维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)01－0041－04

凋亡抑制基因 survivin 在膀胱移行细胞癌中表达的初步研究

何卫阳[1], 苟　欣[1], 祝海洲[2], 詹自力[1]

(1.重庆医科大学临床学院泌尿外科,重庆　400046;2.济宁医学院外总教研室,济宁　272033)

【摘　要】目的:探讨新的凋亡抑制基因 survivin 在膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell cancer,BTCC)中的表达,及其与 p53、bcl－2 和 ki67 基因表达的相关性。方法:应用免疫组织化学链霉抗生物素蛋白—过氧化物酶连接法(SP 法),检测 survivin、bcl－2、p53 和 ki67 在 58 例 BTCC 中的表达,另选 10 例癌旁正常组织作对照。结果:survivin 基因在癌旁正常组织中无表达,而在 BTCC 中呈高表达,survivin 的表达与 BTCC 的临床分期和病理分级密切相关。58 例 BTCC 中,41 例表达阳性,占 70.7%。同时发现 survivin 的表达与 p53、bcl－2、ki67 的表达也密切相关。结论:survivin 基因的过度表达单独或和 p53、bcl－2、ki67 协同在 BTCC 的发生发展中起重要作用,其过度表达提示 BTCC 预后不良。survivin 可能会成为膀胱移行细胞癌一个新的诊断指标和治疗的靶点。

【关键词】膀胱肿瘤;免疫组织化学;survivin;bcl－2;p53;ki67;

【中国图书分类法分类号】R737.14　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－05－12

A novel antiapoptosis gene, survivin, expression in bladder transitional cell cancer

HE Weiyang, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the expression of a novel inhibitor gene of apoptosis, survivin, in bladder transitional cell cancer, and its relationship with the expression of p53, bcl－2 and ki67 genes. *Methods*: Using streptavidin－biotin peroxidase(SP) method, we examined the expression of survivin, p53, bcl－2 and ki67 proteins in 10 normal bladder tissues and 58 bladder transitional cell cancer tissues. *Results*: Survivin was expressed in 41 of 58(70.7%) cases of BTCC. In contrast, normal bladder epithelium did not express survivin. Overexpression of survivin was related to the tumor grade and clinical stage. The expression of survivin was strongly correlated with p53. bcl－2 and ki67 expression. *Conclusion*: Apoptosis inhibition by survivin, alone or in cooperation with p53 and bcl－2 may participate in the onset and progression of bladder transitional cell cancer. Survivin could be a new diagnostic/therapeutic target in bladder tranditional cell cancer.

【Key words】Bladder neoplasms; Immunohistochemical methods; Survivin; Bcl－2; P53; Ki67

凋亡的调控对维持人体组织的自身稳定和形态发育是至关重要的[1]。凋亡障碍使细胞生存延长,转化突变的细胞积累而导致肿瘤的形成[2]。越来越多的研究证明,凋亡障碍在肿瘤的发生发展中起重要作用。survivin 是最近发现的一种凋亡抑制蛋白,它主要是通过抑制半胱天冬氨酸酶 caspase－3 和 caspase－7 的活性而抑制细胞凋亡[3]。survivin 基因在正常组织中不表达,而选择性地表达于多种肿瘤组织。这一特点为肿瘤的诊断和治疗提供了新的靶点。本研究着重探讨 survivin 在 BTCC 组织中的表达,及其与 bcl－2、p53 和 Ki67 表达的相关性。

作者介绍:何卫阳(1973－　),男,住院医师,硕士生,
主要研究方向:膀胱肿瘤的诊断和治疗。

1　材料和方法

1.1　一般资料

标本取自我院 1995～2000 年间经病理检查证实的 BTCC58 例,年龄 48～84 岁,平均 67.4 岁,男 46 例,女 12 例。取 10 例癌旁正常组织作对照。病理分级根据世界卫生组织(WHO)分类标准:G1 级 20 例,G2 级 20 例,G3 级 18 例。临床分期根据国际抗癌协会(UICC)标准:Ta－T1 为浅表型,T2－T4 为浸润型。

1.2　免疫组织化学方法

采用链霉抗生物素蛋白—过氧化物酶连接(SP)免疫组织化学法。即用鼠抗人 bcl－2 蛋白(bcl－2),鼠抗人抗突变型 p53 蛋白(p53),鼠抗人 ki67 蛋白(MIB－1)及 SP 试剂盒

维普资讯 http://www.cqvip.com

均购自福州迈新生物技术开发公司。鼠抗人 survivin 单克隆抗体(survivinAb－2)购自美国 Neomarkers 公司。实验步骤按试剂盒说明书进行。以 Hela 细胞涂片作 survivin 的阳性对照,以扁桃腺切片作 bcl－2 和 ki67 的阳性对照,以直肠癌切片作 p53 的阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,作阴性对照。

1.3 结果判定

分别由两名经验丰富的病理医师在不知临床和病理资料的情况下独立观察切片(至少 5 个具有代表性的高倍视野),不少于 1000 个细胞,对免疫组织化学结果进行评估。

survivin 阳性标准:以细胞浆被染成淡黄或棕黄色者为阳性细胞标志,阳性细胞≥10%为阳性病例。p53 阳性判断标准:以细胞核中有棕黄色颗粒为阳性细胞,阳性细胞≥25%即为阳性病例,bcl－2 阳性表现为胞浆弥漫性着色,阳性细胞≥10%为阳性病例。ki67 以细胞核被染成棕褐色为阳性细胞,阳性细胞≥5%为阳性病例。凡达不到上述标准及显色强度与背景无明显差别者为阴性。

1.4 统计学方法

采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 BTCC 中 survivin 基因的表达

survivin 基因表达阳性染色主要定位于肿瘤细胞胞浆中,为胞浆弥漫性淡黄色或棕黄色。10 例癌旁正常膀胱移行上皮均未见 survivin 基因的表达。而 58 例 BTCC 中有 41 例 survivin 基因表达阳性,占 70.7%。

2.2 BTCC 中 survivin 基因表达与临床病理

survivin 基因阳性表达与患者年龄、性别无相关性($P>0.05$),与膀胱 TCC 临床分期及病理分级呈正相关($P<0.01$)。见表 1。

表 1 BTCC 患者临床病理及 bcl－2,p53 蛋白和 ki67 的表达与 survivin 基因表达的相关性

类别	总例数	survivin 基因阳性表达		χ^2	P 值
		例数	百分率(%)		
正常膀胱移行上皮	10	0	0/10*		
膀胱癌	58	41	70.7		
年龄					
≤65	23	18	78.3	1.05	>0.05
>65	35	23	65.7		
男	46	33	71.7	0.116	>0.05
女	12	8	66.7		
临床分期					
Ta－T1(浅表型)	21	8	38.1	16.74	<0.01
T2－T4(浸润型)	37	33	91.6		
病理分级					
G1－G2	40	24	60	7.12	<0.01
G3	18	17	17/18*		
p53 蛋白表达					
阴性	16	7	7/16*	7.74	<0.01
阳性	42	34	81		
bcl－2 蛋白表达					
阴性	40	32	80	5.38	<0.05
阳性	18	9	9/18*		
ki67 表达					
阴性	24	13	54.2	5.40	<0.05
阳性	34	28	82.5		

* 例数少于 20,不计算百分率。

2.3 BTCC 中 survivin 基因表达与 bcl－2、p53 和 ki67 表达的相关性

p53 蛋白阳性产物主要定位于肿瘤细胞核中,BTCC 中 survivin 表达与 p53 蛋白的表达密切相关,p53 表达的阳性和阴性病例中,survivin 基因阳性表达分别为 34/42(80.9%)和 7/16,两者比较,差异有显著性($P<0.01$);bcl－2 阳性产物主要定位于肿瘤细胞胞浆中,bcl－2 基因表达阳性和阴性病例中,survivin 基因阳性表达分别为 9/18 和 32/40(80%),两者比较,差异有显著性($P<0.05$);ki67 表达阳性产物定

维普资讯 http://www.cqvip.com

位于细胞核中,Ki67 表达阳性和阴性中,survivin 阳性表达分别为:28/32(82.5%)和 13/24(54.2%),两者比较差异有显著性($P<0.05$)。见表 1。

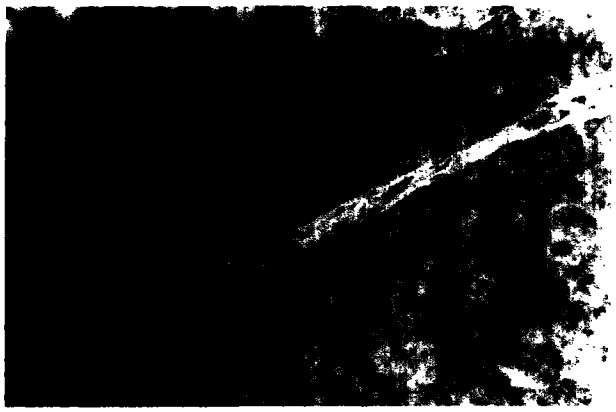


图 1 膀胱移行细胞癌中 survivin 在胞浆呈淡黄或棕黄色表达(SP×200)



图 2 膀胱移行细胞癌中 survivin 在胞浆呈淡黄或棕黄色表达(SP×100)

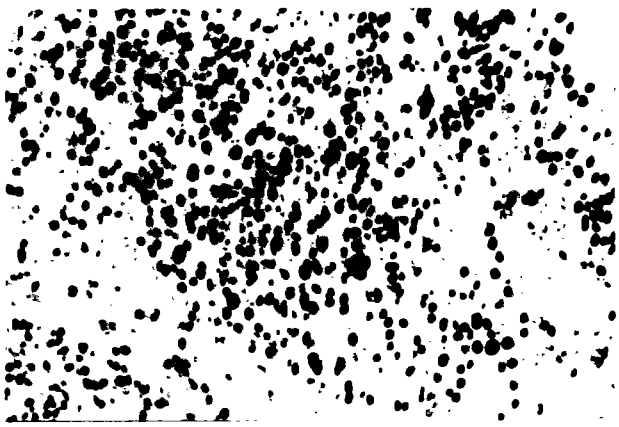


图 3 膀胱移行细胞癌中 p53 在胞核呈棕褐色强阳性表达(SP×200)



图 4 膀胱移行细胞癌中 ki67 在胞核中呈棕褐色阳性表达(SP×200)

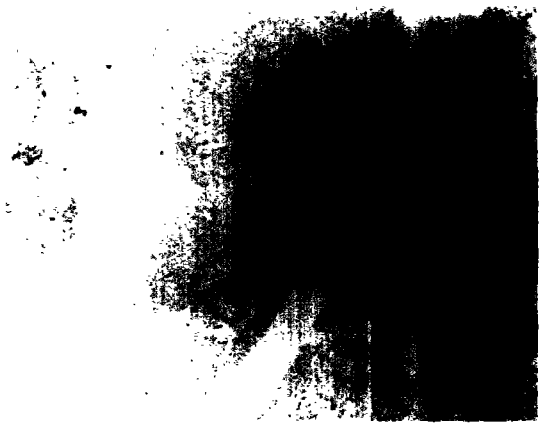


图 5 survivin 在癌旁正常粘膜无阳性表达(SP×100)



图 6 膀胱移行细胞癌中 bcl-2 在胞浆中呈棕黄色阳性表达(SP×100)

3 讨 论

survivin 是最近被发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP),survivin 的过度表达能抑制细胞凋亡,从而导致细胞的异常增生和恶

维普资讯 http://www.cqvip.com

性转化。目前研究认为,survivin 的抗凋亡功能在于直接抑制了半胱氨酸蛋白酶 caspase－3 和 caspase－7 的活性。这一功能主要是通过在细胞内与纺缍体微管的聚合和解聚来实现的[4]。survivin 主要分布于胚胎及分化未成熟的组织,在成人终末分化的正常组织中一般不表达,但却选择性地表达多种肿瘤组织[5]。我们的研究发现,BTCC 组织中有 70.7% 的病例 survivin 表达阳性,而 10 例癌旁正常组织中均无 survivin 阳性表达,这与 Swana 等所检测的结果基本相符[6]。survivin 通过多种途径抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,被认为是细胞增殖和细胞死亡的界面分子,BTCC 中 survivin 基因的异常表达可能促进细胞逃离生长监控,使细胞生存延长,转化突变的细胞积累而导致肿瘤的形成。在对 BTCC 组织 survivin 基因表达分析时发现,临床分期越晚、组织分化恶性度越高,survivin 基因表达的阳性率越高,从而表明 survivin 基因的高表达可能预示肿瘤有较高的侵袭性和不良预后。

Lu[7]等在胃癌研究中发现,srvivin 表达与 p53 蛋白呈正相关,提示抑癌基因 p53 对 survivin 表达可能具有负反馈作用。我们的研究同时也发现在 BTCC 中 srvivin 基因的表达与 p53 蛋白的表达呈显著相关,而且突变型 p53 强阳性者较弱阳性者 srvivin 基因表达的阳性率高。突变型 p53 的堆积是野生型 p53 失活的结果。因此进一步提示抑癌基因 p53 对 survivin 表达可能具有负反馈作用。p53 是重要的细胞凋亡调控基因,在转录水平上,野生型 p53 对 bcl－2 基因的表达有下调作用,是否这种转录水平的抑制也对 Survivin 基因起作用,从目前的证据看,p53 在大多数人类肿瘤中存在高频率突变,而 survivin 基因也在不同肿瘤中高表达,可否推测这是由于 p53 基因突变而丧失了对 survivin 基因表达的下调作用[8]。

bcl－2 基因位于 18q21 上,因其具有抑制细胞丢失,阻止细胞凋亡的功能而被称为"存活基因"。它编码一种凋亡抑制蛋白,对各种原因引起的细胞凋亡有抑制作用,使突变产物聚集,从而促进肿瘤的发生发展。王梅等[8]在宫颈癌的研究中发现 survivin 的表达与 bcl－2 的表达呈正相关,而本研究则显示 survivin 与 bcl－2 表达呈负相关,见表 1。这可能与病例的选择偏倚和样本较小有关,有待进一步研究。而且 bcl－2 的表达与 BTCC 的临床分期和病理分级也呈负相关($P<0.05$),这与 Lydia 和 Robin 等研究结果相符[9,10]。从而揭示 bcl－2 在 BTCC 的表达可能属于早期分子事件,survivin 和 bcl－2 抑制细胞凋亡的机制和作用大小不同,bcl－2 的抗凋亡作用在 BTCC 的发展中可能不起重要作用。

我们的研究还发现在 BTCC 中,survivin 的表达与 ki67 的表达密切相关。这表明 survivin 不仅具有抑制凋亡的作用,同时也与细胞增殖有关。这与 kawasaki[11]的研究结果相符。以前的研究曾推测细胞的增殖增加反过来可能因为缺乏营养、竞争生长因子及缺氧而诱导细胞凋亡。我们的研究结果表明,在 BTCC 的发生发展中可能有高增殖和低凋亡同时存在的现象。

综上所述,我们得出以下结论,survivin 基因在 BTCC 组织中表达上调,提示 survivin 基因可能通过抑制 BTCC 细胞的凋亡,在膀胱癌的发生发展起重要作用。在 BTCC 的发生发展中 survivin 可能同时起着抑制凋亡和促进增殖的双重作用。抑癌基因 p53 和凋亡抑制基因 bcl－2 表达的异常与 survivin 表达的上调可能在 BTCC 的癌变中起协同作用。bcl－2 表达的丢失、survivin、p53 和 ki67 的高表达是浸润型及低分化 BTCC 的特征之一。survivin 的高表达往往提示预后不良。同时检测 survivin、p53 和 ki67 对 BTCC 的发展和预后有一定的临床参考价值。

参 考 文 献

[1] Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis[J]. Cell, 1994;76:777－779.

[2] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995;276:1456－1462.

[3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti－apoptotic protein human Survivin is a direct inhibitor of caspase－3 and －7 [J]. Biochemistry, 2001;40:1117－1123.

[4] Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, et al. Pleiotropic cell division defects and apoptosis induced by interference with Survivin function[J]. Nat Cell Biol, 1999;1(8):461－466.

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

(下转第 50 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

异。说明 $MgSO_4$ 可减少脑损伤后细胞凋亡,而不影响凋亡出现和持续时间。已有大量实验证明,在急性脑损伤后脑组织内 Mg^{2+} 浓度显著下降。这一现象与细胞凋亡之间的关系如何?值得进一步探讨。我们认为 Mg^{2+} 影响细胞凋亡的因素可能有以下几个方面:①对脑血流量调节,Altuna BT[4]发现 Mg^{2+} 具有调节脑血管和外周血管功能,减轻脑伤后伤区缺血、缺氧改变;②Mg^{2+} 是 Ca^{2+} 细胞内流天然的拮抗剂,可以阻断神经元细胞膜上的电压调节钙通道、受体阀门通道以及 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交换通道,另外,细胞内 Mg^{2+} 可以防止细胞内 Ca^{2+} 被线粒体摄取,阻滞线粒体内 Ca^{2+} 超载所致的线粒体损伤[5];③对创伤后自由基的清除。冯东福[6]认为早期 $MgSO_4$ 治疗可以减轻大鼠脑伤后线粒体自由基损害;④Mg^{2+} 是 EAA 的 NMDA 受体通道的非竞争性拮抗剂[7],采用嵌制技术研究发现,Mg^{2+} 能阻断与脑伤发病过程有关的电压依赖 NMDA 受体钙离子通道[8],同时在硫酸镁对大鼠创伤性脑损伤兴奋性氨基酸的影响的实验中发现 $MgSO_4$ 对 EAA 的释放有抑制作用;⑤对于调节细胞凋亡的基因 c-fos 以及 p53 的表达具有抑制作用[9,10]。因此我们认为,TBI 后早期镁剂使用可以减轻神经元的凋亡。对创伤脑组织有一定保护作用。

参 考 文 献

[1] Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptotic cell death after expeimental traumatic brain injury in the rat[J]. Am J Pathl, 1995;147(6):1575-1583.

[2] 张亚卓,王忠诚,郑毓书,等.猫中脑损伤后细胞凋亡及相关基因表达的意义[J].中华神经外科杂志,1999;15(4):233-236.

[3] 崔建忠,高俊玲,周云涛,等.外源性 bFGF 对大鼠创伤性海马神经元坏死凋亡的治疗作用[J].中华神经外科杂志,2000;16(1):45-47.

[4] Altua BT, Altara BM. The role of magnesium in etiology of strokes and cerebrovasospasm[J]. Magnesium, 1982;1:277.

[5] 冯东福,朱志安,张 红,等.硫酸镁对大鼠脑损伤后钙超载的抑制作用[J].上海第二军医科大学学报,1999;19(5):398-400.

[6] 冯东福,朱志安,张 红,等.硫酸镁对大鼠脑损伤后线粒体的影响[J].上海医学,2000;23(7):408-410.

[7] Bareyre FM, Saatman KE, Helfaer MA, et al. Alterations in ionized and total blood magnesium after experimental traumatic brain injury: Relationship to neurobehavioral outcome and neuroprotective efficacy of magnesium chlorid[J]. J Neurochem, 1999;73(1):271-280.

[8] Zhang L, RzigaLinski BA, Ellis EF, et al. Reduction of voltage-dependent Mg^{2+} blockade of NMDA current in mechanically injuried neurons[J]. Science, 1996;274(5294):1921-1923.

[9] Muir JK, Raghupathi R, Emery DL, et al. Postinjury magnesium treatment attenuates traumatic brain injury-induced cortical induction of p53 mRNA in rats[J]. Exp Neurol, 1999;159(2):584-593.

[10] 樊永中,朱凤清,周幽心.大鼠脑挫裂伤后 Fos 蛋白表达及硫酸镁的作用[J].苏州医学院学报,2000;20(7):607-610.

(上接第 44 页)

[6] Swana HS, Grossman D, Anthony JN, et al. Tumor content of the antiapoptosismolecule Survivin and recurrence of bladder cancer[J]. N Engl J Med, 1999;341:452-453.

[7] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. 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.

[8] 王 梅,王 冰,王晓丽,等。凋亡相关基因 Survivin 在子宫颈癌组织中的表达及其与 bcl-2 和 p53 表达相关性的初步研究[J].中华妇产科杂志,2001;36(9),546-548.

[9] Lydia N, Christina V, Anastasios Z, et al. The prevalence of bcl-2, p53, and ki67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates[J]. Hum Pathol, 1996;29:146-149.

[10] Robin T, Peter A, Paul E, et al. Invasion of bladder by tramsitional cell carcinoma[J]. Cancer, 1998;82:715-718.

[11] Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis[J]. Cancer, 2001;71:2026-2032.