

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)06-0556-03

肝癌组织 survivin 的表达与凋亡、增殖和 p53 的关系

惠文涛¹, 南克俊¹, 阮之平¹, 景昭¹, 张群翎² (西安交通大学第一医院: ¹ 肿瘤内科, ² 病理科, 西安 陕西 710061)

Relationships between survivin expression and cancer cell apoptosis, proliferation and p53 expression in hepatocellular carcinoma

HUI Wen-Tao¹, NAN Ke-Jun¹, RUAN Zhi-Ping¹, JING Zhao¹, ZHANG Qun-Ling²

¹Department of Oncology, ²Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To investigate the expression of survivin protein and its relationship with cell apoptosis, proliferation and p53 protein expression in primary hepatocellular carcinoma (HCC). **METHODS:** The expressions of survivin, p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in 42 cancer tissues, 34 adjacent cirrhosis tissues and 10 normal tissues were assessed by immunohistochemical method and apoptosis was detected by TUNEL method. **RESULTS:** Survivin protein was expressed in 30 of the 42 cases of HCC (71.4%) and in 4 of the 34 cases of adjacent cirrhosis tissues (11.8%). Expression of survivin protein was negative in the 10 cases of normal tissues. Survivin protein positive expression rate in HCC was significantly higher than that in adjacent cirrhosis tissues and normal tissues ($P < 0.001$). The increased survivin protein expression in cancer was significantly correlated with the histological grade ($P = 0.003$), p53 protein expression ($P = 0.008$), survival time ($P = 0.002$) and the ratio of proliferative index to apoptotic index ($P = 0.001$), but was not with age, sex, tumor size, clinical stage and local metastasis ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** There is a marked increased survivin expression in HCC, which may play an important role in breaking the balance between the proliferation and apoptosis of HCC cells. Survivin may promote p53-negative HCC cells to obtain an anti-apoptosis ability, thereby promoting the development of HCC and partly playing a role in the further malignant transition of tumor cells.

【Keywords】 survivin; liver neoplasms; apoptosis; proliferating cell nuclear antigen; genes; p53

【摘要】 目的: 研究肝癌 survivin 的表达与细胞增殖、凋亡以及 p53 表达的关系。方法: 应用免疫组化法检测原发性肝癌组织 42 例、癌旁肝硬化组织 34 例、正常肝组织 10 例中 survivin, p53 增殖细胞核抗原(PCNA)的表达。应用 TUNEL 法

收稿日期 2005-08-05; 接受日期 2005-10-08

作者简介: 惠文涛, 硕士生(导师南克俊)。Tel: (029)83791992

Email: docxwt@163.com

检测细胞凋亡。结果: 在 42 例肝癌组织中 survivin 阳性 30 例 (71.4%) 显著高于癌旁肝硬化组织 (11.8%) 和正常肝组织 (0%, $P < 0.001$)。肝癌中 survivin 蛋白的高表达与病理分级 ($P = 0.003$)、p53 蛋白水平 ($P = 0.008$)、细胞增殖凋亡比 ($P = 0.001$) 及患者生存时间 ($P = 0.002$) 存在显著相关性, 而与年龄、性别、肿瘤大小、临床分期、门脉癌栓(局部转移)无显著相关 ($P > 0.05$)。结论: 肝癌组织 survivin 高表达在打破肝癌细胞的增生和凋亡之间的平衡中起着重要作用。Survivin 可能抑制 p53 阴性肝癌细胞的凋亡, 在肿瘤细胞的进一步恶性转化中发挥作用。

【关键词】 survivin; 肝肿瘤; 细胞凋亡; 增殖细胞核抗原; 基因 p53

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A

0 引言

肝癌中存在增殖与凋亡平衡失调, 决定着肝癌细胞的增生速率。Survivin 在多种恶性肿瘤组织中高表达, 包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、子宫内膜癌、卵巢癌^[1-2]。p53 是一个经典的抑癌基因, 在肝癌中 p53 的突变率高达 55.1%^[3]。我们采用免疫组化和原位末端标记法(TUNEL)检测 survivin, p53 在肝癌组织中的表达, 并探讨 survivin 与细胞凋亡、细胞增殖、p53 的相关性及其临床病理学意义。

1 材料和方法

1.1 材料 西安交通大学第一医院 2000-02/2002-11 手术切除经病理学证实的肝癌标本 42 例, 带有癌旁肝硬化组织 34 例, 男 34 例, 女 8 例, 年龄 29 ~ 72 岁(中位年龄 49.4 岁); 肿瘤直径 ≤ 50 mm 者 17 例, > 50 mm 者 25 例; 门脉癌栓阳性者 14 例, 算作局部转移, 阴性者 28 例, 算作局部无转移, 所有患者术前均未经过化疗和放疗。Edmondson 病理 I ~ II 级 36 例, III ~ IV 级 6 例; TNM 临床 I ~ II 期 12 例, III ~ IV 期 30 例。标本用 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚连续切片。同期健康成年男性 HE 染色病理诊断正常肝脏组织标本 10 例(经家属同意)为对照组。鼠抗人 survivin mAb(4F7)购自美国 Neomarker 公司; 免疫组化 Elivision 二步法检测试剂盒(即用型)购自福州迈新生物技术开发公司; 鼠抗人 PCNA mAb(pc10), 鼠抗人 p53 mAb(MAB-0226, 突变型)购自北京中山生

物技术有限公司,原位细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 Survivin, PCNA 和 p53 表达

应用免疫组化 (Elivision 两步法) 染色, 切片常规脱蜡至水, 置于 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液行微波修复 15 min, 置冷, 30 mL/L 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶 20 min, 羊血清封闭 37℃ 20 min, 滴加 survivin (1:100), p53 (1:50), PCNA (1:50) 一抗, 置 37℃ 恒温箱 2 h, 分别滴加两步法试剂盒中的 A 液和 B 液各 50 μ L 分别室温孵育 40 min, DAB 显色, 苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 脱水透明后中性树胶封片, 光镜下观察阳性细胞并按阳性标准计数。以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照, 以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。survivin 染色定位于胞质, 呈棕黄色, 切片根据阳性细胞百分率分为: 阳性 (+), 随机计数 5 个视野, 计算每个视野阳性细胞率, 取平均值, 如大于 10% 则为阳性; 阴性 (-) 没有或仅有弱的染色, 阳性细胞率 < 10%。P53 染色定位于胞核, 呈棕黄色, 阳性判断标准同 survivin。PCNA 染色以胞核染成棕黄色为阳性, 增殖活性以 PCNA 标记指数 (PCNA-LI) 代表, 随机计数 500 个细胞中阳性细胞数, $PCNA-LI = (\text{阳性细胞数} / \text{细胞总数}) \times 100\%$ 。

1.2.2 HCC 凋亡检测

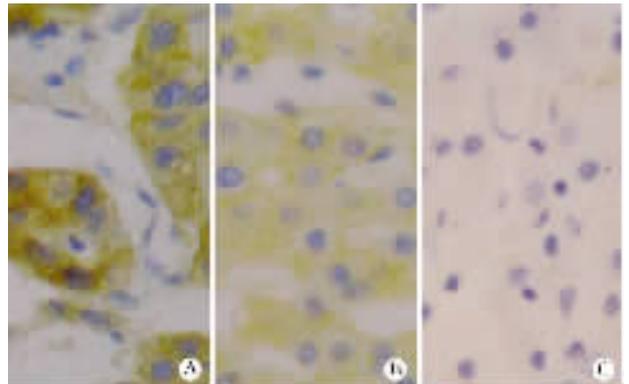
经多聚赖氨酸处理的组织切片同免疫组化法脱蜡至水。微波热修复处理 15 min 将凋亡检测试剂盒中试剂 1 与试剂 2 按 1:9 混合为 TUNEL 反应液。取反应液 50 μ L 滴加到组织上, 置 37℃ 恒温箱孵育 1 h; 滴加试剂 3 液 50 μ L 37℃ 孵育 40 min, 滴加 BCIP/NBT 显色 15 ~ 30 min; 核固红衬染 5 ~ 10 min, 自来水冲洗 5 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。肝癌组织中 TUNEL 阳性信号 (即凋亡细胞) 呈现为蓝紫色颗粒, 位于细胞核, 核浓缩呈小圆形, 散在分布, 周围无炎性细胞浸润, 未凋亡细胞核被衬染为粉红色。凋亡活性以凋亡指数 (apoptosis index, AI) 表示, 随机计数 500 个细胞中阳性细胞数, $AI = (\text{阳性细胞数} / \text{细胞总数}) \times 100\%$ 。

统计学处理: 所得数据应用 SPSS11.0 统计软件包处理。Survivin 的表达及其与 p53 及各临床病理指标之间的关系采用 χ^2 检验, 与 AI 增殖指数 (proliferation index, PI) 的关系采用 *t* 检验。生存分析采用 Cox 比例风险回归模型。

2 结果

2.1 Survivin 表达与 HCC 临床病理特征的关系

Survivin 蛋白主要表达于肝癌细胞浆, 免疫组化染色见胞浆内棕黄色颗粒, 阳性细胞在肝癌组织内呈散在分布。42 例 HCC 中 survivin 阳性 30 例, 阳性率为 71.4% (图 1A), 癌旁肝硬化组织 34 例 survivin 阳性 4 例, 阳性率为 11.8% (图 1B), 正常肝组织为阴性 (图 1C)。HCC 组织 survivin 的阳性率显著高于癌旁肝硬化组织和正常肝组织 ($P < 0.001$)。HCC 组织 survivin 表达与肿瘤细胞分化程度有关, 而与年龄、性别、分期、肿瘤大小、转移无关, Edmondson 分级 I ~ II 级和 III ~ IV 级患者 survivin 阳性率分别为 40.0% 和 88.9%, 两者差异显著 ($P = 0.003$, 表 1)。应用 Logistic 回归分析得出病理分级是影响 survivin 表达的一个重要因素 ($P = 0.002$)。survivin 阳性者肝癌细胞增生凋亡比 (PI/AI) 显著高于 survivin 阴性者 (4.03 ± 0.92 vs 2.92 ± 0.73 , $P = 0.001$), 采用生存曲线的 Log-rank 检验得出 survivin 阴性组生存期显著长于 survivin 阳性组 ($P = 0.0148$, 图 2)。



A 原发性肝癌组织 B 癌旁肝硬化组织 C 常肝组织。

图 1 Survivin 表达

2.2 PCNA, p53 和凋亡在 HCC 组织中的表达

PCNA 表达于肝细胞核中, 阳性细胞胞核呈棕黄色 (图 3A), 肝癌组织中 PI 为 30.8%, p53 在的表达率为 38.3%, 阳性细胞胞浆呈棕黄色颗粒 (图 3B)。HCC 组织中发生凋亡的细胞核被染成蓝色, 复染的未凋亡细胞被染成粉红色 (图 3C) 并结合 HE 染色排除坏死细胞, 肝癌组织中 AI 为 8.7%, p53 表达阴性者 survivin 表达率 (87.5%) 显著高于 p53 阳性者 (50.0%), 两者差异有显著性 ($P = 0.008$)。

3 讨论

肿瘤的发生发展与细胞死亡和增殖之间平衡失调关系密切。有研究表明, 随着肝细胞分化变差、瘤体直径变大、分期变晚, 细胞凋亡率和增殖率均增加

表1 Survivin 表达与 HCC 各项病理指标之间的关系

临床病理特征	n	survivin(+)表达(%)
年龄(岁)		
≤45	15	11(73.3)
>45	27	19(70.4)
性别		
男	34	23(67.6)
女	8	7(87.5)
病理分级		
I-II	15	6(40.0)
III-IV	27	24(88.9) ^b
临床分期		
I-II	12	8(66.7)
III-IV	30	22(73.3)
肿瘤大小		
≤50 mm	17	13(76.5)
>50 mm	25	17(68.0)
转移		
-	28	20(71.4)
+	14	10(71.4)

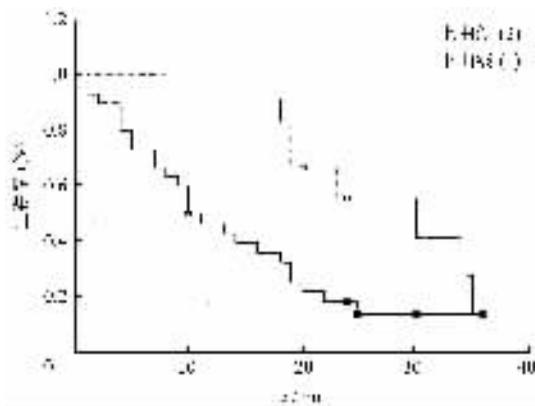
^bP < 0.01 vs I-II期.

图2 Survivin 阴性和阳性组生存曲线的比较(1:阳性 2:阴性)

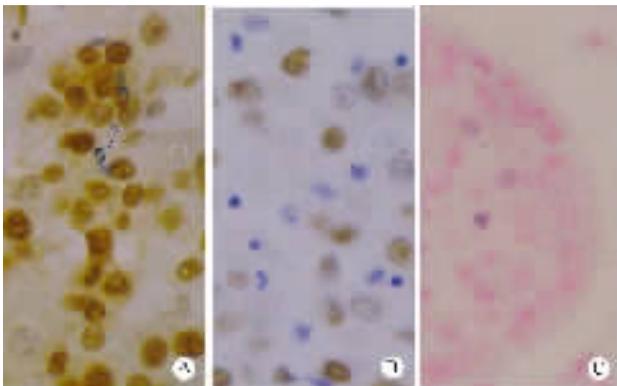


图3 PCNA(A), p53(B)和凋亡(C)在原发性肝癌组织中的表达

($P < 0.01$) 然而凋亡率总是低于增殖率,并且在分化较差、体积较大、分期较晚、p53 阳性的肝癌组织中增殖凋亡比越来越大($P < 0.001$)^[4]. 结果发现 30 例肝癌组织和 4 例癌旁肝硬化组织中有 survivin 表达,而在 10 例正常肝组织无 survivin 表达. 这与以往在其他肿瘤组织中对 survivin 表达研究结果类似^[5-6]. 统计学分析表明, survivin 在肝癌组织中的阳性率显著高于肝硬化组织和正常肝组织,低分化肝癌组 survivin 的表达显著高于高分化组,且 survivin 阳性组增殖凋亡比显著高于 survivin 阴性组, survivin 阳性组生存期显著短于阴性组,这些结果都说明 survivin 的高表达可能破坏细胞增殖与凋亡之间的平衡,在肝癌的发生发展中起重要作用^[7], survivin 阳性表达可作为预测预后的重要指标. 同时本研究得出 survivin 在正常肝组织不表达而在肝癌组织中高表达使 survivin 的靶向治疗成为可能. 我们还发现突变型 p53(mtp53)蛋白阴性组 survivin 阳性率显著高于突变 p53 阳性组. 这说明 mtp53 阴性组肝癌至少部分通过 survivin 的表达获得抗凋亡能力,从而在肿瘤细胞的进一步恶性转化中发挥了作用. 而对于那些突变 p53 阳性的肝癌, survivin 表达减弱,则通过凋亡删除一些老化的肿瘤细胞,选择更具有侵袭力、增殖旺盛的细胞克隆,促进肿瘤发生发展.

【参考文献】

- [1] Cohen C, Lohmann CM, Cotsonis G, et al. Survivin expression in ovarian carcinoma: Correlation with apoptotic marker and prognosis [J]. Mod Pathol, 2003, 16: 574-583.
- [2] Kazuhiro K, Ryuichiro D, Masayuki K, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients [J]. Surgery, 2004, 136: 443-448.
- [3] 李海民, 孙凯, 袁科峰, 等. P53, P73, nm23-H1 基因在肝细胞肝癌中的表达与临床病理的关系[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(18): 1718-1722.
- [4] 张惠中, 高萍, 林芳, 等. 凋亡抑制因子反义寡核苷酸对肝癌细胞生物学作用[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(13): 1232-1235.
- [5] Takizawa T, Kitagawa M, Hasegawa M, et al. Expression of IAP family proteins in esophageal cancer [J]. Exp Mol Pathol, 2004, 76(3): 253-259.
- [6] Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor Survivin in aggressive squamous cell carcinoma [J]. Exp Mol Pathol, 2003, 70(3): 249-254.
- [7] Lim IK. Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fischer 344 male rats [J]. Mech Aging Dev, 2003, 124(5): 697-708.

编辑 潘伯荣