位内膜新生微血管密度高于在位内膜和正常内膜,且于增殖期在位内膜血管化高于正常内膜,这与 Ota^[7]的报道一致,而 Schindl 等研究发现,子宫腺肌瘤中,微血管密度(MVD)在位内膜与正常内膜之间无差异,而异位内膜则高于在位内膜和正常内膜,且在月经周期中无改变^[8],以上其他学者进行的血管生成方面的研究是应用 VWF、CD34 等进行的,而 VWF、CD31、CD34 是所有血管内皮的标记物。Endoglin 不同于以上指标,其抗体优先结合于激活的内皮细胞和正在参与血管形成的内皮细胞,是新生血管内皮细胞的特异性标记物。虽然各研究的结论不尽相同,但均说明子宫腺肌瘤具有侵蚀过程所特有的血管增生特性。本研究还提示,这种血管增生特性及其与密

切相关的细胞凋亡抑制共同参与了子宫腺肌瘤的发病过程。

研究 SVV 相关的细胞凋亡、细胞增殖及血管生成机制与子宫腺肌瘤病因的关系,对于治疗该病具有良好的应用前景。因 SVV 在正常细胞分裂以后基本上不表达,只在肿瘤细胞发挥抑制凋亡的作用,这将使其成为治疗上特异性较强的潜在靶点。已有学者转染反义 SVV 足以诱导 HeLa 细胞、恶性黑色素瘤细胞的凋亡^[9,10]。在其他实体肿瘤,通过反义技术诱导肿瘤细胞凋亡在理论上可认为不损伤癌旁正常组织,很值得探索。

(本文图见封 3)

参考文献:

- [1] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1-8.
- [2] Chen J, Wu W, Tahir SK, et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits tyrosinase and anchorage-independent growth[J]. *Neoplasia*, 2000, 2(3): 235-241.
- [3] O'Connor DS, Schechner JS, Adid C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 393-398.
- [4] Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, et al. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium[J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(6): 529-534.
- [5] Jones RK, Searle RF, Bulmer N. A study of apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(12): 3496-3502.
- [6] Keshava N, Kim I, Mantione J, et al. Overexpression of CSF-1, its receptor and cell cycle genes in ectopic endometrial tissue compared to eutopic endometrial tissue[J]. *J Soc Gynecol Invest*, 1998, 5(suppl 1): 112.
- [7] Ota H, Igarashi S, Tanaka T, Morimoto T. Morphometric evaluation of uterine malvascularization in the endometrium in adenomyosis[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(3): 715-719.
- [8] Schindl M, Birner P, Obermair A, et al. Increased microvessel density in adenomyosis of the uterus[J]. *Fertil Steril*, 2001, 75(1): 131-135.
- [9] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene transfer[J]. *HBiol Ciem*, 1998, 273(18): 11177-11182.
- [10] Grossman D, McNiff JM, Li F, et al. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in non-melanoma skin cancer and in keratinocyte cell lines[J]. *Lab Invest*, 1999, 79(9): 1121-1126.

[编辑: 张麟; 校对: 周永红]

凋亡抑制蛋白 survivin 与子宫腺肌瘤关系的研究

(正文见 400 页)

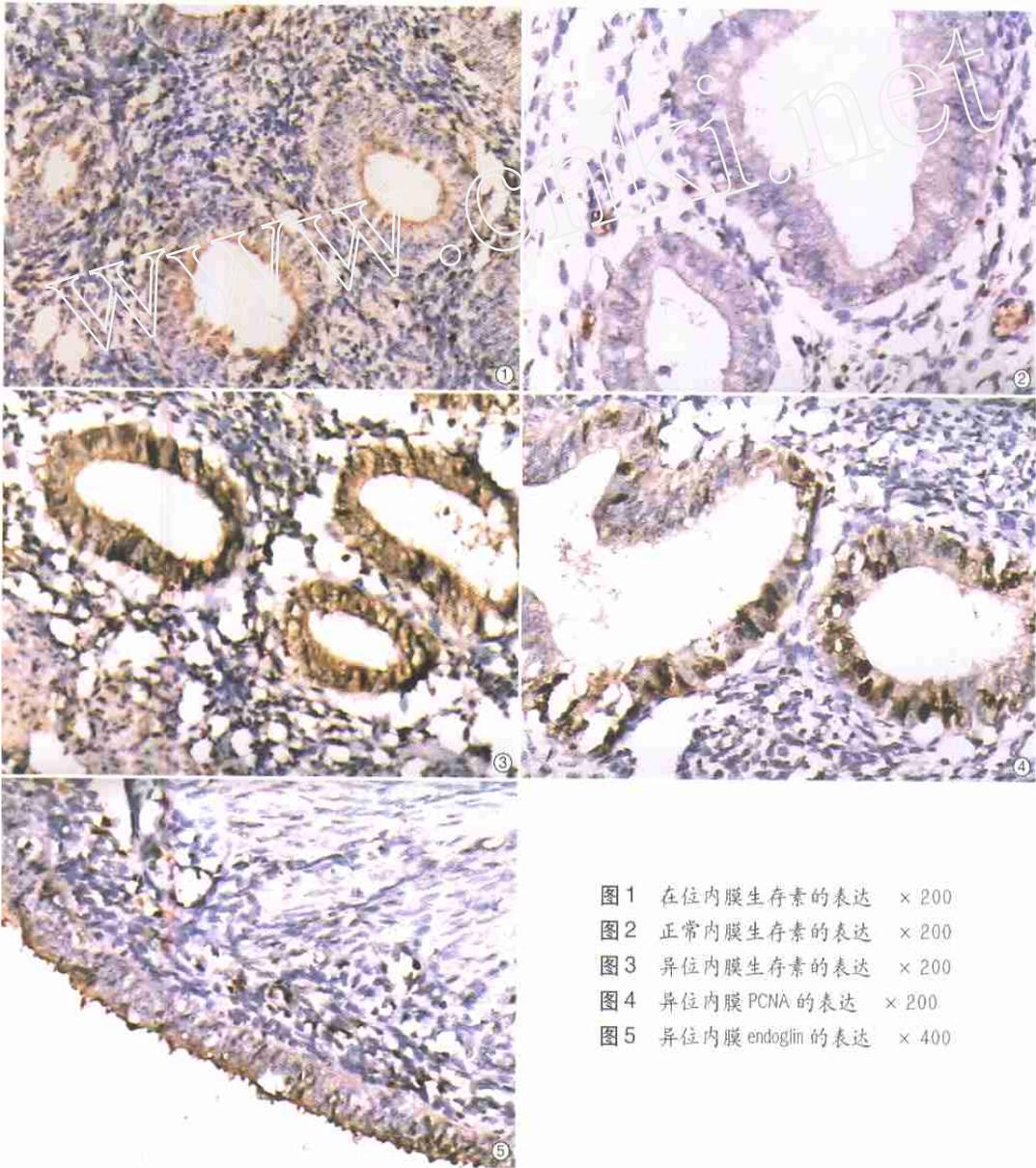


图 1 在位内膜生存素的表达 × 200

图 2 正常内膜生存素的表达 × 200

图 3 异位内膜生存素的表达 × 200

图 4 异位内膜 PCNA 的表达 × 200

图 5 异位内膜 endoglin 的表达 × 400