

· 短篇论著 ·

凋亡抑制基因 Survivin 在甲状腺癌组织中的表达及意义

刘钢 史火喜 袁又能 黄文广

【摘要】 目的 探讨凋亡抑制基因 Survivin 在甲状腺癌中的表达及其与病理预后之间的关系。方法 应用免疫组化 SP 法检测 68 例甲状腺癌、54 例甲状腺腺瘤、32 例癌旁组织和 23 例正常甲状腺组织中 Survivin 的表达情况,评价 Survivin 的阳性表达率与甲状腺癌的病理预后之间的关系。结果 Survivin 在甲状腺腺癌组织、甲状腺腺瘤组织、癌旁甲状腺组织及正常甲状腺组织中的阳性表达率分别为 44.1%、25.9%、18.8% 和 0。甲状腺未分化癌和髓样癌组织中 Survivin 的阳性率明显增高,存在转移和临床Ⅲ、Ⅳ期病例中, Survivin 的阳性率明显增高。结论 Survivin 过量表达可能与甲状腺肿瘤的发生发展有关,癌组织中 Survivin 的表达可作为判断甲状腺癌病理类型和预后的参考指标。

【关键词】 甲状腺肿瘤; 凋亡抑制蛋白类; 基因表达; 免疫组织化学

细胞凋亡是在多基因调控下主动的自杀过程,又称为细胞的程序性死亡。肿瘤细胞凋亡的减少助长了肿瘤的恶性生长,放化疗的抗肿瘤机制体现在诱导肿瘤细胞的凋亡上,在凋亡通路上抗凋亡基因与促凋亡因素相互制约,对凋亡抑制基因的深入研究必将有利于解除肿瘤细胞凋亡的抑制,在肿瘤的治疗上具有重要意义。Survivin 是 1997 年由美国的 Ambrosini 发现的一种凋亡抑制基因,在凋亡通路上扮演着负调节角色,它不仅与肿瘤的发生发展有关,而且与肿瘤的预后及复发有关。国内外文献对消化道肿瘤、泌尿系肿瘤及淋巴造血系肿瘤研究较多,但在甲状腺癌方面的研究较少,本研究采用免疫组化 SP 法,探讨 Survivin 在甲状腺癌组织、甲状腺腺瘤组织、癌旁甲状腺组织及正常甲状腺组织中的表达情况,探讨 Survivin 在甲状腺组织发生发展过程中的作用,以揭示 Survivin 与甲状腺癌的生物行为及预后的关系。

一、材料和方法

1. 标本取材:取自华中科技大学附属协和医院 2006 年 8 月至 2010 年 8 月手术治疗的甲状腺病例标本,所有标本均经 10% 甲醛固定、石蜡包埋,连续切取 5 μm 切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 2 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜备用,标本收集情况见表 1。其中 68 例甲状腺癌按 WHO 分期有乳头状癌 43 例,髓样癌 20 例,未分化癌 5 例,未见滤泡状癌;AJCC 分期 I 期 26 例,II 期 22 例,III 期 15 例,IV 期 5 例;淋巴结转移 30 例,未见淋巴结转移 38 例。

表 1 甲状腺疾病标本收集情况

组织种类	总例数	男性例数	女性例数	平均年龄(岁)
甲状腺癌	68	29	39	54
甲状腺腺瘤	54	21	33	38
癌旁甲状腺组织	32	8	24	35
正常甲状腺组织	23	12	11	39

2. 免疫组化试剂:Survivin 为鼠抗人单抗(产品编号为 ZM-0098),为美国 Zymed 公司产品,SP-9000 通用试剂盒为美国 Zymed 公司产品,购自武汉博士德生物技术公司。

3. 染色方法:切片脱蜡水化以后,用 3% H_2O_2 室温处理 15 min,微波修复抗原,正常山羊血清室温孵育 30 min,滴加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。滴加生物素标记的二抗,室温孵育 30 min,DAB 显色。经苏木精复染后,脱水、透明并封片,各步之间均经充分洗涤,用已知 Survivin 阳性的扁桃体作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性空白对照。

4. 判断标准:以细胞膜和细胞质内出现黄色至深棕色颗粒为阳性细胞。由两位病理医师采用双盲法阅片,结果不一致时不采用。阳性细胞达到总数的 25% 时确定为阳性,<25% 时确定为阴性。

5. 统计学分析:所有数据采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计分析,进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,另采用 BioMedCalc 软件进行核实,其结果与 SPSS 软件计算结果一致。

二、结果

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.03.042

基金项目:黄石市科技攻关计划项目(黄科鉴字[2010]第 1 号)

作者单位:435000 湖北省,武汉大学医学院黄石市中心医院普外科(刘钢、史火喜、袁又能);华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科中心(黄文广)

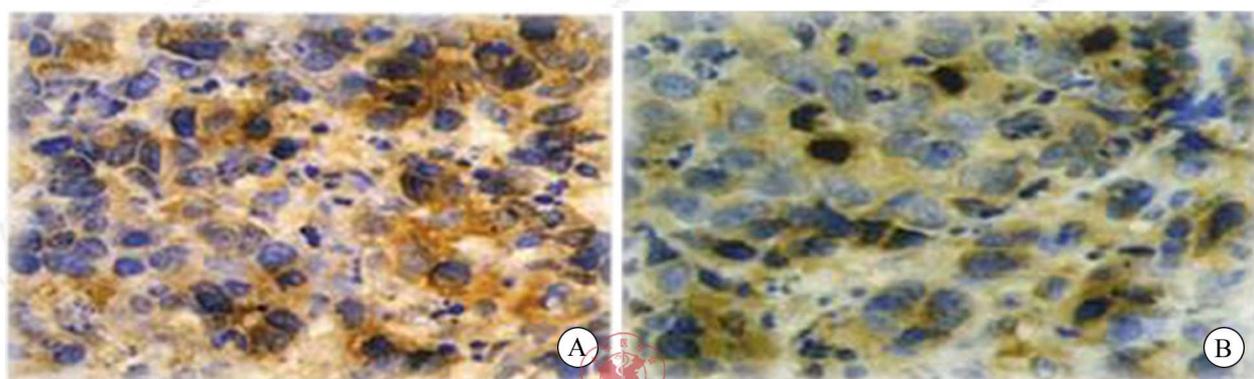
通讯作者:刘钢,Email:hsig06@163.com

1. Survivin 在不同甲状腺组织中的表达情况(图1,表2);光镜下 Survivin 阳性反应表现为细胞核或细胞质部分染成棕褐色。在甲状腺癌及甲状腺腺瘤组织,阳性部分局限于肿瘤上皮部分,在癌旁甲状腺组织,阳性部分局限于滤泡上皮,正常甲状腺组织染色阴性。Survivin 阳性率在甲状腺癌为 44.1%,高于甲状腺腺瘤(25.9%)($P < 0.05$)及癌旁甲状腺组织(18.8%)($P < 0.05$)。

表2 Survivin 在不同甲状腺组织中的表达情况

组织类型	例数	Survivin 阳性表达		χ^2 值	P 值
		例	%		
正常甲状腺	23	0	0	9.362 ^a	<0.05
癌旁甲状腺	32	6	18.8	3.091 ^a	<0.05
甲状腺腺瘤	54	14	25.9	2.046 ^a	<0.05
甲状腺癌	68	30	44.1	-	-

注:^a 与甲状腺癌组织比较



A: Survivin在未分化癌中的表达; B: Survivin在有淋巴结转移的癌中的表达

图1 Survivin在不同甲状腺癌组织中的表达(免疫组化 ×400)

2. 甲状腺癌中 Survivin 表达与甲状腺癌临床病理指标的关系(表3);Survivin 的表达程度与甲状腺癌组织学类型、淋巴结转移情况和临床病理分期有显著关系。在恶性程度较高的未分化癌和髓样癌中, Survivin 阳性率明显高于恶性程度较低的乳头状癌,在有淋巴结转移病例或临床Ⅲ、Ⅳ期病例, Survivin 阳性率高于相应的无淋巴结转移和临床Ⅰ、Ⅱ期病例,差异均有统计学意义。而将髓样癌与未分化癌中的 Survivin 阳性表达率进行比较,则 Survivin 在两者中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表3 甲状腺癌中 Survivin 表达与甲状腺癌病理指标之间的关系

病理指标	例数	Survivin 阳性表达		χ^2 值	P 值
		例	%		
组织学类型					
乳头状癌	43	14	32.6		
髓样癌	20	18	90.0	5.309 ^a	<0.05
未分化癌	5	5	100.0	2.710 ^a	<0.05
淋巴结转移					
有	30	26	86.7	9.582	<0.05
无	38	8	21.1		
病理分期					
Ⅰ、Ⅱ期	48	14	29.2	2.993	<0.05
Ⅲ、Ⅳ期	20	13	65.0		

注:^a 与乳头状癌组织比较

三、讨论

促进肿瘤细胞的凋亡在肿瘤的治疗上具有重要意义,本研究通过免疫组化方法检测甲状腺癌、甲状腺腺瘤、癌旁正常组织及正常甲状腺组织中 Survivin 表达的差异并分析表达水平与病理特征之间的关系,结果表明随着肿瘤恶性程度的增高, Survivin 的表达水平也增高,髓样癌组和未分化癌组显著高于乳头状癌组,淋巴结转移组高于未转移组,Ⅲ、Ⅳ期组高于Ⅰ、Ⅱ期组,其差异经检验具有统计学意义。认为肿瘤的恶性程度与 Survivin 的表达相关, Survivin 表达水平可作为判断甲状腺癌恶性程度的参考指标, Survivin 的激活与表达是甲状腺癌细胞凋亡通路上的重要事件,针对 Survivin 设计合适的干预方法对甲状腺癌进行基因治疗成为可能,针对 Survivin 的治疗有望成为甲状腺癌基因治疗的新的靶点。

唐小飞等^[1]通过免疫组化方法研究了 Survivin 在甲状腺恶性肿瘤和良性肿瘤中的差异性表达,揭示了 Survivin 与肿瘤恶性程度的相关关系;卢秀波等^[2]运用免疫组化方法研究了 Survivin 在正常甲状腺组织和分化型甲状腺癌,有淋巴结转移和无淋巴结转移的患者中的差异性表达,进一步揭示了 Survivin 与肿瘤恶性化倾向的协同关系;张海燕等^[3]利用存活素反义寡核苷酸杂交技术成功地消除了 Survivin 对甲状腺癌凋亡的抑制作用,从而极大地加速了肿瘤的凋亡进程。

回顾国内外文献^[4-6],多名专家学者对胃癌、结肠癌、食管癌、肝癌、喉癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、脑胶质瘤、乳腺癌、白血病、淋巴瘤等多种肿瘤中的 Survivin 表达进行过研究,采用的方法有免疫组化、RT-PCR、免疫印迹、流式细胞术及细胞周期分析技术等多种,结果均显示出 Survivin 的表达水平与肿瘤的病理分期及恶性程度相关,另有研究^[7-8]认为 Survivin 的凋亡抑制作用体现在对 Caspase 凋亡通路的负调节上, Caspase 是细胞凋亡的核心机制,即一系列 Caspase 的激活和级联反应驱赶着凋亡向前进行, Survivin 与 Caspase-3 和 Caspase-7 紧密结合从而使后两者失活,阻止了凋亡的进程。本研究探讨了 Survivin 的表达与甲状腺癌的病理特征及恶性程度之间的关系,结果与先前研究基本一致,进一步丰富和完善了人们对 Survivin 在凋亡中重要作用的认识。

基于甲状腺癌中 Survivin 在恶性程度高的组织中高表达,在恶性程度低的组织中低表达以及在正常甲状腺组织中不表达的特性,我们可以设计出针对 Survivin 的阻断性抗体免疫治疗或反义核酸基因治疗^[9-10]。另一方面,根据 Survivin 在细胞中的周期依赖性表达,靶向治疗能在周期中相应阶段增加化疗、放疗的药敏性^[11],从而更好地促进肿瘤细胞的凋亡,第三还可以借助与另外一些凋亡抑制基因具有协同性的特点,设计两种或三种抗凋亡抑制基因相结合,充分发挥多基因之间的协同抗肿瘤作用^[12-13],因此以 Survivin 为靶点的抗癌治疗有可能成为甲状腺癌治疗的新的突破口,而本文的研究结果为甲状腺癌的靶向治疗提供了理论基础。

综上所述, Survivin 基因是甲状腺癌凋亡通路上的负调控基因,该基因在甲状腺癌及其相关组织中的差异性表达是针对该基因进行基因治疗的理论基础,同时该基因还可以作为甲状腺癌病理分期和预后判断新的参考指标,为晚期甲状腺癌的综合治疗开辟了新的前景。

参 考 文 献

- [1] 唐小飞,王贵民,陈光,等. Stat3, Survivin 在甲状腺癌中的表达及临床意义. 中华实验外科杂志, 2010, 8(8):1106.
- [2] 卢秀波,安兆峰,王庆兆,等. Survivin 和 c-myc 在分化型甲状腺癌中的表达及临床意义. 中华实验外科杂志, 2009, 21(6):705-706.
- [3] 张海燕,高大兴,李萍,等. 存活素反义寡核苷酸对甲状腺癌细胞生长的抑制作用. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(1):63-66.
- [4] Kitamura H, Torigoe T, Honma I, et al. Expression and antigenicity of survivin, an inhibitor of apoptosis family member, in bladder cancer: implications for specific immunotherapy. Urology, 2006, 67(5):955-959.
- [5] Bao ST, Gui SQ, Lin MS. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006, 5(4):580-583.
- [6] Reiber H, Köller T, Palberg T, et al. Salt concentration and particle density dependence of electrophoretic mobilities of spherical colloids in aqueous suspension. J Colloid Interface Sci, 2007, 309(2):315-322.
- [7] Ulukus EC, Kargi HA, Sis B, et al. Survivin expression in non-small-cell lung carcinomas: correlation with apoptosis and other apoptosis-related proteins, clinicopathologic prognostic factors and prognosis. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(1):31-37.
- [8] Xu JH, Wang AX, Huang HZ, et al. Survivin shRNA induces caspase-3-dependent apoptosis and enhances cisplatin sensitivity in squamous cell carcinoma of the tongue. Oncol Res, 2010, 18(8):377-385.
- [9] Wang L, Yin F, Du Y, et al. Depression of MAD2 inhibits apoptosis and increases proliferation and multidrug resistance in gastric cancer cells by regulating the activation of phosphorylated survivin. Tumour Biol, 2010, 31(3):225-232.
- [10] Yan G, Duan R, Yin K, et al. Inhibition of survivin expression to induce the apoptosis of hepatocarcinoma cells by adenovirus-mediated siRNA. Biosci Trends, 2008, 2(2):88-93.
- [11] Chen XM, Luan XY, Lei DP, et al. Suppression of survivin expression by short hairpin RNA induces apoptosis in human laryngeal carcinoma cells. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2008, 70(3):168-175.
- [12] Song H, Xin XY, Xiao F, et al. Survivin gene RNA interference inhibits proliferation, induces apoptosis, and enhances radiosensitivity in HeLa cells. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008, 136(1):83-89.
- [13] Guan HT, Xue XH, Dai ZJ, et al. Down-regulation of survivin expression by small interfering RNA induces pancreatic cancer cell apoptosis and

enhances its radiosensitivity. World J Gastroenterol, 2006, 12(18):2901-2907.

(收稿日期:2010-10-22)

(本文编辑:吴莹)

刘钢,史火喜,袁又能,等.凋亡抑制基因 Survivin 在甲状腺癌组织中的表达及意义[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(3):840-843.