文章编号:1000-5404(2006)22-2289-04

论著

非小细胞肺癌组织中Survivin、p16基因的表达及关系

李学昌,闵家新,蒋 力,姚 珂,张国强 (第三军医大学新桥医院胸外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨凋亡抑制因子Survivin、抑癌基因p16在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达意义及关系。**方法** 采用免疫组化链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合体(SABC)方法检测64例NSCLC组织及26例癌旁组织、15例肺良性疾病组织Survivin、p16基因的表达,并分析其相关性。**结果** Survivin蛋白在NSCLC组织中阳性表达率70.31%,癌旁组织阳性表达率11.54%($P<0.05$),肺良性疾病中不表达。Survivin蛋白表达与NSCLC的分化程度、TNM分期、淋巴结转移相关($P<0.05$)。p16蛋白在肺良性疾病组织及癌旁组织中的表达与在NSCLC组织中的表达差异均有显著性($P<0.05$)。p16蛋白表达阳性组、阴性组的Survivin蛋白表达阳性率差异有显著性($P<0.05$),且表达呈正相关($r=0.396$, $P<0.005$)。**结论** Survivin基因在NSCLC的发生、发展中起重要作用,有可能作为其早期诊断、治疗的靶基因之一。Survivin的过度表达与p16抑癌作用的失去可能在NSCLC的发病机制中有协同作用。

关键词: Survivin; p16 ;非小细胞肺癌;凋亡;免疫组化
中图法分类号: R394.3;R730.23;R734.2 **文献标识码:** A

Expression and relationship of survivin gene and p16 protein in non-small-cell lung cancer

LI Xue-chang, MIN Jia-xin, JIANG Li, YAO Ke, ZHANG Guo-qiang (Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the expression and relationship of survivin gene, a novel member of inhibitor of apoptosis protein family, and p16 protein in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Methods By strep Avidin-Biotin Complex (SABC) method, the expression of survivin gene and p16 protein was examined in 64 NSCLC tissue samples, 26 paraneoplasmatic tissues and 15 tissue samples of lung benign diseases, and their dependablity was analyzed. Results Survivin expressed in 45 of 65 NSCLC tissues (70.31%) ($P<0.05$) and in 3 of 26 paraneoplasmatic samples (11.54 %) ($P<0.05$), did not express in the tissue samples of lung benign diseases ($P<0.05$). Overexpression of survivin was related to differentiation, TNM stages and lymph node metastases of NSCLC ($P<0.05$). The positive expression of p16 protein was more in paraneoplamatic tissues (76.59%), tissues from lung benign diseases (93.33%) than in NSCLC tissues (51.56%) ($P<0.05$). The survivin expression in NSCLC was of positive correlation with p16 expression ($r=0.396$, $P=0.005$). Conclusion Survivin gene is important in the development and progress of NSCLC. It may become a target gene of early diagnosis and gene therapy for malignant tumor. The overexpression of survivin gene and the deactivation of antioncogene p16 may play synergetic roles in the carcinogenesis of NSCLC.

Key words: survivin; p16; non-small-cell lung cancer; apoptosis; immunohistochemistry

肺癌为临床最常见的恶性肿瘤之一,其5年生存率不足10%。肺癌的发生发展与多种基因的改变有密切关系。目前已知的有癌基因、抑癌基因、抑凋亡基因等,除以上各基因独立的致癌作用外,它们之间还可能通过某种复杂的相互作用关系影响着恶性肿瘤的发生发展。本实验主要研究Survivin、p16基因蛋白在非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)中的表达,以探讨上述基因的表达与NSCLC的发生、发展及分化、转移的关系,为肺癌的诊断、治疗提供理论依据。

作者简介:李学昌(1972-),男,天津市人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事肺癌的发生发展及胸部创伤方面的研究。电话:13426020911
通讯作者:闵家新,电话:(023) 68755616, E-mail: lixuech@eyou.com
收稿日期:2005-12-19;修回日期:2006-02-22

1 材料与方法

1.1 病例资料

全组共64例NSCLC组织及选取的癌旁组织标本26例和15例肺良性疾病组织标本，来自第三军医大学西南医院和新桥医院胸外科2003年10月至2005年3月手术病例。NSCLC病例中男性41例，女性23例，平均年龄55.6岁(35～78岁)。组织学类型按WHO标准分类：肺鳞癌39例，肺腺癌25例，其中有淋巴结转移37例。按国际抗癌联盟标准(1997)进行临床分期：Ⅰ、Ⅱ期27例，Ⅲ期35例，Ⅳ期2例。分化程度：高、中、低分化鳞癌分别为16、13、10例，腺癌为5、6、14例。

15例肺良性疾病患者，男性9例，女性6例，平均42.3岁(21～56岁)，其中结核瘤7例、炎性假瘤6例、腺瘤1例、支气管扩张症1例。

所有患者术前未行放、化疗，术后均经病理确诊。全部组织标本均经10%甲醛固定，石蜡包埋，常规切片，厚度4 μm。

1.2 免疫组化染色

免疫组化采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合体SABC方法，SABC试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒及兔抗人Survivin、P16抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司。实验步骤按SABC试剂盒说明书进行，抗体效价为1∶100。每批样本均设立阳性和阴性对照。阳性对照为在预实验中发现的染色阳性标本切片，阴性对照用0.02 mol/L PBS代替一抗。

1.3 结果判定

光学显微镜下观察，Survivin阳性显色为细胞质染色呈淡黄至棕黄色；p16阳性显色为细胞核和(或)细胞质被染成褐黄色、呈现粗细不等、深浅不一的颗粒状。在高倍显微镜(×400)下，每视野取100个细胞，将阳性细胞按其数量及显色强度分为3级：表达弱阳性(+，阳性细胞数<20%)；表达强阳性(+++，即阳性细胞数>70%)；表达中度阳性(++，阳性细胞数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间)。凡显色强度与背景无明显差别者为阴性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 11.5软件进行χ^2检验和Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 NSCLC患者癌组织、癌旁组织和肺良性疾病组织Survivin、p16蛋白表达

Survivin阳性显色定位于细胞质中，染色为粗细不等的淡黄至棕黄色的颗粒(图1、2)。Survivin表达阳性率在NSCLC癌组织70.31%(45/64)，高于肺良性疾病及癌旁组织的0%(0/15)、11.54%(3/26)($P<0.05$，表1)。

p16阳性显色为细胞核和(或)细胞质被染成褐黄色、呈现粗细不等、深浅不一的颗粒状(图3、4)。p16蛋白阳性率在肺良性疾病及癌旁组织与NSCLC相比，差异显著($P<0.05$，表1)。

表1 NSCLC患者癌组织、癌旁组织和肺良性疾病组织Survivin、p16蛋白表达

项目	n	Survivin蛋白表达			p16蛋白表达		
		−	+ ～ +++	阳性率(%)	−	+ ～ +++	阳性率(%)
NSCLC癌组织	64	19	45	70.31	31	33	51.56
癌旁组织	26	23	3	11.54[a]	6	20	76.92[a]
肺良性疾病组织	15	15	0	0[a]	1	14	93.33[a]

a：$P<0.05$，与NSCLC癌组织比较

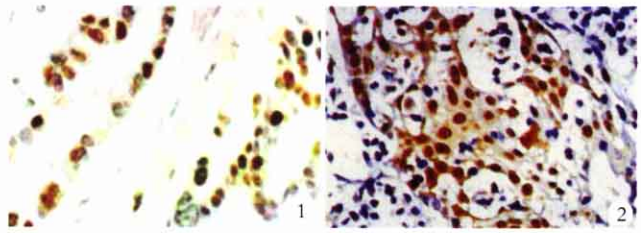


图1 Survivin在高分化腺癌中阳性表达(+++) (SABC×400)

图2 Survivin在中分化鳞癌中阳性表达(++) (SABC×400)

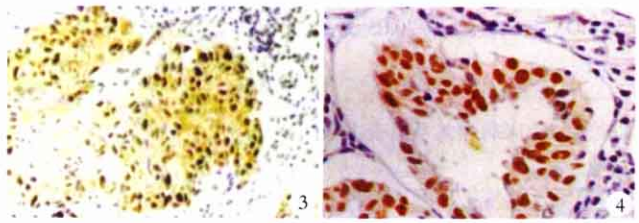


图3 p16在中分化鳞癌中阳性表达(+++) (SABC×200)

图4 p16在高分化腺癌中阳性表达(+++) (SABC×400)

2.2 NSCLC组织中Survivin蛋白的表达与临床病理特征的关系

Survivin蛋白的表达与NSCLC患者的性别、病理类型无关($P>0.05$)。与NSCLC的分化程度、淋巴结转移与否及TNM分期相关($P<0.05$)，见表2。

表2 NSCLC患者临床病理特征及p16蛋白表达与Survivin蛋白表达的关系

影响因素	例数	Survivin蛋白表达			χ^2	P
		−	+ ～ +++	阳性率(%)		
性别						
男	41	13	28	68.29	0.22	>0.05
女	23	6	17	73.91		
组织类型						
腺癌	25	8	17	68.00	0.11	>0.05
鳞癌	39	11	28	71.80		
分化程度						
低	24	3	21	87.50	5.43	<0.05
中、高	40	16	24	60.00		
分期						
Ⅲ～Ⅳ	37	7	30	81.08	4.87	<0.05
Ⅰ～Ⅱ	27	12	15	55.56		
淋巴结转移						
有	38	7	31	81.58	5.69	<0.05
无	26	12	14	53.85		
P16蛋白表达[a]						
阴性	31	14	17	54.84	6.90	<0.01
阳性	33	5	28	84.85		

a：经Spearman等级相关分析，$r=0.396$，$P=0.005$

2.3　NSCLC 组织中 Survivin 蛋白的表达与 p16 表达的关系

NSCLC 组织 p16 蛋白表达呈阴性者，Survivin 蛋白的表达阳性率为 54.84%，而 p16 蛋白表达阳性中 Survivin 表达阳性率达 84.85%，两者比较有显著性差异（$P<0.05$，表 2）。NSCLC 中 Survivin、p16 蛋白表达呈正相关（$r=0.396$，$P=0.005$，表 2）

3　讨论

Survivin 基因是凋亡抑制蛋白（inhibitor of apoptosis protein，IAP）基因家族的一个新成员，1997 年由 Ambrosini 等[1]在人类基因组文库中筛选分离出来。Survivin 基因特异地表达于人和鼠的胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞，在正常成人组织的表达仅见于胸腺、睾丸和分泌期子宫内膜[2]。它的主要作用是抑制肿瘤细胞凋亡，促进肿瘤细胞增殖。此外，它还与肿瘤的化疗药物敏感性和预后有关。

由于 Survivin 表达的组织特异性及功能的多样性，使其成为肿瘤研究领域的一个新热点。Survivin 通过直接或间接干涉 caspase 的功能而抑制细胞凋亡。Survivin 直接作用于 caspase，主要是抑制 caspase-3、caspase-7 的活性，阻断细胞的凋亡过程；Survivin 也可与细胞周期调控因子 CDK4 形成 Survivin－CDK4 复合体，使得 p21 从 CDK4 的复合体中释放出来，p21 进一步与线粒体 caspase-3 结合，抑制其活性，阻止细胞凋亡[3]。最终打破细胞正常的增殖与凋亡的平衡，造成细胞凋亡减少而增殖过度，导致癌症的发生。

本实验中，NSCLC 患者癌组织 Survivin 表达阳性率为 70.31%，Karczmarek-Borowska 等[4]报道的 NSCLC 组织中 Survivin mRNA 表达阳性率 58.3% 略高。癌旁组织的 Survivin 蛋白表达阳性率 11.54%，与 Monzo 等[5]报道的 12% 相符。Survivin 基因在肺癌组织中表达的阳性率较高，在正常组织中几乎无表达，提示 Survivin 基因可能成为一个新的肺癌诊断标志。

本研究还显示，Survivin 基因在 NSCLC 组织中的表达与性别、癌变组织类型无关，随恶性程度增高、分化程度降低及淋巴结转移而上调，与 Sarela 等[6]报道的分化程度越低、恶性程度越高，Survivin 蛋白的表达越高相符。表明基因转录功能增强，基因蛋白生成，抑制肺癌细胞凋亡，在肺癌发生、发展中起重要作用。Mesri 等[7]构建一种腺病毒（PAD－T34A）编码表达磷酸化缺陷（Thr34－ALa）Survivin 突变体，转染乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌及肺癌等肿瘤细胞后可发生细胞凋亡，而对正常组织细胞增生活力无影响，提示 Survivin 基因可望成为肺癌治疗的一个新靶点。

p16 基因是细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK4）的抑制因子，也称为多重肿瘤抑制基因（MTS1/CDKN2）[7]，参与对细胞周期的调控，其异常与多种肿瘤的形成和发生关系密切。其基因产物作为细胞周期的负性调节成分，功能的丧失会导致对 Rb 磷酸化抑制的解除，促使细胞增殖加快。在人肺癌、食管癌、结肠癌等均发现了 p16 基因的改变而导致其蛋白表达降低[8－10]。本研究结果显示 p16 在 NSCLC 组织表达阳性率为 51.56%，与 Jin 等[11]报道相符。肺良性疾病组织及癌旁正常肺组织中 p16 蛋白阳性率均高于肺癌组织（$P<0.05$）。p16 蛋白在肺癌组织中的表达明显下降，表明肺癌组织中存在 p16 蛋白的缺失，提示肺癌的发生可能与 p16 基因表达产物缺失有关，p16 基因有可能同时成为预测病程进展的指标之一。

p16 基因的抑癌机制主要是通过与 CDK4 结合形成 CDK4/p16 复合物，使 CDK4 失活从而抑制细胞的过度增殖。Survivin 基因的抑凋亡机制之一是与 CDK4/p16 复合物竞争 CDK4，由于 Survivin 与 CDK4 的结合力强于 p16，故使 p16 蛋白游离而过度表达，CDK4 被活化，促使细胞从 G_1 期向 S 期转化，造成大量细胞无限制生长，导致癌变的发生、发展[12]。在细胞过度增殖时意味着 p16 抑增殖作用的丧失及 Survivin 抑凋亡作用的产生，造成癌变的发生、发展，故两者均有过度表达。可能是因为 Survivin 基因作用出现的同时，p16 蛋白作用丧失，这种双重作用进一步增强了细胞的过度增殖，故两者可表现出类似协同的正相关作用。从而出现本实验中 p16 表达阳性率越高，Survivin 表达阳性程度越高的结果。这表明 Survivin 和 p16 基因在 NSCLC 的发生机制中有明显的相关作用。

总之，Survivin 作为一个新的抑癌基因，其价值主要在于正常组织几乎不表达，而在肿瘤组织中普遍表达，并与肿瘤的发生，发展密切相关。这使得 Survivin 可望作为恶性肿瘤早期诊断、治疗的靶基因之一，从而使应用靶向 Survivin 的抗肿瘤疗法成为可能。但迄今为止，应用 Survivin 靶向治疗及早期诊断技术尚需进一步研究；Survivin 的确切作用机制及其激活途径、Survivin 在肿瘤中的作用机制等问题均有待进一步探讨。

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] REKER S, BECKER J C, SVANE I M, *et al*. HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients[J]. Int J Cancer, 2004, 108(6): 937 - 941.

[3] SUZUKI A, ITO T, KAWANO H, *et al*. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with CDK4 to resist Fas-mediated cell death[J]. Oncogene, 2000, 19(10): 1346 - 1353.

[4] KARCZMAREK-BOROWSKA B, FILIP A, WOJCIEROWSKI J, *et al*. Survivin antiapoptotic gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer: *in situ* hybridization study[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2005, 43(4): 237 - 242.

[5] MONZO M, ROSELL R, FELIP E, *et al*. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(7): 2100 - 2104.

[6] SARELA A I, MACADAM R C, FARMERY S M, *et al*. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J]. Gut, 2000, 46(5): 645 - 650.

[7] MESRI M, WALL N R, LI J, *et al*. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus [J]. J Clin Invest, 2001, 108(7): 981 - 990.

[8] TUTOR O, DIAZ M A, RAMIREZ M, *et al*. Loss of heterozygosity of p16 correlates with minimal residual disease at the end of the induction therapy in non-high risk childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res, 2002, 26(9): 817 - 820.

[9] TOKUGAWA T, SUGIHARA H, TANI T, *et al*. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 4938 - 4944.

[10] TADA T, WATANABE T, KAZAMA S, *et al*. Reduced p16 expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancers[J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(54): 1756 - 1760.

[11] JIN M, INOUE S, UMEMURA T, *et al*. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II [J]. Lung Cancer, 2001, 34(2): 207 - 218.

[12] SUZUKI A, HAYASHIDA M, ITO T, *et al*. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16^{INK4a} and Cdk2/cyclin E complex activation[J]. Oncogene, 2000, 19(29): 3225 - 3234.

(编辑 汪勤俭)

(上接2286页)

在有丝分裂中不分离可能是嵌合体的形成原因。环状染色体在有丝分裂过程中不稳定易丢失，故45,X核型细胞能够持续存在，并占优势[1]。Jani等[13]认为r(X)缺少X失活中心(X-inactivation center, XIC)，缺乏相关基因的剂量补偿，导致先天畸形和/或智力障碍，症状甚至可能比45,XO核型更为严重。由此可见，2条完整的X染色体对于女性的生长发育、维持卵巢的正常功能是必需的。

由于体内有残留基础卵泡，15% ~ 20%的TS患者有自发月经来潮，最初周期可以是规律的，但随着卵巢组织纤维化，周期逐渐紊乱，直至数年后闭经(约来月经后5年)[1]。统计数据显示TS患者生育率为5% ~ 10%，多数是嵌合型或X结构异常者具有生育能力；只有8% ~ 10%的非嵌合型患者在青春期具有正常的卵巢功能，其中仅极少数人能够妊娠[5]，目前约有100多名TS患者后代出生。Hreinsson等[5]对9例12 ~ 19岁的TS患者通过卵巢活检获取卵子(其始基卵泡数量远远少于正常青春期女性所见)，进行冷冻用于后期的生育治疗。如果卵巢功能不过早衰竭，那么患者在生育期是有生育后代可能的。TS母亲的后代流产率和畸形率高达25% ~ 30%[6]，因此临床实践中必须对受孕患者进行产前筛查。另外，青春期生长发育迟缓的女性，应常规进行染色体筛查，以早期诊断和进行生育指导。Muir等[7]认为供卵可使TS患者的妊娠率提高至24% ~ 47%。Chen等[8]报道了1例23岁核型为45,X[10]/46,X,idic(X)(qter-p22.3::p22.33-qter)[40]的患者通过供卵IVF-ET助孕技术成功妊娠，生育健康3胞胎。因此通过全面评估和认真操作，辅助生育技术可以安全地用于Turner综合征患者，以解决其生育问题。

关键词：环状染色体；Turner综合征；X染色体；不孕

中图法分类号：R596.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] LOESCH D Z, BUI Q M, KELSO W, *et al*. Effect of Turner's syndrome and X-linked imprinting on cognitive status: analysis based on pedigree data[J]. Brain Dev, 2005, 27(7): 494 - 503.

[2] COOLS M, ROOMAN R P, WAUTERS J, *et al*. A monosomic 45, X karyotype in a mother with Turner's syndrome and in her daughter[J]. Fertil Steril, 2004, 82(4): 923 - 925.

[3] JANI M M, TORCHIA B S, PAI G S, *et al*. Molecular characterization of tiny ring X chromosomes from females with functional X chromosome disomy and lack of cis X inactivation[J]. Genomics, 1995, 27(1): 182 - 188.

[4] 葛秀生. 临床生殖内分泌学：女性与男性[M]. 北京：科学技术文献出版社，2001：289.

[5] HREINSSON J G, OTALA M, FRIDSTROM M, *et al*. Follicles are found in the ovaries of adolescent girls with Turner's syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(8): 3618 - 3623.

[6] DENNISTON A. Turner's syndrome[J]. Lancet, 2001, 358(9299): 2169 - 2170.

[7] ABIR R, FISCH B, NAHUM R, *et al*. Turner's syndrome and fertility: current status and possible putative prospects[J]. Hum Reprod Update, 2001, 7(6): 603 - 610.

[8] CHEN C P, HWU Y M, YEH L F, *et al*. Successful triplet pregnancy and delivery after oocyte donation in an infertile female with chromosome mosaicism for monosomy X, partial trisomy X, and terminal Xp deletion[J]. Fertil Steril, 2003, 79(5): 1231 - 1233.

(编辑 陈聪连)