

文章编号:1005-6947(2005)11-0817-03

· 胰腺癌专题研究 ·

Survivin 在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌增殖活性的关系

王宇令¹, 刘源¹, 张建勋², 葛春林³

(1. 中国医科大学附属第二临床学院 普通外科, 辽宁 沈阳 110003; 2. 辽宁省盘锦市第四人民医院 外科, 辽宁 盘锦 124000; 3. 中国医科大学附属一院 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨 Survivin 在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌增殖活性的关系。方法 用 RT-PCR 法检测 62 例胰腺癌、12 例慢性胰腺炎和 10 例正常胰腺组织中 Survivin mRNA 的表达;用免疫组织化学法检测胰腺癌中增殖细胞核抗原(PCNA)的表达,并观察两者的关系。结果 Survivin mRNA 在胰腺癌中表达率为 74.2%,在慢性胰腺炎及正常胰腺组织中不表达,前者与后两者差异有显著性($P < 0.01$);与胰腺癌的分化程度、临床分期及淋巴结转移无明显关系($P > 0.05$)。Survivin 的表达与胰腺癌增殖活性有关;Survivin 阳性肿瘤具有较高的增殖活性,其 PCNA 指数为 $(46.4 \pm 15.2)\%$,明显高于 Survivin 表达阴性肿瘤者 $(28.4 \pm 14.8)\%$ ($P < 0.01$)。结论 Survivin 基因在胰腺癌中过表达,并与胰腺癌的高增殖有关。提示该基因对胰腺癌的发生和发展起重要作用。Survivin 基因有望成为胰腺癌诊断和治疗的新靶点。

关键词: 胰腺肿瘤/遗传学; 胰腺肿瘤/病理学; 基因表达; 免疫组织化学

中图分类号:R735.9

文献标识码:A

The expression of survivin gene and the relationship with proliferative activity in pancreatic adenocarcinoma

WANG Yu-ling¹, LIU Yuan¹, ZHANG Jian-xun², GE Chun-lin³

(1. Department of General Surgery, the 2nd Clinical College, China Medical University, Shenyang 110003, China; 2. Department of Surgery, the 4th People Hospital, Panjin, Liaoning 124000, China; 3. The Department of General Surgery, the 1st Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of Survivin and the relationship with proliferative activity in pancreatic carcinoma (PC). **Methods** The expression of Survivin mRNA was investigated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in 62 cases of PC samples, 12 cases of chronic pancreatitis (CP) samples, and 10 cases of normal pancreatic tissue samples. Meanwhile, the expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) was detected by immunohistochemical assay. **Results** The expression of Survivin gene was detected in a significantly greater proportion in PC (74.2%) than CP (0/12) and normal pancreatic tissue (0/10) ($P < 0.05$). There was no relationship between Survivin gene expression and histological differentiation, clinical stage, or lymph nodes metastasis of PC. Furthermore, Survivin positive PC had higher PCNA-LI than that of survivin negative PC ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of Survivin gene is increased in PC and related to higher proliferation potential of PC, and that suggested that survivin may play an important role in the pathogenesis and progression of PC. Survivin may be identified as a new potential diagnostic/therapeutic target of PC.

Key words: Pancreatic Neoplasms/genet; Pancreatic/pathol; Gene expression; Immunohistochemistry

CLC number: R735.9

Document code: A

收稿日期:2005-01-25; 修订日期:2005-05-04。

作者简介:王宇令(1962-),男,辽宁营口人,中国医科大学附属第二临床学院副教授,主要从事胰腺肿瘤方面的研究。

通讯作者:王宇令 电话:024-83955312; E-mail:Wangyl@cmuzh.com。

越来越多的研究表明,肿瘤的发生不仅与细胞的增殖和分化异常有关,也和细胞凋亡异常有关。胰腺癌是较常见的消化系统肿瘤,与许多凋亡和增殖相关基因的异常表达或基因突变有关。Survivin是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员,其与胰腺癌的发生发展及增殖活性的关系目前研究较少。笔者探讨了Survivin在胰腺癌中的表达及其与增殖细胞核抗原(PCNA)表达的关系,旨在为胰腺癌的诊断及治疗提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 胰腺癌组 62例胰腺癌标本均为取自2002年8月~2004年7月我院手术切除并经病理证实的胰腺癌组织。男34例,女28例;年龄35~72岁,平均(56.0)岁。分化程度:高分化20例,中分化22例,低分化20例。按国际抗癌协会(UICC)1997年TNM分期标准分期:I期15例,II期21例,III期17例,IV期9例。有局部淋巴结转移22例,无淋巴结转移40例。

1.1.2 对照组 取同期手术切取的非肿瘤性胰腺组织标本22例(慢性胰腺炎12例,正常胰腺组织10例,均取自壶腹癌及胰腺内分泌性肿瘤手术切除标本)作对照。每一标本分2块:一块用10%福尔马林固定,石蜡包埋;另一块液氮速冻后,-70℃保存待用。

1.2 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测Survivin基因表达

样品总RNA的制备:取组织50~100mg,用Trizol法提取组织中的总RNA。cDNA的合成方法:反应体系中加入提取的RNA 5μg,2.5mmol/L脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)4μL,寡聚脱氧胸苷酸(oligo-dT)0.3μg,RNA酶抑制剂(RNasin)20U,0.1mol/L巯基乙醇(DDT)2.5μL,加水至19μL。上述混合物70℃加热5min后,冰上冷却,然后加入Moloney小鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶200U,5×逆转录酶缓冲液5μL,终体积25μL,简短离心、混均后37℃水浴60min;最后90℃灭活M-MLV逆转录酶活性,冰上冷却后即完成cDNA的合成。PCR反应:cDNA扩增Survivin基因引物序列^[1]为5'-GGACCACCGCATCTCTACAT(上游)和5'-GCACTTTCTTCGAGTTTCC(下游);内对照β-肌动蛋白(β-actin)基因引物序列为5'-CGCTGCGCTG-GTCGTCGACA-3'和5'-GTCACGCACGATTTCCCGCT-3'。在25μL反应体系中含有cDNA1μL,2.5mmol/L dNTP2μL,20pmol/L上下游引物各0.5μL,Pfu DNA聚合酶1.25U(0.25μL),5×Pfu DNA聚合酶

缓冲液2.5μL。反应条件:94℃,40s;60℃,1min;72℃1min,共32个循环。以β-actin为内参照检测转录效率。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)显色并照相。

1.3 免疫组织化学(免疫组化)法检测PCNA的表达

采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组化方法。一抗PCNA抗体及SP试剂盒均为武汉博士德公司产品。一抗工作浓度为1:50,实验步骤按试剂盒说明书进行。将已知阳性肺癌切片作阳性对照,PBS缓冲液代替一抗,作阴性对照。

结果判定:以细胞核染成棕黄色为阳性。增殖活性以PCNA标记指数(PCNA-LI)代表,随机计数500个细胞中阳性细胞数。PCNA-LI=(阳性细胞数/计数细胞总数)×100%。

1.4 统计学处理

数据的组间差异采用 χ^2 检验法及t检验,SPSS12.0软件进行数据分析。

2 结果

2.1 胰腺癌、慢性胰腺炎及正常胰腺组织中Survivin基因的表达

Survivin基因RT-PCR产物为338个碱基,β-actin内对照为619个碱基。74.2%的胰腺癌组织表达Survivin基因,而慢性胰腺炎和正常胰腺组织不表达($P < 0.01$)(图1)。

M: DL 2000 DNA Marker; 1~3: 胰腺癌; 4, 5: 慢性胰腺炎; 6, 7: 正常胰腺组织

图1 Survivin基因mRNA在胰腺癌、慢性胰腺炎及正常胰腺组织中的表达

2.2 Survivin基因表达与胰腺癌临床病理特征的关系

Survivin基因表达与胰腺癌的分化程度、TNM分期及淋巴结转移无明显关系(附表)。

2.3 Survivin与PCNA表达的关系

胰腺癌组织PCNA平均指数为(41.2 ± 17.0)% (图2),显著高于慢性胰腺炎(2.1 ±

0.6)%和正常胰腺组织的(1.3±0.2)%($P < 0.01$)。46例Survivin阳性胰腺癌中PCNA平均指数为(46.4±15.2)%,明显高于16例Survivin阴性的胰腺癌中PCNA平均指数(28.4±14.8)%。Survivin的表达与PCNA指数关系明显($P < 0.01$)。

表1 Survivin基因表达与胰管细胞癌临床病理特征的关系

项目	总例数	Survivin 阳性表达		χ^2 值	P 值
		例数	百分率(%)		
分化程度					
高分化	20	14	70.0	0.561	>0.05
中分化	22	16	72.7		
低分化	20	16	80.0		
临床分期				2.540	>0.05
I,II期	36	24	66.7		
III,IV期	26	22	84.6		
淋巴结转移				0.169	>0.05
阳性	22	17	77.3		
阴性	40	29	72.5		

图2 PCNA在胰腺癌组织中的表达(×400)

3 讨论

细胞增殖和凋亡的平衡对于维持多细胞生物体的稳态至关重要。平衡的破坏使存在基因缺陷的细胞得以生存,促使基因突变的积累和细胞的恶性转化,最终导致肿瘤的发生和发展^[2]。Survivin是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员,能直接抑制凋亡途径终末效应因子Caspase-3,7的活性,阻断细胞的凋亡过程^[3]。与其他IAP家族成员不同的是,Survivin在组织分布上具有明显的细胞选择性,通常只表达于胚胎和发育的胎儿组织,除胸腺外不见于其他正常终末分化的成人组织。而在大多数肿瘤组织中可见Survivin表达^[4]。本研究证实,正常胰腺组织和慢性胰腺炎Survivin基因无表达,而在74.2%的胰腺癌组织中有Survivin mRNA表达。Survivin基因在胰腺癌组织表达上调,提示Survivin基因可能通过抑制细胞凋亡,对胰腺癌的发生发展起重要作用。

Survivin基因的表达与胰腺癌分化程度、TNM分期和淋巴结转移均无明显关系。Survivin表达上

调可出现在胰腺癌发生的各个阶段,提示用RT-PCR检测Survivin mRNA对于恶性程度及病期早晚的预测无明显价值。然而,有研究^[5]显示,Survivin阴性的乳腺癌患者术后生存时间明显高于Survivin阳性的乳腺癌患者。检测Survivin mRNA或蛋白表达对于预测乳腺癌的预后有一定价值。有关Survivin与胰腺癌的预后尚有待于进一步探讨。

已有研究表明,Survivin可能通过影响细胞周期循环参与细胞增殖的调控^[6]。增殖细胞核抗原(PCNA)又称周期蛋白,在静止细胞内含量很少,G₁晚期开始增加,S期达到高峰,G₂,M期明显下降。故PCNA可作为细胞周期内S期的特异性标记。其合成和表达与细胞增殖有关。因此,PCNA可作为评价细胞增殖状态的一个指标。本研究显示,Survivin表达阳性的胰腺癌其PCNA指数明显高于Survivin表达阴性的胰腺癌,说明二者关系密切。这种关系表明,Survivin基因异常表达与胰腺癌细胞增殖活性升高有关,可能具有促进胰腺癌细胞增殖的作用。有关Survivin调控细胞增殖的机制目前还不清楚。可能的机制是:Survivin与CDK4直接作用,导致Cdk2/CyclinE激活与Rb磷酸化;磷酸化的Rb蛋白失去对细胞生长的抑制作用,导致细胞失控性生长。Survivin与Cdk4相互作用还可导致p21蛋白与Cdk4分离,分离后的p21蛋白与线粒体的前Caspase-3结合,抑制Fas介导的凋亡。

综上所述,本研究发现:Survivin基因在胰腺癌组织中表达上调,并与PCNA有明显的关系,提示Survivin基因可能通过抑制凋亡、促进增殖,从而干扰细胞凋亡和增殖的平衡,促进胰腺癌的发生和发展。Survivin基因有望成为胰腺癌基因治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, *et al.* Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J]. *Gut*, 2000, 46(5): 645-650.
- [2] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer[J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 342-348.
- [3] Shin S, Sung BJ, Cho YS. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117-1123.
- [4] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC, *et al.* A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.
- [5] 吴万敏,王小娟,孟化. Survivin在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(11): 868-869.
- [6] Ito T, Shiraki K, Sugimotok, *et al.* Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2000, 31(5): 1080-1085.