

文章编号:1005-6947(2007)08-0809-04

· 简要论著 ·

Survivin 和 cyclinD1 在原发性肝细胞癌中的表达及其相关性研究

董俊峰, 吴小鹏

(山东大学齐鲁医院 普通外科, 山东 济南 250012)

摘要:为探讨 survivin 和 cyclinD1 在原发性肝细胞癌(HCC)组织中的表达及两者在肝癌发病机制中的作用和相关性。笔者利用免疫组织化学 S-P 法检测 50 例原发性肝癌组织(HCC 组)及 20 例正常肝组织(正常组)中 survivin 和 cyclinD1 蛋白的表达情况。采用 Spearman 相关分析法分析两种蛋白表达的相关性。结果显示,HCC 组中 survivin 蛋白表达的阳性率为 66.0% (33/50),显著高于正常组(均为阴性表达)($P < 0.001$);其阳性表达与肝癌的肝内转移和癌灶的多发性有关($P = 0.019, P = 0.030$)。cyclinD1 蛋白在 HCC 组的阳性率为 44.0% (22/50),显著高于正常组(均为阴性表达)($P < 0.001$);其阳性表达与肝癌的肝内转移和分化程度有关($P = 0.035, P = 0.036$)。两种蛋白的阳性表达呈正相关($r = 0.466, P < 0.001$)。两者的过表达均与患者术后 < 3 年生存期有关($P = 0.018, P = 0.013$)。提示 survivin 与 cyclinD1 在 HCC 的发生及发展过程中起着不同程度的作用;两者的联合检测对判定原发性 HCC 的预后可提供一定的依据。

[中国普通外科杂志,2007,16(8):809-812]

关键词: 癌,肝细胞; Survivin; CyclinD1; 免疫组织化学

中图分类号: R 735.7

文献标识码: B

存活素(survivin)是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族的成员,除具有较强的抑制凋亡作用外,还有调节细胞周期和肿瘤血管保护等多种生物学活性^[1]。细胞周期素 D1(cyclinD1)作为 G₁/S 期细胞周期相关蛋白,其基因和编码蛋白的异常,以及与多种肿瘤相关基因的协同作用可促使细胞的恶性转化。cyclinD1 表达失控时,将引起细胞增殖周期失调,细胞失控性生长形成肿瘤。本研究通过免疫组织化学 S-P 法检测肝细胞癌(HCC)和正常肝细胞中 survivin 和 cyclinD1 的表达,初步探讨两者在 HCC 发病机制中的作用以及它们之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本及其一般资料

1.1.1 HCC 组 收集我院 2001—2003 年临床

与病理资料完整的 50 例 HCC 患者的肝癌组织标本。男 42 例,女 8 例;年龄 28~71(平均 53)岁。肿瘤分化程度按 Edmondson 四级分级法(I, II 级为高中分化, III, IV 级为低分化),高中分化 22 例,低分化 28 例。

1.1.2 正常组 收集我院 2001—2003 年临床与病理资料完整的 20 例正常肝组织标本作为对照组。男 14 例,女 6 例;年龄 32~67(平均 50)岁。

所有标本均经 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,5 μ m 厚连续切片,分别作 HE 和免疫组化染色。

1.2 主要试剂

兔抗人 survivin 多克隆抗体、兔抗人 cyclinD1 多克隆抗体和 S-P 试剂盒,均购自北京市中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化方法 石蜡切片脱蜡水化,修复抗原,正常非免疫动物血清孵育,分别加入一抗(survivin 或 cyclinD1 多克隆抗体),二抗孵育;DAB 显色,脱水,透明,封片。用磷酸盐缓冲液代

收稿日期:2006-09-18; 修订日期:2007-07-16。

作者简介:董俊峰,男,山东淄博人,山东大学齐鲁医院硕士研究生(现为济南军区总医院主治医师),主要从事肝胆肿瘤方面的研究。

通讯作者:董俊峰 E-mail:djfl977@tom.com

替一抗作阴性对照,以试剂盒中所附已知阳性切片为阳性对照。

1.3.2 免疫组化结果判断 survivin 和 cyclinD1 均以肿瘤细胞出现棕黄色颗粒为阳性表达。survivin 定位于胞浆,少数胞核可同时染色。cyclinD1 定位于胞核,少数胞浆可同时染色。根据阳性肿瘤细胞占肿瘤细胞总数的比例判定阴阳性及其程度:阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为阴性(-); $>10\% \sim 25\%$ 为弱阳性(+); $>25\% \sim 50\%$ 为中度阳性(++); $>50\%$ 为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用 SAS 8.2 统计软件对相关数据资料进行统计学处理。Survivin 和 CyclinD1 阳性表达率的比较采用 χ^2 检验、Fisher 精确概率法检验;两者表达关系采用 Spearman 相关分析,检验水准均采用 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 survivin 蛋白的表达

HCC 组 survivin 蛋白阳性表达率为 66.0%,正常组未见表达,两者差异有高度显著性 ($\chi^2 = 24.973, P < 0.001$)。survivin 蛋白的表达与肝癌患者的年龄、性别、术前甲胎蛋白 (AFP) 水平、肿瘤直径、包膜浸润、肝硬化背景、乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、Child 肝功能分级、肝癌分化程度等无明显关系 (均 $P > 0.05$)。肝内转移有与无的 HCC 组织中 survivin 蛋白阳性表达率分别为 84.6% 和 59.5%,差异有显著性 ($\chi^2 = 5.418, P = 0.019$);单发病灶与多发病灶的 HCC 组织中 survivin 蛋白阳性表达率分别为 60.5% 和 91.7%,差异有显著性 ($\chi^2 = 4.635, P = 0.030$) (表 1) (图 1)。

表 1 survivin 的表达与肝癌临床病理参数的关系(例)

临床病理参数	n	survivin 阳性表达		P 值	临床病理参数	n	survivin 阳性表达		P 值
		阳性者	阴性者				阳性者	阴性者	
性别					肿瘤数目				
男	42	28	14	0.301	单个	38	22(60.5%)	16	0.030
女	8	5	3		多个	12	11(91.7%)	1	
年龄(岁)					Child 分级				
35	41	28	13	0.226	A	31	20	11	0.777
≤ 35	9	5	4		B	19	13	6	
AFP($\mu\text{g/l}$)					分化程度				
≤ 20	20	15	5	0.273	高中	22	14	8	0.755
> 20	30	18	12		低	28	19	9	
肝硬化					肝内转移				
无	8	6	15	0.442	有	13	12(84.6%)	1	0.019
有	42	27	15		无	37	21(59.5%)	16	
HBsAg					包膜浸润				
阳性	43	28	15	0.554	有	36	23	13	0.235
阴性	7	5	2		无	14	10	4	
肿瘤直径(cm)					生存期(年)				
≤ 5	18	13	5	0.486	≥ 3	17	7(41.2%)	10	0.018
> 5	32	20	12		< 3	26	20(76.9%)	6	

2.2 cyclinD1 蛋白的表达

HCC 组 cyclinD1 蛋白的阳性表达率为 44.0%,正常组未见表达,两者差异有高度显著性 ($\chi^2 = 12.833, P < 0.001$); cyclinD1 蛋白表达与肝癌患者的年龄、性别、术前 AFP 水平、肿瘤直径、包膜浸润、肝硬化背景、HBsAg 及 Child 肝功能分级等

均无明显关系 (均 $P > 0.05$)。肝内转移有与无的 HCC 组织中 cyclinD1 蛋白阳性表达率分别为 56.2% 和 23.5%,差异有显著性 ($\chi^2 = 4.461, P = 0.036$);高中分化与低分化 HCC 组织中 cyclinD1 蛋白阳性表达率分别为 36.4% 和 64.3%,差异有显著性 ($\chi^2 = 4.539, P = 0.035$) (表 2) (图 2)。

表2 cyclinD1 的表达与肝癌临床病理参数的关系(例)

临床病理参数	n	cyclinD1 阳性表达		P 值	临床病理参数	n	cyclinD1 阳性表达		P 值
		阳性者	阴性者				阳性者	阴性者	
性别					肿瘤数目				
男	42	20	22	0.162	单个	38	15	23	0.208
女	8	2	6		多个	12	7	5	
年龄(岁)					Child 分级				
35	41	18	23	0.287	A	31	12	19	0.336
≤35	9	4	5		B	19	10	9	
AFP(μg/l)					分化程度				
≤20	20	10	10	0.485	高中	22	6(36.4%)	16	0.035
>20	30	12	8		低	28	16(64.3%)	12	
肝硬化					肝内转移				
无	8	3	5	0.282	有	13	9(56.2%)	4	0.036
有	42	19	23		无	37	13(23.5%)	24	
HBsAg					包膜浸润				
阳性	43	20	23	0.322	有	36	14	22	0.243
阴性	7	2	5		无	14	8	6	
肿瘤直径(cm)					生存期(年)				
≤5	18	10	8	0.217	≥3	17	4(23.5%)	13	0.013
>5	32	12	20		<3	26	16(61.5%)	10	

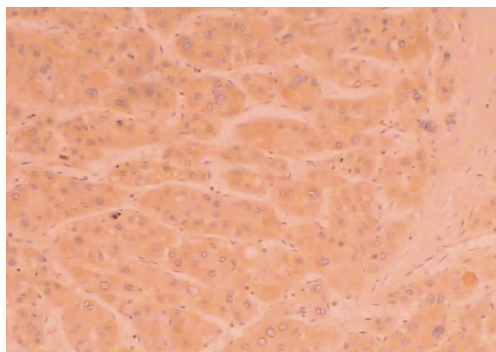


图1 肝细胞癌中 survivin 的表达(S-P×200)

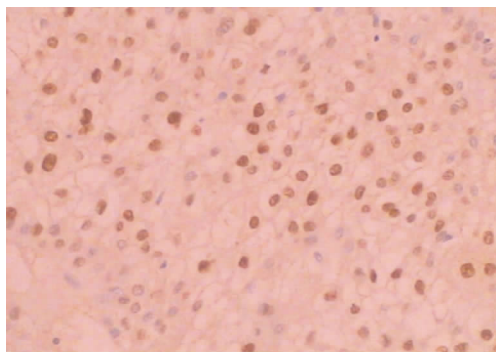


图2 肝细胞癌中 cyclinD1 的表达(S-P×200)

2.3 两种基因蛋白的表达与预后

随访时间 ≥ 3 年生存组的 17 例中 survivin 和 cyclinD1 的阳性率分别为 41.2% (7/17) 和 23.5% (4/17); < 3 年生存组的 26 例中 survivin 和 cyclinD1 的阳性率分别为 76.9% (20/26) 和 61.5% (16/26), 两组间差异显著 (P = 0.018, P = 0.013)。

2.4 survivin 表达与 cyclinD1 表达之间的相关性

survivin (-) 的 15 例中 cyclinD1 (+) 2 例, 阳性率为 13.3%; survivin (+) 的 33 例中 cyclinD1 (+) 20 例, 阳性率为 60.6%, survivin 表达与 cyclinD1 表达呈显著正相关 (r = 0.466, P < 0.001) (表 3)。

表3 survivin 和 cyclinD1 在肝细胞癌中表达的相互关系

survivin	cyclinD1		计	r	P 值
	(-)	(+) %			
(-)	15	2(13.3)	17	0.466	<0.001
(+)	13	20(60.6)	33		

3 讨论

生理状态下,在成人,除子宫内膜、胎盘和胸腺组织中可存在不同程度的 survivin 表达外,大多数组织未能检测出 survivin 的表达;在癌旁组织中也不表达或低表达;其具体机制尚不清楚^[2-5]。然而,人类绝大多数恶性肿瘤却发现存在不同程度的 survivin 表达,如胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、乳癌和宫颈癌等。survivin 系通过抑制半胱氨酸天冬蛋白酶 3 和 7 (caspase 3, caspase 7) 的活性而抑制细胞凋亡; caspases 则是控制细胞凋亡的核心环节。survivin 直接作用于 caspase, 阻止由 caspase 激活剂或凋亡诱导剂诱导的细胞内相关自杀酶的积累,从而阻断细胞的凋亡过程^[6]。另外, survivin 与细胞周期调控因子 CDK4 形成 survivin-CDK4 复合体, 释放出 p21, p21 能进一步与线粒体 caspase3 结合,抑制其活性,阻止细胞凋

亡^[7]。此外, survivin 的表达还具有细胞周期依赖性, 特异性地在 G₂/M 期表达, 通过与细胞有丝分裂纺锤体的微管结合, 参与对细胞基因转录的调节。因此认为, survivin 具有抑制细胞凋亡与调控细胞周期两种功能; 其过度表达可造成细胞增殖增加、凋亡减少, 细胞增殖与凋亡平衡失调, 导致肿瘤的发生。

本研究显示, HCC 组织中 survivin 蛋白阳性表达率为 66.0%, 而在正常肝组织中未见表达, 表明其参与了肝癌的发生、发展, 其机制是抑制了肝细胞的凋亡和调控细胞周期。survivin 蛋白表达与性别、年龄、肿瘤的分化程度、HBsAg、肿瘤大小、Child 肝功能分级等无关, 而与 HCC 肝内转移和肿瘤多发密切相关, 预示着高度侵袭性的病理特征。Ikeguchi 等^[8]的研究结果显示, survivin mRNA 的表达与 HCC 预后相关。本组 43 例随访患者中, 生存期 ≥ 3 年组的 survivin 阳性率 (41.2%) 明显低于生存期 < 3 年组 (76.9%)。提示 survivin 阳性表达与患者预后相关, 与 Ikeguchi 等的研究结果一致。上述事实表明, survivin 阳性的表达程度与 HCC 的发生发展和预后相关, 与病期进展相一致, 可作为有效的预后预测因子。

cyclinD1 是一种反映细胞周期变化的蛋白, 其在细胞周期 G₁ 到 S 期的转变中有重要意义, 具有细胞周期正调控作用。在 G₁ 期 cyclinD1 与相应的细胞周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinases, CDK) 结合, 使 pRB 磷酸化, 驱使细胞通过检测点, 加速细胞周期进程^[9]。cyclinD1 作为 G₁/S 期细胞周期相关蛋白, 其基因和编码蛋白的异常, 以及与多种肿瘤相关基因的协同作用可促使细胞恶性转化; cyclinD1 表达失控时, 将引起细胞增殖周期失调, 细胞失控性生长形成肿瘤。cyclinD1 除与肿瘤的发生发展有关外, 还与肿瘤的转移、预后也密切相关^[10]。本研究显示, HCC 组织中 cyclinD1 蛋白阳性表达率为 44.0%, 而在正常肝组织中未见表达。cyclinD1 蛋白表达与性别、年龄、肿瘤的数目、肿瘤大小、HBsAg 及 Child 肝功能分级等无关, 而与 HCC 的肝内转移、肿瘤分化程度呈显著相关。研究同时表明, 随访的 43 例中, 生存期 ≥ 3 年组 cyclinD1 的表达率 (23.5%) 明显低于生存期 < 3 年组 (61.5%)。说明 cyclinD1 的表达随肿瘤恶性程度的增高而增高, 与肝癌的发生发展密切相关, 其过度表达可反映肝癌的侵袭力。上述结果表明 cyclinD1 与 HCC 的发生发展、分化程度及生存期有关, 可作为有效的预后预测因子。

HCC 的发生发展不仅是细胞增殖过强, 而且与细胞凋亡减弱密切相关, 细胞的癌变是多种致癌因子协同作用的结果。本研究观察到在 HCC 组织中, survivin 与 cyclinD1 之间的表达呈正相关, 提示 survivin 对细胞凋亡的抑制, 使得 cyclinD1 过表达, 细胞持续增殖, 导致癌的发生。Conway 等^[11]的实验结果证实, 处于 S 期细胞 survivin mRNA 提高 6.2 倍, G₂ 期提高 survivin mRNA 40 倍。这进一步证实 survivin 与细胞分裂、增殖密切相关。

总之, survivin 与 cyclinD1 在肝细胞癌的发生、发展中起着不同程度的作用。对两基因的检测有利于判断 HCC 的恶性程度和预后分析, 为进一步治疗提供有效的依据。survivin 与 cyclinD1 的过表达可作为判断肝癌预后差的指标。

参考文献:

- [1] Lu CD, Altieri DC, Tanigaqwa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9):1808-1812.
- [2] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Br Cancer*, 2002, 86(6):886-892.
- [3] Mori A, Wada H, Nishimura Y, et al. Expression of antiapoptosis gene survivin in human leukemia [J]. *Int Hematol*, 2002, 75(2):161-165.
- [4] Das A, Tan WL, Teo J, et al. Expression of survivin in primary glioblastomas [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(6):302-306.
- [5] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting [J]. *Biol Chem*, 1998, 273(18):11177-11182.
- [6] Ingo T, Wang Y, Sausville ED, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas, Bax, caspase, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(6):5315-5318.
- [7] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspases 3/p21 complex formation as result of interaction with CDK4 to resist Fas-mediated cell death [J]. *Oncogene*, 2000, 19(10):1346-1353.
- [8] Ikeguchi A, Ueda T, Sakatani T, et al. Expression of survivin mRNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Diag Molecular Path*, 2002, 11(1):33-36.
- [9] Simile MM, Miglio MR, Muroli MR, et al. Down-regulation of c-myc and cyclinD1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(3):333-441.
- [10] 杨剑, 糜漫天. 细胞周期素 D1 与肿瘤研究进展 [J]. 国外医学·肿瘤学分册, 2003, 30(5):336-337.
- [11] Conway EM, Pollefeyt S, Comelissen J, et al. Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct anti-apoptosis function [J]. *Blood*, 2000, 95(5):1435-1442.