

文章编号:1005-6947(2007)02-0177-03

· 简要论著 ·

Survivin 和 hTERT 在原发性胆囊癌中的表达及其与临床病理的联系

陈波, 徐立宁, 邹声泉, 王剑明

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030)

摘要: 采用免疫组织化学 SP 法检测原发性胆囊癌组织 ($n = 34$) 及慢性胆囊炎组织 ($n = 20$) 中 survivin 和 hTERT 蛋白的表达。结果显示, 原发性胆囊癌组织中 survivin 和 hTERT 蛋白的表达率分别为 70.6% 和 73.5%, 明显高于炎症对照组的 20.0% 和 25.0% ($P = 0.001, P = 0.004$); 两者的异常表达呈正相关 ($r = 0.344, P = 0.046$), 但与胆囊癌患者的年龄、性别、组织类型、分化程度、淋巴或远处转移之间均无明显关系 (均为 $P > 0.05$)。提示 survivin 和 hTERT 蛋白分别通过抑制细胞凋亡及诱导细胞永生生化机制而协同参与了胆囊癌的发生、演进的全过程, 且两者之间可能存在相互调控的机制。检测组织中 survivin 和 hTERT 蛋白的表达有助于胆囊癌的鉴别诊断, 但对判断预后无帮助。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(2): 177-179]

关键词: 胆囊肿瘤/病理学; 蛋白质 survivin; 蛋白质 hTERT; 凋亡

中图分类号: R735.8

文献标识码: B

凋亡抑制蛋白 survivin 和端粒酶逆转录酶 (hTERT) 在肿瘤细胞凋亡与增殖失控的机制中发挥了重要作用, 参与多种肿瘤的发生发展过程^[1-2]。survivin 和 hTERT 蛋白表达于大多数人类的常见肿瘤, 而正常组织中则多不表达; 两者均有可能成为肿瘤诊断与治疗的潜在靶位^[3-4]。目前对 survivin 和 hTERT 蛋白在胆囊癌中的表达及其意义还不太明了。本研究拟通过免疫组织化学 (免疫组化) SP 法检测 survivin 及 hTERT 蛋白在原发性胆囊癌中的表达, 并联系临床病理资料进行分析, 旨在进一步了解细胞永生生化与凋亡抑制机制在胆囊癌变过程中的作用, 以加深对原发性胆囊癌恶性生物学特性的认识。

1 材料和方法

1.1 标本及其一般资料

选取同济医院 1990 年 1 月—2004 年 10 月手术切除并经病理证实之原发性胆囊癌石蜡包埋存档标本 34 例。其中男 15 例, 女 19 例; 平均年

龄 57.1 岁, 其中 > 50 岁者 22 例, ≤ 50 岁者 12 例。23 例为腺癌, 4 例为腺瘤恶变, 3 例为乳头状腺癌, 另外鳞癌、黏液腺癌、管状腺癌和未分化癌各 1 例。高分化 14 例, 中分化 8 例, 低分化 11 例, 未分化 1 例。伴有周围淋巴结转移 7 例, 肝转移的 11 例, 大网膜转移 1 例, 神经转移 1 例; 无转移 14 例。取同期手术的 20 例慢性胆囊炎组织作为对照 (男女各 10 例, 平均年龄 51.6 岁)。

1.2 试剂与方法

survivin 兔抗人多克隆抗体为美国 Santa-Cruze 产品 (克隆号: SC-10811); SP 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗人 hTERT 多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司 (克隆号: BA0564)。所有标本经 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋。切取 5 μm 厚的石蜡切片并常规脱蜡至水, 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性。切片置入 0.01 mol/L 柠檬酸抗原修复液 (pH6.0) 中行微波加热抗原修复 (92 ~ 98 $^{\circ}\text{C}$ 20 min), 其后的过程均按免疫组化 SP 法进行染色。阳性对照采用 survivin 和 hTERT 均阳性表达的乳腺癌组织, 阴性对照采用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗。

基金项目: 国家 863 计划重大资助项目 (2002AA214061)。

收稿日期: 2006-02-28; **修订日期:** 2006-06-30。

作者简介: 陈波, 男, 湖北枣阳人, 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生, 主要从事胆道肿瘤方面的研究。

通讯作者: 邹声泉 E-mail: sqzou@tjh.tjmu.edu.cn。

1.3 结果判断

参考文献报道的半定量方法^[5]。镜下观察,以细胞浆或胞核出现黄色颗粒为阳性。按显色深浅评分(A):0分为细胞不显色;1分为细胞显浅黄色;2分为棕黄色;3分为棕褐色。按显色比例评分(B):1分为显色癌细胞占癌细胞总数比例 $<1/4$;2分为 $1/4 \sim 1/2$;3分为 $1/2 \sim 3/4$;4分为 $>3/4$ 。最后以 $A \times B$ 的值划定标准:(-)为0分;(+)为1~4分;(++)为5~9分;(+++)为10分以上。(+)-(+++)判断为阳性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 12.0统计软件行Fisher精确概率检验及Spearman相关分析。显著检验水准 α 值取0.05。

2 结果

2.1 survivin 和 hTERT 蛋白表达的细胞内定位及阳性率

光镜下观察,可见细胞中survivin和hTERT的阳性表达呈均匀细颗粒状,着色从淡黄色到深棕色。亚细胞定位hTERT主要表达于胆囊癌细胞的胞质(图1),survivin既可以表达于胆囊癌细胞的胞质也可以表达于胞核(图2-3)。统计结果显示,原发性胆囊中,survivin及hTERT的阳性表达率分别为70.6%(24/34)及73.5%(25/34),明显高于炎症对照组的20%(4/20)($P=0.001$)及25%(5/20)($P=0.004$)。

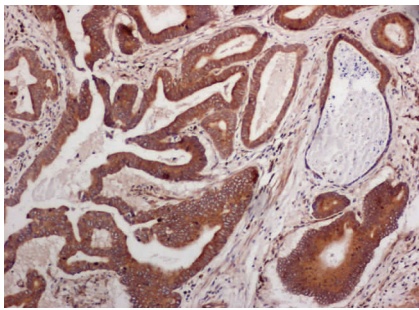


图1 原发性胆囊癌组织(高分化腺癌)细胞质中hTERT蛋白的阳性表达(++)(S-P $\times 100$)

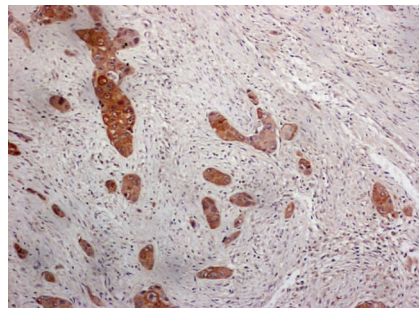


图2 原发性胆囊癌组织(低分化鳞癌)细胞质中survivin的阳性表达(++)(S-P $\times 100$)

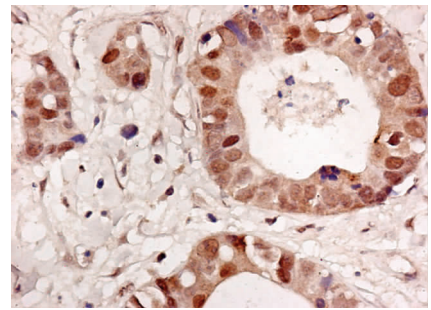


图3 原发性胆囊癌组织(中低分化腺癌)细胞核中survivin的阳性表达(++)(S-P $\times 400$)

2.2 survivin 和 hTERT 蛋白表达与原发性胆囊癌临床病理特征的关系

本组资料中survivin及hTERT的表达与原发

性胆囊癌患者的性别、年龄、组织类型、分化程度、转移均无明显关系(同一因素的组间差异均无显著性, $P>0.05$)。

表1 survivin 和 hTERT 表达与原发性胆囊癌临床病理特征的关系

| 临床病理因素 | 例数 | survivin 阳性表达 | | hTERT 阳性表达 | |
|-------------|----|---------------|-------|------------|-------|
| | | 阳性(%) | P 值 | 阳性(%) | P 值 |
| 性别 | | | | | |
| 男 | 15 | 9(60.0) | 0.276 | 11(73.3) | 1.00 |
| 女 | 19 | 15(78.9) | | 14(73.7) | |
| 年龄 | | | | | |
| <50岁 | 12 | 6(50.0) | 0.112 | 8(66.7) | 0.687 |
| ≥ 50 岁 | 22 | 18(81.8) | | 17(77.2) | |
| 组织类型 | | | | | |
| 腺癌 | 23 | 15(69.6) | 0.437 | 17(69.6) | 1.00 |
| 其他罕见类型 | 11 | 9(72.7) | | 8(81.8) | |
| 分化程度 | | | | | |
| 高中分化 | 22 | 17(72.7) | 0.271 | 18(81.8) | 0.224 |
| 低未分化 | 12 | 7(66.7) | | 7(58.3) | |
| 淋巴结或远处转移 | | | | | |
| 无 | 14 | 11(78.5) | 0.467 | 11(78.5) | 0.704 |
| 有 | 20 | 13(65.0) | | 14(70.0) | |

2.3 原发性胆囊癌中 survivin 与 hTERT 表达的相关性

在 34 例原发性胆囊癌中 survivin 阳性表达而 hTERT 阴性表达者有 4 例, survivin 阴性表达而 hTERT 阳性表达者有 5 例,两者同时阳性表达的有 20 例,两者同时阴性表达的有 5 例,两者的表达一致率为 73.53%。Spearman 相关分析显示 survivin 与 hTERT 蛋白的表达呈正相关($r=0.344$, $P=0.046$)。

3 讨论

hTERT(端粒酶逆转录酶)是由位于 15P15 的 TERT 基因编码,作为端粒酶的催化亚基,是控制端粒酶活性的限速酶。应用反义技术或 RNA 干扰技术来抑制 hTERT 基因的表达,通过抑制端粒酶活性而发挥抗肿瘤效应,是当前肿瘤基因治疗的一个候选靶点^[6]。本实验证实原发性胆囊癌组织中有 hTERT 蛋白的异常高表达,且明显高于炎症对照组。说明端粒酶的激活在胆囊癌的发生过程中发挥了重要作用。此结果为胆囊癌以 hTERT 为靶位的基因治疗提供了理论支持。

survivin 蛋白是新发现的一种凋亡抑制蛋白(IAP)家族成员之一。survivin 选择性地表达于绝大多数肿瘤组织,且与多种肿瘤的预后密切相关。本实验证实了在胆囊癌组织中同样有 survivin 的异常高表达,说明在胆囊癌变过程中存在有 survivin 介导的凋亡抑制。最近的研究发现了两种具有不同抗凋亡特性的 survivin 剪接变构体(survivin delta Ex3 及 survivin2B)。由于移码突变使其编码蛋白的结构也有显著差异,造成不同的功能改变及亚细胞定位不同;其中 survivin delta Ex3 保留了抗凋亡特性且定位胞核,而 survivin2B 则定位于胞质且抗凋亡能力明显降低。本组实验发现 survivin 在胆囊癌组织细胞的胞质及胞核中均有表达,提示胆囊癌细胞中可能存在 survivin 的异构体。通过封闭 survivin 基因来下调 survivin 蛋白的表达可诱导多种肿瘤细胞凋亡且具有到放疗和化疗增敏的功效。对常规放化疗不敏感是胆囊癌的重要的生物学特性,因此,针对 survivin 的肿瘤基因治疗在胆囊癌中亦具有潜在的应用价值。

survivin 及 hTERT 蛋白均控制着肿瘤的发生与演进的关键步骤 - 细胞的无限增殖与凋亡受阻。

本实验显示 survivin 与 hTERT 在原发性胆囊癌中均有异常高表达且呈正相关,提示增殖失控和凋亡受阻机制在胆囊癌的发生过程中具有协同效应,共同促进了胆囊癌的发生与演进。最近 Endoh^[7]等发现结肠癌组织中 survivin 可以通过上调 hTERT 的核心启动子 sp1 及 c-myc 的表达,参与 hTERT 基因的转录激活。胆囊癌变过程中是否存在类似的调控机制,尚待进一步的研究来阐明。

survivin 及 hTERT 的异常表达与多种消化道肿瘤的分期,分型,转移复发等临床病理特征密切相关^[8]。本组中未见两者的表达与胆囊癌患者的年龄、性别、组织类型、分化程度、淋巴或远处转移等临床病理特征之间存在明显关系,这与胆管癌中两者的表达特征较相似,提示胆道肿瘤可能具有自身独特的生物特性。本研究提示 survivin 及 hTERT 的表达贯穿于胆囊癌变的全过程,两者可能是胆囊癌变过程中的早期事件;两者的表达情况但并不适用于胆囊癌的疾病评估及预后判断。

参考文献:

- [1] Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells[J]. FEBS Letters, 2004, 564(1-2): 9-13.
- [2] Johnson ME, Howerth EW. Survivin: A bifunctional inhibitor of apoptosis protein[J]. Vet Pathol, 2004, 41(6): 599-607.
- [3] Pallini R, Sorrentino A, Pierconti F, et al. Telomerase inhibition by stable RNA interference impairs tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts[J]. Int J Cancer, 2005, 118(9): 2158-2167.
- [4] Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Introduction of a survivin gene-specific small inhibitory RNA inhibits growth of pancreatic cancer cells [J]. Anticancer Res, 2005, 25(6B): 3967-3972.
- [5] 王川,张祥福,杨发端,等. nm23 基因表达产物/NDPK 在大肠癌中的表达及临床意义[J]. 中华病理学杂志, 1995, 24(6): 356-358.
- [6] 陈波,邹声泉. 端粒酶在肿瘤诊断与辅助治疗中的潜在应用价值[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14: (10) 780-782.
- [7] Endoh T, Tsuji N, Asanuma K, et al. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1-and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription[J]. Exp Cell Res, 2005, 305(2): 300-311.
- [8] 韦长元,曹骥,黎丹戎,等. hTERT mRNA 和 MDR mRNA 在人肝癌中的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(8): 583-586.