

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.07.009

消化道肿瘤原发灶及转移淋巴结 survivin、bcl-2 表达与化疗药敏性的关系

韩杰¹, 吕炳蓉¹, 檀碧波¹, 耿玮¹, 王安峰³, 赵建辉¹, 何春年²

Relationship between Expression of survivin, bcl-2 and Chemosensitivities in Lymph Node Metastases Compared with Gastrointestinal Primary Tumor

HAN Jie¹, LV Bing-rong¹, TAN Bi-bo¹, GENG Wei¹, WANG An-feng³, ZHAO Jian-hui¹, HE Chun-nian²

1. Department of Gastrointestinal Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China, 2. Department of Pathology; 3. Department of Oncology, The Third Hospital of Hebei Medical University

Abstract: Objective To investigate the relationship between expression of survivin or bcl-2 and chemosensitivities in lymph node metastases (LNMs) and gastrointestinal carcinomas. **Methods** The chemosensitivities of tumor cells to 11 drugs were measured by MTT assay, and expression of survivin and bcl-2 were determined immunohistochemically in 54 paired primary tumor (PT) and LNMs of gastrointestinal carcinomas. **Results** The low accordance (24.1%) in expression of survivin was observed between PT and LNMs ($k = -0.0634$, $P = 0.4392$). There was no significant difference in either expression of survivin or bcl-2 between PT and LNMs ($Z = 3.5, 9.5$; both $P > 0.05$). The expression of bcl-2 showed a positive correlation between LNMs and PT ($r = 0.5226$, $P < 0.05$). In PT, survivin expression showed positive correlation with bcl-2 ($r = 0.2937$, $P = 0.0311$). The inhibition rates of LNMs cells for HCPT, LOHP, CDDP, MTX and VCR were lower than those of PT ($t = -2.08 \sim -2.48$, all $P < 0.05$), and for higher VP-16, THP and MMC were detected ($t = 2.11 \sim 3.06$, all $P < 0.05$). There was statistically negative correlativity between expression of survivin and inhibition rates of PT for VCR ($r = -0.4135$, $P < 0.05$), and of LNMs for VP-16 and PTX ($r = -0.4061, -0.5127$; both $P < 0.05$) respectively. Expression of bcl-2 in PT was negative correlation with inhibition rates for 5-Fu and PTX ($r = -0.4715, -0.3965$; both $P < 0.05$), and also in LNMs for VP-16, HCPT, PTX, LOHP and eADM ($r = -0.4002 \sim -0.5644$; all $P < 0.05$). **Conclusion** The LNMs of gastrointestinal carcinomas are heterogeneous with respect to the expression of anti-apoptosis proteins and response to chemotherapy. Effective adjuvant chemotherapy in gastrointestinal cancers depends on targeting the metastatic component of the disease.

Key words: Gastrointestinal carcinomas; Lymph node metastases; Chemosensitivities; survivin; bcl-2

摘要:目的 探讨消化道肿瘤原发灶及转移淋巴结 survivin、bcl-2 表达的变化及其与化疗药敏性的关系。**方法** 对 54 例胃癌和结肠癌肿瘤组织、转移淋巴结分别进行细胞培养化疗药敏性实验及 survivin、bcl-2 免疫组化染色,对比研究两种病灶的实验结果。**结果** (1)原发、转移灶 survivin 表达一致率较低,为 24.1% ($k = -0.0634$, $P = 0.4392$); survivin、bcl-2 在原发灶与转移淋巴结间表达强度无明显差异 ($Z = 3.5, 9.5$, 均 $P > 0.05$); bcl-2 在原发灶与转移淋巴结中表达具有明显相关性 ($r = 0.5226$, $P < 0.05$), 原发灶中 survivin 与 bcl-2 表达具有正相关性 ($r = 0.2937$, $P = 0.0311$)。 (2) 11 种化疗药物对原发灶、转移灶肿瘤细胞的平均抑制率不同。HCPT、LOHP、CDDP、MTX、VCR 对转移淋巴结细胞抑制率均明显低于原发灶 ($t = -2.08 \sim -2.48$, 均 $P < 0.05$), VP-16、THP、MMC 对原发灶的抑制率明显低于转移灶 ($t = 2.11 \sim 3.06$, 均 $P < 0.05$)。 (3) 在原发灶及转移灶中, survivin 表达程度分别与 VCR 和 VP-16、PTX 的

抑制率呈负相关 ($r = -0.4135$ 及 $r = -0.4061, -0.5127$; 均 $P < 0.05$); 而 bcl-2 表达程度则分别与 5-Fu、PTX 和 VP-16、HCPT、PTX、LOHP、eADM 的抑制率呈负相关 ($r = -0.4715, -0.3965$ 及 $r = -0.4002 \sim -0.5644$; 均 $P < 0.05$)。 **结论** 消化道肿瘤淋巴结转

收稿日期:2008-06-10;修回日期:2008-10-29

基金项目:河北省科技计划基金资助项目(06276102D-73)

作者单位:1. 050051 石家庄, 河北省人民医院胃肠外科, 2. 病理科; 3. 河北医科大学第三医院放疗科

作者简介:韩杰(1962-),男,硕士,教授,主要从事胃肠外科临床及研究工作

转移灶在凋亡抑制蛋白表达程度及对化疗药敏性方面均呈现与原发灶不同的异质性,术后辅助化疗靶目标应针对淋巴结转移灶。

关键词: 消化道肿瘤; 转移淋巴结; 化疗药敏性; survivin; bcl-2

中图分类号: R735; R979.1 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2009)07-0571-04

0 引言

肿瘤细胞对凋亡的耐受是多药耐药(multidrug resistance, MDR)的一个新机制,许多化疗药物是通过损伤 DNA 或作用于凋亡相关基因、诱导肿瘤细胞凋亡而发挥作用,因此与细胞凋亡有关的基因与 MDR 密切相关。survivin、bcl-2 作为重要的凋亡抑制蛋白,被认为是新型耐药基因蛋白,其在肿瘤组织高表达与肿瘤对化疗药物的耐受有关^[1-3],但消化道肿瘤 survivin、bcl-2 表达与化疗耐药性关系的临床研究尚未见报道。由于肿瘤转移灶 MDR 相关因子的异质性表达可能是影响化疗疗效的重要原因^[4-5],为此本文对比研究了消化道肿瘤原发灶、淋巴结转移灶 survivin、bcl-2 表达的变化及其与化疗耐药性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2006 年 10 月~2007 年 6 月在我院手术并经病理证实伴淋巴结转移的消化道肿瘤病例 54 例,其中胃癌 34 例,大肠癌 20 例。男性 32 例,女性 22 例;年龄 22~80 岁,平均年龄 63.9 岁。所有病例术前均未接受放、化疗。每例肿瘤原发灶、相应淋巴结转移灶标本均经中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,经苏木精-伊红染色病理诊断。

1.2 免疫组化染色测定 survivin、bcl-2 表达

鼠抗人 survivin、bcl-2 单克隆抗体及免疫组化试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司(美国 Zymed 公司产品),采用 SP 法分别对肿瘤原发灶、转移淋巴结进行免疫组化染色,染色步骤严格按试剂盒说明书进行操作。用 PBS 代替一抗做阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。由两位病理医师分别双盲阅片进行结果判断。每张切片随机取 5 个高倍视野($\times 400$),每视野计数 100 个细胞,survivin、bcl-2 以细胞膜及(或)细胞质着黄色为染色阳性。按肿瘤细胞着色强度和阳性细胞率分别进行计分。着色强度计分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。阳性细胞率计分:阳性细胞 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为

2 分,51%~75%为 3 分, $\geq 76\%$ 为 4 分;两种计分所得分值的乘积为 1 表示阴性(-),2~3 为弱阳性(+),4~7 为阳性(++), ≥ 8 为强阳性(+++)。

1.3 肿瘤细胞培养化疗药敏性实验

术中标本离体后分别取新鲜肿瘤组织、转移淋巴结 1(~2) 枚各 1.0 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm 置入双抗(青霉素 G 钠 100 u/ml、链霉素 200 μ g/ml)培养液,2 h 内行原代细胞培养化疗药物敏感实验。转移淋巴结的诊断以术中清扫可疑肿大淋巴结中切取少许组织、冰冻切片诊断并经术后病理证实。肿瘤原发灶、转移淋巴结组织经研磨分散,用细胞分离器调细胞浓度为 5×10^5 /ml。培养前将肿瘤药敏检测板(泰伦生物公司专利产品 ZL03236962. X)和 DMEM 培养基预温至 37 $^{\circ}$ C。11 种受试药物为 5-氟尿嘧啶(5-Fu)、足叶乙甙(VP-16)、羟基喜树碱(HCPT)、紫杉醇(PTX)、奥沙利铂(LOHP)、顺铂(CDDP)、表阿霉素(eADM)、吡喃阿霉素(THP)、甲氨喋呤(MTX)、丝裂霉素(MMC)、长春新碱(VCR),药物终浓度为血浆峰值药物浓度^[6]。每种药物设立 3 个复孔,同时设不加药物的细胞对照组。接种细胞悬液 200 μ l/孔,微量振荡器振荡混匀,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱培养 48 h,加 MTT(5 mg/ml)20 μ l/孔,继续培养 3~24 h,依据显微镜下观察 MTT 还原形成兰色针状结晶终止培养。将细胞培养板 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,吸水纸吸去残留液体。加入 DMSO 100 μ l/孔,轻轻振荡混匀,酶标仪 570 nm 测各孔 A 值。用复孔吸光度平均值进行比较并计算肿瘤细胞平均抑制率(IR)。IR = (1 - 给药孔平均 A 值/对照组平均 A 值) $\times 100\%$ 。

1.4 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件分析实验数据。计量资料采用配对 *t* 检验、直线相关分析,等级资料采用一致性检验(kappa 检验)、Wilcoxon 秩和检验和 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤原发灶、转移灶中 survivin、bcl-2 表达的比较

bcl-2 在肿瘤原发灶、淋巴结转移灶中表达强度的一致率较高,为 46.3%(25/29)($k = 0.2627, P < 0.001$);而 survivin 在两者中表达强度的一致率较低,为 24.1%(13/41)($k = -0.0634, P = 0.4392$)。两种癌组织中 survivin 或 bcl-2 表达程度均无明显差异($Z = 3.5, Z = 9.5$; 均 $P > 0.05$)。

bcl-2 在肿瘤原发灶与转移淋巴结中表达具有相关性($r = 0.5226, P = 0.0074$),而 survivin 在二者间表达无明显相关性($r = 0.1572, P = 0.4531$)。在肿瘤原发灶, survivin 与 bcl-2 表达具有正相关性($r = 0.2937, P = 0.0311$),而转移灶中二种因子表达无明显相关性($P > 0.05$)。

2.2 肿瘤原发灶、转移灶之间化疗药物抑制率比较

11 种常用化疗药物对肿瘤原发灶、淋巴结转移灶的细胞平均抑制率不同。化疗药物对原发灶与转移灶的肿瘤细胞抑制率比较, VP-16、THP、MMC 对原发灶肿瘤细胞抑制率明显低于转移灶($t = 2.11 \sim 3.06, P < 0.05$), HCPT、LOHP、CDDP、MTX、VCR 对淋巴结转移灶的细胞抑制率均明显低于原发灶($t = -2.08 \sim -2.48, 均 P < 0.05$),而 5-Fu、PTX、eADM 对转移灶、原发灶的细胞抑制率无明显差异(均 $P > 0.05$)。直线相关分析显示, 5-Fu、LOHP、THP、MTX 对原发灶肿瘤细胞的抑制率与淋巴结转移灶之间具有正相关性($r = 0.4118 \sim 0.5259, 均 P < 0.05$),见表 1。

2.3 原发灶和转移灶 survivin、bcl-2 表达与化疗药物抑制率相关性

survivin 在肿瘤原发灶中表达程度与 VCR 对肿瘤细胞的平均抑制率呈负相关($r = -0.4135, P < 0.05$),而其在转移灶中表达程度则与 VP-16、PTX 的抑制率呈负相关($r = -0.4061, r = -0.5127; 均 P < 0.05$); bcl-2 在原发灶表达程度与 5-Fu、PTX 的抑制率呈负相关($r = -0.4715, r = -0.3965; 均 P < 0.05$),而其在转移灶的表达程度则与 VP-16、HCPT、PTX、LOHP、eADM 的抑制率均具有负相关性($r = -0.4002 \sim -0.5644, 均 P < 0.05$)。survivin 或 bcl-2 在肿瘤原发及转移灶中表达均未发现与某种化疗药物对肿瘤细胞的抑制率具有正相关性

(均 $P > 0.05$),即肿瘤组织 survivin 或 bcl-2 表达时并未显示出原发或转移灶对某种化疗药物的敏感性增加。

3 讨论

细胞凋亡抑制是独立于经典耐药途径的另一 MDR 重要途径。化疗药物致使肿瘤细胞 DNA 损伤后,细胞通过 p53 通路反式激活 p21WAF/CIP1 基因程序诱导细胞凋亡; bcl-2 是凋亡的最终调控点,通过干扰细胞色素自线粒体的释放而阻断蛋白酶级联反应的激活, survivin 则在 bcl-2 的下游直接抑制细胞凋亡的核心—caspase 而阻断肿瘤细胞的凋亡。抗凋亡蛋白 survivin、bcl-2 正是在化疗药物作用靶点后水平通过抑制化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡而产生 MDR 表型,目前胃癌常用的化疗药物均能诱导胃癌细胞凋亡^[2]。本研究发现, survivin 在原发灶、淋巴结转移灶中表达分别与 VCR 和 VP-16、PTX 耐药有关,而 bcl-2 在二种癌组织中表达则分别与 5-Fu、PTX 和 VP-16、OPT、PTX、LOHP、eADM 的耐药有关,肿瘤组织耐药相关因子的表达程度与某种化疗药物对肿瘤细胞的抑制率呈负相关说明该因子高表达时对某种药物敏感性降低而表现出相对化疗耐药。因此本研究结果表明,消化道肿瘤凋亡抑制蛋白表达与肿瘤细胞对一些化疗药物的耐药性密切相关。同时我们还发现,原发灶中 survivin 与 bcl-2 表达具有正相关性,且 survivin 和 bcl-2 在转移灶中表达均显示对 VP-16、PTX 耐药,表明 survivin 与 bcl-2 基因可能有共同的转录激活机制,两者通过凋亡通路不同位点协同发挥抗凋亡效应^[7]。

研究表明,肿瘤转移灶的 MDR 可呈现明显异质性变化^[4,8]。与原发灶相比,一些特定部位的转移

表 1 11 种药物对 54 例原发和转移灶肿瘤细胞抑制率比较 ($n = 54, \%, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibitory rates of 11 drugs between PT and LNMs ($n = 54, \%, \bar{x} \pm s$)

Durgs	PT	LNMs	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
5-Fu	33.82 ± 5.85	35.60 ± 10.05	1.02	0.3188	0.5025	0.0105
VP-16	24.56 ± 6.99	28.84 ± 9.38	2.16	0.0406	0.2810	0.1740
HCPT	31.73 ± 8.46	26.28 ± 10.57	-2.48	0.0205	0.3508	0.0856
PTX	44.40 ± 9.37	44.85 ± 10.65	0.19	0.8543	0.2784	0.1778
LOHP	32.13 ± 12.05	27.57 ± 9.96	-2.1	0.0470	0.5259	0.0069
CDDP	30.23 ± 9.02	24.04 ± 10.49	-2.28	0.0321	0.0325	0.8780
eADM	28.27 ± 11.31	29.96 ± 12.58	0.55	0.5854	0.1868	0.3712
THP	21.53 ± 12.93	27.31 ± 11.49	2.11	0.0350	0.4546	0.0151
MMC	17.49 ± 7.58	22.90 ± 8.20	3.06	0.0022	0.0703	0.7224
MTX	27.09 ± 7.82	22.56 ± 11.46	-2.08	0.0480	0.4118	0.0410
VCR	33.07 ± 13.04	25.29 ± 7.62	-2.33	0.0406	-0.2587	0.2118

PT: primary tumor; LNMs: lymph node metastases

灶如乳腺癌腋淋巴结转移对 DOX、5-Fu、MMC 等化疗药物表现为更强的耐药性^[9]；胃癌转移至淋巴结中的癌细胞 survivin 的表达率较高^[10]。这种异质性与肿瘤演进过程中不同细胞亚群发生的基因和(或)大分子改变有关,但消化道肿瘤转移灶中凋亡抑制蛋白表达与化疗药物敏感性的关系未见报道。本研究发现,在原发灶与淋巴结转移灶中尽管 survivin 及 bcl-2 表达程度无明显差异,但其表达的相关性并不一致,而 survivin 在两种癌灶中表达程度的一致率较低,表明消化道肿瘤原发与转移灶之间凋亡抑制蛋白表达水平的差异性变化;同时原发和转移灶对 11 种化疗药物中的 8 种药物敏感性不同,仅 5-Fu、PTX、eADM 对转移灶、原发灶的细胞抑制率无明显差异。以上研究结果显示,消化道肿瘤转移灶在凋亡抑制蛋白表达及对化疗耐药性方面均呈现异质性。进展期消化道肿瘤淋巴结转移率高达 60%~80%,且已成为影响预后的独立因素,而肿瘤切除后复发的根源是残留和(或)转移灶^[5],因此术后辅助化疗的靶目标不仅应针对淋巴结转移灶,而且必须考虑转移灶 MDR 的异质性对化疗效果的影响。

有学者将凋亡相关基因/蛋白表达水平作为某种化疗药物的疗效预测因子,如 bcl-2 高表达对铂类相对耐药而对紫杉醇敏感, survivin 高表达对二者均耐药^[11]。本研究发现, survivin 在消化道肿瘤原发灶、转移灶中表达所涉及化疗耐药的药物种类及数量各不相同, bcl-2 也表现出同样的变化,且 survivin、bcl-2 高表达均未显示出肿瘤对某种化疗药物的敏感性增加,表明凋亡抑制蛋白在原发、转移灶中的表达分别与不同种类的化疗药物抑制率降低、耐药性增加有关。由于肿瘤细胞对化疗药物耐药程度取决于多种 MDR 相关基因/蛋白复杂的网络化调节、多种 MDR 机制的共同作用^[12],因此临床上若以肿瘤组织凋亡抑制蛋白表达程度来预测肿瘤对化疗药物的耐药性则准确性较差,并且原发灶中 survivin、bcl-2 表达程度也不能准确预测异质化的转移灶 MDR。

本研究初步证实了消化道肿瘤 survivin、bcl-2

表达与化疗耐药有关;肿瘤原发灶、淋巴结转移灶在凋亡抑制蛋白表达、对化疗药物耐药性方面均存在差异。进一步研究转移灶 MDR 的异质性变化,可为重组消化道肿瘤化疗策略、开展针对淋巴结转移灶的化疗提供重要理论依据。

参考文献:

- [1] Shi Z, Liang YJ, Chen ZS, et al. Overexpression of survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(4): 969-976.
- [2] Kim R, Tanabe K, Inoue H, et al. Mechanism antitumor action in protracted infusion of low dose 5-Fluorouracil and cisplatin in gastric carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(3): 549-555.
- [3] 薛兴欢, 张淑群, 姜建涛, 等. 靶向 Survivin siRNA 与 5-Fu 协同抑制 MCF-7 细胞增殖[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(3): 255-257.
- [4] 韩杰, 吕炳蓉, 檀碧波, 等. 消化道肿瘤淋巴结转移灶多药耐药性的变化及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 25(12): 1495-1496.
- [5] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis[J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(8): 872-877.
- [6] 张毅, 沈炜明. MTT 肿瘤药敏试验中培养基的选择[J]. *药学服务与研究*, 2004, 4(3): 269-271.
- [7] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N, et al. Expression of a novel and antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(10): 1808-1812.
- [8] 张静, 宁殿宾, 赵玉哲, 等. 乳腺癌原发灶及淋巴结转移灶中 P-gp、GST- π 、Topo- II 的表达及临床意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(3): 181-183.
- [9] Furukawa T, Kubota T, Tanino H, et al. Chemosensitivity of breast cancer lymph node metastasis compared to the primary tumor from individual patients tested in the histoculture drug response assay[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20: 3657-3678.
- [10] Wang ZN, Xu HM, Jiang L, et al. Expression of survivin in primary and metastatic gastric cancer cell obtained by laser capture microdissection[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(21): 3094-3098.
- [11] 赵晓东, 张毅. 常规化疗药物疗效预测因子与化疗选药[J]. *癌症*, 2006, 25(12): 1577-1580.
- [12] Shtil AA, Azare J. Redundancy of biological regulation as the basis of emergence of multidrug resistance[J]. *Int Rev Cytol*, 2005, 246(1): 1-29.

[编辑:周永红;校对:安 凤]