

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.11.010

Ezrin 和 survivin 在非小细胞肺癌的表达及其相关性

王靖华¹, 张敏¹, 陈龙邦¹, 马恒辉²

Expression and Correlation of Ezrin and survivin in Non-small Cell Lung Cancer

WANG Jing-hua¹, ZHANG Min¹, CHEN Long-bang¹, MA Heng-hui²

1. Department of Oncology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China, 2. Department of Pathology

Abstract: Objective To study the Ezrin and survivin expression and their correlation and clinical significances in NSCLC. **Methods** The expression of Ezrin and survivin were detected in 86 NSCLC by Envision method of immunohistochemical staining. Their relations with the clinical pathologic and other characters were analyzed. **Results** The high expression rate of Ezrin in non-small cell lung cancer was 60.5% and significantly correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not associated with gender, histologic subtype, TNM stages, differentiation and smoking. Meanwhile, the high expression rate of survivin in non-small cell lung cancer was 65.1% and significantly correlated with TNM stages and lymph node metastasis ($P < 0.05$), while not associated with gender, histologic subtype, differentiation and smoking. The expression of Ezrin and survivin was coincident in NSCLC ($r = 0.384$). **Conclusion** Ezrin and survivin might play synergetic roles in the process of carcinogenesis of NSCLC. Their expression may be close associated with non-small cell lung cancer metastasis, combination detection of Ezrin and survivin may be valuable for diagnosing lung cancer metastasis and providing evidence for clinical treatment.

Key words: Lung cancer; Ezrin; survivin; Metastasis; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨 Ezrin 和 survivin 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达情况及其相关性。**方法** 利用免疫组织化学(Envision 法)对 86 例非小细胞肺癌组织石蜡标本进行 Ezrin 和 survivin 蛋白表达的检测和分析。**结果** 非小细胞肺癌中 Ezrin 蛋白高表达率为 60.5% (52/86), 其与患者有无淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$), 与性别、肿瘤组织学类型、分化程度、临床 TNM 分期、吸烟无明显相关性 ($P > 0.05$), survivin 的阳性表达率为 65.1% (56/86), 并且与患者临床 TNM 分期、有无淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$), 与性别、肿瘤组织学类型、分化程度、吸烟无关 ($P > 0.05$), 同时, Ezrin 和 survivin 表达呈显著正相关 ($r = 0.384$)。 **结论** Ezrin 和 survivin 在 NSCLC 的发生发展中具有协同作用, 其表达与非小细胞肺癌转移密切相关, 两者联合有助于判断肿瘤转移和为临床治疗提供参考依据。

关键词: 肺癌; Ezrin; survivin; 转移; 免疫组织化学

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)11-0936-04

0 引言

肺癌是目前最常见的恶性肿瘤之一, 其中非小细胞肺癌约占 80%。Ezrin 是一种膜细胞骨架连接蛋白, 是 ERM (ezrin, radixin, moesin) 蛋白家族成员之一, 近来已有不少文献报道 Ezrin 参与了多种肿瘤的生长和转移^[1], 而在肿瘤发生发展过程中, 不仅细胞增殖和分化存在异常, 细胞凋亡的失平

衡也起着重要作用, survivin 是新近发现的凋亡抑制作用最强的凋亡抑制因子^[2], survivin 在正常分化成熟的组织细胞中不表达, 而当细胞发生转化或恶变时又重新获得表达, 且在多种恶性肿瘤中都有高表达, 提示其在肿瘤发生中起重要的作用。

1 资料与方法

1.1 标本及试剂来源

收集我院 2000~2007 年手术切除后经病理证实的 NSCLC 患者标本 86 例, 取同期手术的 18 例肺上皮良性病变组织标本作为对照, 所有病例均经 HE 染色病理确诊。所有病例中, 男性患者 67 例, 占 77.9%, 女性患者 19 例, 占 22.1%, 发病年龄 32

收稿日期: 2008-07-02; 修回日期: 2009-04-01

基金项目: 南京军区南京总医院科研基金资助项目 (NZ06006)

作者单位: 1. 210002 南京军区南京总医院肿瘤内科, 2. 病理科

作者简介: 王靖华(1956-), 女, 硕士, 主任医师, 主要从事肿瘤内科治疗研究

~80 岁,平均 59.4 岁;鳞状细胞癌 37 例,腺癌 37 例,腺鳞癌 12 例;高分化癌 8 例,中分化癌 45 例,低分化癌 33 例;TNM 分期中,Ⅰ期 24 例,Ⅱ期 25 例,ⅢA 期 13 例,ⅢB~Ⅳ期 24 例(1997 年肺癌国际分期修订版)。

鼠抗人 Ezrin 单克隆抗体购自美国 Neo Markers 公司, survivin 多克隆抗体购自美国 Zymed 公司,均为浓缩性抗体, Ezrin 工作稀释度为 1:200, survivin 工作稀释度为 1:150, EnVision 免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

标本经 4% 中性甲醛固定,石蜡包埋,切片厚 3~4 μm,免疫组织化学染色。免疫组织化学采用 EnVision 二步法,高温、高压抗原修复,修复液为 1mmol/L EDTA (pH 8.0),以已知阳性片做阳性对照,以 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)代替一抗作为阴性对照,DAB 显色,苏木精衬染。

1.3 免疫组织化学阳性结果判断

Ezrin 阳性表达在肿瘤细胞胞质内,为棕黄色颗粒状沉淀,均一弥漫性分布。按染色强度和阳性表达细胞数,参考 Mathew 等^[3]分级标准:(-),无表达;(+), <50% 细胞阳性表达或染色较浅;(++), ≥50% 阳性表达且深染。(+) 归为阳性表达,(++) 为强阳性表达。

survivin 阳性着色在肿瘤细胞胞质内和胞核中,出现棕黄色颗粒为阳性细胞,结果判断评分标准参考 Ikehara 等^[2]:对每张切片阳性细胞的阳性程度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别计 0、1、2、3 分,然后选取代表性的区域,计数 5 个高倍视野(×400)下阳性细胞所占的百分比,阳性细胞数 <5% 为 0 分, ≥5%~25% 为 1 分, ≥25%~50% 为 2 分, ≥50% 为 3 分,最后将两项分数相加,以切片中两项之和 ≥3 分为阳性。

1.4 统计学方法

应用 SPSS15.0 软件包进行统计分析,采用卡方检验和 Fisher's 精确检验, Ezrin 与 survivin 之间关系采用 Spearman 等级相关性分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ezrin 和 survivin 在良性病变肺上皮组织和非小细胞肺癌中的表达

在 18 例良性病变肺上皮组织中, Ezrin 蛋白在肺泡上皮中呈阴性表达,在 86 例非小细胞肺癌标本中, Ezrin 蛋白有 52 例强阳性表达,高表达率为 60.5%, Ezrin 阳性表达于肺癌细胞质中,以均一弥漫分布为主,也可见粗大棕黄色颗粒,在间质中未见阳性表达,见图 1、2。两者间差异有统计学意义($\chi^2 = 21.767, P<0.01$)。

survivin 蛋白在癌组织中的阳性表达率为 65.1%(56/86),阳性表达于肺癌细胞胞质和胞核中,为棕黄色颗粒状,在良性病变肺上皮组织中均呈阴性表达,见图 3、4。两者差异有统计学意义($\chi^2 = 25.395, P<0.01$)。

2.2 非小细胞肺癌组织中 Ezrin 和 survivin 与临床病理特征的关系

有淋巴结转移的 NSCLC 组织 Ezrin 蛋白阳性表达率为 71.1%,显著高于无淋巴结转移的 NSCLC 组织 48.8%(P<0.05),并且有淋巴结转移的 NSCLC 组织 survivin 阳性率 75.6%,显著高于无淋巴结转移的 NSCLC 组织 53.7%(P<0.05), Ezrin 强阳性表达率与患者有无淋巴结转移密切相关(P<0.05),而与患者性别、肿瘤组织学分型、分化程度、临床 TNM 分期和吸烟无明显相关性(P>0.05), survivin 阳性表达率与患者临床 TNM 分期、有无淋巴结转移密切相关(P<0.05),与性别、肿瘤组织学类型、分化程度、吸烟无关(P>0.05),见表 1。

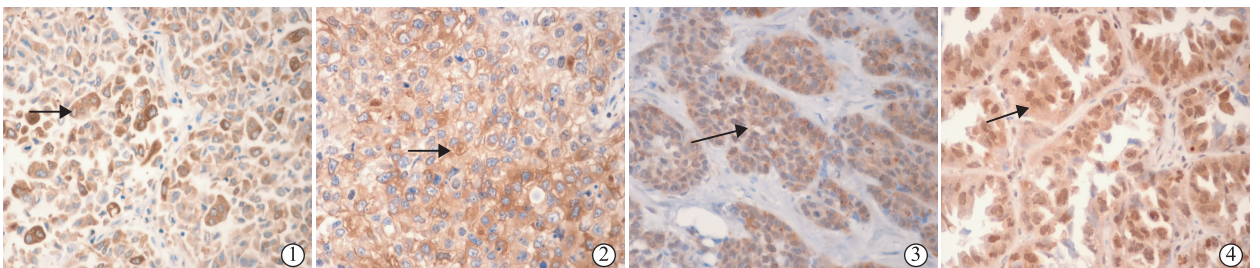


图 1 Ezrin 在肺腺癌中的高表达(EnVision ×400) 图 2 Ezrin 在肺鳞癌中的高表达(EnVision ×400)

图 3 survivin 在肺鳞癌中的高表达(EnVision ×400) 图 4 survivin 在肺腺癌中的高表达(EnVision ×400)

Figure 1 The high expression in Ezrin of lung adenocarcinoma(EnVision method ×400) Figure 2 The high expression of Ezrin in lung squamous carcinoma(EnVision method ×400) Figure 3 The high expression of survivin in lung squamous carcinoma(EnVision method ×400) Figure 4 The high expression of survivin in lung adenocarcinoma(EnVision method ×400)

表 1 Ezrin 和 survivin 表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between the expression of Ezrin and survivin and the clinicopathologic parameters in NSCLC

Clinicopathologic parameter	n	Ezrin		%	P	survivin		%	P
		- / +	++			-	+		
Gender									
Male	67	30	37	55.2	0.062	23	44	65.7	0.839
Female	19	4	15	78.9		7	12	63.2	
Histologic type									
Squamous cell carcinoma	37	19	18	48.6	0.135	12	25	67.6	0.567
Adenocarcinoma	37	12	25	67.6		15	22	59.5	
Adenosquamous carcinoma	12	3	9	75.0		3	9	75.0	
Pathologic grade									
G1	8	3	5	62.5	1.000	4	4	50.0	0.227
G2	45	18	27	60.0		18	27	60.0	
G3	33	13	20	60.6		8	25	75.8	
Lymph node metastasis									
Negative	41	21	20	48.8	0.034	19	22	53.7	0.033
Positive	45	13	32	71.1		11	34	75.6	
TNM stage									
I ~ II	49	20	29	59.2	0.780	21	28	57.1	0.039
III ~ IV	37	14	23	62.2		8	29	78.4	
Smoking history									
Yes	51	23	28	54.9	0.203	19	32	62.7	0.578
No	35	11	24	68.6		11	24	68.6	

2.3 非小细胞肺癌中 Ezrin 和 survivin 表达的关系

在 Ezrin 蛋白强阳性表达的 52 例标本中, survivin 蛋白阳性表达 41 例, 其中 11 例阴性表达, 在 Ezrin 蛋白阴性表达的 34 例标本中, survivin 蛋白阳性表达 14 例, 阴性表达 20 例, 经统计学检验, 两者表达呈显著正相关($r = 0.384, P = 0.000$)。

3 讨论

恶性肿瘤的形成是一个极其复杂、多步骤的过程, 癌细胞自原发部位脱落后, 移动到其它部位定居、分裂增殖, 最终形成转移, 而转移是导致患者死亡的主要原因。近年来不少文献报道了 Ezrin 蛋白在多种肿瘤中异常表达^[4], 其在肿瘤转移中的作用受到关注。Ezrin 是连接肌动蛋白丝与胞膜的重要物质之一, 其可通过改变肿瘤细胞运动、调节细胞分子间黏附、参与肿瘤细胞内信号转导、抑制细胞凋亡和调理吞噬细胞的吞噬功能等机制, 影响恶性肿瘤转移。Elliott 等^[5]在乳腺癌研究中利用有高转移潜能的鼠乳腺癌细胞系 AC2M2 来研究 Ezrin 在转移中的作用, 选出高表达野生型 Ezrin 细胞和 Ezrin 氨基端功能域显性负调节的细胞, 结果显示高表达野生型 Ezrin 的细胞种植到同系基因型的小鼠脂肪垫上, 很快发现肺转移, 而 Ezrin 氨基端功能域被明

显负调节的细胞没有发现肺转移灶, 这说明 Ezrin 高表达在乳腺癌的转移中是必须的。本研究结果发现, Ezrin 蛋白在 NSCLC 组织中的阳性表达显著高于良性病变肺上皮组织, 并且其高表达率与淋巴结转移的情况密切相关, 说明随着肿瘤恶性程度的增高, Ezrin 的表达也随之增加, 这提示 Ezrin 与 NSCLC 的发生发展和浸润转移密切相关, Ezrin 表达上调可能有助于提示 NSCLC, 其在 NSCLC 发生淋巴结转移的过程中起到了重要促进作用。国内目前也有相似研究发现 Ezrin 过度表达与淋巴结转移和病理分级或临床分期明显相关。本研究发现 Ezrin 仅与淋巴结转移密切相关, 考虑可能与标本来源、收集方式、纳入标准等有关, 可进一步增大样本量以减少统计误差。

survivin 具有抑制细胞凋亡和调节细胞有丝分裂双重功能, Kishi 等^[6]研究了 82 例前列腺癌标本和 80 例正常对照前列腺组织, 发现 survivin 在有淋巴结转移和血管侵犯的癌组织中表达增高, 提示 survivin 表达程度与前列腺癌的发生发展、转移有关。我们的研究显示 survivin 蛋白在 NSCLC 组织中的阳性表达率显著高于良性病变肺上皮组织, survivin 阳性表达率与患者临床 TNM 分期、有无淋巴结转移密切相关, 与性别、肿瘤组织学类型、分化程度、吸烟无关。这些说明了 survivin 蛋

白同样参与了 NSCLC 的发生和增殖,而且随着肺癌临床分期的增高,表达随之增强,其表达强弱可能预示着患者分期的早晚,病情的轻重,提示 survivin 在 NSCLC 侵袭转移过程中的重要角色,与 NSCLC 的恶性程度密切相关,这与潘琦等^[7]在 NSCLC 中的相关研究的结论一致。

最新研究显示,Ezrin 是参与 CD95 介导的 CD4+ T 淋巴细胞凋亡重要因子。Lozupone 等^[8]和 Luciani 等^[9]报道了经磷酸化激活的 Ezrin 能够与 CD95 特异连接,促使了 CD95 与肌动蛋白连接,细胞膜极性改变,从而使细胞对 CD95 介导的细胞凋亡途径的敏感性发生改变。Ezrin 可能通过阻止到达转移灶的瘤细胞发生凋亡,从而促进转移。survivin 的主要生物学功能是抗凋亡,正常细胞脱离原来组织时即启动凋亡过程,因而不会形成远隔部位的增殖。survivin 对癌细胞凋亡机制的抑制,使细胞得以继续分裂,最终造成肿瘤邻近和远处转移灶的发生。已有体外实验证明,survivin 可抑制 Caspase-3 活化的两条途径,一方面可直接作用于 Caspase-3 和 Caspase-7,另一方面也可以阻止 Caspase-3 和 Caspase-7 的自发激活,抑制细胞凋亡。为探讨 Ezrin 和 survivin 两者在 NSCLC 中的关系,本研究检测了两者的表达和关系。结果显示,Ezrin 和 survivin 表达均与淋巴结转移密切相关,且两者之间的表达呈显著正相关,提示 Ezrin 和 survivin 在肿瘤转移中有着重要的作用,对肺癌的发生和转移具有协同作用,两者可能共同作用于凋亡抑制途径中的某个汇集点,两者联合检测将有助于 NSCLC 的诊断、判断转移和预后,为临床诊疗提供参考依据,但两者在肿瘤细胞凋亡过程中的确切作用及其抑制凋亡促进转移的分子机制还有待进一步的研究。

总之,我们的研究显示,Ezrin 和 survivin 蛋白

均与 NSCLC 的发生、浸润和转移显著相关,如果进一步在分子水平上研究两者促进肿瘤发生和转移的分子机制,将更有助于临床诊疗,两者的联合检测将有助于非小细胞肺癌的诊断,为靶向治疗提供新的途径。

参考文献:

- [1] Martin TA, Harrison G, Mansel RE, et al. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003, 46(2): 165-186.
- [2] Ikehara M, Oshita F, Kameda Y, et al. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung[J]. Oncol Rep, 2002, 9(4): 835-838.
- [3] Mathew J, Hnes JE, Obafunwa JO, et al. CD44 is expressed in hepatocellular carcinoma as showing vascular invasion[J]. J Pathol, 1996, 179(1): 74-79.
- [4] Bruce B, Khanna G, Ren L, et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers[J]. Clin Exp Metastasis, 2007, 24(2): 69-78.
- [5] Elliott B E, Meens JA, SenGupta SK, et al. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells [J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(3): R365-373.
- [6] Kishi H, Igawa M, Kikuno N, et al. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis [J]. Urol, 2004, 171(5): 1855-1860.
- [7] 潘琦,陈福春,陈洪雷,等. 人非小细胞肺癌组织中 survivin 的表达及与 Caspase-3 和 p21^{WAF1}表达的意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(2): 97-100.
- [8] Lozupone F, Lugini L, Matarrese P, et al. Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of Ezrin[J]. Biol Chem, 2004, 279(10): 9199-9207.
- [9] Luciani F, Matarrese P, Giammarioli AM, et al. CD95/phosphorylated ezrin association underlies HIV-1 GP120/IL-2-induced susceptibility to CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis of human resting CD4+ T lymphocytes[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(5): 574-582.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]