

· 临床研究 ·

食管癌组织中存活蛋白的异常表达*

蔡燕¹, 陈先卓², 彭乙华³, 唐中¹, 刘青松¹, 蒋红², 杨明辉^{1△}

(川北医学院附属医院:1. 检验科;2. 风湿免疫研究所;3. 内分泌科, 四川南充 637000)

摘要:目的 通过比较食管癌组织和癌旁组织中存活蛋白的表达情况,探讨凋亡抑制因子存活蛋白与食管癌之间的关系。方法 T-A 克隆制备存活蛋白 定量 PCR 标准品 pTA/存活蛋白;采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)和免疫组织化学法检测 33 例经病理证实的食管癌组织(实验组)及其相应的癌旁组织(对照组)中存活蛋白的 mRNA 和蛋白质表达水平,并分析存活蛋白表达与食管癌临床病理特征间的关系。结果 FQ-PCR 结果显示,实验组中存活蛋白的阳性表达率为 81.82%(27/33),对照组中阳性表达率为 39.40%(14/33),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);免疫组织化学结果在实验组和对照组中的阳性率与 FQ-PCR 结果一致,但对照组中的阳性细胞多为炎症细胞(非上皮细胞);存活蛋白的表达与患者年龄、性别及肿瘤分化程度无关($P > 0.05$),与肿瘤分期和淋巴结转移高度相关($P < 0.05$)。结论 存活蛋白在食管癌组织中的阳性表达可能与肿瘤发生、浸润和淋巴结转移密切相关。

关键词:食管肿瘤;存活蛋白;聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)05-0432-03

Abnormal expression of survivin in human esophageal cancer tissue*

Cai Yan¹, Chen Xianzhuo², Peng Yihua³, Tang Zhong¹, Liu Qingsong¹, Jiang Hong², Yang Minghui^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Institute of Rheumatism Immunity; 3. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: **Objective** To observe the correlation between survivin and the esophageal cancer by comparing the expression level of survivin in the cancer tissue and the adjacent tissue. **Methods** Recombinant plasmids pTA/survivin used as the standard plasmids in quantitative real-time PCR was constructed. Quantitative real-time PCR and immunohistochemistry were used to evaluate the endogenous expression level of survivin mRNA and protein in 33 cases of esophageal cancer tissues (experimental group) confirmed by pathology and their corresponding adjacent tissues (control group). And the relationship between the expression level of survivin and the clinicopathologic parameters of esophageal cancer was also analyzed. **Results** FQ-PCR results showed that the positive expression rate of survivin in the experimental group was 81.82%(27/33), the control group was 39.4%(14/33), there was significant difference between the two groups when analyzed by the statistical software ($P < 0.05$). The immunohistochemical results in the two groups were consistent with the FQ-PCR, but the positive cells of the control group were mostly inflammatory cells not the epithelial cells. There was no significant correlation between survivin expression and age, sex and tumor differentiation grade ($P > 0.05$), but had significant relationship with tumor stage and lymph node metastases ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of survivin in esophageal cancer tissue may be associated with tumorigenesis, invasion and lymph node metastasis.

Key words: esophageal neoplasms; survivin; polymerase chain reaction

存活蛋白(survivin)是迄今发现最强的凋亡抑制因子,属于凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员^[1-2]。研究表明, survivin 可选择性地表达于肿瘤组织,在正常成熟组织中不表达或很少表达^[3-5]。近年研究显示, survivin 可通过促进肿瘤细胞增殖和抑制肿瘤细胞凋亡在肿瘤的发展中具有重要作用^[6]。本文拟用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)和免疫组织化学法检测食管癌及其癌旁组织中 survivin 的表达情况,以探讨其与食管癌之间的关系,为临床上治疗食管癌提供潜在的药物靶标。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 人食管癌组织及癌旁组织标本 收集 2010 年 7 月至 2010 年 12 月期间本院胸外科手术切除的食管癌组织及其距

离癌边缘 10 cm 以上的癌旁组织,并根据病理结果筛选出食管中段及中上段鳞癌 33 例及其相应的癌旁组织进行后续实验,33 例食管癌组织中有 14 例为高分化鳞癌,19 例为中低分化鳞癌;按食管癌国际 TNM 分期, T1 期 2 例, T2 期 13 例, T3 期 18 例;有淋巴结转移 20 例,无淋巴结转移 13 例;患者年龄 48~68 岁,平均 58 岁, ≥58 岁者 15 例, <58 岁者 18 例;其中男 24 例,女 9 例。

1.1.2 主要试剂和酶 Trizol 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自成都博奥、pTA vector 试剂盒、FQ-PCR 试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自北京天根;兔抗人 survivin 购自博士德;二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)和 ABC 免疫组化试剂盒购自北京中杉公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

1.2.1.1 根据 Genbank 中的 survivin 基因编码序列(序列号 NM_001168),由深圳 ABI 生物技术有限公司设计并合成 survivin 的 FQ-PCR 引物及探针(sales order No:186238135)。探针序列:5'-ATT GCA GGC TGT CGC CAT GTG GAA A-3'。

1.2.1.2 另用引物设计软件 Primer Premer 5.0 设计 survivin 标准品外围引物:FP:5'-TCT GGG AAG GGT TGT GAA TG-3';RP:5'-TAG ATA AAA CCA CAT GAG AC-3'产物为 216 bp,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 标准品制备 参照文献[7],制备 survivin 标准品。

1.2.3 FQ-PCR 扩增 按 Trizol 总 RNA 提取试剂盒操作说明提取癌中心和癌旁组织总 RNA,测定其浓度和纯度后,各取约 1 mg 用逆转录酶逆转录为 cDNA 备用。紫外分光光度计测定各标本的 cDNA 浓度,并用去离子水将浓度调整一致,各取 2 μL 作为模板进行绝对 FQ-PCR 扩增。反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 15 s,60 °C 退火延伸 30 s,共 40 个循环,于每一循环的退火阶段检测荧光值。以标准品制备标准曲线。每一待测标本(包括标准品)各做 2 个平行管,以每一标本的平均拷贝数作为 survivin 的表达量进行统计学分析。

1.2.4 免疫组化检测 将各标本用石蜡进行包埋并切片,采用链霉素抗生物素蛋白过氧化物酶法(S-P 法)检测 survivin 蛋白表达。一抗用试剂盒中的专用抗体稀释液按 1:100 进行稀释,二抗为专用二抗工作液。以 PBS 代替一抗做阴性对照。具体步骤按试剂盒操作说明进行。结果判断:免疫组化结果参照文献[8]评分:根据染色强度无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕色为 2 分,棕褐色为 3 分;染色细胞阳性所占百分比评分:无阳性细胞为 0 分,1%~10%为 1 分,11%~50%为 2 分,≥51%为 3 分。两项乘积即为该例免疫组化得分,乘积大于 3 分定为该组织表达 survivin 为阳性。

1.3 统计学处理 FQ-PCR 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件进行 *t* 检验和单因素方差分析,免疫组化结果用 χ^2 检验进行比较,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准品制备结果 运用 T-A 克隆成功制备 pTA/survivin 标准品,经测序鉴定,插入片段与 Genbank 中报道的 survivin mRNA 序列完全一致,提取的质粒标准品在 ABI 7900 定量 PCR 仪上进行扩增能得到典型的 S 形扩增曲线,各梯度间的 Ct 值差几乎相等,标准曲线的相关系数为 0.99 以上,提示误差较小,可信度较高,该标准品可用于 survivin 的定量检测,见图 1。

2.2 FQ-PCR 检测结果 各阳性标本得到了理想的扩增曲线,33 例食管癌组织中 survivin 阳性率为 81.82%(27/33),癌旁组织中 survivin 阳性率为 39.40%(14/33),将每一标本的平均拷贝数作为该标本中 survivin 基因的表达量,实验组和对照组中 survivin 的 mRNA 水平表达量用统计软件 SPSS 16.0 进行两独立样本 *t* 检验,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

2.3 免疫组化检测结果 免疫组化结果与 FQ-PCR 结果一致,其中 FQ-PCR 检测 survivin 为阳性者,其癌中心细胞胞质中有 survivin 蛋白表达;但癌旁组织中经 FQ-PCR 检测为阳性的标本中,阳性细胞为炎症细胞,上皮细胞中无表达或仅少许细胞胞质中可见弱表达的 survivin 蛋白(封 2 图 2),且为 T3

期并有淋巴结转移的食管癌旁组织。余 FQ-PCR 检测为阴性的组织中免疫组化结果也为阴性。

表 1 食管癌组织和癌旁组织中 survivin 的 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	survivin 表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组	18 850±207 1	2.284	0.029
实验组	89 878±76 599*		

*:*P*<0.05,与对照组比较。

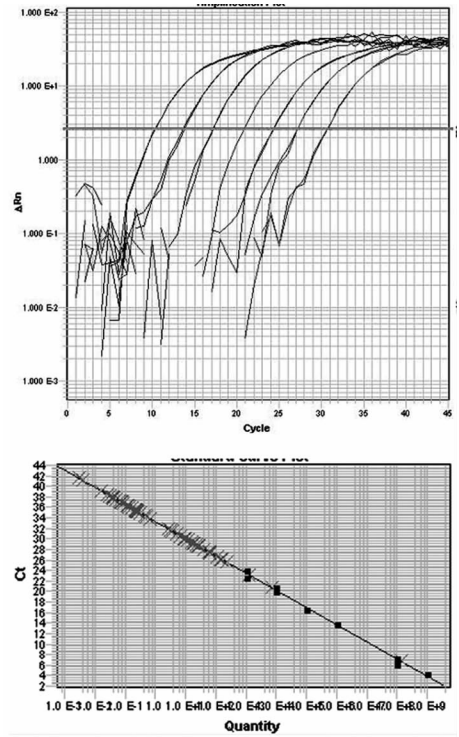


图 1 标准品扩增曲线和标准曲线

表 2 survivin 表达与临床病理特征的关系

指标	<i>n</i>	survivin		<i>P</i>
		+	-	
年龄(岁)				
≤58	15	12	3	0.805
>58	18	15	3	
性别				
男	24	20	4	0.381
女	9	7	2	
肿瘤分化程度				
高分化	14	11	3	0.425
中低分化	19	16	3	
TMN 分期				
T ₁ +T ₂	15	10	5	0.047
T ₃	18	17	1	
淋巴结转移				
有	20	19	1	0.015
无	13	8	5	

2.4 食管癌中 survivin 的表达与临床病理特征的相关性

FQ-PCR 和免疫组织化学结果均显示 survivin 的表达与患者年龄、性别、分化程度等无关,但与肿瘤分期和淋巴结转移与否高度相关,其中 T₃ 期食管癌细胞中 survivin 的阳性表达率明显高于 T₁ 和 T₂ 期,有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

3 讨 论

食管癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,在我国其发病率和病死率居世界首位。由于其发病和发展机制尚未完全阐明,故众多学者仍致力于寻找肿瘤发生、发展的原因,以求找到抗肿瘤治疗的靶标。作为凋亡抑制蛋白家族中的一员, survivin 是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子,可通过直接或间接抑制半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(cystemyl aspartate specific protease, caspase)的活性发挥其抑制细胞凋亡的作用。另外 survivin 还可以调节细胞周期、促进肿瘤血管生成,广泛表达于多种肿瘤细胞,是目前研究的热点,并被认为有可能成为肿瘤标志物或肿瘤治疗的新靶点。

Grabowski 等^[9]研究发现,在人的正常食管上皮细胞胞质中有 survivin 的表达,并认为 survivin 在肿瘤细胞的核表达与食管癌的发生、发展有关。而李大鹏和王启之^[10]的研究显示, survivin 主要表达与食管癌细胞的胞质中,癌旁的食管上皮中 survivin 表达为阴性,即使食管炎标本中也仅 2 例不典型增生的标本中 survivin 表达为阳性。二者虽然就 survivin 在食管上皮的表达情况和在细胞中的表达部位持不同意见,但均显示 survivin 的阳性表达可能与食管癌的发生、发展有关。

本实验通过 FQ-PCR 和免疫组织化学检测显示 survivin 在癌中心和癌旁组织中的表达差异具有统计学意义。虽然 FQ-PCR 检测到有 39.40% 的癌旁组织中有 survivin 表达,但免疫组织化学法显示阳性细胞几乎为炎症细胞,上皮细胞中鲜有表达(该结果与 Grabowski 等^[9]的结果不一致),而且阳性癌旁组织为 T₃ 期且有淋巴结转移的患者,一方面提示 survivin 在正常食管上皮细胞中不表达;另一方面显示 survivin 的阳性表达、炎症细胞浸润和肿瘤细胞侵袭、转移之间可能有密切关系。说明 survivin 与食管癌的发生发展有关。与临床病理特征分析结果示 survivin 的表达与患者年龄、性别、分化程度等无关,但与肿瘤分期和淋巴结转移与否高度相关,其中 T₃ 期食管癌细胞中 survivin 的阳性表达率明显高于 T₁ 和 T₂ 期,有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 survivin 在肿瘤侵袭和淋巴管发生中有一定的作用。

总之, survivin 在食管癌的发生、发展和转移过程中可能具有重要作用。目前已有通过下调 survivin 的表达来治疗肿瘤的报道发表,如 RNAi^[11]、提高 survivin 抑制剂野生型 P53 的表达^[12]或采用中药单体血根碱^[13]等。可见 survivin 也可作为治疗食道癌的潜在药物靶标,以提高患者的生存质量和延长患者的寿命。

参考文献:

- [1] Johnson ME, Howerth EW. Survivin; a bifunctional inhibitor of apoptosis protein[J]. *Vet Pathol*, 2004, 41(6): 599-607.
- [2] Angela F, Natalie R, Sam W, et al. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4989-4995.
- [3] Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, et al. Expression of surviving and Bcl-2 in the normal human endometrium [J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(6): 529-534.
- [4] Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(5): 1087-1098.
- [5] Alain CM, Monica MM, Steffan TN, et al. Survivin; key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(8): 5000-5005.
- [6] 陈利民, 郑建华, 王焱冬. P53、survivin 的研究进展 [J]. *疾病监测与控制杂志*. 2009, 3(4): 243-245.
- [7] Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, et al. Improved quantitation of minimal residual disease multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(1): 3957-3964.
- [8] 许良中. 乳腺病理学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 395.
- [9] Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(1): 115-119.
- [10] 李大鹏, 王启之. survivin 在食道癌的表达及其与 Bcl-2 相关性研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2009, 34(3): 198-200.
- [11] Seth S, Matsui Y, Fosnaugh K, et al. RNAi-based Therapeutics Targeting Survivin and PLK1 for Treatment of Bladder Cancer [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(5): 928-935.
- [12] Adamkov M, Halasova E, Rajcani J, et al. Relation between expression pattern of p53 and survivin in cutaneous basal cell carcinomas [J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(3): BR74-80.
- [13] Sun M, Lou W, Chun JY, et al. Sanguinarine suppresses prostate tumor growth and inhibits survivin expression [J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(3): 283-292.

(收稿日期: 2011-03-15 修回日期: 2011-06-22)