胶质瘤中 S100、survivin 和 Ki-67 的表达及其生物学意义

陈宏刚,唐运涛,刘伦波,冯爱平,黄启军 (德阳市第二人民医院神经外科,四川 德阳 618000)

[摘 要] **目的** 探讨 S100、survivin 和 Ki-67 作为肿瘤生物学标记在星形胶质瘤中的表达及其生物学意义。**方法** 采用 HE 染色和 SP 法对 65 例星形胶质瘤中 S100、survivin 和 Ki-67 的表达情况进行研究,探寻其与肿瘤恶性程度的关系,及三者之间的相互关系。**结果** 在正常脑组织中,S100 多显全细胞型阳性,survivin 蛋白和 Ki-67 不表达。随着星形胶质瘤恶性程度的增高,S100 表达强度减弱;survivin 蛋白的表达和 Ki-67 指数增高。S100、survivin 和 Ki-67 的表达与星形胶质瘤的恶性程度有显著相关性。**结论** S100 和 survivin 在恶性胶质瘤的发生、发展过程中起重要作用,可以作为星形胶质瘤恶性程度的标志物。

[关键词] 神经胶质瘤;S100;survivin;免疫组织化学
[中图分类号] R739.41 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)03-0287-03

Expressions of S100, survivin and Ki-67 in gliomas and their biological significances

CHEN Hong-gang, TANG Yun-tao, LIU Lun-bo, FENG Ai-ping, HUANG Qi-jun (Department of Neurosurgery, 2nd People's Hospital of Deyang, Deyang Sichuan 618000, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of S100, survivin and Ki-67 in astroglioma and to discuss their biological significances. **Methods** The expressions of S100, survivin and Ki-67 in 65 cases of astroglioma were detected by HE staining and SP immunohistochemical staining technique and their correlations with the severity of tumors were discussed. **Results** In normal cerebral tissue, S100 protein presented as whole cell staining and strong positive, mewnwhile, survivin and Ki-67 were unexpressed. However, the expression of survivin and Ki-67 increased, the intensity of S100 protein decreased with the increase of the malignant degree of astrocytomas. There was definite correlation between the expressions of S100, survivin as well as Ki-67 and the malignant degree of astrocytomas. **Conclusion** S100 and survivin play a significant role in the carcinogenesis and development of astroglioma, they can be regarded as the markers of malignant tumor.

Keywords: glioma; S100; survivin; immunohistochemistry

在胶质瘤临床诊治中,相同病理分级的患者预后和生存时间可有较大差异。筛选特异性的生物学标记辅助胶质瘤的诊断和预后判断,以及以此为线索探寻胶质瘤生物治疗的靶点,对胶质瘤的诊治具有重要的价值。本研究通过观察 S100、survivin 和Ki-67在星形胶质瘤中的表达,探讨 S100、survivin 和 Ki-67 作为肿瘤生物学标记在胶质瘤诊治中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

胶质瘤石蜡包埋标本取自我院 2005 年至 2009 年间手术切除的部分胶质瘤,共 65 例,其中男性患者 37 例,女性 28 例;年龄 19 ~65 岁,平均年龄 41.8 岁。按 1999 年 WHO 关于神经上皮源性肿瘤恶性程度分级标准,Ⅰ ~ Ⅱ级 30 例、Ⅲ ~ Ⅳ级 38 例,选择典型病灶的石蜡块连续切片。另取 5 例无颅脑疾病尸解标本的脑组织作为对照。试剂和工作液购自北京中山生物技术有限公司、福州迈新生物技术公司。

[作者简介] 陈宏刚(1969 -),男,河南省三门峡市人,副主任医师,本科,主要从事神经肿瘤、颅脑损伤基础与临床方面的研究。电话:(0838)2236004,E-mail:463358738@qq.com

[收稿日期] 2011-01-20 [修回日期] 2011-02-13

1.2 免疫组织化学染色

切片常规 HE 染色,SP 法免疫组织化学染色。采用 S100 鼠抗人单克隆抗体、鼠抗人 survivin 单克隆抗体、Ki-67 单克降抗体,一抗工作浓度均为 1∶100。免疫组化染色步骤按产品说明书进行操作。经脱蜡后,抗原修复,加一抗孵育过夜后冲洗,滴加二抗,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明,封片。每批染色均设立阳性和阴性对照。

1.3 结果判定

S100 染色以肿瘤细胞染色强度高于背景非特异染色为阳性;survivin 蛋白阳性细胞胞浆呈黄色至棕黄色为主。染色强度根据染色阳性细胞的百分率分为 4 级:随机计数 10 个高倍视野的瘤细胞,细胞不着色,与背景一致为(-),阳性细胞占 1% ~25% 为(+),阳性细胞占 25% ~50% 为(++),阳性细胞占 50% 以上为(+++)。Ki-67 阳性表达为细胞核出现棕黄色颗粒,选择标记良好的区域观察 10 个高倍视野,计算阳性细胞所占百分比即为 Ki-67 指数(Ki-67 LI)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计分析软件对实验数据资料进行 χ^2 检验、t 检验及 Spearman 等级相关分析。

2 结果

在正常脑组织中,S100 染色为 100% 阳性;在星形胶质瘤

细胞中,S100 多显全细胞型阳性,随着星形胶质瘤恶性程度的增高,S100 强度减弱($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同级别胶质瘤 S100 蛋白的表达

项目	例数(n)	-(n)	+(n)	++(n)	阳性率(%)
正常脑组织	5	0	2	3	100.00
Ⅰ~Ⅱ级	30	7	9	14	76.67
Ⅲ~Ⅳ级	38	31	7	0*	18.42*

*:与正常脑组织、及Ⅰ~Ⅱ级胶质瘤比较,$P<0.05$

survivin 蛋白在正常脑组织中不表达,在胶质瘤组织中有 survivin 蛋白表达,其阳性染色部位定位于细胞胞质内,且随着肿瘤级别的增高表达增强($P<0.05$),见表 2。

表 2 不同级别胶质瘤 survivin 蛋白的表达

项目	例数(n)	-(n)	+(n)	++(n)	阳性率(%)
Ⅰ~Ⅱ级	30	18	8	4	40.00
Ⅲ~Ⅳ级	38	15	13	10*	60.53*

*:与Ⅰ~Ⅱ级胶质瘤比较,$P<0.05$

正常的脑组织中 Ki-67 几乎不表达,在脑胶质瘤组织中有明确的表达。实验检测的各级胶质瘤细胞中 Ki-67 LI 随着肿瘤级别的增高而增高($P<0.05$),见表 3。survivin 表达与 Ki-67 LI 呈高度正相关关系($r=0.69$,$P<0.05$),即 Ki-67 LI 越高,则 survivin 表达越强。

表 3 不同级别胶质瘤 Ki-67 的表达

项目	例数(n)	Ki-67 LI(%)
Ⅰ~Ⅱ级	30	8.10±5.11
Ⅲ~Ⅳ级	38	20.33±6.79*

*:与Ⅰ~Ⅱ级胶质瘤比较,$P<0.05$

3 讨论

有研究发现,细胞增殖与细胞凋亡失衡是肿瘤发生的重要环节[1]。肿瘤细胞的异常增殖和凋亡的抑制,是调控这些环节基因异常表达的结果。针对这些基因表达产物的研究,能够反应肿瘤恶性演变的进程,为胶质瘤病理诊断及预后判断提供依据。同时,阻抑这些基因的异常表达,也是肿瘤生物治疗的策略。

S100 蛋白是一组相对分子质量较低的钙结合蛋白,与其他 EF 手型钙离子结合蛋白具有高度同源性,S100 蛋白能够在神经纤维中稳定的表达,具有参与细胞周期调控、细胞增殖分化、酶的激活等多种生物学功能[1]。S100 家族中有 16 个成员基因定位均位于稳定性差的 1q21,其编码的蛋白是与肿瘤增殖呈负相关的蛋白,该区易发生各种染色体重排,且有多个 S100 成员在多种肿瘤中表达异常,并与肿瘤的浸润、转移有关。因此 S100 家族与肿瘤的发生、发展关系密切[2]。已有体外基因学实验证实 S100 在低级别的商品化胶质瘤细胞株中高表达,且随着恶性程度提高,S100 表达下调[3]。但目前未见 S100 在人体胶质瘤细胞免疫组化方面的研究报道。本文通过免疫组化对 S100 在胶质瘤细胞的表达研究发现,S100 在高级别的胶质瘤细胞中低表达,与它在其他恶性肿瘤中的表达一致[4],提示胶质瘤细胞的异常增殖与 S100 表达下调或缺失有关。

survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis, IAP)基因家族的新成员,能选择性的在肿瘤中表达而在正常终末分化组织中不表达,这一特质使其具有值得期待的应用前景,它也是目前发现的最强的凋亡抑制因子[5]。本实验结果表明 survivin 蛋白在正常脑组织中不表达,从胶质瘤低级别组到高级别组中表达水平逐渐增高。证实了 survivin 蛋白的表达水平随胶质瘤恶性程度的升高而增高。说明在胶质瘤恶性转化过程中,survivin 表达的上调,导致了胶质瘤细胞凋亡的抑制,基于这种机制,survivin 基因的表达产物不仅能鉴别组织的良恶性质,也能作为判断预后的指标。Chakravarti 等[6]采用 Western blot 方法检测了 92 例胶质瘤,结果显示无论是胶质母细胞瘤组还是非胶质母细胞瘤组,survivin 蛋白表达组的生存期都明显短于 survivin 蛋白阴性组,survivin 蛋白表达量也与患者生存期呈显著负相关。提示 survivin 蛋白高表达与胶质瘤患者的预后存在密切关系,且并不依赖于肿瘤病理级别的影响。在胶质瘤的生物治疗中,由于 survivin 具有只在肿瘤组织中表达,而在正常组织中不表达的特性,针对 survivin 的治疗可以有效地杀死肿瘤细胞,并且最大限度地减少对正常细胞的毒性作用。这为胶质瘤的生物治疗提供了可喜的突破口,基于阻断 survivin 表达途径的抗肿瘤药物已进入Ⅱ期临床试验[7],并开始了针对来源于 survivin 抗原表位的肿瘤疫苗研究[8]。

Ki-67 抗原半衰期短,细胞脱离增殖周期后迅速降解,更能反映肿瘤的增殖活性、恶性程度及判断患者预后,是目前肿瘤增殖活动研究中可靠的增殖期标志物[9]。应用免疫组化方法检测 Ki-67,正常的脑组织中 Ki-67 几乎不表达,而脑胶质瘤组织中有明确的表达[10]。本研究结果显示,各级胶质瘤细胞中 Ki-67 指数随着肿瘤级别的增高而增高,且 survivin 蛋白表达与 Ki-67 呈正相关。说明 survivin 不仅能抑制细胞的凋亡,亦与细胞增殖密切相关。survivin 在有丝分裂中

可以通过其 C 末端与有丝分裂的微管结合,稳定微管、避免它的解聚、保护了与 caspasc-3 结合的有丝分裂细胞器的完整性,从而间接抑制了 caspasc-3 的促凋亡活性,对抗 G_2/M 期凋亡的诱导,因此 survivin 蛋白过表达可逃逸凋亡关卡,诱导有丝分裂,促进转化细胞的异常增殖,表现为增殖活性的升高。这有可能是二者表达呈正相关的原因所在[11]。受细胞内外多种因素影响,胶质瘤的恶性转化是多基因共同调控的结果。Ki-67 在应用中固然客观、简便易行,但对于脑胶质瘤患者的预后,还需结合患者具体临床特征以及其他标记物等进行综合评价[12]。本研究证实 Ki-67 还与其他胶质瘤增殖和凋亡因子的表达存在相互作用,所以科学定量的分析 S100、survivin 和 Ki-67 在各级别胶质瘤中的表达差异,有助于鉴别肿瘤的恶性程度,了解胶质瘤的增殖情况和判定预后。

[参考文献]

[1] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular functional roles[J]. Int J Biochem Cell Biol,2001,33(7):637 - 668.

[2] Gupta S, Hussain T, MacLennan GT, et al. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma[J]. J Clin Oncol,2003,21(1):106 - 112.

[3] Zeng Yi, Yang Zhong, Han Yangyun, et al. Screening of differentially expressed genes related to differentiation and proliferation by gene expression profiling of different grade astrocytoma cell lines[J]. Neural Regen Res,2008,3(3):245 - 249.

[4] Zhang X, Hunt JL, Shin DM, et al. Down-regulation of S100A2 in lymph node metastases of head and neck cancer[J]. Head Neck,2007,29(3):236 - 243.

[5] Villapol S, Acarin L, Faiz M, et al. Survivin and heat shock protein 25/27 colocalize with cleaved caspase-3 in surviving reactive astrocytes following excitotoxicity to the immature brain[J]. Neuroscience,2008,153(1):108 - 119.

[6] Chakravarti A, Nolle, Black PM, et a1. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas[J]. J Clin Oncol,2002,20(4):1063 - 1068.

[7] Shapiro GI. Preclinical and clinical development of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol[J]. Clin Cancer Res,2004,10(12 Pt 2):4270s - 4275s.

[8] Soling A, Plugge EM, Schmitz M, et a1. Autoantibodies to the inhibitor of apoptosis protein survivin in patients with brajn tumors[J]. InI J Oncol,2007,30(1):123 - 128.

[9] Pennati M, Binda M, Colella G, et al. Ribozvme mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and deceases increases spontaneous and drug induced and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells[J]. Oncogene,2004,23:386 - 394.

[10] Smith DL, Soria JC, Morat L, et a1. Human telomerase reverse transcriptase(hTERT) and Ki-67 are better predictors of survival than established clinical indicators in patients undergoing curative hepatic resectionfor colorectal metastases[J]. Ann Surg Oncol,2004,11(1):45 - 51.

[11] Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis[J]. J Biol Chem,2003,278(25):23130 - 23140.

[12] Punglia RS, Morrow M, Winer EP, et al. Local therapy and survival in brast cancer[J]. N Engl J Med,2007,356(23):2399 - 2405.

(编辑:周小林)

(上接第 286 页)

将药液形成强气流喷射到起雾挡板上,从而激化为微小气雾颗粒。而氧气驱动雾化吸入方法是以高压氧气为动力,将药物溶液雾化喷出,同时气雾颗粒大小完全符合雾化吸入标准,在更好的给药同时还吸入了氧气,达到治疗气道疾患以及纠正缺氧的双重效果,与超声雾化和空气压缩泵雾化相比较具有显著的优越性[9]。

本研究将氧驱动雾化方式吸入沐舒坦治疗慢性支气管炎急性发作期患者,通过病例对照研究发现,总有效率达到了 96%,仅出现了 2 例喘憋、紫绀加重、胸闷、剧烈咳嗽症状,4 例腹胀、恶心、呕吐症状,其总有效率与不良反应发生率与超声雾化和空气压缩泵雾化相比较具有显著的统计学差异($P<0.05$)。该方法不仅临床疗效好,而且不良反应少,在临床上可将氧驱动雾化方式吸入沐舒坦作为治疗慢性支气管炎急性发作期患者的一种首选有效的方法。

[参考文献]

[1] 袁 霞. 986 例慢性支气管炎相关因素分析[J]. 内蒙古中医药,2009,28(2):63.

[2] 葛金芳,李 俊,姚宏伟. 慢性支气管炎免疫病理机制的研究进展[J]. 安徽医药,2003,7(3):163 - 166.

[3] 孙 婧. 慢性支气管炎治疗现状分析[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(6):278 - 279.

[4] 林全敏. 布地奈德联合沙丁胺醇吸入治疗喘息型慢性支气管炎急性发作疗效观察[J]. 中国实用医学,2010,5(12):172 - 173.

[5] 方晓惠,钮善福. 沐舒坦针剂治疗呼吸系统疾病疗效观察[J]. 上海医科大学学报,2002,27(2):152 - 153.

[6] Gibbs BF, Schmutzler W, Vollrath IB, et a1. Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells[J]. Inflamm Res,1999,48(2):86 - 93.

[7] Gillissen A, Nowak D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy[J]. Respir Med,1998,92(4):609 - 623.

[8] 赵 京,李 硕,曹 玲,等. 医学问答[J]. 中华儿科杂志,1998,36(12):751.

[9] 钱旭胜. 不同雾化吸入方式吸入沐舒坦治疗慢性支气管炎急性发作期患者的疗效观察[J]. 中国医药指南,2010,8(18):33 - 34.

(编辑:余汇洋)