论著

文章编号:1000-5404(2006)21-2186-03

Survivin在子宫内膜异位症的表达及其与bcl-2、bax相关性的研究

王 佳,唐良萄,姚珍薇 (重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨凋亡抑制基因survivin在子宫内膜异位症的表达,及其与bcl-2、bax的相关性。**方法** 应用免疫组织化学S-P法,检测40例子宫内膜异位症异位内膜组织中survivin、bcl-2、bax蛋白的表达,并与正常在位子宫内膜组织25例进行对照。**结果** 子宫内膜异位症异位内膜组织中survivin蛋白阳性表达率为67.5%,明显高于正常在位内膜组织的表达率4.2%($P<0.05$),并且异位内膜组织中survivin蛋白表达与月经周期无相关性($P<0.05$);survivin蛋白表达与bcl-2蛋白呈正相关($P<0.05$),而与bax蛋白呈负相关($P<0.05$)。**结论** survivin可通过抑制异位内膜细胞凋亡,对子宫内膜异位症的发生、发展起作用;survivin与bcl-2、bax在子宫内膜异位症的发生、发展中分别起协同和拮抗作用。

关键词:子宫内膜异位症;survivin;细胞凋亡;bcl-2;bax

中图法分类号:R394.3;R711.710.2 **文献标识码**:A

Expression of survivin in endometriosis and its relationship with bcl-2 and bax protein

WANG Jia, TANG Liang-dan, YAO Zhen-wei (Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the relationship of apoptosis-related gene survivin with bcl-2, bax protein in endometriosis. Methods The expressions of survivin, bcl-2 and bax protein were detected by immunohistochemical method (SP) in ectopic endometrium from 40 cases, and compared with that in eutopic endometrium from 25 cases without endometriosis. Results The expression rate of survivin protein in endometriotic cells was much higher than that in normal endometrial cells. The survivin was not correlated with the phase of menstrual cycle, but positively correlated to bcl-2, negatively to bax. Conclusion Survivin may play an important role in pathogenesis of endometriosis. With survivin gene, apoptosis-related gene bcl-2 may have a synergic role and bax have an antagonistic role in the formation and progression of endometriosis.

Key words: endometriosis; survivin; apoptosis; bcl-2; bax

子宫内膜异位症(endometriosis,EMs)是一种严重影响妇女身心健康的常见病,近年来发病率呈上升趋势,因其发病机制尚未完全阐明,临床上尚无有效的根治措施。此病虽为良性病变,但具有类似恶性肿瘤的侵袭性、种植性和复发性等恶性行为。近年研究者开始从肿瘤发生的角度探讨子宫内膜异位症的病因,认为患者的异位内膜凋亡减弱,异位增殖能力增强,从而在盆腔内种植生长,因此推测子宫内膜异位症的发生、发展可能与凋亡调控基因有关。

Survivin是新近发现的一种凋亡抑制基因,由Ambrosini等[1]于1997年利用效应细胞蛋白酶受体-1(EPR-1)的cDNA与人类基因库杂交分离得到,将其定位于人染色体17q25。诸多研究表明,survivin主要分布于胚胎及分化未成熟的组织中,在成人分化成熟组织中无表达,而在多种恶性肿瘤组织中异常高表达。子宫内膜异位症作为具有恶性行为的良性疾病,是否与恶性肿瘤类似,有survivin高表达的特性呢?因此,本研究探讨survivin蛋白在子宫内膜异位症的表达,分析其与bcl-2、bax蛋白表达的相关性,探讨这三者在子宫内膜异位症发病机制中的作用,为临床寻找防治对策提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选择重庆医科大学附属第一医院妇科2003年10月至2004年8月因子宫内膜异位症行手术治疗的病例,取其异位内

作者简介:王 佳(1969-),女,四川省达州市人,博士研究生,主治医师,主要从事妇科肿瘤及子宫内膜异位症方面的研究。电话:(023)89011006,E-mail:wangjiajia02@sina.com

收稿日期:2005-12-27;修回日期:2006-03-22

膜作为病例组，共 40 例，其中增生期 25 例，分泌期 15 例，所有病例均经病理学检查证实。患者年龄为 38～52 岁，平均 45 岁。同期取因子宫肌瘤行子宫切除术的正常在位子宫内膜作为对照组，共 25 例，其中增生期 14 例，分泌期 11 例，年龄为 40～51 岁，平均 45.5 岁。排除半年内使用过激素的病例。

1.2　方法

1.2.1　免疫组织化学（S-P 法）染色　一抗：鼠抗人 survivin 单克隆抗体（ZM-0458），工作浓度为 1∶100；鼠抗人 bcl-2 蛋白单克隆抗体（ZM-0010），工作浓度为 1∶100；鼠抗人 bax 单克隆抗体（ZM-0300），工作浓度为 1∶50。二抗：生物素标记羊抗小鼠 IgG。以上试剂及 S-P 试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司提供。实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。将已知肺癌组织切片作为阳性对照，用磷酸盐缓冲液代替一抗，作为阴性对照。

1.2.2　结果判定　Survivin 蛋白阳性染色定位于细胞质，bcl-2、bax 蛋白阳性染色定位于细胞质。异位内膜每张切片取所见到的所有腺体，正常在位子宫内膜每张切片取 20 个腺体，根据细胞着色强度及阳性细胞数综合判定结果：无色或阳性细胞数 0% 为（－），浅黄色或阳性细胞数≤25% 为（＋），棕色或阳性细胞数 25%～50% 为（＋＋），深棕色或阳性细胞数＞50% 为（＋＋＋）。

1.3　统计学方法

采用 SAS 软件包进行非参数秩和检验、χ^2 检验、Spearman 等级秩相关分析。

2　结果

25 例正常在位子宫内膜组织中，14 例增生期 survivin 蛋白表达均为阴性，11 例分泌期有 1 例表达阳性，其余 10 例均为阴性。40 例子宫内膜异位症异位内膜中 survivin 蛋白阳性表达率为 67.5%（27/40），其蛋白主要表达于腺上皮细胞质，多以棕色、深棕色着色为主，见图 1。其中增生期阳性表达率为 68.0%（17/25），分泌期为 66.7%（10/15）。非参数秩和检验示子宫内膜异位症组与正常对照组 survivin 蛋白表达率的差异有统计学意义（$\chi^2=24.10$，$P<0.05$）。非参数秩和检验示子宫内膜异位症异位内膜在增生期与分泌期 survivin 蛋白表达率的差异无统计学意义（$\chi^2=0.10$，$P>0.05$），见表 1。

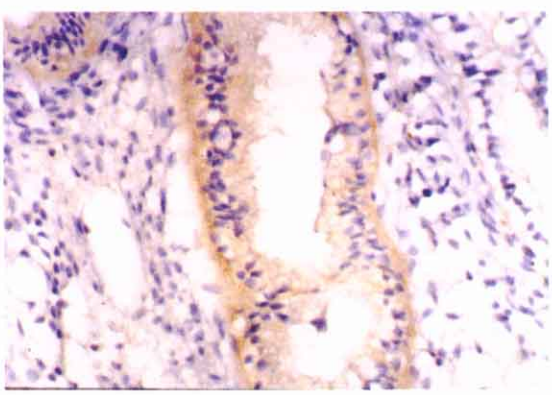


图 1　子宫内膜异位症异位内膜组织 survivin 免疫组化染色　（S-P×400）

表 1　正常在位子宫内膜和 EMs 异位内膜组织中 survivin 蛋白的表达

组别	n	—	＋	＋＋	＋＋＋	阳性率（%）
正常在位子宫内膜	25	24	1	0	0	4.2
EMs 异位内膜	40	13[a]	8[a]	9[a]	10[a]	67.5[a]
增生期	25	8	6	5	6	68.0
分泌期	15	5	2	4	4	66.7

a：$P<0.05$，与正常在位子宫内膜组比较

在子宫内膜异位症异位内膜组织中，bcl-2 及 bax 蛋白均表达于腺上皮细胞细胞质中，多以棕色、深棕色着色为主，见图 2，3。bcl-2 蛋白阳性的异位内膜组织中，survivin 蛋白表达率为 82.8%，明显高于 bcl-2 蛋白阴性者的表达率 27.3%（$\chi^2=11.19$，$P<0.01$），分析 survivin 与 bcl-2 的关系呈正相关（$r=0.529$，$P<0.05$）。bax 蛋白阳性的异位内膜组织中，survivin 蛋白表达率为 35.7%，明显低于 bax 蛋白阴性者的表达率 84.6%（$\chi^2=9.92$，$P<0.05$），分析 survivin 与 bax 的关系呈负相关（$r=-0.500$，$P<0.05$），见表 2。

表 2　EMs 异位内膜 survivin 蛋白表达与 bcl-2、bax 蛋白表达的相关性

类别	总例数	survivin 蛋白阳性表达		χ^2	P 值
		例数	百分率（%）		
bcl-2 蛋白					
阳性	29	24	82.8	11.19	<0.01
阴性	11	3	27.3		
Bax 蛋白					
阳性	14	5	35.7	9.92	<0.01
阴性	26	22	84.6		

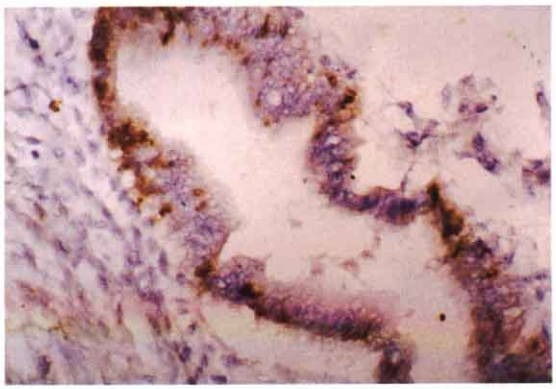


图 2　子宫内膜异位症异位内膜组织 bcl-2 免疫组化染色　（S-P×400）

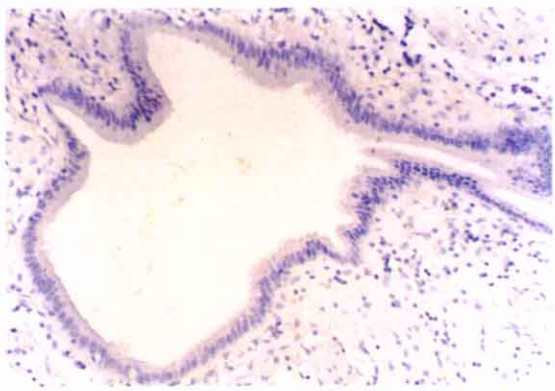


图 3　子宫内膜异位症异位内膜组织 bax 免疫组化染色　（S-P×200）

3 讨论

Survivin 是新近发现的一种凋亡抑制基因，具有抑制细胞凋亡和调节细胞增殖双重作用。与肿瘤的发生、发展密切相关。而子宫内膜异位症作为具有侵袭性、种植性和复发性的良性疾病，其生物学行为与恶性肿瘤有很多相似之处，推测其发病机制与 survivin 有一定关系。

本研究表明，子宫内膜异位症异位内膜中 survivin 蛋白阳性表达率为 67.5%，明显高于正常在位子宫内膜的表达率 4.2%，两组之间的蛋白表达率差异有统计学意义。这与 Ueda 等[2]的研究结果相一致。表明 survivin 基因在子宫内膜异位症高表达，说明 survivin 基因可能通过抑制异位内膜细胞凋亡而使得异位内膜细胞的净生长率提高，使细胞过量蓄积，导致异位内膜细胞的增殖失控，促使异位内膜出现类似恶性肿瘤的侵袭性生长，因此 survivin 基因对子宫内膜异位症侵袭性的发生及发展起着重要作用。

Konno 等[3]研究发现，survivin 在正常子宫内膜中有一定的低表达，在月经周期的分泌晚期 survivin 表达增高，而在增生期无表达。本研究结果，25 例正常在位子宫内膜组织中，14 例增生期 survivin 蛋白表达均为阴性，11 例分泌期只有 1 例表达阳性，其余 10 例均为阴性。但此结果不能说明 survivin 在正常月经周期中的变化及作用，还需扩大样本量作进一步的研究。而 survivin 在子宫内膜异位症异位内膜增生期的阳性表达率为 68.0%，分泌期为 66.7%，两组之间的蛋白表达率无差异，表明异位内膜 survivin 蛋白的表达不随着月经周期的变化而变化，即与月经周期无关。这一结果支持子宫内膜异位症存在“自主性”，有相对非激素依赖的特点。

bcl-2 基因是迄今研究得最深入、最广泛的凋亡调控基因之一，它通过广泛抑制各种刺激因素，抑制细胞凋亡、延长细胞活力而发挥生物学作用。本研究表明，子宫内膜异位症异位内膜中 bcl-2 蛋白的表达与 survivin 蛋白的表达呈正相关。Survivin 基因位于染色体 17q25，bcl-2 基因位于染色体 18q21，两者均由于无肿瘤相关抗原而富含鸟嘌呤和胞嘧啶的启动子调节，在增殖活跃的细胞中，两者均明显表达，表明在转录水平，两者可能受共同机制调控。但二者抑制细胞凋亡的机制不同。bcl-2 通过干扰细胞色素 C 自线粒体的释放从而阻断 caspase 蛋白酶级联反应的激活；而 survivin 在 bcl-2 的下游直接抑制 caspase 蛋白酶。从 survivin 与 bcl-2 在子宫内膜异位症的联合表达及二者的正相关性，可以推测 survivin 与 bcl-2 对子宫内膜异位症的发生、发展具有协同作用。

Bax 基因属凋亡活化基因，转染 bax 基因能修饰肿瘤细胞的恶性表型。有研究表明，将 bax 基因与 survivin 基因协同转染肿瘤细胞系，其共同诱导的细胞凋亡比单纯 bax 基因转染减少 1/3，表明 survivin 基因可拮抗 bax 基因的促细胞凋亡作用[4]。本研究表明，子宫内膜异位症异位内膜组织中 survivin 蛋白与 bax 蛋白的表达呈负相关，提示 survivin 蛋白可能通过抑制 bax 蛋白表达，而抑制细胞凋亡，从而促进子宫内膜异位症的发生、发展。

随着对 survivin 基因结构和功能的了解日益清楚，以 survivin 为靶点进行基因治疗的研究已在一部分恶性肿瘤中展开。Blanc-Brude 等[5]在乳腺癌模型中注入 survivin 显性负性突变体后，发现肿瘤细胞出现自发性凋亡，肿瘤生长速度明显减慢。Shankar[6]用 survivin 反义寡核苷酸处理少突神经胶质细胞瘤（TC620）细胞，阻断 survivin 的表达，抑制了细胞分裂，促进了细胞凋亡。这些研究均表明抑制 survivin 的功能能诱导肿瘤细胞的凋亡，抑制肿瘤生长。子宫内膜异位症具有类似恶性肿瘤的生物学行为，结合 survivin 在异位内膜中高表达的特性，推测阻断 survivin 的表达同样可促进异位内膜细胞凋亡，因此可考虑对子宫内膜异位症患者补充靶向 survivin 的基因治疗。本研究表明，bcl-2 对子宫内膜异位症的发生、发展与 survivin 具有协同作用，二者抑制细胞凋亡的机制虽有不同，但均能导致 caspase 蛋白酶功能失活而触发凋亡，因此靶向 survivin 的治疗可与 bcl-2 靶向治疗互补，协同发挥治疗作用。

参考文献：

[1] AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[2] UEDA M, YAMASHITA Y, TAKEHARA M, *et al*. Survivin gene expression in endometriosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(7): 3452-3459.

[3] KONNO R, YAMAKAWA H, UTSUNOMIYA H, *et al*. Expression of survivin and bcl-2 in the normal human endometrium [J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(6): 529-534.

[4] TAMM I, WANG Y, SAUSVILLE E, *et al*. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs [J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5315-5320.

[5] BLANC-BRUDE O P, MESRI M, WALL N R, *et al*. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2683-2692.

[6] SHANKAR S L, MANI S, O'GUIN K N, *et al*. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways [J]. J Neurochem, 2001, 79(2): 426-436.

（编辑 龙 亮）