

Survivin在大肠癌组织中表达的意义及其与Bcl-2的关系

耿婉如, 李宁, 余琦, 周会芹, 许红民

耿婉如, 军医进修学院学员队 北京市 100082
李宁, 余琦, 周会芹, 许红民, 中国人民解放军总医院第二附属医院病理科 北京市 100091
通讯作者: 许红民, 100091, 北京市, 中国人民解放军总医院第二附属医院病理科. xuhongmin@yahoo.com.cn
电话: 010-66775260
收稿日期: 2006-08-09 接受日期: 2006-11-03

Significance of Survivin expression and its correlation with Bcl-2 protein expression in colorectal carcinoma

Wan-Ru Geng, Ning Li, Qi Yu, Hui-Qin Zhou, Hong-Min Xu

Wan-Ru Geng, Postgraduate Team, Postgraduate Medical School of Chinese PLA, Beijing 100082, China
Ning Li, Qi Yu, Hui-Qin Zhou, Hong-Min Xu, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China
Correspondence to: Hong-Min Xu, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100091, China. xuhongmin@yahoo.com.cn
Received: 2006-08-09 Accepted: 2006-11-03

Abstract

AIM: To study the expression of Survivin and its correlation with expression of Bcl-2 protein in colorectal carcinoma.

METHODS: The expression of Survivin and Bcl-2 protein was evaluated by immunohistochemistry in 52 case of colorectal carcinoma. The relationship between Survivin expression and clinical indexes as well as Bcl-2 expression was analyzed.

RESULTS: Survivin was expressed in 27 of 52 (51.9%) colorectal carcinoma cases. The expression of Survivin showed no correlation with the age, sex, tumor location, size, differentiation degree, pathologic types and lymph node metastasis ($P > 0.05$). The 5-year survival rate was lower in patients with high Survivin expression than that in those with low Survivin expression (52.94% vs 83.33%, $P = 0.0304$). There was no significant relationship between Survivin and Bcl-2 expression ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Survivin expression may play a strong inhibitory role in the apoptosis of colorectal cancer cells, and the patients with high Survivin expression have an unfavorable prognosis. No correlation is found between Survivin and Bcl-2 expression.

Key Words: Colorectal carcinoma; Immunohistochemistry; Survivin; Bcl-2; Prognosis

Geng WR, Li N, Yu Q, Zhou HQ, Xu HM. Significance of Survivin expression and its correlation with Bcl-2 protein expression in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):305-309

摘要

目的: 探讨凋亡抑制蛋白Survivin在大肠癌组织中表达的意义并分析其与Bcl-2的关系。

方法: 用免疫组化方法检测52例大肠癌组织中Survivin和Bcl-2的表达, 运用统计学方法分析Survivin表达与预后的关系以及Survivin在凋亡抑制机制方面与Bcl-2的关系。

结果: Survivin在大肠癌组织中表达的阳性率为51.9%(27/52), Survivin表达与患者年龄、性别、生长部位、肿瘤病理类型、大小、淋巴结转移、组织分化程度等无关($P > 0.05$)。但是Survivin高表达患者的5 a生存率明显低于Survivin低表达患者, 二者差别有统计学意义(52.94% vs 83.33%, $P = 0.0304$)。Survivin的表达与Bcl-2的表达无关($P = 0.5524$)。

结论: Survivin在大肠癌中的表达能强烈抑制凋亡, 高表达者预后较差。Survivin的表达与Bcl-2的表达无关。

关键词: 大肠癌; 免疫组化; Survivin; Bcl-2; 预后

耿婉如, 李宁, 余琦, 周会芹, 许红民. Survivin在大肠癌组织中表达的意义及其与Bcl-2的关系. *世界华人消化杂志* 2007;15(3):305-309

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/305.asp>

0 引言

对于正常细胞, 凋亡是一种生理性死亡, 他参与

■背景资料

凋亡抑制是目前肿瘤研究的一个热点。Survivin是一种凋亡抑制蛋白, 在多数人类肿瘤中表达增高。虽然关于Survivin在大肠癌中的表达已有报道, 但是主要集中在Survivin与血管形成的关系方面, 与Bcl-2的关系的报道仍较少。

■研究前沿

Survivin在肿瘤中的特殊作用,使其成为肿瘤基因治疗中的一个理想靶目标,但是, Survivin转基因模型的建立, Survivin-Knockout动物模型的建立、Survivin相关的生物学分子以及他们之间的相互关系都是目前亟待解决的问题。

细胞的各种生理、病理过程,对细胞发生、分化和维持机体稳态都有很重要的作用。此外,凋亡还能作为防御系统,通过清除变异细胞和改变基因表达阻止细胞发生转化。因此,如果凋亡被抑制,基因发生突变的细胞就会得以继续生存,并且通过突变导致肿瘤的发生和发展。凋亡抑制是目前肿瘤研究的一个热点方向。Survivin是新近发现的一种凋亡抑制蛋白,在众多人类恶性肿瘤中上调表达。国外对Survivin在肿瘤方面的研究开展较早,但是对于他在大肠癌中表达方面的研究较少,而且对于Survivin对预后表达的关系不一,具有争议性。国内对于Survivin在大肠癌的表达研究主要集中在他与血管形成的关系方面^[1-2]。本研究通过免疫组化方法检测了52例大肠癌组织中Survivin和Bcl-2的表达,结合预后调查运用统计学方法分析Survivin表达与预后的关系,并且通过与一种目前研究已经比较深入的凋亡相关蛋白Bcl-2之间的相关分析,探讨Survivin在大肠癌发生、发展、预后中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 标本均取自已经取得随访的中国人民解放军总医院第二附属医院1995-09/2000-12病例存档的石蜡标本,行常规病理切片制片后,由2位高年资病理医生进行复诊。所有患者术前未接受放疗和化疗。52例大肠癌患者中男32例,女20例,男女比例为1.6:1。患者年龄34-73(平均51.6)岁,随访结果最短5 a,最长10 a。肿瘤最大直径8 cm,最小直径1.5 cm,小于3 cm的12例,大于3 cm的40例。其中有复发或者转移的为12例,包括转移到卵巢,腹膜,脑等。术后30 d内死亡的不在本研究之列。检测一抗Survivin抗体和Bcl-2抗体均购自北京中山试剂公司。

1.2 方法 用PBS代替一抗作为阴性对照,用公司随试剂赠送的阳性片作为阳性对照。免疫组化染色前均染色复查病理类型。具体操作步骤简述如下:石蜡组织块,4 μ m切片后,放在80℃烤箱烘烤30 min,二甲苯去蜡10 min(2次),梯度酒精逐级水化。然后置于100 mL/L过氧化氢中10 min,消除组织内源性过氧化酶。微波抗原2档修复时间3 min后,冷却,加入一抗工作液,4℃过夜。室温下PBS洗3次,每次5 min。滴加二抗,37℃烤箱置30 min。PBS洗3次,每次5 min。滴加三抗,37℃烤箱置20 min后DAB显色。苏木素复染后,透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察。

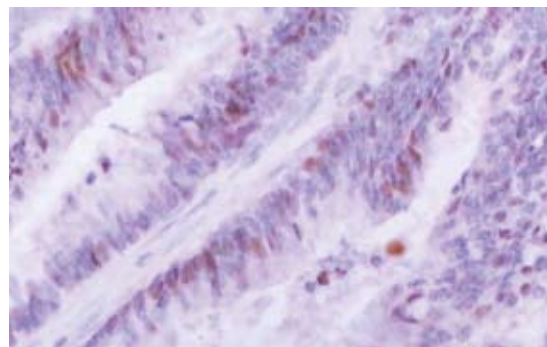


图1 Survivin蛋白的阳性表达位于细胞质($\times 40$)。

根据肿瘤细胞染色的程度定下判断标准。(-)表示没有观察到棕色的阳性细胞; (+)为阳性细胞胞质染成均匀浅黄色或胞质染成棕色的细胞 $\leq 25\%$; (++)阳性细胞胞质染成棕色 $>25\%$, 并含一些较细的棕色颗粒或胞质染成深棕色 $\leq 50\%$; (+++)阳性细胞胞质染成深棕色 $>50\%$, 并有较粗大的深棕色颗粒。在本研究中,以阳性细胞表达 $>25\%$ 为高表达组, $\leq 25\%$ 为低表达组。

统计学处理 采用SPSS10.0软件,不同组间阳性率差异用pearson χ^2 检验,等级资料秩和检验计算高中低分化组间阳性率的差异, Kaplan-Meier法比较生存情况并进行log-rank检验。以 $P \leq 0.05$ 为有统计学意义,以 $P \leq 0.01$ 为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin在大肠癌中的表达 Survivin蛋白表达不均匀,在同一个癌组织中的不同区域和不同腺体内着色不均匀,表现为显色的有无和强弱的差异(图1)。Survivin在大肠癌中表达的阳性率为51.92%(27/52)。此外,本研究证实Survivin蛋白阳性染色主要定位于细胞质。

2.2 Survivin在大肠癌中表达与临床病理特征的关系 Survivin表达与患者的年龄、性别和肿瘤的生长部位、大小、分化程度、病理类型等均无明显关系($P > 0.05$, 表1)。

2.3 Survivin表达与Bcl-2表达的关系 在Bcl-2表达阳性的30例患者中, Survivin表达阳性患者中有14例患者表达阳性,在Bcl-2表达阴性的22例患者中, Survivin表达阳性患者中有13例,二者无明显相关性($P > 0.05$, 表1)。

2.4 Survivin蛋白表达与预后的关系 Survivin高表达患者与Survivin低表达患者的5 a生存率分别为52.94%和83.33%, $P = 0.0304$,二者比较有统

表 1 Survivin表达与临床病理特征及Bcl-2表达的关系

项目	n	阳性(n)	阳性率(%)	χ^2	P值
性别					
男	32	14	43.75	1.4565	0.2275
女	20	13	65.00		
年龄					
>60岁	15	11	73.33	2.7596	0.0967
≤60岁	37	16	43.24		
部位					
直肠	35	19	54.28	2.0952	0.1478
结肠	17	8	47.05		
肿瘤类型					
黏液癌	12	5	41.67	0.2318	0.6312
腺癌	40	22	55.00		
淋巴结转移					
有	22	15	68.18	2.9881	0.0839
无	30	12	40.00		
分化程度 ¹					
高	16	6	37.50	1.951	P>0.05
中	21	10	47.61		
低	15	11	73.33		
Bcl-2表达					
阳性	30	14	46.67	0.4091	0.5224
阴性	22	13	59.09		

¹高中低分化组两两比较的结果P值均>0.05, 无统计学意义。

计学意义($P = 0.0371$), Kplan-Meier生存曲线如图2所示。Kplan-Meier生存分析结果表明, 在52例大肠癌患者中, Survivin高表达组患者的5 a生存率明显少于低表达组($P < 0.05$)。

3 讨论

人体组织中, 细胞增殖与细胞凋亡的动态平衡维持着内环境稳定和正常的形态结构。大肠癌的发生是一个长期的多步骤多因素的变化过程, 必然涉及到变异的积累。细胞的凋亡过程受凋亡促进因子P53, Fas等和凋亡抑制因子、Bcl-2的共同调节^[3]。因此, 凋亡抑制因子的过度表达必然影响人体的稳定, 在癌症的发生、发展中起重要作用。

Survivin是新近发现的一种凋亡抑制蛋白, 在许多人类恶性肿瘤中表达上调。Survivin是1997年通过效应细胞蛋白酶受体1(effector cell protease receptor-1, EPR-1) DNA与人类基因库杂交而分离得到的。Survivin基因横跨14.7 kb, 编码含142个氨基酸、分子量为16.5 kDa的蛋白质, 是抗凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis protein,

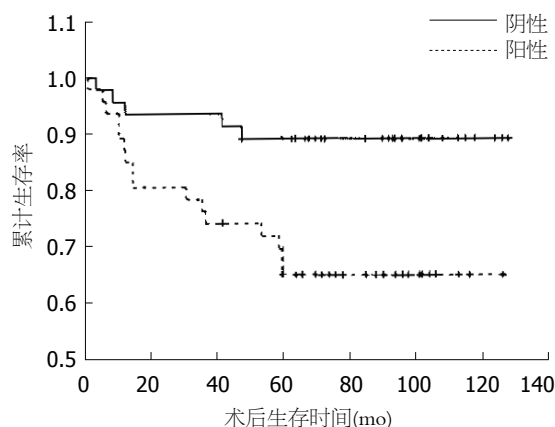


图 2 大肠癌患者Survivin高表达与低表达的Kplan-Meier生存曲线。

IAPs)家族中最小的成员^[4]。与其他IAPs相似, Survivin具有一个凋亡抑制蛋白重复序列结构和一个螺旋扩展的C端的二聚体结构, 但是缺乏锌指结构^[5]。Survivin在肿瘤中以细胞周期依赖的形式在G2/M期高表达, G1期其mRNA和蛋白水平迅速下降。其组织分布特征有明显的细胞选择性, 他在终末分化的成人组织不表达(除胸腺、生殖器等), 而在大多数肿瘤组织中表达。

本试验结果表明, Survivin和Bcl-2蛋白在52例大肠癌中表达无明显相关性($P > 0.05$), 综合文献复习, 分析二者可能是通过不同的凋亡抑制途径来调控机体, 从不同的途径实现对细胞程序性死亡的抑制。目前大多数观点认为, Survivin主要通过天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteinases with specificity for aspartic acid residues, Caspase)直接或间接作用以实现对细胞凋亡的抑制。可能主要通过两种途径来抑制细胞凋亡: 其一是作为重要的凋亡通路的调节因子直接牢固结合并抑制凋亡终末效应器Caspase-3和Caspase-7的活性阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程^[6]。另外, Survivin也可通过P21间接抑制Caspase, 其机制是Survivin与细胞周期调控因子CDK形成Survivin-CDK4复合体, 使得P21从CDK4的复合体中释放出来, P21进一步与线粒体Caspase-3结合, 抑制其活性, 阻止细胞凋亡^[7]。

Bcl-2的抗凋亡机制已经基本明确, 与Survivin完全不同, 他主要通过线粒体通路来影响凋亡。Bcl-2表达使线粒体渗透性改变的多种蛋白, 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Apaf-1结合, 防止caspase活化。此外, 越来越多的证据表明Bc-2

■应用要点

未来的研究工作中, 以Survivin为靶点的抗癌治疗有可能成为肿瘤治疗的一个新的突破口, 显示出良好的前景。随着Survivin和其他凋亡调节因子、癌基因、抑癌基因关系的深入研究及其调控机制的进一步阐明, 将有利于肿瘤发病机制的阐明, 并为肿瘤的诊治提供更充分的理论依据。

■名词解释

凋亡蛋白抑制因子(IAP): 是一类重要的抗细胞凋亡因子, 该家族结构的共同特点是N端含有一个或多个(目前发现最多为3个)串联的杆状病毒IAP重复序列(baculovirus IAP repeat, BIR), C端含或不含有一个环指(ring finger)结构。目前人类IAP家族已发现有8个成员, 其中Survivin是新近发现的一个IAPs家族成员。

家族除存在于线粒体膜表面外也存在于内质网膜, 能阻断多种致使内质网释放储存钙的凋亡刺激。Foyouzi-Youssefi *et al*^[8]发现, Bcl-2的表达通过增加内质网膜对钙离子通透性降低内质网腔钙浓度而减少可释放的游离钙离子。然而, 也有学者研究认为Survivin的表达与Bcl-2有关。Kawasaki *et al*^[9]采用免疫组化检测171例结肠癌中Survivin表达, 显示他与Bcl-2的表达显著相关。Survivin与Bcl-2的这种表达相关性在神经母细胞瘤、胃癌和非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌中都有类似的结果。Kawasaki *et al*^[9]认为可能转录水平的调节可能导致了两个基因在肿瘤中的共表达。而且, Survivin与Bcl-2都被富含GC而缺少TATA的启动子所调控, 并都在增生活跃的细胞中转录, 从而推测Survivin基因与Bcl-2可能有共同的转录激活机制, 两者协同作用发挥抗凋亡效应^[10]。这种分歧说明关于Survivin抑制细胞凋亡的具体环节还不清楚, 有待于进一步的研究。此外, 有趣的是, 人们还发现在抑制凋亡的同时Survivin还可以促进细胞增殖。Giodini *et al*^[11]用Survivin的多克隆抗体通过微细胞注射法注入Hela细胞, 发现注射后的细胞出现有丝分裂纺锤体缩短, 分裂前期和中期延长, 微管聚合异常, 并有凋亡现象, 体内实验显示强制表达Survivin能稳定微管, 避免他的解聚, 从而诱导有丝分裂, 说明Survivin同时还具有促进增殖的作用。那么, 既然Survivin是正常的细胞增殖所必需的, 到底是何种机制导致他在肿瘤细胞中的上调呢? 这仍然是一个值得深入研究的问题。

关于Survivin与预后的关系观点越来越趋向一致。近年来, 国内外有许多报道已经证实了Survivin的阳性表达与非小细胞肺癌^[12]、乳腺癌^[13]、胃癌^[14]等的不良预后有显著相关性。然而, 分化较低的非霍奇金淋巴瘤并不表达Survivin^[10]。

这些研究提示, 由于Survivin的组织学分布特点及其结构特点, 他在多种恶性肿瘤都有预测预后的价值。而另外Sarela *et al*^[15]以大肠癌整体作为研究对象, 研究结果显示, Survivin mRNA和蛋白的检测对大肠癌患者的预后无明显价值, 但该作者对TNM分期中的II期大肠癌病例进一步研究, 发现Survivin阴性的大肠癌患者的5 a生存率明显高于Survivin阳性组, 提出Survivin仅对II期大肠癌患者的预后有一定预测价值。在本研究中, Survivin蛋白表达阳性患者的5 a生存率显著低于Survivin蛋白表达阴性的患者, 提示

Survivin对于大肠癌的预后有一定的预测作用。在大肠癌的诊断及预后等方面具有重要意义, 有望成为具有临床应用价值的肿瘤诊断和预后判断的标记物, 从而对临床工作发挥指导作用。

未来的研究工作中, 以Survivin为靶点的抗癌治疗有可能成为肿瘤治疗的一个新的突破口, 显示出良好的前景^[16]。Survivin反义核酸的应用在实验研究中已显示出降低内源性Survivin表达、促进细胞凋亡、促进肿瘤血管形成过程中内皮细胞的凋亡和血管的退行性改变等功能。随着Survivin和其他凋亡调节因子、癌基因、抑癌基因关系的深入研究及其调控机制的进一步阐明, 将有利于肿瘤发病机制的阐明, 并为肿瘤的诊治提供更充分的理论依据。

致谢: 衷心感谢Radu Seicean M.D, Ph.D. (Romania)慷慨的提供原文Molecular prognostic factors in rectal cancer.

4 参考文献

- 1 刘丰, 宋炯, 傅仲学, 罗小东. Survivin的表达与直肠癌细胞凋亡、血管形成及预后的关系. 中华实验外科杂志 2004; 21: 757-758
- 2 梁青春, 罗鑫. 大肠癌Survivin的表达与血管生成的关系. 实用预防医学 2005; 12: 87-91
- 3 林连捷, 郑长青. Survivin与肿瘤. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2027-2029
- 4 都昌胡, 徐军. 凋亡蛋白抑制剂家族研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1581-1589
- 5 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320
- 6 Miller LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 323-328
- 7 Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353
- 8 Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause KH. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5723-5728
- 9 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 10 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- 11 Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbisky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by

- survivin. *Cancer Res* 2002; 62: 2462-2467
- 12 O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13103-13107
- 13 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134
- 14 Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001; 163: 109-116
- 15 Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 305-310
- 16 陆才德, 戴德坚, 孟化. Survivin-值得关注的抗癌治疗靶. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 701-705

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

凋亡抑制是目前肿瘤研究的一个热点. Survivin是一种凋亡抑制蛋白, 在多数人类肿瘤中表达增高. 因此, 本文选题比较热门. 虽然关于Survivin在大肠癌中的表达已有报道, 但其与Bcl-2的关系的报道仍较少. 故文章有一定的可读性. 但研究方法比较简单, 如能配合mRNA检测, 文章将会深入一些.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

● 消息 ●

2007 年协和肝脏外科新技术学习班通知

本刊讯 为了提高我国肝脏外科学临床与研究水平, 学习该领域国际先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展, 由洛克菲勒基金会设立的CMB基金会资助, 中国医学科学院、中国协和医科大学、北京协和医院主办, 天津第一中心医院东方器官移植中心、中山大学第一附属医院器官移植中心协办, 中国医学科学院国际会议中心承办的“07年协和肝脏外科新技术学习班”将于2007-04下旬在北京市中国协和医科大学新科研教学楼举行.

培训班将邀请国内外肝脏外科领域著名专家黄洁夫教授、钟守先教授、芝加哥大学移植中心主任Michael Millis教授、瑞典Lund 大学肝外科主任Bengt Jeppsson教授、香港范上达教授、冷希圣教授、叶胜龙教授、沈中阳教授、何晓顺教授、朱继业教授、戴朝六教授等任教. 培训班除邀请国内知名专家作专题学术讲座外, 还有机会在天津第一中心医院东方器官移植中心进行临床肝移植的学习和观摩; 本培训班的另一个特点是参加培训的学员有申请CMB基金会合作课题并得到适当的基金资助的机会; 培训班将给予国家级继续教育学分10分. 我们真诚欢迎各位肝脏外科领域的同仁参加培训班, 共同促进和加强肝脏外科学的学术交流与合作, 推动我国肝脏外科学的发展.

收费标准: 培训费680元/人(含材料费和讲课费, 食宿自理)

通讯地址: 北京东城区东单三条9号中国医学科学院/中国协和医科大学国际合作处 邮编: 100730 联系人: 乔楠、蒋育红 电话: 010-65105934, 65105935, 65253447 传真: 010-65124876 E-mail: jiangyuhong@yzjg.pumc.edu.cn; dakuansun@yahoo.com.cn.