

· 论 著 ·

## Survivin、Bax 蛋白在喉病变组织中的表达及临床意义

蔡 雯<sup>1</sup>, 崔 颖<sup>2△</sup>, 张婷婷<sup>1</sup>, 张 本<sup>2</sup>

(1. 辽宁医学院耳鼻咽喉-头颈外科专业研究生班, 辽宁锦州 121001;

2. 辽宁医学院附属第一医院耳鼻咽喉-头颈外科, 辽宁锦州 121001)

**摘要:**目的 检测声带息肉、喉不典型增生及声门区喉癌中凋亡抑制蛋白(Survivin)和凋亡促进蛋白(Bax)的表达,探讨它们在疾病发生、发展中的作用及之间的相关性和临床意义。方法 采用免疫组化 SP 法对声带息肉、喉不典型增生、声门区喉癌各 24 例进行 Bax 与 Survivin 的检测及分析。结果 声门区喉癌组中 Survivin 蛋白的阳性表达率为 70.83%,明显高于声带息肉组(25.00%)与喉不典型增生组(58.33%)。Survivin 蛋白阳性组和阴性组病例中,临床分期在两组间差异有统计学意义( $P=0.0111$ ),而年龄分布与性别因素在两者间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。Bax 蛋白在声带息肉组中阳性表达率为 87.5%,明显高于声门区喉癌组(41.67%)与喉不典型增生组(54.17%)。Bax 阳性与阴性患者相比,临床分期在两组间差异有统计学意义( $P=0.0183$ ),而性别分布与年龄因素在两者间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 Survivin 和 Bax 同时参与了喉癌细胞凋亡的调控,二者呈负性相关,并对喉癌的发生发展起着重要作用。

**关键词:** bcl-2 相关 X 蛋白;声带息肉;喉不典型增生;声门区喉肿瘤;Survivin

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.20.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)20-1988-03

## Expression of Survivin and Bax protein in differ laryngeal disease and its clinical significance

Cai Wen<sup>1</sup>, Cui Ying<sup>2△</sup>, Zhang Tingting<sup>1</sup>, Zhang Ben<sup>2</sup>

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, School of Graduate Class of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Otolaryngology, The Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**Abstract: Objective** To examine the expression of apoptosis inhibitive protein(survivin) and pro-apoptosis protein(bax) in polyp vocal cord and displasia and glottic carcinoma, and investigate the relationship between the expression level of them and the clinical significance. **Methods** Immunohistochemical SP method was used to determine the expressions of Bax and Survivin proteins in polyp vocal cord and displasia and glottic carcinoma of 72 cases. **Results** Survivin protein was expressed in 24 samples of glottic carcinoma(70.83%), which remark higher than the polyp vocal cord(25.00%) and displasia(58.33%). There were no differences of gender, age of glottic carcinoma between negative and positive of survivin protein groups( $P>0.05$ ), but we found that there were different effect of clinical stage between the two groups( $P=0.0111$ ). Bax protein was expressed in 24 samples of polyp vocal cord (87.5%), which remark higher than the glottic carcinoma(41.67%) and displasia(54.17%). There were no differences of gender, age of glottic carcinoma between negative and positive of bax protein groups( $P>0.05$ ); but we found that there were different effect of clinical stage between the two groups( $P=0.0183$ ). **Conclusion** The both of survivin and bax were involve in regulation of the apoptosis and cell cycle of carcinoma of the larynx, which indicate that it may play a crucial role in the genesis and progression of laryngeal neoplasms.

**Key words:** bcl-2 associated X protein; polyp vocal cord; displasia; glottic carcinoma; Survivin

喉癌(laryngeal neoplasms)是耳鼻咽喉科常见的恶性肿瘤,严重威胁人类的健康,发病率仅次于鼻咽癌,国内各地统计喉癌约占耳鼻咽喉科恶性肿瘤发病率的 7.9%~35%,占全身恶性肿瘤的 1.2%~1.6%<sup>[1]</sup>。喉癌的早期发现对于喉癌的预防及早期治疗有着重要意义。东北地区是喉癌的高发地区,喉癌的发病率明显高于其他省市。近年来对于凋亡抑制蛋白(Survivin)及凋亡促进蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)在恶性肿瘤中的表达已经成为研究重点,但目前对于 Survivin 与 Bax 在声带息肉、喉不典型增生与声门区喉癌中的表达关系与临床意义的研究较少。本文探讨这两种蛋白在 3 种病变的表达对于较早的诊断与预防喉癌具有重要的临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择本院 2000 至 2010 年诊治的声带息肉、喉不典型增生、声门区喉癌手术标本各 24 例。其中男 54 例,

女 18 例。平均年龄 60.06 岁。喉不典型增生中包括:声带白斑与喉乳头状瘤。喉癌病理证实均为声门区喉鳞状细胞癌,术前均未做过放疗及化疗。按国际抗癌协会(UICC)标准(2002)确定 TNM 分期。I 期 8 例,II 期 3 例,III 期 13 例,IV 期 0 例。

**1.2 免疫组化检测方法** 第一抗体 Bax 和 Survivin 多克隆抗体以及 SP 免疫组化试剂盒均为上海蓝基公司产品,第一抗体工作液浓度 Bax 和 Survivin 均为 1:200。每次染色均用磷酸盐缓冲液(PBS)替代第一抗体作阴性对照。所有标本均经 10%中性甲醛固定,常规石蜡病理切片,脱蜡水化。用微波 3 min 进行抗原修复, PBS 漂洗 4 min, 共 3 次, 置入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min, PBS 漂洗 4 min, 共 3 次, 正常血清 37℃ 孵育 10 min, 加入一抗工作液 4℃ 冰箱孵育过夜, 再用 PBS 漂洗 4 min, 共 3 次, 加入生物素标记二抗 37℃ 孵育 30 min, PBS 漂洗 4 min, 共 3 次, 再加入辣根酶标记链霉素卵白素工作液 37℃ 孵育 30 min,

△ 通讯作者, Tel:15084126051; E-mail: Yingwu2002@163.com.

PBS 漂洗 4 min, 共 3 次。DAB 显色, 苏木精复染细胞核, 中性树脂封片, 显微镜观察照相。

**1.3 染色结果判断** 阳性显色为棕黄色, Bax 蛋白只在胞质着色; Survivin 蛋白表达以胞质着色为主, 偶见胞核表达。高倍镜下每张切片选择 5 个视野进行计数, 取平均值, 阳性细胞大于 10% 为阳性。

**1.4 统计学处理** 两样本率的比较采用四格表资料的  $\chi^2$  检验及相关分析。

**2 结 果**

**2.1 不同病变喉组织中 Bax 蛋白的阳性表达水平** 按声带息肉、喉不典型增生、声门区喉癌逐渐降低(图 1~3)。而 Survivin 蛋白则逐渐增高(图 4~6)。

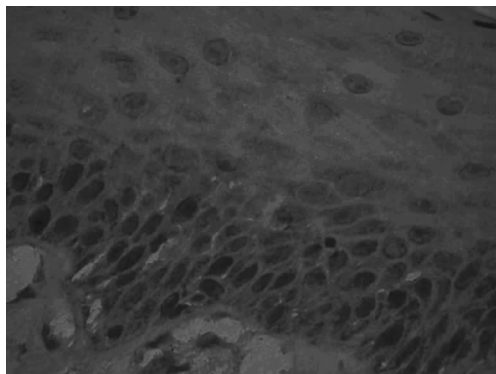


图 1 Bax 蛋白在声带息肉中的阳性表达(SP, ×400)

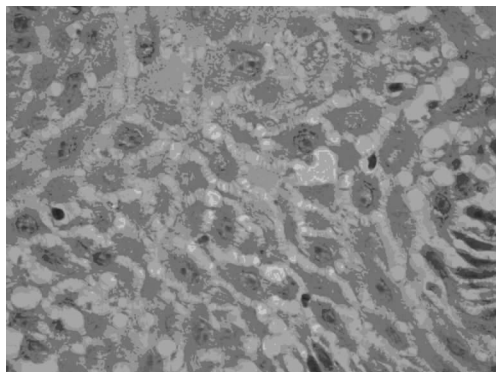


图 2 Bax 蛋白在喉不典型增生中的阳性表达(SP, ×400)

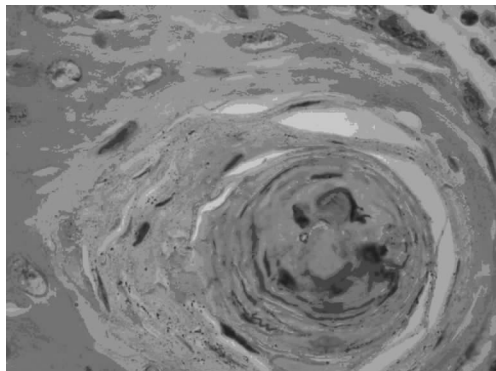


图 3 Bax 蛋白在声门区喉癌中的阳性表达(SP, ×400)

**2.2 3 组间 Bax 与 Survivin 的表达情况比较** Bax 在声带息肉组的阳性率为 87.50%, 与喉不典型增生组的阳性率 54.17% 比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。喉不典型增生组的阳性率与声门区喉癌组的阳性率 41.67% 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而喉癌组的阳性率与声带息肉组比较差

异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。Survivin 在声带息肉组的阳性率为 25.00%, 与喉不典型增生组的阳性率 58.33% 比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。喉不典型增生组的阳性率与喉癌组的阳性率 70.83% 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。喉癌组的阳性率与声带息肉组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

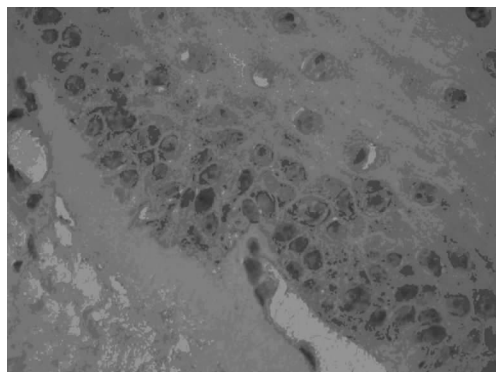


图 4 Survivin 蛋白在声带息肉中的阳性表达(SP, ×400)

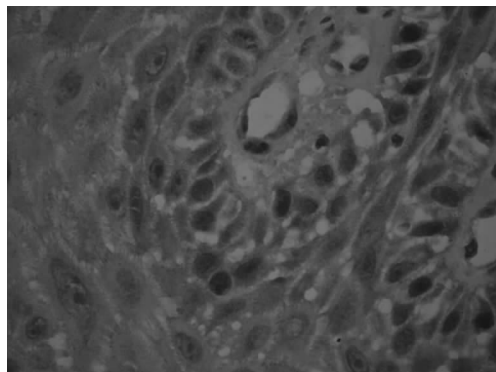


图 5 Survivin 蛋白在喉不典型增生中的阳性表达(SP, ×400)

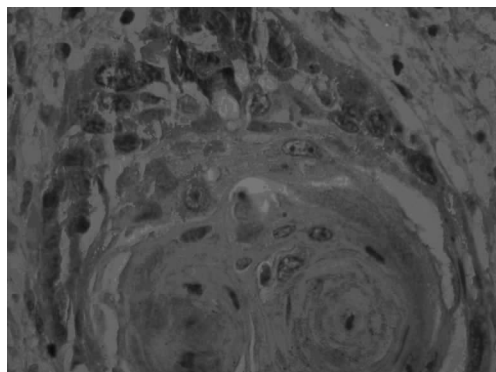


图 6 Survivin 蛋白在声门区喉癌中的阳性表达(SP, ×400)

表 1 Bax 在不同组织中表达情况比较

组别	总例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	$\chi^2$	P
声带息肉组	24	21	3	87.50	4.94	<0.05▲
喉不典型增生组	24	13	11	54.17	0.75	>0.05☆
喉癌组	24	10	14	41.67	9.11	<0.005◆

▲: 与喉不典型增生组比较; ☆: 与喉癌组比较; ◆: 与声带息肉组比较。统计方法为四格表卡方检验。

**2.3 Bax 的阳性表达水平与声门区喉癌组织的分级呈负相关** I、II 级鳞状细胞癌呈高表达, III 级鳞状细胞癌呈低表达。与性别、年龄无关。Survivin 蛋白的表达水平与喉鳞状细胞癌的分级呈正相关。I、II 级鳞状细胞癌呈低表达, III 级鳞状细

胞癌呈高表达。与性别、年龄无关,见表 3。

#### 2.4 Bax 蛋白在喉癌的表达与 Survivin 蛋白表达之间的关系

24 例喉癌患者中 17 例 Survivin 蛋白呈阳性表达,阳性表达率为 70.83%。从表 4 中可以看出:在 Survivin 蛋白表达阳性、阴性标本中,Bax 蛋白阳性率分别为 23.53%(4/17)、85.71%(6/7)。二者在喉癌中有着负相关的作用( $r = -0.2014, P < 0.05$ )。

表 2 Survivin 蛋白在不同组织中表达情况比较

组别	总例数	阳性 细胞数	阴性 细胞数	阳性率 (%)	$\chi^2$	P
声带息肉组	24	6	18	25.00	4.27	<0.05 <sup>▲</sup>
喉不典型增生组	24	14	10	58.33	1.422	>0.05 <sup>☆</sup>
喉癌组	24	17	7	70.83	10.10	<0.005 <sup>◆</sup>

▲:与喉不典型增生组比较;☆:与喉癌组比较;◆:与声带息肉组比较。统计方法为四格表卡方检验。

表 3 Bax 蛋白和 Survivin 蛋白与声门区喉癌组织学分级的关系[n(%)]

临床病理因素	总例数	Bax 蛋白 阳性表达	P	Survivin 蛋白 阳性表达	P
性别					
男	21	9(42.86)	0.999 7	15(71.43)	0.436 8
女	3	1(33.33)		2(66.67)	
年龄(岁)					
≤60	14	6(42.86)	0.999 9	11(78.57)	0.614 7
>60	10	4(40.00)		6(60.00)	
临床分期					
I~II	11	8(72.73)	0.011 1*	5(45.45)	0.018 3*
III~IV	13	2(15.38)		12(92.31)	

用 Fisher 精确检验统计,\* : $P < 0.05$ 。

表 4 24 例喉癌患者中 Bax 蛋白与 Survivin 蛋白的表达关系

Bax 蛋白	Survivin 蛋白		合计	r	P
	阳性	阴性			
阳性	4	6	10	-0.201 4	0.008
阴性	13	1	14		
合计	17	7			

统计方法为 Spearman 等级相关。

### 3 讨 论

细胞凋亡是在生理或病理条件下由基因控制的自主有序的程序性死亡过程。凋亡抑制可以使细胞躲过死亡而异常增殖,导致肿瘤发生、发展<sup>[2]</sup>。细胞凋亡一直是医学界关注的焦点,它在肿瘤的发生和发展中起着不容忽视的作用。

凋亡抑制基因 Survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族的新成员,位于 17q25,全长为 15 kb,有 4 个外显子和 3 个内含子,Survivin 基因编码产生一个由 142 个氨基酸组成的分子量 16.5 KD 的胞浆蛋白。Survivin 在胚胎和发育的胎儿组织中表达丰富,而在正常终末分化的成人组织中不表达,在大多数人类肿瘤组织中又存在 Survivin mRNA 和蛋白的表达,其表达与多种肿瘤的生物特性及疾病分期有关<sup>[3-5]</sup>。本研究中 Survivin 在息肉组织中低表达,表明此蛋白在良性病变中也有一定的表达。Survivin

主要通过直接作用于 Caspase-3、Caspase-7,抑制其活性而发挥抗凋亡作用<sup>[6]</sup>。还可以通过与细胞周期 G<sub>2</sub>/M 有丝分裂纺锤体的微管蛋白特异性结合,以维持有丝分裂的方式发挥抗凋亡作用<sup>[7]</sup>。本研究检测喉良性病变、喉不典型增生、声门区喉癌各 24 例组织中,在喉良性病变中表达明显低于喉癌与喉不典型增生,差异有统计学意义。表明 Survivin 在喉细胞癌变的过程中起到明显的促进作用。并且 Survivin 在喉癌中的阳性表达率为 70.83%,与 Dong 等<sup>[8]</sup>首次报道了 Survivin 在喉癌中的表达情况相近,其 Survivin 表达率为 65.7%。统计显示,Survivin 在不同临床分期的喉癌组织中也存在显著性差异,提示 Survivin 对于喉癌的发展也起到促进作用,与相关文献<sup>[9]</sup>报道的 Survivin 参与癌症的发展相一致,可结合临床作为肿瘤分期与预后的参考指标。Survivin 在年龄与性别的表达上差异无统计学意义。

Bax 基因为 Bcl-2 基因家族一员,Bcl-2 基因是一种原癌基因,具有抑制凋亡的作用,最早由 Tsujimoto 等<sup>[10]</sup>于 1984 年在大多数非霍奇金滤泡状 B 细胞淋巴瘤中首先发现。人 Bax 基因是 Oitvai 等<sup>[11]</sup>在 1993 年首先在白细胞介素-3(IL-3)依赖的细胞凋亡过程中发现的。Bax 位于染色体 19q13 上,含 6 个外显子,其编码的蛋白分子量为 21 KD,与 Bcl-1 蛋白具有 21% 的同源性,是细胞凋亡的促进因子<sup>[12]</sup>。当 Bax 蛋白大量表达,通过其自身形成 Bax 同二聚体和/或与 Bcl-2 形成 Bax-Bcl-2 异二聚体,抑制 Bcl-2 功能,加速细胞死亡,Bcl-2 和 Bax 的表达程度与二者的比例(Bax/Bcl-2)<sup>[13]</sup>对于决定细胞接受凋亡信号后存活与否起关键作用。本实验检测喉良性病变、喉不典型增生、声门区喉癌各 24 例组织中,在声带息肉组中明显高于喉不典型增生组与喉癌组,差异有统计学意义。表明 Bax 对于喉细胞癌变的过程中起着抑制作用。统计显示,Bax 在临床分期 I~II 级的表达中明显高于 III~IV 级的表达,提示 Bax 对于喉癌的发展也起到抑制其发展的作用。Bax 在年龄与性别的表达上差异无统计学意义。

以往研究中多是由 Survivin 与 Caspase 或 Bax 与 Bcl-2 这两组一对一配对组合的蛋白在喉癌的发生发展中的作用。而 Survivin 是可中和由 IL-3、Fas、Bax、TNF- $\alpha$ 、Caspase、抗癌药物 X-射线所诱导的凋亡刺激物<sup>[14-15]</sup>。因此,本实验将参与两种不同凋亡途径的 Survivin 与 Bax 蛋白在喉病变组织的表达情况与联系进行分析,结果这两种蛋白也都参与了喉组织由良性病变至恶性病变的发展过程,在肿瘤的发生、发展过程中的作用不同,并有着负相关的抑制与促进凋亡的作用,表明在喉组织病变发生、发展的过程中这两种凋亡途径都起着作用并有着相互的影响。本实验打破了以往将声带息肉作为阴性对照组的比较,将声带息肉、喉不典型增生、声门区喉癌 3 种疾病进行了比较。通过本实验可以初步了解到 Survivin 与 Bax 在喉良性病变、喉不典型增生、声门区喉癌 3 种组织中有明显的递增与递减的关系,并在喉癌组织中有负相关性的表达。由此可见,两者对于喉癌的发生、发展起着负相关的作用。在临床应用中提供一个辅助参考指标,为较早诊断与预防喉癌的发生提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 吕正华,栾信庸.喉癌临床治疗的辩证思维——浅谈当前临床医学为什么需要哲学[J].医学与哲学,2005,11(26):34-35. (下转第 1994 页)

- mal nocturnal hemoglobinuria[J]. *Lab Hematol*, 2006, 12(2):82-86.
- [5] Isoda A, Tsukamoto N, Mitsui T, et al. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes[J]. *Int J Lab Hematol*, 2007, 29(1):52-56.
- [6] Barros MM, Yamamoto M, Figueiredo MS, et al. Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein- $\alpha$ ,  $\beta$  on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia[J]. *Transfusion*, 2009, 49(1):154-160.
- [7] 李庆, 翟志敏, 耿良权, 等. 贫血伴白细胞和血小板减少患者 CD59 检测结果分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(7):739-743.
- [8] Dworacki G, Sikora J, Mizera-Nyczak E, et al. Flow cytometric analysis of CD55 and CD59 expression on blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 43(2):117-124.
- [9] Savage WJ, Brodsky RA. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. *Hematology*, 2007, 12(5):371-376.
- [10] 孙健. 关于 PNH 克隆演变的研究进展[J]. *上海第二医科大学学报*, 2005, 25(9):975-979.
- [11] Hernández-Campo PM, Almeida J, Sánchez ML, et al. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006, 70(2):71-79.
- [12] Gupta PK, Charan VD, Kumar H. PNH revisited: clinical profile, laboratory diagnosis and follow-up[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2009, 52(1):38-45.
- [13] Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007, 72(5):291-298.
- [14] 龚奕, 孔佩艳, 张曦, 等. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症转化为急性非淋巴细胞白血病 1 例[J]. *重庆医学*, 2006, 35(5):封 3-封 3.
- [15] Kaiafa G, Papadopoulos A, Ntaios G, et al. Detection of CD55- and CD59- deficient granulocytic populations in patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Ann Hematol*, 2008, 87(4):257-262.
- [16] Ruiz-Argüelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins(CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias [J]. *Autoimmun Rev*, 2007, 6(3):155-159.

(收稿日期:2010-11-29 修回日期:2011-01-15)

(上接第 1990 页)

- [2] Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer[J]. *Clin Oncol*, 1999, 17:2941-2953.
- [3] Swana HS, Grossman D, Anthony JN, et al. Tumor content of the antiapoptosis molecule surviving and recurrence of bladder cancer[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(6):452-453.
- [4] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression in early stage non-small cell lung cancer[J]. *J Pathol*, 2003, 200(5):620-626.
- [5] Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, et al. Correlation between surviving mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2003, 6(4):217-224.
- [6] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by Survivin[J]. *Nature*, 1998, 396(671):580-584.
- [7] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of Survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(2):92-95.
- [8] Dong Y, Sui L, Watanabe Y, et al. Survivin expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implication[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22:2377-2383.
- [9] 刘敏, 李萍, 兰显国, 等. Survivin 和 VEGF 在涎腺腺样囊性癌中的表达及临床意义[J]. *重庆医学*, 2010, 39(10):1231-1233.
- [10] Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of chromosome breakpoint of neoplastic Bc-1 with the chromosome translocation[J]. *Science*, 1984, 226(1):1097-1099.
- [11] Oitvai AN, Milliman CL, Kors SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax that accelerate programmed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74:609-619.
- [12] Kagawa S, Gu J, Swisher SG, et al. Antitumor effect of adenovirus-mediated Bax gene transfer of p53-sensitive and p53-resistant cancer line[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5):1157-1161.
- [13] Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death[J]. *Cancer Res*, 1999, 59:1693-1700.
- [14] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein surviving inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs[J]. *Cancer Res*, 1998, 58:5315-5320.
- [15] Asanuma K, Morial R, Yajima T, et al. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91:1204-1209.

(收稿日期:2010-11-20 修回日期:2011-02-10)