

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.017

· 临床研究 ·

Survivin 在胃癌组织中的表达及其与 Bcl-2、Bax 表达的关系

赵宇¹, 王宇令¹, 吴琦¹, 王强^{2*}, 寇有为²(1. 中国医科大学附属盛京医院 整形外科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国医科大学附属盛京医院 胃肠外科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的: 探讨 Survivin 在胃癌组织中的表达及其与 Bcl-2、Bax 表达的关系, 并讨论它们相关的临床意义。方法: 选择临床及病理资料完整的中国医科大学附属盛京医院 2005 - 2007 年手术切除并经病理证实为胃腺癌术前均未行化放疗的蜡块标本 54 例, 另取良性胃黏膜组织 15 例。应用免疫组化 S-P 法检测 54 例胃癌组织中 Survivin、Bcl-2、Bax 的表达, 并检测 15 例正常胃黏膜组织中 Survivin 的表达。结果: 54 例胃癌组织中有 39 例 Survivin 表达阳性, 阳性率为 72.2%; 15 例正常胃黏膜组织中无 Survivin 阳性表达。Survivin 的表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期密切相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤大小、远隔转移及分化程度无相关性。Bcl-2 阳性表达者中 Survivin 阳性表达率为 81.8%, Bcl-2 阴性表达者中 Survivin 阳性表达率为 57.1%, Survivin 与 Bcl-2 的表达呈正相关 ($P < 0.01$); 而 Survivin 与 Bax 的表达无明显相关性。结论: 胃癌组织中 Survivin 的表达与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移和临床分期密切相关; Bcl-2 的表达呈正相关, 而与 Bax 的表达无明显相关性。

[关键词] 胃肿瘤; Survivin; Bcl-2; Bax; 凋亡; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0187-04

Expression of Survivin gene in gastric carcinoma and its relationship with Bcl-2 and Bax expression

ZHAO Yu¹, WANG Yu-ling¹, WU Qi¹, WANG Qiang², KOU You-wei²(1. Department of Plastic Surgery, Affiliated Shengjing Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated to Shengjing Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of Survivin gene in gastric carcinoma and its relationship with Bcl-2 and Bax expression, as well as their roles in the development and progression of gastric carcinoma. **Methods:** Fifty-four paraffin blocks were obtained from patients with gastric carcinoma receiving surgery. The diagnosis of these patients was confirmed by pathology in our Hospital from 2005-2007; no patients received chemoradiation therapy before surgery. Fifteen benign gastric-mucosa tissues were used as control. S-P immunohistochemistry was used to detect Survivin, Bcl-2 and Bax expression in gastric carcinoma tissues, and Survivin in 15 benign gastric mucosa tissues. **Results:** Survivin was positive in 39 of the 54 tissues, with a positive rate of 72.2%. Survivin expression was not detected in the 15 benign gastric-mucosa tissues. Expression of Survivin in gastric carcinoma tissues was correlated with the invasion, lymph nodes metastasis and TNM stage of gastric carcinoma, but not with patients' sex and age, tumor size, remote metastasis or cell histological stage. Positive rate of Survivin expression in Bcl-2 positive gastric carcinoma tissues was 81.8% (27/33) and the rate was 63.6% (14/22) in Bcl-2 negative gastric carcinoma tissues. Survivin expression in gastric carcinoma tissues was correlated with the expression of Bcl-2 but not with Bax ($P < 0.05$). **Conclusion:** Expression of Survivin in gastric carcinoma tissues is correlated with the invasion, lymph node metastasis and TNM stage of gastric carcinoma. Survivin expression in gastric carcinoma tissues is positively correlated with the expression of Bcl-2 but not with Bax ($P < 0.05$).

[Key words] stomach neoplasms; Survivin; Bcl-2; Bax; apoptosis; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 187-190]

Survivin 是近年来发现的凋亡抑制因子, 作用于各凋亡途径的汇集点^[1]。Survivin 的组织分布具有明显的细胞选择性, 表达于胚胎和发育期的胎儿组织, 不见于终末分化的成人组织(子宫内膜、胸腺和

[作者简介] 赵宇(1978 -), 男, 辽宁省沈阳市人, 硕士, 从事胃肠疾病的临床及基础研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: wangq@sj-hospital.org

胎盘除外)及癌旁正常组织,但在大多数恶性肿瘤组织中均有广泛的表达。同时, Survivin 的表达还具有细胞周期依赖性,在 G_1 期不表达,而在 G_2/M 期高表达,因而与细胞增殖密切相关。Bcl-2 和 Bax 是研究得非常深入的肿瘤相关基因,与细胞凋亡密切相关,两者与 Survivin 的相关性是近来研究的热点。胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,早期诊断困难,临床患者多为进展期或晚期,故其预后较差,且胃癌对放疗、化疗不甚敏感。目前胃癌的发病机制仍不十分清楚。有关 Survivin 与胃癌的相关报道甚少,其与 Bcl-2、Bax 表达的关系尚未明了。本研究检测 Survivin 在胃癌中的表达及其与 Bcl-2、Bax 表达的相关性,并探讨其意义,从而为胃癌的诊断和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择临床及病理资料完整的中国医科大学附属盛京医院 2005 - 2007 年手术切除并经病理证实为胃癌的蜡块标本 54 例,全部病例术前均未行化、放疗,病理类型均为腺癌。其中男 37 例,女 17 例;年龄 38 ~ 78 岁;肿瘤的原发灶大小、浸润深度(T)、淋巴结转移(N)由病理学确定,远处转移(M)由病理学和临床确定。组织学分化:高分化 19 例,中分化 17 例,低分化 18 例;局部淋巴结转移 25 例,无转移 29 例;根据 1997 年国际抗癌联盟(UICC)制定的 TNM 分期标准进行临床分期: I 期 12 例, II 期 14 例, III 期 16 例, IV 期 12 例。另取正常胃黏膜组织 15 例,标本取自胃溃疡或十二指肠溃疡手术标本中的胃黏膜组织,经病理观察证实且排除合并重度不典型增生及肠上皮化生。其中男 10 例,女 5 例,年龄 44 ~ 77 岁。

1.2 主要实验材料

浓缩型 Survivin 鼠抗人单克隆抗体 SC-8806 为美国 Santa Cruz 公司产品, Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体(即用型)、Bax 鼠抗人单克隆抗体(即用型)全部购于福州迈新生物技术有限公司, S-P 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 免疫组化法检测胃癌组织中 Survivin、Bcl-2 和 Bax 的表达

将蜡块制成 5 μm 厚的切片。选取一张进行常规 H-E 染色,确定组织学诊断及分化程度。检测 Survivin、Bcl-2、Bax 在胃组织中表达的步骤如下:石蜡切片常规脱蜡至水;0.01 mol/L pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液高温高压 1.5 min,分别用 3% H_2O_2 和非免疫血清

阻断内源性过氧化物酶活性并封闭非特异性结合位点;滴加一抗(Survivin 1:200 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;生物素标记的二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;SP 复合物 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,DAB 显色,苏木精复染 3 min,盐酸酒精分化 2 ~ 3 s,脱水、透明、中性树胶封片。已知阳性的乳腺癌切片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 免疫组化阳性结果的判定

细胞胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞,以阳性细胞密度最高的区域计数 5 个高倍视野($\times 400$)。肿瘤细胞阳性程度:- 为阳性细胞 $\leq 5\%$; + 为阳性细胞 6% ~ 25%; ++ 为阳性细胞 26% ~ 50%; +++ 为阳性细胞 51% ~ 75%; ++++ 为阳性细胞 $> 75\%$ 。设定阳性细胞 $\leq 5\%$ 为阴性组,阳性细胞 $> 5\%$ 为阳性组。

1.5 统计学处理

应用 SPSS12.0 软件进行统计学处理,各项指标间差异检验均应用 χ^2 检验,组间相关性采用 spearman 相关分析。

2 结果

2.1 Survivin 在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达

免疫组化检测结果(图 1)显示, Survivin 表达阳性染色主要定位于胃癌细胞胞质中,为粗细不一的棕黄色颗粒。54 例胃癌组织中有 39 例 Survivin 表达阳性,阳性率为 72.2%。同一胃癌组织中 Survivin 阳性染色细胞分布基本均一,显色强度也基本一致,而不同标本之间则存在较大差异。15 例正常胃黏膜组织中无一例 Survivin 呈阳性表达。胃癌组织与正常胃黏膜组织相比, Survivin 的表达有明显差异($P < 0.01$)。

2.2 Survivin 的表达与胃癌临床病理特征的相关性

胃癌组织中 Survivin 的表达与患者的性别、年龄及肿瘤大小无相关性($P > 0.05$);在未浸润浆膜和浸润浆膜的胃癌组织中, Survivin 表达的阳性率分别为 46.7%(7/15)和 82.1%(32/39),两者差异有统计学意义($P < 0.05$);在有淋巴结转移和无淋巴结转移的胃癌组织中, Survivin 表达的阳性率分别为 88.0%(22/25)和 58.6%(17/29),两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。在有无远隔转移的胃癌组织中, Survivin 表达的阳性率分为 83.3%(10/12)和 69.0%(29/42),两者表达无显著性差异($P > 0.05$); Survivin 在 I、II 期胃癌组织中的阳性表达率为 53.8%(14/26),在 III、IV 胃癌组织中的阳性表达率为 89.3%(25/28),两者相比有显著性差异($P < 0.05$)。在高、中、低分化的胃癌组织中的 Survivin 阳性表达率分为 72.7%(13/19), 70.6%(12/17)、

77.8% (14/18),三者表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),结果见表1。

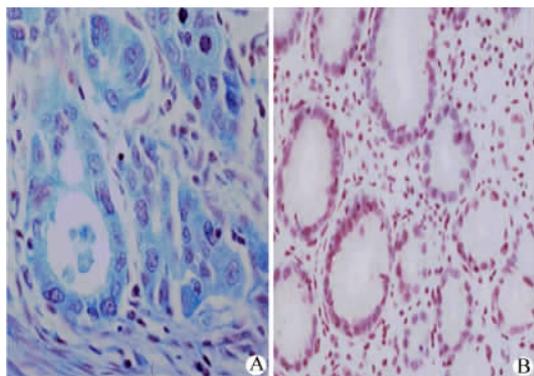


图1 Survivin 在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达

Fig.1 Expression of Survivin in gastric carcinoma tissues and benign gastric mucosa tissues

A: Expression of Survivin in gastric carcinoma tissue($\times 400$);
B: Expression of Survivin in benign gastric mucosa tissue($\times 200$)

2.3 胃癌组织中 Survivin 与 Bcl-2、Bax 表达的相关性

免疫组化检测结果(图2)显示,Bcl-2 阳性产物主要定位于胃癌细胞胞质中,为棕黄色颗粒。Bcl-2 在 54 例胃癌组织中有 33 例呈阳性表达,阳性率为 61.1%。33 例 Bcl-2 阳性表达者中 Survivin 阳性表达占 27 例,阳性率为 81.8%;而 21 例 Bcl-2 阴性表达者中 Survivin 阳性表达占 12 例,阳性率为 57.1%。Survivin 的表达与 Bcl-2 的表达呈正相关 ($r=0.269, P < 0.05$)。

54 例胃癌组织中有 22 例 Bax 呈阳性表达,表达率为 40.7%,其中,22 例 Bax 阳性表达者中 Survivin 阳性占 14 例,阳性率为 63.6%;而 32 例 Bax 阴性表达者中 Survivin 阳性表达 25 例,阳性率为 78.1%,两者无显著相关性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

多种恶性肿瘤中, Survivin 表达上调,伴随明显的凋亡抑制^[2],并与细胞增殖^[3]和血管生成^[4]正相关。Survivin 表达上调预示着生存期缩短和预后不良,提示其在肿瘤的发生和演进中具有重要作用。梁素美^[5]等采用免疫组化的方法检测了 Survivin 在结直肠癌中的表达情况,发现 Survivin 在结直肠癌中表达率高达 56.45%,但在正常结肠上皮中无表达,其表达水平与肿瘤分化程度相关。本研究中,胃癌组织中 Survivin 的阳性表达率为 72.7%,而在正

常胃组织中无表达,与同类研究结果一致。Survivin 在胃癌组织中表达上调,提示 Survivin 可能通过抑制胃癌细胞凋亡,对胃癌的发生发展起作用^[6]。Survivin 的表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有明显的相关性,临床分期愈晚, Survivin 表达的阳性率愈高;表明 Survivin 的表达预示胃癌有较高的侵袭性, Survivin 对胃癌的发生、发展起着促进作用。测定胃癌组织中 Survivin 表达率对判断预后有着指导作用。

表1 Survivin 的表达与胃癌临床病理特征的关系

Tab. 1 Correlation of Survivin expression with clinicopathological characteristics of gastric carcinoma

Index	N	Survivin expression		χ^2	P
		n	%		
Sex					
Male	37	27	73.0	0.033	0.856
Female	17	12	70.6		
Age					
<60	24	17	70.8	0.042	0.839
≥ 60	30	22	73.3		
Tumor size					
<5 cm	37	28	71.8	0.132	0.716
≥ 5 cm	17	13	76.5		
Infiltrating serosa					
No	15	7	46.7	6.761	0.009
Yes	39	32	82.1		
Lymphatic metastasis					
Yes	25	22	88.0	5.776	0.016
No	29	17	58.6		
Distant metastasis					
Yes	12	10	83.3	0.949	0.330
No	42	29	69.0		
TNM stage					
I + II	26	14	53.8	8.440	0.004
III + IV	28	25	89.3		
Differentiation					
Well	19	13	72.7	0.250	0.883
Moderate	17	12	70.6		
Poor	18	14	77.8		

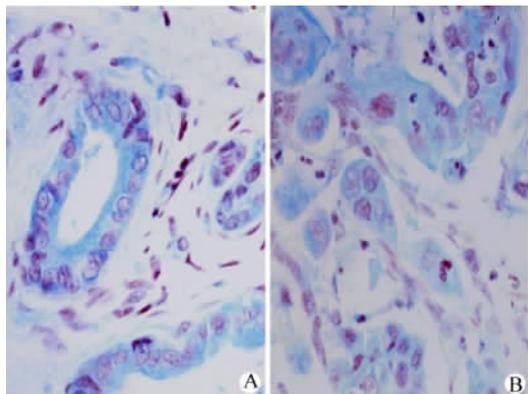


图 2 Bcl-2 和 Bax 在胃癌组织中的表达(×400)

Fig. 2 Expression of Bcl-2 and Bax in gastric carcinoma tissues(×400)

A: Expression of Bcl-2 in gastric carcinoma tissue;

B: Expression of Bax in gastric carcinoma tissues

Bcl-2 基因是凋亡调控基因之一,通过广泛抑制各种刺激因素诱导的细胞凋亡延长细胞活力而发挥生物学作用。有研究^[7]表明, Survivin 阳性细胞中 Bcl-2 表达亦阳性的样本凋亡指数显著下降,提示两者表达具有相关性。但 Survivin 和 Bcl-2 二者的抗凋亡的机制是不同的。Bcl-2 主要对抗引起线粒体破裂的离子失衡,从而阻断细胞色素 C 释放,也可直接与凋亡活化因子(apoptosis activating factor 1, Apaf-1)结合,防止 Caspase 活化^[8],从而发挥抗凋亡作用,这一环节处在半胱氨酸蛋白酶 Caspase 级联反应的上游。而 Survivin 则直接作用于细胞凋亡途径中的终末效应酶 Caspase-3、Caspase-7 来发挥抗凋亡作用。在对乳腺癌^[9]和宫颈癌^[10]的研究中发现, Survivin 与 Bcl-2 的表达具有明显的相关性,说明这两条对抗细胞凋亡的途径会聚起来起作用。本实验结果显示,胃癌组织中 Bcl-2 的阳性率 61.1%, 33 例 Bcl-2 阳性胃癌中有 27 例 Survivin 表达阳性,占 81.8%,胃癌中 Survivin 与 Bcl-2 的表达有相关性。它们可能通过作用于细胞凋亡的不同阶段协同发挥抗凋亡效应,从而在促进肿瘤发生、发展中起协同作用。

Bax 基因属凋亡活化基因,转染 Bax 基因能修饰肿瘤细胞的恶性表型。Bax 基因突变存在于多种恶性肿瘤,提示 Bax 基因属于抑癌基因^[11]。本实验中发现 Survivin 与 Bax 的表达无明显相关性,提示两者在胃癌中可能通过不同途径对凋亡起作用。

Survivin 具有肿瘤特异性表达的特点,并能在多个层面上发挥抗癌作用,因而在肿瘤的治疗中得到广泛研究。以 survivin 为靶向的基因治疗研究,为肿瘤

的基因治疗开辟了新的途径^[12-14]。survivin 在胃癌中的表达对胃癌的诊断和治疗有重要的指导意义。

[参考文献]

- [1] Tamm I, Wang Y, Sausville E, *et al.* IAP-family protein Survivin inhibits Caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, Caspase, and anticancer drugs[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5315-5320.
- [2] Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, *et al.* A potent immunogenic general cancer vaccine that targets Survivin, an inhibitor of apoptosis proteins[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(4): 1474-1482.
- [3] Tarnawski A, Pai R, Chiou SK, *et al.* Rebamipide inhibits gastric cancer growth by targeting Survivin and Aurora-B[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(1): 207-212.
- [4] Kaga S, Zhan L, Altaf E, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and Survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(1): 138-147.
- [5] 梁素美,文欣轩,方细堂. 结直肠癌中 survivin, caspase23、p21WAF1 的蛋白表达及其意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(8): 596-599.
- [6] Wang TT, Qian XP, Liu BR. Survivin: potential role in diagnosis, prognosis and targeted therapy of gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*. 2007, 13(20): 2784-2790.
- [7] Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(2A): 805-808.
- [8] Barinaga M. Death by dozens of cuts[J]. *Science*, 1998, 280(5360): 32-34.
- [9] Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Imran AK. Correlations in survivin expression with the expression of p53 and Bcl-2 in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2007, 38(5): 904-910.
- [10] Saitoh Y, Yaginuma Y, Ishikawa M. Analysis of Bcl-2, Bax and Survivin genes in uterine cancer[J]. *Int J Oncol*, 1999, 15(1): 137-141.
- [11] Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, *et al.* Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*[J]. *Nature*, 1997, 385(6617): 637-640.
- [12] 许兰涛,崔煜. Survivin 反义寡聚脱氧核苷酸对人胃癌细胞生长的抑制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1): 31-34.
- [13] Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, surviving, and EPR-1 in hematological malignancies[J]. *Leuk Res*, 2005, 24(6): 965-970.
- [14] Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, *et al.* A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(4): 1474-1482.

[收稿日期] 2008-12-09

[修回日期] 2009-03-11

[本文编辑] 韩丹