



Survivin在结直肠癌中的表达及其临床意义

大肠癌是世界上高发恶性肿瘤之一，在我国居第3位。细胞凋亡调节紊乱是大肠癌的重要机制之一。Survivin是新近发现的凋亡抑制蛋白(inhibition apoptosis protein, IAP)，在正常成熟组织中不表达，在各种肿瘤组织广泛表达，其独特的结构和生物学功能在肿瘤分子生物学研究中日益受到重视。组织芯片技术(tissue microarray/tissue chip)是由基因芯片概念而发展的一种新方法，可在一张玻片上一次性完成几百甚至上千例组织标本的基因扩增、mRNA转录及基因表达产物的分析，是快速、经济、大规模检测的有力工具。本研究利用组织芯片技术结合免疫组织化学方法检测survivin蛋白在早期结直肠癌组织中的表达，探讨结直肠癌组织中凋亡抑制因子survivin的表达及其与各临床病理因素的关系，评价survivin在结直肠癌预后判断中的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

南方医科大学附属珠江医院普通外科1992~2000年外科手术切除的原发性结直肠癌石蜡标本126例。所选病例均为经过手术根治、无血行转移的结直肠癌病人。本组研究病例中，男66例，女60例；平均年龄56岁(29~81岁)，其中大于/等于60岁59例，小于60岁67例；肿瘤小于5 cm 70例，大于/等于5 cm 56例；肿瘤位于结肠57例，位于直肠69例；病理学检查示：高分化69例，中、低分化57例；浸润深度：未突破肌层的67例，突破肌层的59例；淋巴转移阳性50例，淋巴转移阴性76例；Dukes分期：A、B期76例，C期50例；术后复发转移24例，其中局部复发6例，血行远处转移18例，其中肝转移13例，肺转移2例，骨转移2例，颅部转移1例。所选病例肿瘤浸润深度均未突破肌层。随访时间平均60月(7~98个月)。

1.2 主要试剂与方法

采用免疫组织化学SABC方法：survivin 兔抗人多克隆抗体(RB-1629)为美国Neomarkers公司产品(购自晶美公司)，SABC试剂盒均购自福州迈新公司，即用型。组织切片经高压处理，修复暴露抗原。以已有survivin表达的大肠癌作阳性对照，以PBS代替一抗作空白对照，严格按照SABC免疫组化试剂盒说明书操作，DAB显色。

1.3 组织芯片制作过程[1]

(1)载玻片的准备：载玻片经过清洁液浸泡，充分水洗并烘干，用10%多聚赖氨酸处理载玻片，烘干备用。(2)组织芯片模块制备：将熔化石蜡制作4.0 cm×2.0 cm×1 cm大小的空白蜡块，设计10×8点组织阵列，用打孔机制成模块。(3)将原蜡块放在45℃温箱中烘5~10 min。然后，用打孔针从组织块选定部位逐个取出组织芯，随即放入预先设计的阵列模块中，排布成组织芯片。(4)对供体组织HE切片作形态学观察并在供体蜡块上准确标记所需要的靶点。(5)利用打孔仪钻取靶点组织，并转移至受体蜡块相应的孔位上，即制成所需的阵列蜡块。(6)常规方法作4~5 μm切片，裱于载玻片上。一个组织芯片蜡块一般可切4~5 μm的连续切片100张左右。(7)最后，将制成的组织芯片面朝下放在铜板上，于55℃放置30 min，轻压模块使组织柱在模块

中排平。对组织芯片蜡块切片，切下的组织平整地粘贴于载玻片上，以备免疫组化实验使用。

1.4 结果判断标准

采用双盲法，评判标准由两位有经验的病理医师分别免疫组化染色结果进行评估。免疫组化染色阳性信号为棕黄色。采用显微摄像计算机图像分析系统，计算阳性细胞和肿瘤细胞的数量。Survivin的判断标准为：阳性细胞<肿瘤细胞的50%者为低表达组；阳性细胞>肿瘤细胞的50%者为高表达组。

1.5 统计学处理

Survivin表达状态与大肠癌临床参数之间的关系比较采用Pearson卡方检验。多因素生存分析应用Cox回归模型，并用Kaplan-Meier限乘法计算生存率，绘制累积生存函数曲线，用Log-rank法比较两组生存曲线有无差异。所有统计学处理均采用SPSS 10.0统计软件包进行。P<0.05认为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

在所有病例中，survivin主要在肿瘤细胞中表达，而在间质细胞、内皮细胞和与肿瘤细胞相邻的正常粘膜细胞则表达较弱。在癌细胞中，survivin被观察到主要在胞质中和核膜周围表达。一般情况下，远切缘正常粘膜组织survivin不表达或表达较弱。采用显微摄像计算机图像分析系统，根据免疫组化染色强度和分级结果，所有病例被分为survivin高表达组和低表达组。其中高表达组有26例(21%)，低表达组有100例(79%)。

2.2 Survivin表达与临床病理特征之间的关系

Survivin与临床病理特征的关系如表1所示。根据统计结果可以看出，survivin在结直肠癌中表达情况与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、浸润深度、淋巴是否转移、Dukes分期均无显著相关。然而，高表达的survivin与肿瘤复发、特别是血行转移显著相关(P<0.05)。

表 1 Survivin 表达与大肠癌临床病理特征之间的关系

Tab.1 Correlation between survivin expression and clinicopathological features of colorectal cancer

Variable	Hazard ratio(95%CI)	Unfavourable/favourable	P value
Age	0.940(0.863-1.023)		0.153 8
Sex	0.382(0.084-1.746)	Male/Female	0.214 8
Histological type	1.118(0.813--1.0539)	Poorly or moderately/Well	0.419 7
Tumor size	1.020(0.991-1.050)		0.179 5
Lymph node metastasis	2.215(0.542-9.054)	Positive/Negative	0.268 1
Dukes' stage	4.222(0.99917.835)	C/A and B	0.050 1
Survivin expression	10.086(1.971-51.612)	High/Low	0.005 5

2.3 Survivin表达与早期结直肠癌患者的预后

126例早期结直肠癌患者中，全组共有118例获得随访，8例失访。5年存活94例，死亡24例，5年总生存率79.7%。其中survivin高表达组(n=26)死亡12例，survivin低表达组(n=100)死亡12例。Survivin高表达组和低表达组的生存率用Kaplan-Meier方法评估，结果表明5年累计生存率在survivin低表达组为87.6%，而在survivin高表达组为53.8%。并用log-rank test进行比较，两组之间生存率具有显著性差异(P<0.05)。

(图1), 具统计学意义。

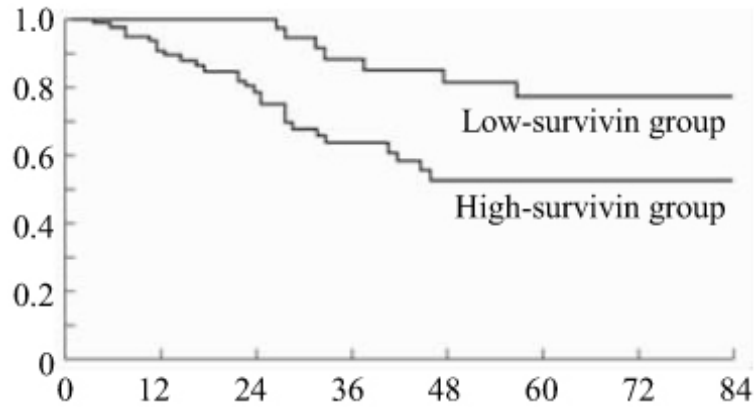


图1 不同水平Survivin表达组生存曲线 (Kaplan-Meier法)

Fig.1 Kaplan-Meier disease-free survival curves of patients with high and low survivin expression Statistically significant difference was found between the tow groups (P<0.05)

在表2中, survivin以及可能的预后因素与生存时间的多因素回归模型分析结果显示, 在潜在的预后因素中(年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、淋巴是否转移、Dukes分期、survivin表达), survivin表达和Dukes分期被认为是结直肠癌根治术后独立预后因素。

表 2 Survivin 与可能的预后因素与生存时间的多因素
回归模型分析结果

Tab.2 Results of multivariate analysis of survivin and possible prognostic factors related to disease-free survival by Cox proportional hazards model

Number of cases	High-survivin	Low-survivin	P value
Age (years)			
≥60	12	47	>0.05
<60	14	53	
Gender			
Male	15	51	>0.05
Female	11	49	
Tumor size (cm)			
<5	14	56	>0.05
≥5	12	44	
Tumor location			
Colon	11	46	>0.05
Rectal	15	54	
Histological type			
Well diff. adenocarcinoma	16	53	>0.05
Moderately or poorly diff. adenocarcinoma	10	47	
Depth			
Muscle	15	52	>0.05

Subserosa	11	48	>0.05
Lymph node metastasis			
+	9	41	
-	17	59	>0.05
Dukes' classification			
A and B	17	59	
C	9	41	>0.05
Recurrence			
+	9	15	
-	17	85	<0.05
Recurrence by hematogenous metastasis			
+	8	10	
-	18	90	<0.05

diff.=differentiate

3 讨论

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤，其发生和发展机制尚未完全阐明。目前研究发现，细胞凋亡的抑制在结直肠癌的发生和发展中可能有重要的地位，但尚未找到有效靶点。Survivin是新近发现的凋亡抑制蛋白，因其在正常组织内不表达，而选择性表达于恶性肿瘤组织的独特表达特性，而受到瞩目[2]。Survivin是1997年Ambrosini等[2]利用效应细胞蛋白酶受体 1 (Effector Cell Protease Peceptor 1, EPR 1)cDNA从人类基因组库中杂交筛选克隆出来的，基因全长15 kb，位于17q25，含有4个外显子和3个内含子，基因编码产生含142个氨基酸的蛋白，是目前人类IAPs家族中研究最多的一个基因。Survivin作为IAP家族的成员之一，survivin在人类最常见的肿瘤组织，包括肝癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌等呈高表达。以往研究发现，survivin是判断胃癌、膀胱、恶性淋巴瘤等恶性肿瘤预后的一个有价值的指标。认为其可能是通过抑制正常细胞凋亡信号传导通路，使一些受损细胞逃避机体免疫系统的监视而无法清除，从而异常存活、累积形成优势克隆而参与肿瘤的发生、发展[3]。

应用组织芯片高效检测临床组织样本具有快速、方便、经济、准确的优点。本研究采用组织芯片技术具有很多优点：可同时分析多个本，提高了效率，减少了时间和资金的消耗；同时各标本的实验条件一致，便于对比。我们制作了126例结直肠癌的组织芯片，每张组织芯片上126个样品，排列整齐，外形为圆形或类圆形，较少的皱折和掉片现象。仅用几张芯片即完成了全部实验，极大节约了研究经费和降低了劳动量，在最短的时间内获得了结直肠癌中survivin表达的全部数据。因此，应用组织芯片大规模高效检测临床组织样本是可行的，组织芯片技术与传统的病理学技术方法相比，具有快速、方便、经济、准确的特点，其应用前景广阔。

在本实验中，我们应用组织芯片结合免疫组织化学SABC法，检测126例早期结直肠癌组织中survivin的表达情况，回顾性分析survivin与各临床病理因素及预后之间的关系。免疫组化结果显示，在所有病例中，survivin主要在肿瘤细胞中表达，而在间质细胞、内皮细胞和与肿瘤细胞相邻的正常粘膜细胞则不表达或表达较弱。可见，与在正常组织中非常有限表达不同的是，在结直肠肿瘤中存在survivin过度表达现象。这种在大肠正常组织和增生组织不表达，而在肿瘤组织尤其是在腺瘤组织过度表达特点说明：survivin基因是在大肠癌发生早期阶段(腺瘤阶段)被激活，表达出大量survivin蛋白。可以认为survivin的过度表达是结直肠上皮癌变过程的早期事件，survivin可作为结直肠癌发生早期阶段的分子标记物。本研究分析Survivin表达

与结直肠癌患者主要临床参数之间的关系后发现, survivin在结直肠癌中表达情况与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、浸润深度、淋巴是否转移、Dukes分期均无显著相关。然而, 结直肠癌组织中 survivin表达与患者预后密切相关。高表达的survivin与肿瘤复发、特别是血行转移显著相关($P < 0.05$)。Survivin高表达组和低表达组的累计生存率用Kaplan-Meier方法评估, 并用log-rank test进行比较, 两组之间生存率存在显著差异性($P = 0.0051$)。Survivin低表达组患者术后五年生存率显著高于survivin高表达组。提示survivin的表达可以影响结直肠癌的生物学行为, 可使其更易发生局部与血行复发转移等恶性行为, 可能是预后不良的指征。Survivin在结直肠癌组织中选择性表达是结直肠癌发生中的普遍事件, 并与肿瘤转移、血管浸润等恶性生物学行为有关, survivin对凋亡的抑制可能是其参与结直肠癌发生的重要机制。可能机制是survivin抑制细胞凋亡, 延长肿瘤细胞的生存期, 增加了这些细胞其它基因改变机会, 如癌基因ras的突变和抑癌基因DCC[4]、p53的突变/缺失, 从而有利于结直肠癌的发生发展。Survivin与可能的预后因素与生存时间的多因素回归模型分析结果显示, 在潜在的预后因素中(年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、淋巴是否转移、Dukes分期、survivin表达), survivin表达和Dukes分期被认为是结直肠癌根治术后独立预后因素, survivin高表达提示预后不良。因此我们认为, 作Dukes分期的补充, 结直肠癌组织中 survivin的检测可为结直肠癌患者预后判断的一个有价值的指标。有研究发现, survivin可能通过调节生理修复性或病理性(肿瘤)的血管生成, 在肿瘤细胞的浸润、迁移可能起重要作用[5]。Sarela等[6]用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测144例结肠癌和86例癌旁组织survivin基因表达, 结果显示63.5%的癌组织阳性, 仅29.1%癌旁组织阳性。而且, survivin基因阴性表达者5年生存率为94.4%, 阳性者5年生存率仅为44.8%。显示survivin的表达程度与病期进展和肿瘤组织的恶性程度相一致, 可作为预后不良的标志之一。从而认为检测survivin为预测肿瘤的发生、发展和预后提供一新的指标。由于survivin的选择性表达特性, 有望成为结直肠癌诊断和治疗的新靶点。本研究结果与以往相关研究基本一致, 根据本实验研究结果, 我们可以认为, 高表达survivin与结直肠癌的复发转移有关, survivin的表达状态是结直肠癌根治术后独立的预后因素。

除了这种在大肠肿瘤组织高选择表达特点外, 目前研究表明抑制肿瘤细胞中的survivin表达或功能可诱导肿瘤细胞自发性细胞凋亡, 也可增加化疗药物的效果, 抑制在体恶性肿瘤生长[7]。Survivin可以作为大肠癌基因治疗、免疫治疗理想的分子靶, 深入研究survivin对肿瘤治疗有广阔的临床应用前景。

参考文献:

- [1] Zhang JZ, Huang YW, Liu DM, et al. Tissue microarray technology and its preliminary application in large intestinal carcinoma[J]. World Chin J Digestol, 2002, 10(2): 157-60.
- [2] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell profile ration by surviving gene targeting[J]. J Biol Chem, 1998, 273(18): 11177-82.
- [3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein in human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7[J]. Biochemistry, 2001, 40: 1117-23.
- [4] 徐美东. DDC基因与大肠癌研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(4): 30-2.
- Xu MD. The study development of DDC gene and colorectal cancer[J]. Chin J Modern Med, 2000, 10(4): 30-2.
- [5] O'Connor DS, Schechner S, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2): 393-8.
- [6] Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, et al. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J]. Gut, 2000, 46: 645-50.
- [7] Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, et al. Inhibitor of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(2): 635-40.

参考文献:

[1] Zhang JZ, Huang YW, Liu DM, et al. Tissue microarray technology and its preliminary application in large intestinal carcinoma[J]. World Chin J Digestol, 2002, 10(2): 157-60.

[2] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by surviving gene targeting[J]. J Biol Chem, 1998, 273(18): 11177-82.

[3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein in human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7[J]. Biochemistry, 2001, 40: 1117-23.

[4] 徐美东. DDC基因与大肠癌研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(4): 30-2.

Xu MD. The study development of DDC gene and colorectal cancer[J]. Chin J Modern Med, 2000, 10(4): 30-2.

[5] O'Connor DS, Schechner S, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2): 393-8.

[6] Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, et al. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J]. Gut, 2000, 46: 645-50.

[7] Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, et al. Inhibitor of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(2): 635-40.

[回结果列表](#)