

# 非小细胞肺癌中 survivin 基因表达及其与 p53、bcl-2 基因表达的相互关系

丛德刚<sup>1</sup>, 王胜发<sup>2</sup>

Expression of survivin Gene and Its Relationship with Expression of p53, bcl-2 Genes in Non-small-cell Lung Cancer

CONG De-gang<sup>1</sup>, WANG Sheng-fa<sup>2</sup>

1. Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Medical College of Hangzhou Teachers College, Hangzhou 310015, China; 2. Department of Thoracic Surgery, the First Hospital Affiliated of Harbin Medical College

**Abstract :Objective** To study the expression of a novel inhibitor gene of apoptosis, survivin, in non-small-cell lung cancer and its relationship with the expression of p53, bcl-2 genes. **Methods** Using streptavidin-biotin peroxidase (SP) method, we examined the expression of survivin, p53 and bcl-2 genes in 76 NSCLC tumor samples and the expression of survivin gene in 30 adjacent normal lung tissue samples. **Results** survivin was expressed in 46 of 76 (60.5%) cases of lung cancer but was not expressed in 30 cases of adjacent normal lung tissues. There was no relationship between survivin gene expression and age, sex, cigarette smoking, histologic subtype, differentiation, tumor size, lymph node metastases, or TNM Stages. survivin positive cases were strongly associated with p53 expression (33/46, 71.7% versus 13/30 43.3%,  $P < 0.05$ ) and bcl-2 expression (36/38, 94.7% versus 10/38 26.3%,  $P < 0.01$ ). **Conclusions** The survivin gene was expression in a vast majority of NSCLC, it also has a great relationship with the expression of p53 and bcl-2. survivin gene may play a role in the pathway of carcinogenesis and be identified as a defining diagnostic marker and a potential therapeutic target in NSCLC.

**Key words**: survivin; p53; bcl-2; Lung cancer; Immunohistochemistry

**摘要:目的** 探讨 survivin 基因在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达,及其与 p53、bcl-2 蛋白表达的相互关系。**方法** 应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(SP法),检测 survivin、p53、bcl-2 基因在 76 例 NSCLC 肿瘤组织及 survivin 基因在 30 例病灶旁正常肺组织中的表达。**结果** survivin 基因在正常肺组织中不表达,76 例肺癌组织中 46 例表达阳性,占 60.5%。survivin 基因表达与肺癌患者的年龄、性别、吸烟、病理类型、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移及 TNM 分期无明显相关关系。肺癌组织中 p53 蛋白表达阳性、阴性者中,survivin 基因表达阳性率分别为 71.7% (33/46)、43.3% (13/30),两者比较,差异有显著性( $P < 0.05$ );bcl-2 蛋白表达阳性、阴性者中,survivin 基因表达阳性率分别为 94.7% (36/38)、26.3% (10/38),两者比较,差异有极显著性( $P < 0.01$ )。**结论** survivin 基因在肺癌组织中的异常表达,对 NSCLC 的发生发展起重要作用。survivin 基因表达与肺癌组织中 p53、bcl-2 蛋白的异常表达密切相关。survivin 基因可能成为 NSCLC 新的诊断标志及基因治疗的新靶点。

**关键词**: survivin; p53; bcl-2; 肺癌

**中图分类号**: R734.2; Q786 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-8578(2005)12-0758-03

## 0 引言

凋亡调节紊乱有助于细胞的恶性转化和肿瘤的进展。研究凋亡的调节机制对于弄清肿瘤包括肺癌的发病机制及提供新的肿瘤防治措施具有重要的意义。survivin 是新近发现的一种凋亡抑制蛋白,其组织分布具有明显的细胞选择性,与另一凋亡抑制基因 bcl-2 的分布显著不同,在正常成人已分化的

组织(胸腺、生殖腺除外)不表达而在多种肿瘤组织中表达,且 survivin 的表达与患者的预后密切相关<sup>[1-3]</sup>。我们采用免疫组织化学方法检测了 76 例肺癌组织和 30 例病灶旁正常肺组织中 survivin 蛋白表达,探讨其与临床病理特征及 p53、bcl-2 表达的相互关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

我院胸外科 2001 年 12 月~2002 年 4 月肺癌

收稿日期:2004-12-06;修回日期:2005-03-30

作者单位:1. 310015 杭州师范学院附属医院胸外科;

2. 哈尔滨医科大学附属第一医院胸外科



手术患者 76 例,其中男 48 例,女 28 例,年龄 37 ~ 76 岁,中位年龄 58 ±10 岁,肺癌组织 76 例,病灶旁正常肺组织 30 例。依据 UICC 1997 年新的修订标准进行 TNM 分期<sup>[4]</sup>,其中 期 48 例, 期 6 例, 期 16 例, 期 6 例。按病理形态学分为:鳞状细胞癌 30 例,腺癌 38 例,大细胞癌 8 例。按分化程度分为:高、中分化癌 18 例,低分化、未分化癌 58 例。所有患者均为原发性肺癌,术前均未接受过化疗或放疗等任何治疗。标本经 10 % 中性福尔马林固定,常规脱水包埋,制成 4μm 厚连续石蜡切片。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法,一抗 survivin 为鼠抗人单克隆抗体(Neomarkers 公司,美国),工作浓度为 1:30;一抗 p53、bcl-2 为鼠抗人单克隆即用型抗体(Santa cruz 公司,美国);SP 试剂盒为福州迈新公司产品。染色步骤按产品说明书进行。DAB 显色。选用已知阳性胃癌切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2 结果判定

光学显微镜下观察,胞核或胞浆染为淡黄至棕黄色者为阳性细胞。凡显色强度与背景无明显差别者为阴性。

1.3 统计学处理

数据用阳性率(%)表示,显著性用  $\chi^2$  检验,用 SPSS 10.0 软件完成。

2 结果

2.1 肺癌和病灶旁正常肺组织 survivin 基因的表达

survivin 基因表达阳性染色主要定位于肿瘤细胞胞浆中,为粗细不一的棕黄色颗粒,见图 1、2。正常肺组织中未见 survivin 基因表达,而 76 例肺癌组织中 46 例 survivin 基因表达阳性,占 60.5 %。

2.2 肺癌组织 survivin 基因表达与临床病理特征的关系

survivin 基因表达与肺癌患者的年龄、性别、吸烟、病理类型、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移及 TNM 分期均无明显相关关系,见表 1。

2.3 肺癌组织 survivin 基因表达与 p53、bcl-2 基因表达的相关性

p53 蛋白阳性产物积聚在肿瘤细胞核中,见图 3。肺癌组织中 survivin 基因表达与 p53 蛋白表达密切相关,p53 蛋白阳性、阴性者中,survivin 基因表达阳性率分别为 71.7 % (33/46)、43.3 % (13/30),两者比较,差异有显著性( $P < 0.05$ )。bcl-2 蛋白阳性产物主要定位于细胞浆中,见图 4。肺癌组织中

survivin 基因表达与 bcl-2 蛋白表达密切相关,bcl-2 蛋白表达阳性、阴性者中,survivin 基因表达阳性率分别为 94.7 % (36/38)、26.3 % (10/38),两者比较,差异有极显著性( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 survivin 基因的表达与肺癌临床病理特征及 p53、bcl-2 蛋白表达的关系

类别	例数	阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)	$\chi^2$ 值	P
年龄						
< 60 岁	36	20	16	55.6	0.707	0.400
> 60 岁	40	26	14	65.0		
性别						
男	48	30	18	62.5	0.212	0.645
女	28	16	12	57.1		
吸烟						
有	40	26	14	65.0	3.172	0.075
无	36	20	16	55.6		
病理类型						
鳞癌	30	20	10	66.7	0.955	0.620
腺癌	38	22	16	58		
大细胞癌	8	4	4	4/8*		
分化程度						
低、未分化	58	34	24	58.6	0.372	0.542
中、高分化	18	12	6	66.7		
原发肿瘤						
T <sub>1</sub>	16	10	6	62.5	2.678	0.444
T <sub>2</sub>	46	30	16	65.2		
T <sub>3</sub>	6	2	4	2/6*		
T <sub>4</sub>	8	4	4	4/8*		
淋巴结转移						
阳性	18	8	10	44.4	2.553	0.110
阴性	58	38	20	65.5		
病理分期						
~ 期	54	36	18	66.7	2.944	0.086
~ 期	22	10	12	45.5		
p53 蛋白表达						
阴性	30	13	17	43.3	6.132	0.013
阳性	46	33	13	71.7		
bcl-2 蛋白表达						
阴性	38	10	28	26.3	37.229	0.000
阳性	38	36	2	94.7		

\*例数少于 10,不计算百分率

3 讨论

凋亡抑制延长了细胞的生命,有利于突变的累积,是恶性肿瘤形成的重要机制之一。人体细胞凋亡抑制蛋白(human inhibitor of apoptosis protein, hIAP)是抑制细胞凋亡的重要成分,这一蛋白家族抑制细胞凋亡的作用远大于 bcl-2 家族<sup>[5]</sup>。survivin 是新近发现的最小的 hIAP 蛋白,由 142 个氨基酸构成,与其它 hIAP 家族蛋白不同,只包含一个部分

保守的 BIR 结构 (baculovirus IAP repeat), 缺少一个羧基末端的环指结构。survivin 的抗凋亡功能在于直接抑制了半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性。这一功能可能是通过与有丝分裂的微管聚合和解聚来实现的<sup>[6]</sup>。此外, survivin 还可能通过抑制细胞色素 C 的释放在线粒体水平参与抗凋亡。

survivin 基因表达具有高度的组织特异性。我们的研究结果显示, 肺癌组织 survivin 蛋白表达的阳性率为 60.5%, 与王孝养等<sup>[7]</sup>报道的肺癌组织中 survivin mRNA 表达的阳性率 61% 结果相似, 较 Monz 等<sup>[3]</sup>报道的肺癌组织中 survivin mRNA 表达的阳性率 85.5% 低; 病灶旁正常肺组织中无 survivin 蛋白表达, 与多数报道的关于其他肿瘤病灶旁正常组织中无 survivin 表达的结果相同<sup>[1,8,9]</sup>。Monz 等<sup>[3]</sup>、王孝养等<sup>[7]</sup>分别报道在肺癌病灶旁正常肺组织中检测出了 survivin mRNA (12%、19%), 与我们的实验结果不符, 或许因实验方法不同所致, 根本原因有待进一步研究阐明。survivin 基因在肺癌组织中较高的阳性表达, 提示 survivin 基因可能通过抑制肺癌细胞凋亡对肺癌的发生发展起重要作用, 并可能成为一个新的肺癌诊断标志。导致 survivin 基因在肿瘤中再活化的原因尚不清楚。

survivin 基因表达与患者的年龄、性别、吸烟、病理类型、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移及 TNM 分期均无明显相关关系, 与 Monz 等<sup>[3]</sup>、王孝养等<sup>[7]</sup>研究结果一致, 表明检测 survivin mRNA 和蛋白的表达对恶性程度、病情轻重的预测无明显价值。Sarela 等<sup>[8]</sup>报道 59 例 期直肠癌患者中 62.7% 有 survivin 基因表达, 阴性表达组术后 5 年生存率 (94.4%) 远高于阳性组 (44.8%,  $P = 0.004$ ), 在肺癌和乳腺癌等也有相似的结果<sup>[3,9]</sup>, 表明 survivin 基因表达是肿瘤患者的预后指标。

p53 和 bcl-2 亦是细胞凋亡的重要调控基因, 在某些人类肿瘤中表达。我们的研究结果显示 survivin 基因的表达与 p53、bcl-2 蛋白异常表达密切相关。在转录水平上野生型 p53 对 bcl-2 基因的表达

有下调作用, 而人类肿瘤中存在 p53 的高突变率, 可能使 p53 丧失了对 survivin 的负调控机制<sup>[10]</sup>。survivin 基因所在的 17q25 染色体不稳定, 此位点可能涉及 t(14;18) 易位而导致 bcl-2 基因转录激活。另外, survivin 和 bcl-2 基因都是由无 TATA 的富含 GC 启动子调节的, 转录激活均增强细胞的增殖。推测 survivin 基因和 bcl-2 可能有共同的转录激活机制, 两者协同发挥抗凋亡效应。

(本文图见封 3)

#### 参考文献:

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8):917-921.
- [2] Kawasaki H, Altier DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rats in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(22):5071-5074.
- [3] Monz M, Rafael R, Enrigueta F, et al. A novel anti-apoptosis re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(7):2100-2104.
- [4] Lababede O, Meziane MA, Rice TW. TNM staging of lung cancer: a quick reference chart [J]. *Chest*, 1999, 115(1):233-235.
- [5] Lacasse EC, Baid S, Korneluk RG, et al. The inhibitors of apoptosis (IAP) and their emerging role in cancer [J]. *Oncogene*, 1998, 17(25):3247-3259.
- [6] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396(6711):580-584.
- [7] 王孝养, 陈仕新, 张珍祥, 等. survivin 基因在非小细胞肺癌中的表达及与 p53、c-myc、k-ras 蛋白表达的关系 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(6):371-374.
- [8] Sarela AI, Macadam RCA, Farmery SM, et al. Expression of the anti-apoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma [J]. *Gut*, 2000, 46(5):645-650.
- [9] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1):127-134.
- [10] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9):1808-1812.

[编辑: 贺文]

## 靶向 HER-2 mRNA 反义硫代寡核苷酸体外 抗乳腺癌活性研究

(正文见 745 页)

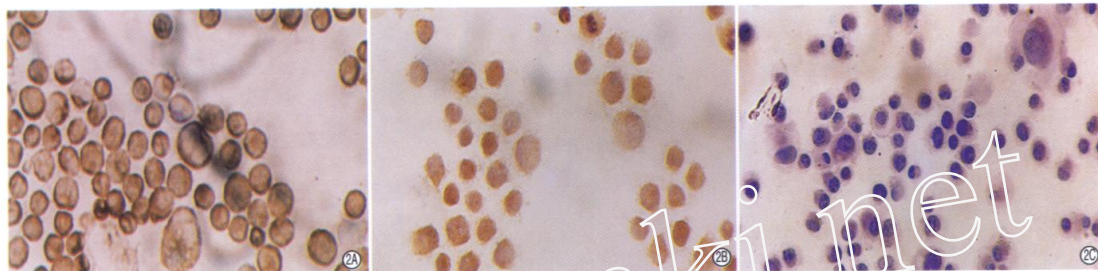


图 2 MDA-MB-453 细胞经不同浓度处理前后 HER2 蛋白水平的变化

A: HA6722 处理前 (染色 3+) ( $\times 400$ );

B:  $80\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HA6722 处理后 (染色 2+) ( $\times 400$ );

C:  $200\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HA6722 处理后 (染色 0+) ( $\times 400$ );

## 非小细胞肺癌中 survivin 基因表达及其 与 p53、bcl-2 基因表达的相互关系

(正文见 758 页)

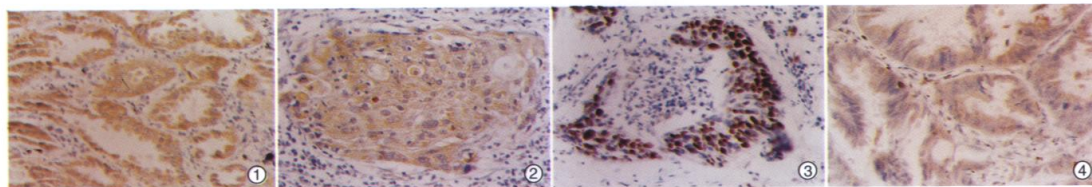


图 1 survivin 基因在肺腺癌组织中呈强阳性表达, 胞浆中可见棕黄色细小颗粒沉积, 阳性细胞呈弥漫分布 (SP  $\times 400$ )

图 2 survivin 基因在肺鳞癌组织中的强阳性表达 (SP  $\times 400$ )

图 3 p53 蛋白在肺鳞癌细胞核中的表达 (SP  $\times 400$ )

图 4 bcl-2 蛋白在肺腺癌细胞浆中的表达 (SP  $\times 400$ )

## DPC4 基因在肺癌中的表达及其与微血管 形成和凋亡的关系

(正文见 761 页)

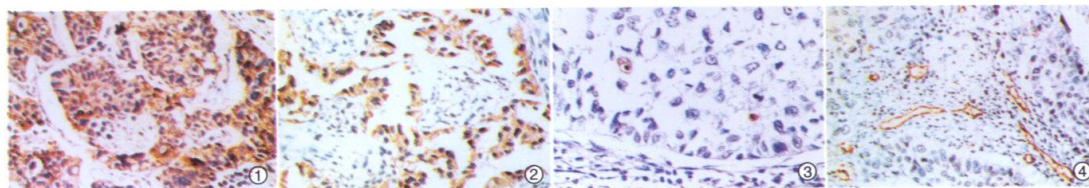


图 1 DPC4 在 NSCLC 高分化鳞癌中呈阳性表达, 癌巢中可见角化珠 (SP  $\times 200$ )

图 2 VEGF 在 NSCLC 低分化腺癌中呈强阳性表达 (SP  $\times 400$ )

图 3 肺鳞癌 TUNEL 染色阳性细胞 (SP  $\times 400$ )

图 4 CD34 在 NSCLC 中分化鳞癌间质微血管中的表达 (SP  $\times 400$ )