

非霍奇金淋巴瘤 survivin 和 Ki67 的表达及意义

李红玲¹, 孙秉中¹, 马福成²

Significance and Expression of survivin Protein and Ki67 in Non-hodgkin sLymphoma

LI Hong-ling, SUN Bin-gzhong, MA Fu-cheng

Department of Hematology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

Abstract: Objective To explore the expression of survivin and Ki67 in malignant non-hodgkin s lymphoma (NHL) cells with variable aggressiveness and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemical staining method and immunofluorescence system was used to detect the expression of survivin and Ki67. **Results** Survivin protein immunoreactivity was seen 0% in reactive hyperplasia of lymph node (LNRH) and 51.9% (28/54) in NHL. Survivin expression increased with the tumor malignancy of NHL, there is a significant difference between the expression rate of survivin in low grade (19%, 4/21) and intermediate to high grade NHL (72.7%, 24/33) ($P < 0.001$). Both survivin and Ki67 had some relation with the grading of the NHL. The expression of survivin was positively correlated with Ki67. **Conclusion** It is suggested that the over-expression of survivin was detected in NHL, survivin might interfere with the antiapoptosis function in the tumor formation.

Keywords: Non-hodgkin s lymphoma; survivin; Ki67; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨 survivin 蛋白、增殖相关抗原 Ki67 在不同恶性度非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 中的表达及意义。方法 应用免疫组织化学染色法检测 NHL 组织中 survivin 蛋白和 Ki67 的表达。结果 在反应性增生淋巴组织 (LNRH) 中未检测到 survivin 蛋白表达。在 NHL 中 survivin 蛋白表达率为 51.9% (28/54), 其中低度恶性及中高度恶性组 NHL 中的表达率分别为 19% (4/21)、72.7% (24/33), 两组之间比较差异有显著性 ($P < 0.001$)。survivin、Ki67 表达与恶性度均显著相关, 而且 survivin 表达也与 Ki67 指数相关。结论 survivin 蛋白在 NHL 患者组织中高表达, 并可能通过其抗凋亡功能参与 NHL 发生发展。

关键词: 非霍奇金淋巴瘤; survivin; Ki67 抗原; 免疫组织化学

中图分类号: R733.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004) 02-0070-03

0 引言

肿瘤发生的直接原因是基因的改变。新近发现的凋亡抑制基因 survivin 在人体多种肿瘤组织中广泛表达, 通过凋亡抑制、肿瘤血管生成等机制参与肿瘤的发生发展, 并与某些肿瘤恶性度及预后不良相关^[1]。我们应用免疫组织化学染色法检测 survivin 蛋白和 Ki67 在非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 中的表达, 探讨 survivin 基因在不同恶性程度 NHL 发病机制中的作用、与 Ki67 表达的关系及临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本 收集 1999 ~ 2002 年西京医院病理科确诊 NHL 存档蜡块共 54 例。男 35 例, 女 19 例, 中位

年龄 49 (6 ~ 81) 岁。淋巴结内病变 31 例, 淋巴结外病变 23 例。按 WHO97 分类标准并参考 1985 年成都会议的标准进行病理分型, 其中低度恶性组 21 例为惰性淋巴瘤, 中高度恶性组 33 例为侵袭性淋巴瘤。免疫组化证实为 41 例为 B 细胞 NHL, 13 例为 T 细胞 NHL, 另取淋巴结反应性增生 (LNRH) 10 例作为对照组。

1.2 实验方法 采用免疫组织化学染色法。所用 survivin 多克隆抗体 (FL-142, sc10811)、Ki67 抗体购自 santercruz 公司, 工作浓度 1:50; DAKO envision+TM (K4000) 购自丹麦 DAKO 公司。以微波枸橼酸盐进行抗原修复, DAB 显色, 以已知 survivin 阳性的肝癌细胞为阳性对照, PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 survivin 阳性染色均定位于细胞浆, 见图 1。染色结果按阳性细胞数的比例分为: -: 阳性细胞数 <5%; +: 阳性细胞数 25%; ++:

收稿日期: 2003-01-30; 修回日期: 2003-12-04
作者单位: 1. 710032 西安, 第四军医大学西京医院血液科, 2. 病理科

阳性细胞数占 25% ~ 50%;+++ 阳性细胞数 50%。Ki67 阳性染色定位于细胞核,每例标本检查 20 个高倍视野,计算其中 Ki67 阳性细胞与总的细胞之比值,以百分数表示 Ki67 标记指数 (Labeling Index,LI)。

1.4 统计学分析 计数资料用 χ^2 检验,对计量资料用 t 检验,相关性用 Spearman 等级相关分析,统计过程应用 SPSS10.0forWindows 软件包进行。

2 结果

2.1 survivin 在良性淋巴组织中的表达 在反应性增生淋巴组织中 survivin 表达为 0% (0/10),见图 1。

2.2 survivin、Ki67 在 NHL 中的表达 survivin 阳性表达主要位于细胞浆,见图 2。survivin 在 NHL 中的表达率平均为 51.9% (28/54),在低度恶性组的表达率低于中高度恶性组,其中低度恶性组为 19% (4/21),中高度恶性组为 72.7% (24/33),两组之间比较差异有显著性 ($P < 0.001$),见表 1。Ki67 表现出同样规律。NHL 低度恶性、中高度恶性之间 Ki67LI 差异有显著性 ($P < 0.05$),恶性程度低的,LI 低;恶性程度高的,LI 高,见表 2。

表 1 survivin 在 NHL 的表达与临床病理特征的关系

临床病理参数	例数	survivin 蛋白表达		χ^2	P
		例数	阳性 (%)		
性别	男	35	17	0.845	0.358
	女	19	11		
年龄	>45	34	16	0.429	0.513
	<45	20	12		
部位	结内	31	16	0.002	0.967
	结外	23	12		
免疫分型	T 细胞	13	6	0.233	0.637
	B 细胞	41	22		
恶性度	良性组	10	0	12.74	<0.001
	低度恶性组	21	4		
	中高度恶性组	33	24		
合计		54	28		

表 2 Ki67 增殖指数 LI 与 NHL 恶性度及 survivin 蛋白表达的关系

项目	survivin		NHL	
	阴性	阳性	低度恶性	中~高度恶性
例数	26	28	21	33
Ki67 增殖指数	24.65 ±8.84	30.43 ±10.85 ^a	23.90 ±8.64	30.03 ±10.62 ^b

注:^a:与阴性组相比 $t = 2.134$, $P = 0.038$; ^b:与低度恶性组相比 $t = 2.216$, $P = 0.031$

2.3 NHL 中 survivin 和 Ki67 表达与临床病理特征的关系及相互关系,见表 1。survivin、Ki67 的表达

与 NHL 免疫分型及首发部位、年龄、性别无相关性。survivin 表达与 Ki67LI 呈显著正相关关系 ($r = 0.323$, $P = 0.017$),见表 2。

3 讨论

survivin 是凋亡抑制蛋白家族 (inhibitor of apoptosis protein,IAP) 新成员,1997 年由耶鲁大学 Altieri 等用效应蛋白酶受体-1 (effector cell protease receptor-1,EPR-1) cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中首先分离出来。survivin 的表达具有细胞周期依赖性,在细胞周期的 G₂/M 期表达。在有丝分裂的早期与纺锤体的微管蛋白相连,干扰 survivin 与微管蛋白的作用可使 survivin 抗凋亡功能丧失^[2]。survivin 基因参与细胞凋亡的调控,并通过抑制细胞凋亡而发挥作用。survivin 与 bcl-2 抑制凋亡的机制不同,bcl-2 通过干扰细胞色素 C 自线粒体的释放阻断 caspase 蛋白酶级联反应,而 survivin 在 bcl-2 下游直接抑制于 caspase-3 和 caspase-7 蛋白酶^[3]。体外实验证实 survivin 可抑制抗癌药、Fas、Bax 等诱导的凋亡^[4]。研究发现 survivin 广泛表达于多种转化细胞及常见各种肿瘤中,survivin 高表达还与白血病等血液系统肿瘤预后不良相关^[5,6]。

本研究应用免疫组化法对 54 例不同恶性度 NHLsurvivin 进行检测,结果显示 survivin 表达与 NHL 免疫分型以及患者的临床病理特征如年龄、性别、结外累及部位等无明显相关性。survivin 在低度恶性 NHL 中的表达低于中高度恶性组。结果与一些对慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤的研究大致一致^[7,8]。提示 survivin 分子在淋巴瘤的侵袭浸润及发展中起重要作用,可作为判断淋巴瘤恶性程度高低的参考指标之一。由于 survivin 特异性表达于肿瘤组织而在正常组织不表达的特点,可能成为淋巴瘤治疗的新靶标。Adida 等^[9]发现 survivin 阳性 NHL 患者五年生存率显著低于 survivin 阴性者,且对化疗反应差,治疗后复发率高,总生存期明显缩短,Cox's 回归分析,survivin 是恶性淋巴瘤的一个独立预后指标。说明 survivin 检测还具有预后判断的意义。survivin 对 NHL 预后判断的意义还有待于今后随访证实。

异常增高的分裂增殖能力是恶性肿瘤细胞的一个特异的生物学标志。业已证实 Ki67 的检测,能反映肿瘤细胞的增殖活性,是判断肿瘤侵袭力及肿瘤预后的有效指标^[1,10,11]。本研究观察了 54 例 NHL 标本,随着 NHL 恶性程度的增高,Ki67LI 逐渐增高,低度恶性组与中高度恶性组之间差异显著 ($P < 0.05$)。说明 Ki67LI 是评估 NHL 肿瘤细胞增殖的

良好指标,与 NHL 侵袭有关,对 NHL 临床分型、组织分级具有一定参考价值。

本研究还发现 survivin 表达与 Ki67 指数相关, survivin 表达阳性组的 Ki67LI 显著高于阴性组,呈正相关趋势,与胰腺癌中^[10]的研究结果一致,提示 survivin 蛋白高表达可能通过抑制凋亡而使肿瘤细胞异常增殖,在 NHL 肿瘤的发生、发展过程中可能有一定作用。survivin 可望成为淋巴瘤诊断、治疗的新靶标。
(本文图见封 2)

参考文献:

[1] Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis [J]. *Cancer*, 2001, 91 (11): 2026-2032.

[2] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396 (6711): 580-584.

[3] Shin S, Sun GBJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40 (4): 1117-1123.

[4] Tamml L, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and prevents apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (23): 5315-5320.

[5] Mori N, Yamada Y, Hata T, et al. Expression of survivin in HTLV-1-infected T-cells and primary ATL cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282 (5): 1110-1113.

[6] Adida C, Recher C, Raffoux E, et al. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2000, 111 (1): 196-203.

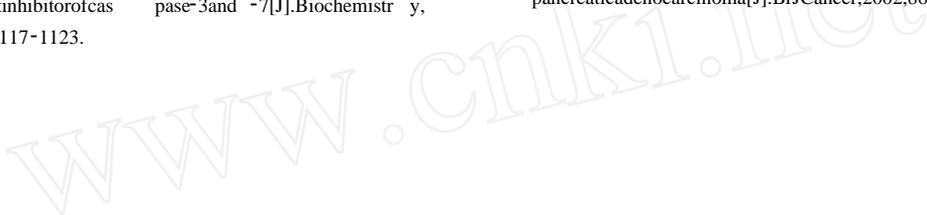
[7] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. Anovel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3 (8): 917-921.

[8] Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al. Survivin expression on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2001, 97 (9): 2777-2783.

[9] Adida C, Haioun C, Gaulard P, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Blood*, 2000, 96 (5): 1921-1925.

[10] Sarella AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin, anovelinhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86 (6): 886-892.

(安凤校对)



非霍奇金淋巴瘤 Survivin 和 Ki67 的表达及意义

(正文见 70 页)

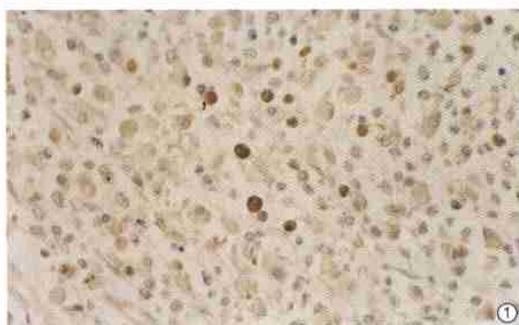


图1 survivin 在非霍奇金淋巴瘤中的阳性表达
(Envision $\times 400$)



图2 survivin 在反应性增生淋巴结中的阴性表达
(Envision $\times 200$)

胃癌中 cyclinD₂ 和 p27^{kip1} 的表达及意义

(正文见 76 页)

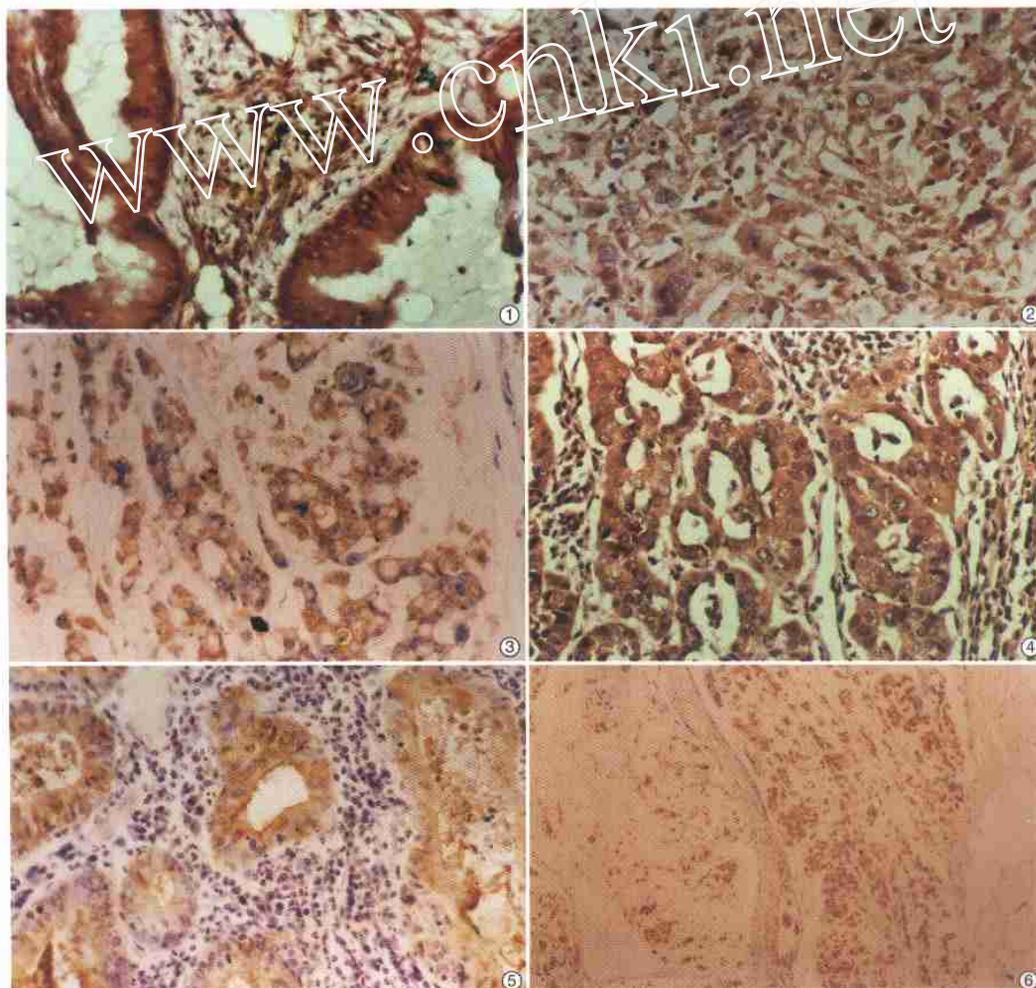


图1 胃高分化腺癌 cyclinD₂ 阳性, 以细胞核为主, $\times 400$

图3 胃印戒细胞癌 cyclinD₂ 阳性, 以细胞浆为主, $\times 400$

图5 胃高分化腺癌, p27^{kip1} 阳性胞浆为主, $\times 400$

图2 胃低分化腺癌 cyclinD₂ 阳性, 以细胞浆为主, $\times 400$

图4 胃高分化腺癌 p27^{kip1} 阳性, 以细胞核为主, $\times 400$

图6 胃印戒细胞癌, cyclinD₂ 阳性, 癌细胞在肌层和浆膜层浸润, $\times 100$