维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0386－04

survivin 在脑胶质瘤中的表达及其与 bcl－2、bax 相关性的研究

石全红，支兴刚

(重庆医科大学临床学院神经外科，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨凋亡抑制基因 survivin 在脑胶质瘤中的表达，及其与 bcl－2、bax 蛋白表达的相关性。方法：应用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白－过氧化酶连接法(SP 法)，检测 40 例脑胶质瘤瘤组织中 survivin、bcl－2、bax 蛋白的表达，与正常脑组织 10 例进行对照。结果：胶质瘤中 survivin 蛋白阳性表达率为 42.5%，明显高于正常脑组织的阳性表达率 0%($P<0.05$)，其中Ⅲ级、Ⅳ级阳性表达率分别为 50.0%、80.0%，明显高于Ⅰ～Ⅱ级的阳性表达率 16.7%($P<0.01$)；survivin 蛋白表达与 bcl－2 蛋白表达呈正相关($P<0.01$)，而与 bax 蛋白表达呈负相关($P<0.05$)。结论：survivin 可通过抑制肿瘤细胞凋亡，对脑胶质瘤的发生、发展起作用；survivin 可能与凋亡相关基因 bcl－2、bax 在脑胶质瘤的发展中分别起协同和拮抗作用。

【关键词】脑胶质瘤；survivin；细胞凋亡；bcl－2；bax

【中国图书分类法分类号】R739.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－03－07

The expression of survivin and its relationship with the expression of bcl－2 and bax protein in glioma

SHI Quanhong, et al

(*Department of Neurosurgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of apoptosis related gene survivin and its relationship with the expression of bcl－2, bax protein in glioma. *Methods*: Expression of survivin, bcl－2 and bax protein was detected by immunohistochemical method(SP) in 40 cases of glioma, and compared with those in 10 cases of normal brain tissue. The correlation between them was analyzed. *Results*: The expression rate(42.5%) of survivin protein in glioma was much higher than that(0%) in normal brain tissue($P<0.05$). The positive ratio was significantly higher in Ⅲ(50.0%) and Ⅳ(80.0%) grade than in Ⅰ～Ⅱ(16.7%) grade($P<0.01$). Expression of bcl－2 and bax protein was positively and negatively correlated with expression of survivin protein respectively. *Conclusion*: Survivin may play an important role in pathogenesis of glioma, apoptosis related gene bcl－2 may have a synergic role and bax have an antagonistic role with survivin gene in formation and progression of glioma.

【Key words】Glioma; Survivin; Apoptosis; Bcl－2; Bax

胶质瘤是最常见的颅内肿瘤，其治愈非常困难，主要原因是其浸润性生长特性，肿瘤边界不清，手术难以全切，术后易复发。目前，胶质瘤分子生物学研究成为神经外科重点内容之一，展示了很好的前景。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。其表达产物具有独特的结构，能够保持特定的细胞抵抗一系列刺激原诱导，抑制细胞凋亡。有研究发现，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[2]。这一特点为肿瘤的诊断和治疗提供了新的靶点。本研究探讨 survivin 蛋白在脑胶质瘤中的表达，分析其与 bcl－2、bax 蛋白表达的相关性，为脑胶质瘤的基因治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选择重庆医科大学临床学院神经外科 2004 年 1 月至

作者介绍：石全红(1969－)，男，硕士，
主要研究方向：颅脑肿瘤及颅脑损伤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2004 年 9 月的手术标本 40 例。40 例胶质瘤均经病理学检查证实，按 WHO 脑瘤分类标准。其中胶质瘤Ⅰ级 8 例；胶质瘤Ⅱ级 10 例；胶质瘤Ⅲ级 12 例；胶质瘤Ⅳ级 10 例。患者年龄为 18～67 岁，平均年龄为 42.5 岁，其中男 26 例，女 14 例。对照组 10 例，均为颅内减压术中切除的正常脑组织。所有组织标本均经 10% 福尔马林固定，常规石蜡包埋，以备检测。

1.2 方法

survivin、bcl－2、bax 蛋白检测：应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白－过氧化酶连接法(SP 法)。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 SP 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。结果判定，survivin 蛋白表达在细胞浆或细胞核，bcl－2、bax 蛋白均表达在细胞浆。每张组织切片随机选择 5 个高倍视野，每个视野计数 200 个肿瘤细胞，计算阳性染色的细胞百分比。判定标准以着色强度及阳性细胞百分数综合判定：无色或阳性细胞数 0% 为(－)，显色浅或阳性细胞数＜50% 为(＋)，显色深或阳性细胞数＞50% 为(＋＋)。

1.3 统计学方法

采用软件包(SAS)进行 χ^2 检验、非参数秩和检验。

2 结 果

表 1 正常脑组织和胶质瘤组织中 survivin 蛋白的表达

类型	n	－	＋	＋＋	阳性率(%)
正常脑组织	10	10	0	0	0
胶质瘤	40	23	7	10	42.5
Ⅰ～Ⅱ级	18	15	3	0	16.7
Ⅲ级	12	6	3	3	50.0
Ⅳ级	10	2	1	7	80.0

胶质瘤组与正常对照组比较，$P<0.05$；胶质瘤组各组之间比较，$P<0.01$

表 2 胶质瘤 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	19	14	73.7	14.40	＜0.01
阴性	21	3	14.3		
Bax 蛋白					
阳性	16	3	18.8	6.16	＜0.05
阴性	24	14	58.3		

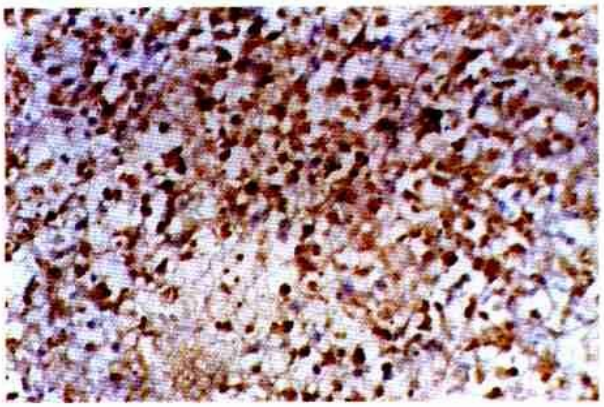


图 1 Ⅳ级胶质瘤 survivin 免疫组化染色(LP 400×)

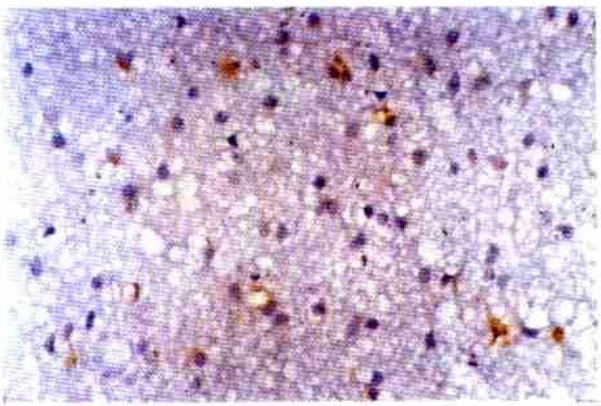


图 2 Ⅱ级胶质瘤 survivin 免疫组化染色(LP 400×)

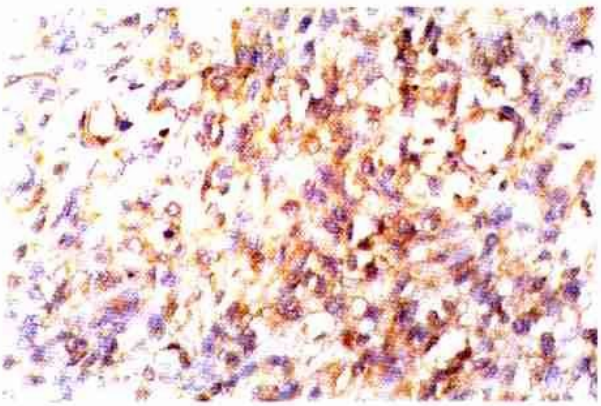


图 3 Survivin 阳性的Ⅲ级胶质瘤 bcl－2 免疫组化染色(LP 400×)

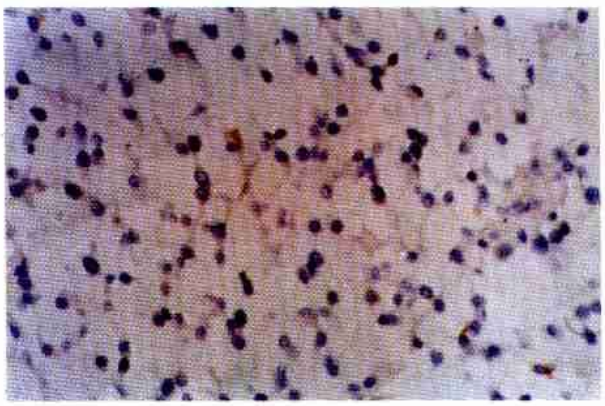


图 4 Survivin 阳性的Ⅲ级胶质瘤 bax 免疫组化染色(LP 400×)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 survivin 蛋白的表达

10 例正常脑组织中 survivin 蛋白表达均为阴性,40 例胶质瘤中 survivin 蛋白阳性表达率为 42.5%(17/40),其蛋白主要表达于胶质瘤瘤细胞浆中,部分表达于瘤细胞胞核中,多以棕色、深棕色着色为主,见图 1、2。其中胶质瘤Ⅰ~Ⅱ级阳性表达率为 16.7%(3/18),Ⅲ级阳性表达率为 50.0%(6/12),Ⅳ级阳性表达率为 80.0%(8/10)。非参数秩和检验示胶质瘤组与正常对照组之间 survivin 蛋白表达率的差异有统计学意义($P<0.01$),并且其表达率与胶质瘤的恶性程度有关,随着胶质瘤恶性程度的增高,survivin 蛋白的表达率也逐步增加,见表 1。

2.2 survivin 蛋白表达与 bcl-2、bax 蛋白表达的关系

bcl-2 及 bax 蛋白主要表达于胶质瘤瘤细胞胞浆中,多以棕色、深棕色着色为主,见图 3,4。bcl-2 蛋白表达阳性的胶质瘤瘤组织中,survivin 蛋白表达率为 73.7%;bcl-2 蛋白表达阴性者,survivin 蛋白表达率为 14.3%,两者呈明显的正相关性($P<0.01$)。在 bax 蛋白表达阳性及阴性的胶质瘤瘤组织中,survivin 蛋白表达率分别为 18.8%及 58.3%,两者呈明显的负相关性($P<0.05$),见表 2。

3 讨 论

细胞凋亡(apoptosis)是一种基本的细胞生理性死亡现象,和肿瘤的发生、恶性化或者消退密切相关。细胞凋亡是维持机体平衡,控制细胞数量,对抗异常细胞增殖,清除体内有害细胞的机制之一。如果与此有关的生理机制出现异常或者障碍,就有可能发生肿瘤。近年来,对脑胶质瘤的细胞凋亡研究已成为热点之一。Survivin 是新近发现的一种凋亡抑制基因,基因全长 14.7kb,包含 3 个内含子和 4 个外显子,编码含 142 个氨基酸、分子量为 16.5kDa 的蛋白质。与其它凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP)不同,survivin 的结构较为独特,仅含一个单独的 BIR(cys/his baculovirus IAP repeat, BIR)区,羧基末端无环指结构,代之以 α 螺旋缠绕区。在有丝分裂起始时,survivin 通过其羧基端的 α 螺旋与纺锤体的微管相结合来发挥作用。Survivin 在细胞周期中呈周期依赖性表达,尤其在细胞周期的 G_2/M 期呈高表达,能够直接抑制细胞凋亡下游终端效应器 caspase-3 和 caspase-7[3],可能通过这一机制直接参与了肿瘤的形成和发展。有研究[4]发现,survivin 在神经系统恶性肿瘤中可释放其他 IAP 家族的蛋白,并通过这些蛋白间接抑制 caspase-3,从而间接参与了肿瘤的形成和发展。

本研究发现,胶质瘤瘤组织中 survivin 蛋白表达率为 42.5%,明显高于正常脑组织的表达率 0%;胶质瘤高度恶性组Ⅳ级、Ⅲ级瘤组织中 survivin 蛋白表达率分别为 80.0%、50.0%,明显高于胶质瘤低度恶性组Ⅰ~Ⅱ级的 survivin 蛋白表达率 16.7%,表明 survivin 蛋白在胶质瘤的表达上调,并且其表达率与胶质瘤的恶性程度有关,随着胶质瘤恶性程度的增高,survivin 蛋白的表达率也逐步增加,说明 survivin 基因可能通过抑制肿瘤细胞的凋亡而使得肿瘤细胞的净生长率提高,促进细胞增殖,从而导致肿瘤细胞的增殖失控恶性化,对胶质瘤的发生、发展起着重要作用。

本研究结果显示,survivin 蛋白的表达与 bcl-2 蛋白的表达相关。bcl-2 基因是迄今研究得最深、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,survivin 蛋白的表达与 bcl-2 蛋白的表达呈现明显正相关,与 Lu 等[5]的报道一致。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。提示 survivin 蛋白与 bcl-2 蛋白对胶质瘤的发生、发展具有协同作用。当然,两者抑制凋亡的机制是完全不同的,bcl-2 蛋白主要是对抗引起线粒体破裂的离子失衡,从而阻断细胞色素 C 释放,也可直接抑制 caspase 的活化[6]。

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,bax 基因突变存在于多种恶性肿瘤,提示 bax 基因也属抑癌基因[7]。有研究发现,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[8]。本研究中,胶质瘤瘤组织中 survivin 蛋白在 bax 蛋白阳性的表达率,明显低于 bax 蛋白阴性者,提示 survivin 蛋白可能通过抑制 bax 蛋白表达,而抑制细胞凋亡,从而促进胶质瘤的发生、发展。

本研究结果提示,survivin 基因对脑胶质瘤的发

维普资讯 http://www.cqvip.com

生、发展起着重要作用,并与凋亡相关基因 bcl-2、bax 在脑胶质瘤的发展中分别起协同和拮抗作用,因此阻断 survivin 的表达对于脑胶质瘤的治疗可能是一个行之有效的方法。Kanwar 等[9]在动物模型癌组织内注射编码反义 survivin 的质粒可阻断 survivin 的表达,并能刺激抗肿瘤的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)增生,诱导细胞凋亡,抑制肿瘤生长。因此对 survivin 在脑胶质瘤中抑制凋亡作用的研究,为肿瘤治疗寻找新的靶点,制定新策略带来了挑战性的机遇。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997;3(8):917-921.

[2] Adida C, Crotty PL, Mograth J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse defferentiational[J]. Am J Pathol, 1998;152:43-49.

[3] Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, et al. A giant ubiquitinconjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors [J]. J Cell Biol, 1998;141:1415-1422.

[4] Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, et al. Survivin inhibition induces human neutral tumor cell death through caspase-independent and caspase-dependent pathways[J]. J Neurochem, 2001;79:426-436.

[5] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N, et al. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas[J]. Cancer Res, 1998;58:1808-1812.

[6] Barimaga M. Death by dozens of cuts[J]. Science, 1998;280(5360):32-34.

[7] Yin C, Dnudson CM, Korsmeyer SJ, et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo[J]. Nature, 1997;13385(6617):637-640.

[8] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), bax, caspase, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998;58:5315-5320.

[9] Kanwar JR, Shen W-P, Kanwar RK, et al. Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7-1 immunogene therapy[J]. Natl Cancer Inst, 2001;93:1541-1552.

(上接第 385 页)而 NAC 如何通过其它机制对肝脏产生保护作用尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Gregory S, Kelly N. D. Clinical Applications of N-acetylcysteine[J]. Altern Med Rev, 1998;3:114-127.

[2] 董雯岳,石一复. 硝酸盐还原酶还原-比色法测定一氧化氮代谢产物[J]. 陕西医学检验,1999;14(3):5-6.

[3] 熊静波. 组织器官及培养细胞一氧化氮合酶活性测定[J]. 国外医学临床生化与检验学分册,1997;18(4):151-153.

[4] Kroncke KD, Fehsel K, Kold-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases[J]. Clin Exp Immunol, 1998;113:147-156.

[5] Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection, how, why, when, where[J]. NO Biol Chem, 1997;1:107-120.

[6] 关玉娟. 一氧化氮及一氧化氮合酶与肝病[J]. 中华内科杂志,1999;38(5):353-354.

[7] 王 佩,吴锡铭. N-乙酰半胱氨酸对硫代酰胺致大鼠肝衰竭的防治作用[J]. 中国现代应用药学杂志,2000;17(4):266-269.

[8] Phillip Harrison, Julia Wendon, Roger Williams. Evidence of increased guanylate cyclase activation by acetylcysteine in fulminant hepatic failure[J]. Hepatology, 1996;5:1067-1072.