

Survivin、Bcl-2 的表达与鼻咽癌相关

The Expression of Survivin and Bcl-2 are Associated with Nasopharyngeal Carcinoma

向 秋/曾思恩/刘强和/何晓松/
侯巧燕/范才文/肖胜军/雷 迅*
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

XIANG Qiu, ZENG Si-en, LIU Qiang-he, HE Xiao-song,
HOU Qiao-yan, FAN Cai-wen, XIAO Sheng-jun, LEI Xun*
(Guilin Medical College, Guilin, 541004, China.)

【摘要】背景与目的: 研究凋亡抑制基因 Survivin、Bcl-2 在鼻咽癌中的表达及其与鼻咽癌的相关性。材料与方法: 应用免疫组化分析 68 例鼻咽癌组织、45 例鼻咽慢性炎症组织中 Survivin 和 Bcl-2 的表达; RT-PCR 分析 24 例鼻咽癌组织、18 例鼻咽慢性炎症组织中 Survivin 和 Bcl-2 的表达。结果: 免疫组化分析表明, 鼻咽癌组织中, Survivin、Bcl-2 的表达阳性率分别为 69.1% (47/68) 和 79.4% (54/68), 鼻咽慢性炎症组织中 Survivin、Bcl-2 的表达阳性率分别 15.6% (7/45) 和 13.3% (6/45), 对两组标本中的 Survivin、Bcl-2 分别进行比较, 差别均有统计学意义 ($P < 0.01$)。RT-PCR 分析表明, 鼻咽癌组织中, Survivin、Bcl-2 的表达阳性率分别为 79.2% (19/24) 和 87.5% (21/24), 鼻咽慢性炎症组织中 Survivin、Bcl-2 的表达阳性率分别 22.2% (4/18) 和 27.8% (5/18), 对两组标本中 Survivin、Bcl-2 分别进行比较, 差别均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: Survivin、Bcl-2 的表达与鼻咽癌相关, 两者的表达可能在鼻咽组织癌变过程中起重要作用。

【关键词】鼻咽癌; 凋亡; Bcl-2; Survivin

中国分类号: R739.62

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)05-0384-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the expressions of survivin and Bcl-2 in nasopharyngeal carcinoma(NPC) and the association between their expressions and NPC. MATERIAL AND METHODS: Using immunohistochemical staining, the expressions of survivin and Bcl-2 were assessed in 68 cases of NPC and 45 cases of nasopharyngeal chronic inflammation tissues. Using RT-PCR, the expressions of survivin and Bcl-2 was measured in 24 cases of NPC and 18 cases of nasopharyngeal chronic inflammation tissues. RESULTS: Analyzed by immunohistochemical staining, the expressions of survivin and Bcl-2 were 69.1% (47/68) and 79.4% (54/68), respectively, in NPC, statistically different ($P < 0.01$) when compared with 15.6% (7/45) and 13.3% (6/45), respectively, in nasopharyngeal chronic inflammation tissues. Analyzed by RT-PCR, the expressions of survivin and Bcl-2 were, 79.2% (19/24) and 87.5% (21/24), respectively, in NPC, statistically different ($P < 0.01$) when compared with that 22.2% (4/18) and 27.8% (5/18), respectively, in nasopharyngeal chronic inflammation tissues. CONCLUSION: The expressions of survivin and Bcl-2 might play important roles in the development of Nasopharyngeal carcinoma.

【KEY WORDS】 nasopharyngeal carcinoma; apoptosis ;Bcl-2; survivin

细胞凋亡是在特定的生理或病理条件下, 细胞接受某些信号的触发后, 引发的细胞程序化死亡。在这个过程中, 有许多因素参与细胞凋亡的调节, 如 Bcl-2、Bax 可

以分别通过阻滞或促进线粒体释放细胞色素 C 等物质来抑制或促进细胞凋亡; 凋亡抑制蛋白新成员 Survivin, 则直接抑制效应分子 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性来阻

收稿日期: 2006-01-18; 修订日期: 2006-04-11

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅基金重点资助项目 (No. 200305); 广西壮族自治区教育厅基金资助项目 (2003-22); 广西高校人才小高地病理学科创新团队基金资助。

作者简介: 向 秋 (1965-), 男, 湖南洞口人, 副教授, 博士, 研究方向: 从事肿瘤研究。

* Correspondence to: LEI Xun Tel: 86-773-2827927

止细胞的凋亡。在多种肿瘤中,均有细胞抗凋亡基因 Survivin 和 Bcl-2 的表达异常,肿瘤的发生与 Survivin、Bcl-2 密切相关^[1-3]。本文研究 Survivin、Bcl-2 在鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)中的表达及其相关性,以期揭示鼻咽癌发生的分子机制,为鼻咽癌的早期诊断和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本 鼻咽组织石蜡块来源于桂林医学院附属医院和湖南省肿瘤医院病理科,其中,鼻咽慢性炎症组织 45 例,男性 26 例,女性 19 例,平均年龄 43.4 岁;鼻咽癌组织 68 例,男性 41 例,女性 27 例,平均年龄 45.6 岁。鼻咽活检组织标本来源于桂林医学院附属医院和广西南溪山医院,鼻咽慢性炎症组织 18 例,男性 11 例,女性 7 例,平均年龄 39.6 岁;鼻咽癌组织 24 例,男性 15 例,女性 9 例,平均年龄 42.3 岁。所有标本均经病理组织切片确诊。

1.2 试剂 小鼠抗人 Survivin、Bcl-2 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;免疫组化检测试剂盒, DAB 显色试剂盒及中性树胶等,购自福州迈新公司。组织总 RNA 提取试剂 Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒及所用酶购自 TaKaRa 生物公司,其余试剂均为国产分析纯。Survivin 引物: F: 5' aaa tgc act cca gcc tet gt 3', R: 5' tgt cga gga agc ttt cag gt 3', 扩增产物为 311 bp; Bcl-2 引物: F: 5' ggg gaa aca cca gaa tca agt 3', R: 5' tgc gac agc tta taa tgg atg 3', 扩增产物为 249 bp; 内参照 GAPDH 引物: F: 5' cca ccc atg gca aat tcc atg gca 3', R: 5' tet aga cgg cag gtc agg tcc acc 3', 扩增产物为 598 bp。引物均由上海博亚公司合成。

1.3 免疫组化检测 所有石蜡块标本均作 4 μ m 连续切片,60 $^{\circ}$ C 烤箱中烤片过夜。免疫组化检测按试剂盒说明书进行。免疫组化染色结果判断:阳性信号定位于细胞膜与细胞质,呈棕黄色或棕褐色颗粒。无着色细胞或着色细胞数 $\leq 10\%$ 记为阴性;着色细胞数 $> 10\%$ 记为阳性。

1.4 总 RNA 提取和 RT-PCR 参照 Trizol 试剂的说明书提取总 RNA,用 DNase I 消化总 RNA 中的痕量 DNA,取 0.1 μ g 总 RNA,参照一步法 RT-PCR 试剂盒说明书上的反应体系和反应条件进行扩增反应。反应条件为(50 $^{\circ}$ C 15 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min)。设 3 种对照:分别用无核酸酶水替代 RNA 样品进行扩增;不加逆转录酶进行扩增;用阳性样品替代 RNA 样品进行扩增。将 RT-PCR 扩增产物

进行电泳,分析结果。

1.5 统计学处理 实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件包 χ^2 检验。

2 结果

2.1 免疫组化分析 Survivin、Bcl-2 在鼻咽癌和鼻咽慢性炎症组织中的表达 免疫组化检测表明, Survivin 蛋白定位于细胞质和细胞膜上(见图 1), 68 例鼻咽癌组织中,有 47 例 Survivin 阳性,阳性率 69.1%; 45 例鼻咽慢性炎症组织中,7 例 Survivin 阳性,阳性率 15.6%, 两者差异有统计学意义($\chi^2 = 31.14, P < 0.01$)。Bcl-2 蛋白也定位于细胞质和细胞膜上(见图 2), 68 例鼻咽癌组织中,有 54 例 Bcl-2 阳性,阳性率 79.4%, 45 例鼻咽慢性炎症组织中,6 例 Bcl-2 阳性,阳性率 13.3%, 两者差异有统计学意义($\chi^2 = 47.48, P < 0.01$)。

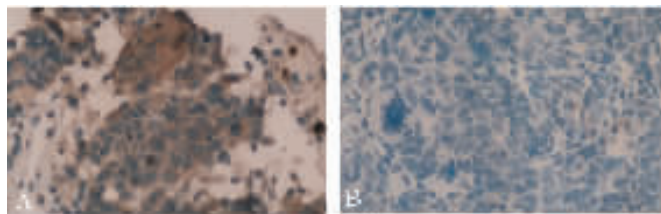


图 1 Survivin 在鼻咽癌组织中的表达(SP 法, DAB 显色, $\times 200$)
Figure 1 Expression of survivin in NPC(SP, DAB stain, $\times 200$). A、B: Positive and negative expression of survivin in NPC tissue, respectively

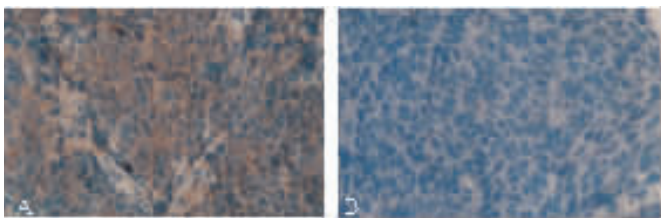


图 2 Bcl-2 在鼻咽癌组织中的表达(SP 法, DAB 显色, $\times 200$)
Figure 2 Expression of Bcl-2 in NPC(SP, DAB stain, $\times 200$). A、B: Positive and negative expression of Bcl-2 in NPC tissue, respectively

2.2 RT-PCR 分析 Survivin、Bcl-2 在鼻咽癌和鼻咽组织中的表达 RT-PCR 检测表明, 24 例鼻咽癌组织中, 19 例表达 Survivin, 阳性率 79.2%, 18 例鼻咽慢性炎症组织中, 4 例表达 Survivin, 阳性率 22.2%, 两者差异有统计学意义($\chi^2 = 13.46, P < 0.01$)。24 例鼻咽癌组织中, 21 例表达 Bcl-2, 阳性率 87.5%, 18 例鼻咽慢性炎症组织中, 5 例表达 Bcl-2, 阳性率 27.7%, 两者差异有统计学意义($\chi^2 = 15.56, P < 0.01$)。见图 3、图 4。

3 讨论

细胞凋亡在肿瘤发生、发展过程中主要起负调控作用, 肿瘤细胞凋亡过程受凋亡促进因子 p53、fas 和凋亡

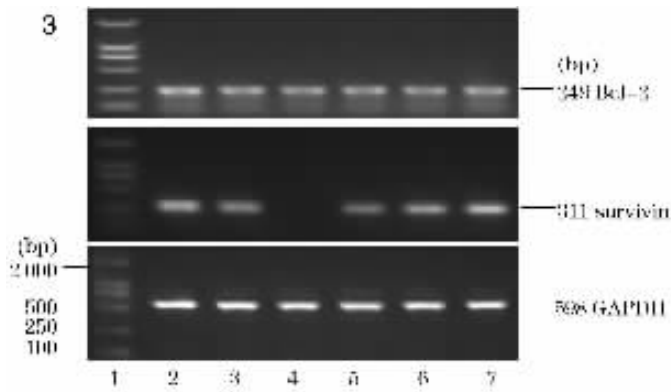


图 3 Survivin、Bcl-2 在鼻咽癌中的表达。1: marker; 2~7 鼻咽癌组织;

慢性炎症组织。 Figure 3 Expression of survivin and Bcl-2 in NPC .1: marker; 2~7: NPC biopsy tissues

Figure.4 Expression of survivin and Bcl-2 in nasopharyngeal chronic inflammation biopsy tissues.1:marker;2~7: nasopharyngeal chronic inflammation biopsy tissues

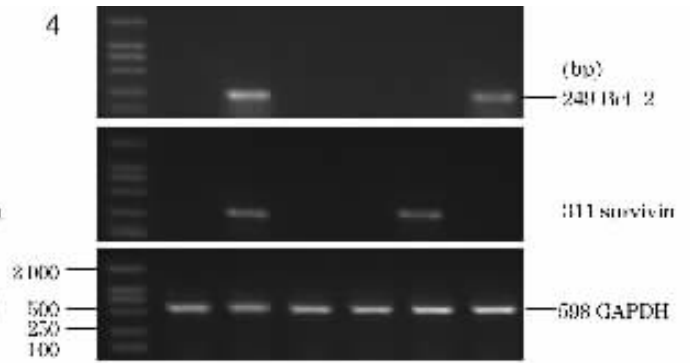


图 4 Survivin、Bcl-2 在鼻咽慢性炎症组织中的表达。1: marker; 2~7 鼻咽

抑制因子 Bcl-2、Survivin 等共同调节。Bcl-2 最早是从人类滤泡性 B 细胞淋巴瘤中发现、分离的基因, 编码一种膜结合蛋白, 定位于线粒体膜、核膜、内质网上, 在细胞的激活和发育过程中表达, 在成熟或走向凋亡的细胞中不表达, Bcl-2 是细胞凋亡相关基因 Bcl 家族中的重要成员^[4]。正常鼻咽黏膜由基底细胞发生, 向表层细胞移行, 分化成熟。有旺盛增殖能力的基底细胞有 Bcl-2 的低表达, 基底以上细胞无 Bcl-2 表达。采用免疫组化和 RT-PCR 分析, 发现鼻咽癌组织中, Bcl-2 的表达明显高于鼻咽慢性炎症组织, 差异有统计学意义, 表明 Bcl-2 的表达与鼻咽癌有相关性。

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族 (Inhibitor of apoptosis protein, IAP) 中最小、作用最强的一个新成员, 与 IAP 家族的其他成员不同, Survivin 不但具有抑制细胞凋亡的作用, 而且可能参与了细胞有丝分裂的调节, 干扰 Survivin 与有丝分裂纺锤体微管的特异性结合, 可致 Survivin 抗凋亡活性的丧失^[5]。Survivin 基因阻断细胞凋亡的途径是直接作用于终末效应酶一半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3、Caspase-7^[6]。Bcl-2 基因阻断细胞凋亡的机制是对抗引起线粒体破裂的离子失衡, 从而阻断线粒体凋亡诱导因子, (Apoptosis inducing factor, AIF), 如细胞色素 C 向细胞质释放, 抑制细胞的凋亡, 诱发细胞癌变。Survivin 在正常胚胎发育过程中表达, 但在成人终末分化的组织细胞中很少表达 (睾丸、胎盘和胸腺除外), 却在许多恶性肿瘤组织如胃癌、肠癌、肺癌、子宫内膜癌等多种癌组织中高表达^[7,8]。我们研究 Survivin 在鼻咽癌组织中的表达, 发现鼻咽癌组织中, Survivin 的表达明显高于鼻咽慢性炎症组织, 差异有统计学意义, 提示 Survivin

可能在鼻咽组织癌变过程中起重要作用。

参考文献:

- [1] Sharma H, Sen S, Mathur M, *et al.* Combined evaluation of expression of telomerase, survivin, and anti-apoptotic Bcl-2 family members in relation to loss of differentiation and apoptosis in human head and neck cancers[J]. *Head Neck*, 2004, 26(8): 733 - 740.
- [2] Kobayashi M, Nakamura S, Shibata K, *et al.* Etodolac inhibits EBER expression and induces Bcl-2 regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells[J]. *Eur J Haematol*, 2005, 75(3): 212 - 220.
- [3] Deveraux Q L, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis[J]. *Genes*, 1999, 13(3): 239 - 252.
- [4] Letsas KP, Frangou LM, Skyras A, *et al.* Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions[J]. *Pathol Int*, 2005, 55(11): 694 - 702.
- [5] Li F, Ambrosini G, Chu EY, *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by Survivin[J]. *Nature*, 1998, 396(11): 580 - 584.
- [6] Shin S, Sung BJ, Cho YS, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117 - 1123.
- [7] Wheatley SP, McNeish IA. a protein with dual roles in mitosis and apoptosis[J]. *INT Rev Cytol*, 2005, 247(1): 34 - 88.
- [8] Parenti A, Leo G, Porzionato A, *et al.* Expression of survivin, p53, and caspase 3 in Barrett's esophagus carcinogenesis[J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(1): 16 - 22.