

文章编号:1005-6947(2007)03-0281-03

· 简要论著 ·

Survivin 在肝细胞性肝癌中的表达及其临床意义

龙厚勇¹, 刘君¹, 郑启昌²

(1. 山东省泰安市中心医院 普通外科, 山东泰安 271000; 2. 华中科技大学同济医学院协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022)

摘要:为研究 survivin 与肝细胞肝癌(HCC)临床特征的关系,探讨其对 HCC 的早期诊断及治疗的意义。笔者应用免疫组织化学(SABC)法,检测 survivin 在 39 例 HCC 组织、4 例正常肝组织和 8 例肝硬化组织中的表达,并分析 HCC 及不同病理学特征与 survivin 蛋白表达的关系。结果显示,HCC 组织、正常肝组织、肝硬化组织中 survivin 基因的阳性表达率依次为 61.3%,0% 和 0%;HCC 组织与后 2 组间差异有显著性($P < 0.05$);随 HCC 分化程度的降低,survivin 的阳性表达率明显上升($P < 0.05$)。提示 survivin 的表达水平在 HCC 的发生、发展中具有重要意义,有望成为一新的肿瘤标志物而应用于临床。

[中国普通外科杂志,2007,16(3):281-283]

关键词: 癌,肝细胞; Survivin 蛋白; 免疫组织化学

中图分类号: R657.3

文献标识码: B

原发性肝细胞癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤,其发生、发展机制尚未完全阐明。目前研究发现,细胞凋亡抑制在肝癌的发生发展中可能占有重要地位,但尚未找到有效靶点。survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白家族(IAP)的新成员,由于其独特的结构、特殊的组织分布及明显

的抗凋亡生物学特性而引起了学者们的浓厚兴趣。本研究应用免疫组织化学(免疫组化)方法,检测 survivin 单克隆抗体对 39 例 HCC 标本中 survivin 的表达,初步探讨其与 HCC 的发生、发展和浸润转移的关系,以及其临床应用的意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源

所有 47 例标本均为泰山医学院附属泰安医院 2001-2005 年手术切除的标本,并经病理学证实诊断。(1)肝细胞肝癌组,39 例,男 23 例,

收稿日期:2006-02-15; **修订日期:**2006-09-22。

作者简介:龙厚勇,男,山东滕州人,泰安市中心医院普外科主治医师,主要从事肝胆外科基础与临床方面的研究。

通讯作者:龙厚勇 E-mail:lhy110@21cn.com

[2] Geng Z, Zhang D, Liu Y. Expression of telomerase hTERT in human non-small cell lung cancer and its correlation with c-myc gene [J]. Chin Med J (Eng), 2003, 116(10): 1467-1470.

[3] Latil A, Vidaud D, Valeri A, et al. hTERT expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer [J]. Int J Cancer, 2000, 89(2): 172-176.

[4] Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of NF-kappaB and human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer and precancerous lesions [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2): 177-181.

[5] Yu J, Dubeau L. Telomerase and malignant transformation [J]. Cancer Treat Res, 2002, 107(1): 213-228.

[6] Jeong Seo E, Jung Kim H, Jae Lee C, et al. The role of

HPV oncoproteins and cellular factors in maintenance of hTERT expression in cervical carcinoma cells [J], 2004, 94(1): 40-47.

[7] Wu TC, Lin P, Hsu CP, et al. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas [J]. Lung Cancer, 2003, 41(2): 163-169.

[8] 靳斌, 姜希宏, 王学浩, 等. 反义人端粒酶 RNA 亚基对胆囊癌端粒酶活性及细胞生长的抑制作用[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(12): 1422-1424.

[9] Kyo S, Takakura M, Inoue M, et al. Telomerase activity in cancer as a diagnostic and therapeutic target [J]. Histol Histopathol, 2000, 15(3): 813-817.

[10] Wang J, Hannon GJ, Beach DH. Risky immortalization by telomerase [J]. Nature, 2000, 405(6788): 755-756.

女8例;年龄29岁~71(平均44.45)岁。高中分化24例,低分化15例。所有病例术前均未行化疗或放疗。(2)肝硬化组(均合并门静脉高压症),8例。男5例,女3例;年龄37岁~67(平均49.8)岁。(3)正常肝组织组(非肝胆疾病患者),4例,男2例,女2例;年龄35~65(平均46.7)岁。

所有标本均为常规石蜡包埋的存档蜡块。每一个标本连续切片2张,厚4 μ m,每张行HE染色复查诊断,另一张用于survivin的免疫组化检测。

1.2 检测项目与方法

1.2.1 免疫组化染色(SP法) 通用型SP试剂盒购自北京鼎国Biotin公司;鼠抗人survivin单克隆抗体购自Neomarkers公司;DAB显色剂(鼎国生物;DDAB系列试剂盒,用前配成工作液)。染色步骤按试剂盒说明书进行。在显微镜下观察记录结果。

1.2.2 survivin检查 肝组织中survivin表达的判断以胞浆中染成棕黄色为阳性。根据阳性细胞百分率判断:阴性(-)为没有或仅有弱的染色,或阳性细胞率<10%;阳性(+)为大于10%的细胞呈阳性染色。对于不均一染色的切片,只考虑其主要染色区域。肝癌标本病理学结果的判断:细胞膜及胞浆内含棕黄色颗粒状物者为阳性细胞。结果分析采用HPIAS-1000高清晰彩色病理图文分析系统(同济千屏公司)分析判断HCC的分化程度与survivin表达的关系。光镜下放大400倍投影到荧光屏,在每张切片的肿瘤区域随即选取4个视野,测量其平均光密度为此片survivin阳性强度的关系。

1.3 统计学处理

将所得结果及临床资料建立数据库,采用SPSS10.0统计软件进行数据处理。差异显著性用 χ^2 检验和 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 不同肝组织中 survivin 的表达

4例正常肝组织和8例肝硬化组织survivin染色均呈阴性,39例HCC组织中24例(61.5%)呈阳性反应(图1-3)。阳性染色呈均一性。HCC-survivin染色阳性率显著高于非癌组织(正常肝和肝硬化组织)(均 $P < 0.001$)(表1)。

表1 survivin在HCC,肝硬化组织和正常肝组织中的表达

	HCC(n=39)	肝纤维化组织(n=8)	正常肝组织(n=4)	P值
阳性	24	0	0	<0.001
阴性	15	8	4	

2.2 survivin在HCC组织中的表达

HCC组织中survivin阳性率为61.5(24/39),其表达与肝癌病理分级有关($P < 0.05$),低分化肿瘤survivin表达阳性率明显高于高分化肿瘤($P < 0.05$);而与肿瘤大小、远处转移、血清甲胎蛋白(AFP)水平、乙肝感染状态无关($P > 0.05$)(图3-4)(表2)。

表2 survivin在HCC中的表达及其与HCC不同病理学特征的关系

肝癌相关指标	n	平均光密度	P值
分化程度			<0.05
高分化	24	0.7630 \pm 0.03779	
低分化	15	0.6431 \pm 0.05012	
肿瘤大小(cm)			>0.05
<5	12	0.7099 \pm 0.03754	
≥ 5	27	0.7123 \pm 0.02339	
远处转移			>0.05
无	26	0.7093 \pm 0.04797	
有	13	0.7145 \pm 0.04088	
血清HbsAg			>0.05
(+)	29	0.7095 \pm 0.04540	
(-)	10	0.7089 \pm 0.03984	
血清AFP水平			>0.05
(+)	33	0.7196 \pm 0.03837	
(-)	16	0.7104 \pm 0.04480	

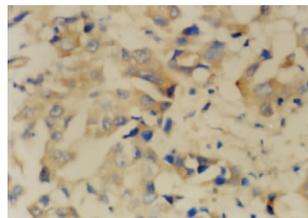
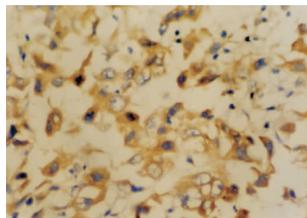
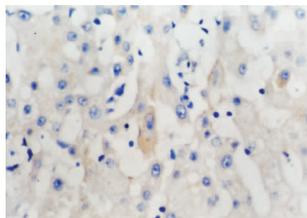
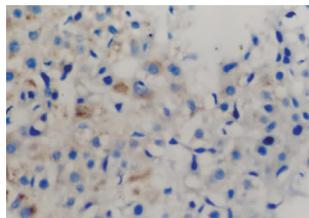


图1 肝硬化组织 survivin 阳性细胞($\times 400$)

图2 正常肝组织 survivin 阳性细胞($\times 400$)

图3 HCC(低分化) survivin 阳性细胞($\times 400$)

图4 HCC(高分化) survivin 阳性细胞($\times 400$)

3 讨论

survivin 表达于胚胎和发育的胎儿组织,在正常终末分化组织中不表达或低表达,而在人类各种肿瘤组织中广泛表达^[1]。这种特性使其成为恶性肿瘤诊断与治疗研究的新靶点。本实验结果提示,survivin 可能是参与 HCC 发生、发展的重要因素之一,其可望作为 HCC 预后不良的生物学指标。

目前研究认为,survivin 主要通过抑制 caspase 家族成员的蛋白水解酶级联反应过程中位于下游的 caspase3 和 caspase7 的活性而发挥抗凋亡作用^[2]。survivin 蛋白缺乏锌指结构,不能直接与 caspase3 结合,而可能通过卷曲的螺旋区与有丝分裂纺锤体发生微管反应;也可与细胞周期凋亡因子 CDK4 形成 survivin - CDK4 复合体,使 p21 从 CDK4 的复合体中释放出来,与线粒体 caspase - 3 结合,抑制其活性,阻止细胞凋亡^[3]。

survivin 的表达还具有细胞周期依赖性。Hela 将癌细胞分别阻断在 G₁ 期,S 期,G₂/M 期,检测细胞内 survivin mRNA 的表达,发现 G₁ 期不能检测到 survivin mRNA 的表达,而在 S 期细胞 mRNA 表达增加 6.2 倍,在 G₂/M 期细胞内 mRNA 表达上调 40 倍,提示其具有控制纺锤体检查和凋亡检查点双重作用。故认为,survivin 的表达与细胞增殖密切相关。

研究表明,survivin 与癌细胞对放疗化疗的抵抗性相关^[3]。Kato 等研究发现,高表达 survivin 能对抗化疗药物引起的凋亡。Rodel 等对 3 种直肠结肠癌细胞系(SW480,SW48,HCT15)在进行放射治疗后检测细胞内其水平。结果表明,对放疗高敏感的 SW40 照射后出现高水平细胞凋亡,并

且 survivin 呈低表达;而低度敏感的 SW480 则有高水平的 survivin 表达,且缺乏显著诱导的细胞凋亡。对于各种肿瘤组织,其表达水平与放疗化疗的敏感性密切相关,故有可能成为评价放疗化疗效果的一个指标。

利用 survivin 组织分布的特点,可使应用靶向其的抗肿瘤疗法成为可能。以其为靶点的基因治疗技术(如 RNAi 技术^[4]、反义 RNA 技术^[5]),可靶向性抑制其表达,使肿瘤细胞凋亡增加,抑制细胞增殖,降低细胞凋亡的阈值,增强对化疗药物的敏感性^[6],从而为肝癌基因治疗提供一条新的思路。

通过对 survivin 的深入研究,必将有利于肿瘤疾病机制的阐明;其作为一个普遍存在的肿瘤抗原,将有可能为肿瘤诊断提供一种理想的肿瘤标记物,成为肿瘤基因治疗的一个可行的新靶点。

参考文献:

- [1] AmbrosiniG, AdidaC, SirugoG, *et al.* Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (5): 11177 - 11182.
- [2] ShinS, SungBJ, ChoYS, *et al.* An anti - apoptotic protein human Survivin is a direct inhibitor of caspase - 3 and caspase - 7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40 (4): 1117 - 1123.
- [3] VerdeciaMA, HuanH, DutilE, *et al.* Structure of the human antiapoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7 (7): 602 - 608.
- [4] 龙厚勇. RNAi 的作用机制及其应用 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2003, 25 (5): 267 - 270.
- [5] 刘祺. survivin 与消化系统肿瘤 [J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12 (11): 854 - 857.
- [6] 段体德, 刘德权, 杨策尧. survivin 反义寡核苷酸对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14 (9): 691 - 695.

作者致歉

本人发表于中国普通外科杂志 2006, 15 (7): 533 - 535 论文《肝动脉缺血对犬肝细胞损害的实验研究》一文, 课题依附单位是: 南华大学附属第二医院。由于工作调动, 本人现工作单位是广东省东莞市人民医院, 特此声明, 并对此造成的不便表示歉意。