

文章编号:1005-6947(2006)08-0586-04

· 基础研究 ·

胆囊癌组织 survivin, caspase-3 和 Cox-2 表达与临床病理特点的关系

何正峰, 丁志强

(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:目的 探讨 survivin, caspase-3 及 Cox-2 蛋白表达与胆囊癌生物学行为及临床病理指标的关系。方法 检测 49 例胆囊癌、9 例胆囊腺瘤、10 例慢性胆囊炎组织中 survivin, caspase-3 及 Cox-2 的表达。结果 (1) survivin, caspase-3 及 Cox-2 在胆囊癌组织中阳性表达率分别为 65.3% (32/49), 44.9% (22/49) 和 75.5% (37/49), 显著高于胆囊良性病变组织 (分别为 $P < 0.001$, < 0.001 及 $= 0.001$)。 (2) survivin 表达与肿瘤浸润程度、分化程度、淋巴结转移及 Nevin 分期均无显著关系 (均 $P > 0.05$); caspase-3 表达与分化程度有关而与肿瘤浸润程度、淋巴结转移、Nevin 分期无关; Cox-2 阳性率在淋巴结转移组与非转移组、不同浸润深度以及 Nevin 分期间差异均有显著性, 而与组织学分级无关。三者均与患者的年龄、性别无关。 (3) survivin 与 caspase-3 表达呈负相关 ($r = -0.373$, $P = 0.008$), survivin 与 Cox-2 表达呈正相关 ($r = 0.404$, $P = 0.004$), caspase-3 与 Cox-2 表达无明显相关性 ($r = -0.156$, $P = 0.284$)。结论 胆囊癌组织 caspase-3 表达较低, 而 survivin 及 Cox-2 表达较高; survivin 和 Cox-2 的过表达以及 caspase-3 的失表达在胆囊癌的发生、发展中起重要作用。 survivin 和 Cox-2 蛋白可望作为靶点用于胆囊癌靶向治疗。

关键词: 胆囊肿瘤/病理学; 腺瘤/病理学; 基因表达; survivin 蛋白; Cox-2 蛋白

中图分类号: R735.8; R730.261

文献标识码: A

Expression and clinicopathological relationship of survivin, caspase-3 and Cox-2 in gallbladder carcinoma

HE Zheng-feng, DING Zhi-qiang

(Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wnhan, 430030, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the relationship between the expression of survivin, caspase-3 and Cox-2 and clinicopathological characteristics in gallbladder carcinoma (GBC). **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of survivin, caspase-3 and Cox-2 in 49 specimens of GBCs, 9 cases of gallbladder adenoma and 10 cases of chronic cholecystitis. **Results** Positive cytoplasmic immunoreactivity was detected in a proportion of 65.3% for survivin, 44.9% for caspase-3, and 75.5% for Cox-2 in GBCs, respectively, and those were significantly higher in malignant lesions than in benign diseases. There was no significant relation between the expression of survivin or Caspase-3 and patients' clinicopathological features, except the expression of caspase-3 was related to the tumor differentiation. There was a relationship between Cox-2 expression and the depth of invasion, lymph node metastases and Nevin's staging of the tumor. Furthermore, the expression of survivin correlated positively with Cox-2 expression ($r = 0.404$, $P = 0.004$) and inversely with caspase-3 ($r = -0.373$, $P = 0.008$), but no significant correlation was found between the expression of caspase-3 and Cox-2 ($r = -0.156$, $P = 0.284$). **Conclusions** The over-expression of survivin and Cox-2 and descended expression of caspase-3 play an important role in the carcinogenesis and progression of GBC. Survivin and Cox-2 may be identified as targets for target therapy of gallbladder carcinoma.

收稿日期:2005-08-05; 修订日期:2006-03-07。

作者简介:何正峰,男,湖北麻城人,华中科技大学同济医学院附属同济医院硕士研究生,主要从事胆胰方面的研究。

通讯作者:何正峰 E-mail:hezhenfeng1228@tom.com。

Key words: Gallbladder Neoplasms/pathol; Adenocarcinoma/pathol; Gene Expression; Survivin protein;

Cox-2 protein

CLC number: R735.8; R730.261

Document code: A

胆囊癌是胆道最常见的恶性肿瘤,近年来发病呈上升趋势;其起病隐匿,恶性程度高,预后极差^[1]。细胞凋亡过程的失控在肿瘤的形成过程中起十分重要的作用。caspase 家族是直接导致细胞凋亡解体的蛋白酶系统,其中 caspase-3 的激活是触发凋亡的关键^[2]。survivin 是近来发现的一种凋亡抑制蛋白,直接作用于 caspase-3 和 caspase-7,抑制细胞凋亡^[3]。近年来的研究表明,诱导型环氧化酶(Cox-2)在多种肿瘤中的表达均明显升高,表达 Cox-2 的细胞株增加癌变潜能与抵抗凋亡有关^[4]。笔者采用免疫组化方法观察 survivin, caspase-3 及 Cox-2 在胆囊癌组织中的表达,并探讨它们与胆囊癌生物学行为及临床病理特性的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源及一般资料

收集本院 1993—2004 年 7 月存档的胆囊癌组织石蜡切片标本 49 例,均经病理学证实诊断。全组临床资料完整。所有患者术前未经放疗化疗及非甾体类抗炎药治疗。其中男 19 例,女 30 例;年龄 34~78(平均 58.4)岁。肿瘤高分化 24 例,中分化 9 例,低分化 16 例(含未分化 1 例);伴淋巴结转移 22 例。按 Nevin 分期:I 期 7 例,II 期 8 例,III 期 11 例,IV 期 7 例,V 期 16 例。另取 9 例胆囊腺瘤(男 3 例,女 6 例;年龄 22~73,平均 55.8 岁)和 10 例慢性胆囊炎(男 4 例,女 6 例;年龄 26~69,平均 42.6 岁)组织作对照。

1.2 免疫组化试剂

survivin 羊抗人多克隆抗体(sc-8806),Cox-2(ZM-0035)单克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品,工作浓度分别为 1:50 和 1:75;caspase-3 多克隆抗体(RB-1197)购于 Neomarks 公司,工作浓度为 1:60。免疫组化 S-ABC 试剂盒购自武汉博士德公司(SA1021);APEs 黏片剂和 DAB 显色试剂盒购自福州迈新公司(AR1022)。用已知阳性切片作阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.3 免疫组化染色方法

采用 SABC 法进行免疫组化染色。切片脱蜡水

化后,3% H₂O₂ 室温处理 10 min,微波抗原修复,正常羊血清室温孵育 15 min;滴加稀释的一抗,4℃ 过夜;滴加生物素标记的二抗,室温孵育 30 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链亲和素室温 30 min,DAB 显色。经苏木素复染后,脱水、透明、封片。

1.4 判断标准

分别参照文献^[4-5]的标准稍作改动,双盲法阅片。survivin, caspase-3 及 Cox-2 在胞浆中均被染成淡黄色至棕黄色者为阳性细胞(survivin 偶见于胞核)。每张切片观察 5 个高倍视野(×400),总细胞计数 > 1 000。阳性细胞率 = 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱计算免疫组化染色评分:(1)阳性细胞 ≤ 5% 为 0 分,阳性细胞 6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,> 50% 为 3 分;(2)阳性细胞染色基本不着色为 0 分,着色淡为 1 分,中度着色为 2,着色深为 3 分。(1)(2)两项乘积即为其免疫组化评分。如在同一病变中存在多个不同评分的视野,则取最大值和最小值的平均值作为免疫组化评分。得分 < 2 为阴性,≥ 2 为阳性。

1.5 统计学处理

采用 SPSS11.5 分析软件进行统计学处理。应用 χ^2 检验分析 survivin, caspase-3 及 Cox-2 表达与临床病理指标的关系;应用 Spearman 等级相关分析检验 caspase-3, survivin, Cox-2 表达间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

2.1 survivin, caspase-3 和 Cox-2 的表达

survivin 在胆囊癌、胆囊腺瘤和慢性胆囊炎组织中阳性率分别为 65.3%, 0 和 0;caspase-3 在胆囊癌、胆囊腺瘤和慢性胆囊炎中阳性率分别为 44.9%, 88.9% (8/9) 和 100%;Cox-2 在胆囊癌、胆囊腺瘤和慢性胆囊炎中阳性率分别为 75.5%, 33.3% 和 30.0%;survivin, caspase-3, Cox-2 在癌组织的表达与在良性病变组织的表达差异均有显著性($P < 0.05$) (图 1-3)。

图1 survivin 在胆囊癌的阳性表达 (SABC × 200)

图2 caspse-3 在胆囊癌的阳性表达 (SABC × 200)

图3 Cox-2 在胆囊癌的阳性表达 (SABC × 400)

2.2 survivin , caspase-3 , Cox-2 表达与胆囊癌患者临床病理特征的关系

survivin 阳性率在不同组织分化、浸润程度、淋巴结转移、Nevin 分期间差异均无显著性；caspase-3 阳性率在不同组织学分级间差异有显著性 ($P =$

0.015) , 而与浸润程度、淋巴结转移、Nevin 分期无显著关系；Cox-2 阳性率在不同组织学分级间差异无显著性,而在淋巴结转移组与非转移组、不同浸润程度和 Nevin 分期间差异有显著性(均 $P < 0.05$) (表1)。

表1 survivin , caspase-3 和 Cox-2 表达与胆囊癌患者临床病理特征的关系

组别	survivin 表达				caspase-3 表达				Cox-2 表达				
	(+)	(-)	χ^2 值	P 值	(+)	(-)	χ^2 值	P 值	(+)	(-)	χ^2 值	P 值	
性别													
男	19	12	7	0.063	0.801	8	11	0.098	0.754	15	4	0.011	0.917
女	30	20	10			14	16			22	8		
年龄(岁)													
≥60	29	19	10	0.001	0.970	15	14	1.338	0.247	24	5	1.173	0.279
<60	20	13	7			7	13			13	7		
组织分化													
高分化	24	15	9	0.163	0.686	15	9	5.891	0.015 ¹⁾	19	5	0.340	0.560
中-低分化	25	17	8			7	18			18	7		
浸润程度 ²⁾													
黏膜及黏膜下	7	2	5	3.315	0.069	4	3	1.993	0.158	3	4	5.749 ²⁾	0.016 ¹⁾
肌层	8	5	3			5	3			5	3		
全层	34	25	9			13	21			29	5		
淋巴结转移													
有	22	16	6	0.970	0.325	7	15	2.761	0.097	20	2	5.120	0.024 ¹⁾
无	27	16	11			15	12			17	10		
Nevin 分期													
I~III	26	15	11	1.417	0.234	15	11	3.665	0.056	16	10	5.847	0.016 ¹⁾
IV~V	23	17	6			7	16			21	2		

注:理论数少于5,采用校正 χ^2 检验值。1) $P < 0.05$, 2) χ^2 值为合并黏膜和肌层浸润组与全层浸润组比较所得

2.3 survivin , caspase-3 , Cox-2 的相关性

Spearman 等级相关性检验结果: survivin 与

caspase-3 表达呈负相关 ($r = - 0.373$, $P = 0.008$) , survivin 与 Cox-2 表达呈正相关 ($r = 0.404$,

$P = 0.004$), caspase-3 与 Cox-2 表达无明显相关性 ($r = -0.156, P = 0.284$)。

3 讨论

细胞增殖与凋亡平衡的破坏可促使细胞恶性转化,最终导致肿瘤的发生、发展。目前尚未找到有效靶点来调控细胞增殖与凋亡。survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白(IAP)基因家族成员。研究表明, survivin 可对抗 G₂/M 期凋亡的诱导,在癌组织中该蛋白可克服凋亡的检查点(checkpoint),允许变异细胞通过有丝分裂异常增殖^[6],并直接作用于 caspase,主要抑制 caspase-3 和 caspase-7 的活性,阻断细胞凋亡过程^[3]。本研究通过联合检测 49 例胆囊癌组织中 survivin 和 caspase-3 的表达,发现胆囊癌中 caspase-3 和 survivin 的表达在不同浸润程度、淋巴结转移及 Nevin 分期期间均无显著差异。说明在肿瘤演进过程中, survivin 与 caspase-3 表达异常可能是早期事件。因此,能否将 caspase-3, survivin 的检测作为早期发现胆囊癌的方法成为笔者考虑的焦点。进一步分析发现 survivin 和 caspase-3 的表达呈负相关,提示在胆囊癌的发生发展过程中 survivin 可能正是通过取消凋亡检查点,允许变异细胞异常增殖,从而促进肿瘤的发生。

Cox-2 在大多数人类肿瘤中过表达,其过表达与结肠癌、头颈部肿瘤、肺癌、前列腺癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤的浸润、淋巴结转移和预后不良有关^[7]。本研究发现, Cox-2 在胆囊癌中的表达率为 75.5%,明显高于胆囊良性病变组织; Cox-2 的表达与组织分化程度、患者的性别、年龄无关($P > 0.05$),而与肿瘤浸润程度、淋巴结转移和 Nevin 分期有密切关系($P < 0.05$)。此结果与 Asano 等^[8]报道的胆囊癌中 PT₃, PT₄ 组 Cox-2 mRNA 水平显著高于 PT₁, PT₂ 组相一致。由此可见, Cox-2 的过度表达参与了胆囊癌的恶性进展过程,并可增强胆囊癌的局部浸润和淋巴转移。Cox-2 可能是反映胆囊癌预后的有用指标。

本实验显示,与胆囊良性病变相比,胆囊癌组织中 Cox-2 与 survivin 均存在高度表达,其共表达率为 57.1% (28/49),而且 Cox-2 与 survivin 表达间存在正相关。Krysan 等^[9]认为在非小细胞性肺癌中 Cox-2 的过表达和前列腺素 E₂ 的增加抑制了 survivin 的泛素化,阻止 survivin 的蛋白酶体降解,增强 survivin 的稳定表达。Wu 等^[10]研究发现, Cox-2

抑制剂可通过激活 caspase-3 和 caspase-9 诱导胆管癌细胞凋亡,而 caspase 的抑制剂能阻止这一过程。因此笔者认为, Cox-2 的过度表达可抑制胆囊癌细胞凋亡,加速细胞增生,促进胆囊癌的发生和发展;这为 Cox-2 抑制剂可能用于某些肿瘤的预防和治疗提供了一定的理论依据。但相关分析显示 Cox-2 与 caspase-3 表达并无显著相关性,说明细胞凋亡过程存在一个复杂的调控网络。故认为,各个信号途径之间的相互联系与相互作用仍需深入探讨。

综上所述, survivin 和 Cox-2 的过表达以及 caspase-3 的失表达在胆囊癌的发生、发展中起重要作用。进一步研究 survivin 和 Cox-2 等凋亡相关基因的激活机制以及基于半胱天冬酶平台的凋亡调节机制,将为胆囊癌等恶性肿瘤的治疗和预防提供新的靶点。

参考文献:

- [1] 毕旭东,付晓光,白光. 原发性胆囊癌的手术治疗[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(1): 68-69.
- [2] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 269-290.
- [3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, *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.
- [4] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, *et al.* Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [5] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1808-1812.
- [6] Li F, Ambrosini G, Chu EY, *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396(6711): 580-584.
- [7] Costa C, Soares R, Reis-Filho JS. Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(6): 429-434.
- [8] Asano T, Shoda J, Ueda T, *et al.* Expressions of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E-receptors in carcinoma of the gallbladder: crucial role of arachidonate metabolism in tumor growth and progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 1157-1167.
- [9] Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, *et al.* Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6359-6362.
- [10] Wu T, Leng J, Han C, *et al.* The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangio carcinoma cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(3): 299-307.