

survivin 和 caspase - 3 在非小细胞肺癌中的表达及相关性研究*

王晓红 赵玲 郭莉 孙振友 白淑平

(哈尔滨医科大学附属第三医院内五科 哈尔滨 150081)

摘要 目的:研究 survivin 和 caspase - 3 蛋白在非小细胞肺癌中的表达情况,分析二者的作用机制及相关性。方法:采用免疫组化 KIT 染色法,检测 survivin 和 caspase - 3 在 60 例 NSCLC 组织和 20 例正常肺组织中的表达情况。结果:肺癌组织中的 survivin 阳性表达率(61.67%)明显高于正常肺组织(5%);Ⅲ期的 survivin 阳性表达率(76.92%)明显高于 I + II 期(50%);均有显著性差异($P < 0.05$);而与年龄,病理类型,组织分化程度,淋巴结转移情况无关。肺癌组织中 caspase - 3 阳性表达率(43.33%)明显低于正常组织(85%);高 + 中分化组的 caspase - 3 阳性表达率(58.06%)明显高于低分化的(27.59%);鳞癌组织中的 caspase - 3 阳性表达率(56.25%)高于腺癌组织(28.57%);均有显著性差异($P < 0.05$);而与年龄,TNM 分期,淋巴结转移情况无关。结论:survivin 在非小细胞肺癌中表达上调,而 caspase - 3 却下降,且二者的表达呈负相关,提示 survivin 可能参与肺癌的发生发展,且抑制 caspase - 3 的激活而抑制凋亡;caspase - 3 的失活可能导致肿瘤细胞的增殖。

关键词: Survivin; caspase - 3; 非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

Expression and relation of survivin and caspase - 3 in non - small cell lung cancer

WANG Xiao - hong, ZHAO Ling, GUO Li, SUN Zhen - you, BAI Shu - ping

The third hospital affiliated to harbin medical university, the fifth medicine Harbin 150081

ABSTRACT Objective: To explore the expression of survivin and caspase - 3 in non - small cell lung cancer(NSCLC), to analyze their action mechanism and relation in NSCLC. **Methods:** Immunohistochemical KIT method was used to detect the expression of survivin and caspase - 3 in 60 NSCLC tissues and 20 normal lung tissues. **Results:** The positive expression rates (61.67%) of survivin with NSCLC were significantly higher than that(5%) of normal lung tissue; the positive expression rates (76.92%) of survivin in Stage III were significantly higher than Stage I + II (50%), there are all significant differences($P < 0.05$), there were no correlation between survivin and age, gender, pathological type, histological differentiation, lymph node metastases status. The positive expression rates (43.33%) of caspase - 3 with NSCLC were significantly lower than that (85%) with normal lung tissue; The positive expression rates (58.06%) of caspase - 3 in good differentiated tissue were significantly higher than that in poor differentiated tissue; The positive expression rates (56.25%) of caspase - 3 in squamous cell carcinoma were significantly higher than that in adenocarcinoma, there are all significant differences ($P < 0.05$), there were no correlation between caspase - 3 and age, gender, TNM stage, lymph node metastases status. **Conclusions:** The survivin expression with NSCLC elevated and was negatively correlated with the caspase - 3 expression which decreased, these findings suggest survivin could take part in the advances of lung cancer and inhibit apoptosis through suppressing the motivation of caspase - 3; inactivation of caspase - 3 could induce the proliferation of carcinoma cell.

Key words: Survivin; caspase - 3; Non - small cell lung cancer

前言

肺癌是当前世界最常见的恶性肿瘤之一,细胞癌变是多因素,多阶段,多基因变异的结果,生长调控失衡是肿瘤发生发展的重要因素之一,细胞凋亡对肿瘤的发生发展起负调控作用,受促凋亡因子如 p53、fas 和凋亡抑制因子如 bcl - 2 的共同调控^[1,2]。caspase - 3 是细胞凋亡的最终执行因子,而 survivin 是迄今发现最强的凋亡抑制因子^[3]的。本研究用免疫组化 KIT 染色法检测 caspase - 3 及 survivin 蛋白在非小细胞肺癌中的表达情况,以探讨上述基因与肺癌的发生发展,临床病理特征之间的关系,及两者的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源:

选取 2001 年在哈尔滨医科大学附属肿瘤医院收治,并经病理学确诊的术后非小细胞肺癌 60 例,术前均未行化疗和放疗,其中 ≥ 60 岁 22 例, < 60 岁 38 例;男性 36 例,女性 24 例,鳞癌 32 例,腺癌 28 例;高分化 + 中分化组 31 例,低分化组 29 例;无淋巴结转移组 23 例,淋巴结转移组 37 例;TNM 分期 I + II 34 例, III 26 例;正常非组织 20 例。

1.2 试剂

鼠抗人 survivin 基因单克隆抗体,鼠抗人 caspase - 3 基因

* 基金项目:黑龙江省卫生厅科研基金资助。(编号:2005 - 72)

作者简介:王晓红,(1966 -),女,副主任医师,研究方向:肿瘤的化疗及生物治疗

通讯作者:赵玲,E-mail:zll8107@yahoo.com.cn

(收稿日期:2006 - 05 - 20 接受日期:2006 - 06 - 23)

单克隆抗体,显色剂 KIT - 5020 均购自福州迈新生物技术开发公司。均采用 KIT 染色法进行。

1.3 方法

石蜡标本制成 4 μ m 厚切片,分别按照试剂盒的说明书进行操作,每批染色均设阴性空白对照,以磷酸盐缓冲液代替一抗,caspase - 3 及 survivin 均以细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,按阳性细胞所占的百分率分为 + ~ + + +。无阳性细胞为阴性-;阳性细胞 \leq 30% 为 +;阳性细胞占 30% ~ 50% 为 + +;阳性细胞 > 50% 为 + + +。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验、Fisher 确切概率法, Pearson's R 相关系数方法进行统计,在 SPSS10.0 版本运行。

2 结果

2.1 非小细胞肺癌组织和正常组织中 survivin 及 caspase - 3 蛋白的表达

Survivin 基因表达阳性染色定位于细胞浆中,表现为粗细不一的棕黄色颗粒。图(1,2)



图 1 survivin 在肺腺癌中的表达 (KIT x 400)
Fig 1 Expression of survivin in lung adenocarcinoma

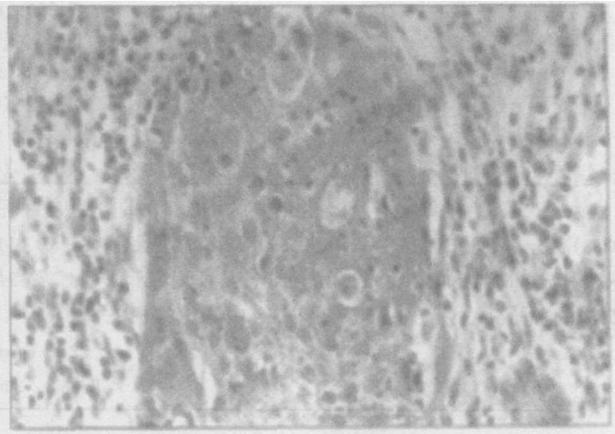


图 2 survivin 在肺鳞癌中的表达 (KIT x 400)
Fig 2 Expression of survivin in squamous cell carcinoma

caspase - 3 蛋白表达阳性染色定位于细胞浆中,表现为粗细不一的棕黄色颗粒。图(3,4)

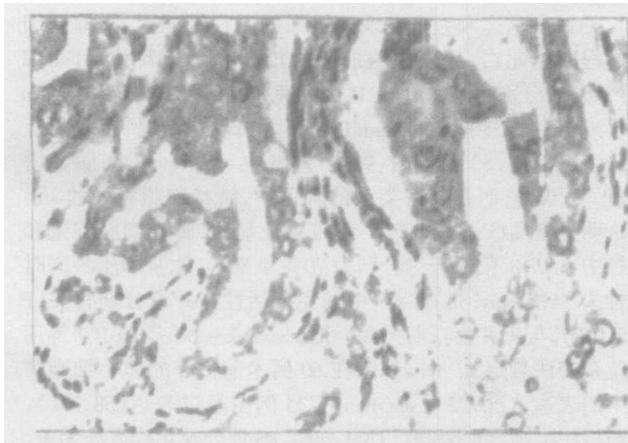


图 3 caspase - 3 在肺腺癌中的表达 (KIT x 400)
Fig 3 Expression of caspase - 3 in lung adenocarcinoma

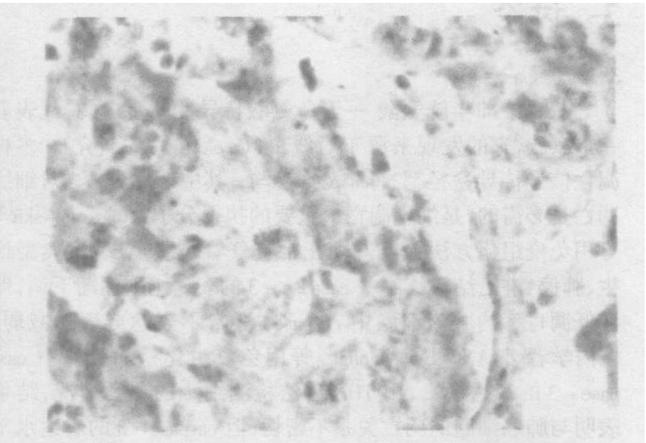


图 4 caspase - 3 在肺鳞癌中的表达 (KIT x 400)
Fig 4 Expression of caspase - 3 in lung squamous cell carcinoma

表 1 survivin 和 caspase - 3 在正常肺组织和肺癌组织中的表达
Table 1 Expression of survivin and caspase - 3 in the normal and lung cancer tissues

分组	例数	survivin		P 值	caspase - 3		P 值
		阳性率	阴性率		阳性率	阴性率	
正常组织	20	5.00% (1)	95.00% (19)	0.000	85.00% (17)	15.00% (3)	0.001
肺癌组织	60	61.67% (37)	38.33% (23)		43.33% (26)	56.67% (34)	

如表 1 所示:在 20 例正常肺组织中 survivin 蛋白阳性表达率为 5%,而 60 例肺癌组织中 survivin 阳性表达率为 61.67%,两者有显著差异性 (P = 0.000)。在 20 例正常肺组织中 caspase - 3 蛋白阳性表达率为 85%,而 60 例肺癌组织中 caspase - 3 蛋白阳性表达率为 43.33%,两者有显著差异性 (P = 0.001)。

2.2 survivin、caspase-3 蛋白与肺癌临床病理特征的关系

表2 survivin 和 caspase-3 与临床病理特征

Table 2 Survivin, caspase-3 and clinical pathologic characteristic

分组	例数	survivin		P 值	caspase-3		P 值
		阳性率	阴性率		阳性率	阴性率	
年龄	≥60	72.72% (16)	27.28% (6)	0.388	40.91% (9)	50.09% (13)	0.171
	<60	55.26% (21)	44.74% (17)		44.74% (17)	55.26% (21)	
性别	男	61.11% (22)	38.89% (14)	0.914	41.67% (15)	58.33% (21)	0.750
	女	62.50% (15)	37.50% (9)		45.83% (11)	54.17% (13)	
淋巴结	有	59.46% (22)	40.54% (15)	0.656	43.24% (16)	56.76% (21)	0.986
	无	65.22% (15)	34.78% (8)		43.48% (10)	56.52% (13)	
病理类型	鳞	56.25% (18)	43.75% (14)	0.188	56.25% (18)	43.75% (14)	0.031
	腺	67.86% (19)	56.25% (9)		28.57% (8)	71.43% (20)	
TNM	I + II	50.00% (17)	50.00% (17)	0.034	41.76% (14)	58.24% (20)	0.700
	III	76.92% (20)	23.08% (6)		46.15% (12)	53.85% (6)	
分化程度	高 + 中	45.16% (14)	54.84% (17)	0.007	58.06% (18)	41.94% (13)	0.017
	低	79.32% (23)	20.68% (6)		27.59% (8)	73.14% (21)	

如表2所示:在高+中 低分化组中 survivin 蛋白的阳性表达水平上调,而 caspase-3 蛋白则下降。Ⅲ期患者的 survivin 蛋白阳性表达率(76.92%)高于 I + II 阳性表达率(50.00%),两者有显著性差异(P=0.034)。鳞癌组织中 caspase-3 蛋白的阳性表达率(56.25%)高于腺癌(28.57%),两者有显著性差异(P=0.031)。而 survivin 与病理类型无关。二者均与年龄 性别 淋巴结转移情况无关。

2.3 caspase-3 和 survivin 在 NSCLC 中表达的相关性

表3 survivin and caspase-3

Table 3 Survivin and caspase-3

	Survivin		χ ²	P 值	Pearson ' R
	阳性表达	阴性表达			
caspase-3	阳性表达	11	7.274	0.007	-0.348
	阴性表达	26			

如表3所示, survivin 蛋白与 caspase-3 蛋白的阳性表达率有显著相关性(P=0.007),且呈负相关(Pearson's R = -0.521)。

3 讨论

3.1 caspase-3

caspase 即半胱氨酸一天冬氨酸特异性的蛋白酶,代表着一个家族,它的发现来源于对线虫(C. elegans)的研究。多种凋亡信号传导途径都有 caspase 参与,其中 caspase-3 对细胞凋亡是必需的,是细胞凋亡最重要的执行分子^[4]。Krajewska^[5]等用免疫组化方法检测发现正常支气管黏膜上皮、不典型增生、肺癌、淋巴结转移癌中 caspase-3 的表达水平逐渐下调,即在低凋亡率的肿瘤细胞中 caspase-3 常不表达或表达减弱。国内学者 ZHANG Bai-hong^[6]等用免疫组化检测肺癌中 caspase-3 的表达水平,用 TUNEL 法检测细胞的凋亡情况,结果表明与肺癌细胞的凋亡关系不密切,但 caspase-3 的表达水平与预后呈正相关,且与肺癌的分化程度(P=0.012)和淋巴结转移情况(P<0.001)有关,与年龄、性别、分期无关。

本文结果显示人正常肺组织中和 NSCLC 组织中 caspase-3 基因的阳性率有显著性差异,与文献报道一致。在人 NSCLC 组织中 caspase-3 的阳性表达与病理类型,组织分化程度有关,鳞癌中的 caspase-3 表达水平较腺癌中的高(P<0.05);高+中分化组的 caspase-3 的表达水平较低分化组高(P<0.05);而与患者年龄, TNM 分期,淋巴结转移情况无关(P>0.05)。因此认为 caspase-3 可能与肿瘤细胞凋亡有关, caspase-3 的失活可能导致肿瘤细胞的异质性和无限增殖, caspase-3 的表达情况可以作为判断肺癌预后的一个参考指标,并且其转染技术可能成为临床治疗的新手段;其在腺癌中的表达水平降低,是否与腺癌易发生全身转移和耐药有关,有待进一步研究。

3.2 survivin

survivin 是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子,抑制细胞的程序化死亡,导致细胞的异常增殖和恶性转化。Falleni 等^[8]研究,分别用定量 RT-PCR 和免疫组化方法测定 survivin 在早期 NSCLC 中的 survivin mRNA 和蛋白表达情况,结果与正常肺组织相比,80 例肺癌(96%)患者中 survivin mRNA 明显增高(P=0.008),而在所有类型的肺癌中,鳞状细胞癌中的 survivin 明显增高(P=0.0022)。免疫组化显示,肿瘤细胞胞浆和胞核中 survivin 阳性表达分别为 70% 和 80%,胞浆和胞核同时阳性为 54%, survivin 在胞浆中的免疫活性与肿瘤分期有关(P=0.019),与患者生存期无关。Karczmarek-Borowska B^[9]等用原位杂交法测定 survivin 基因在 60 例术前化疗的非小细胞肺癌中的表达情况,发现 survivin 在 35 例中呈过表达(58.3%),且与组织类型、分化程度、TNM 分期、PS 评分及化疗方法无关,而与化疗的敏感性有关,且 survivin 过表达的患者生存期较 survivin 无表达的要短(P<0.05),表明 survivin 可以作为预后判断因子和治疗的靶点。

本文研究结果显示人正常肺组织中和 NSCLC 组织中的阳性表达率有显著性差异(P=0.007)。人 NSCLC 组织中的 survivin 表达水平与 TNM 分期有关(P<0.05)。人 NSCLC 组织中的 survivin 表达水平与年龄,病理类型,组织分化程度,淋巴结转移无关(P>0.05)。因此认为 survivin 基因可能通过抑制肿瘤细胞的凋亡而促进肺癌的发生发展。封闭 survivin 基因可能为肺癌的生物治疗提供新的方向。从细胞分子角度进一步研究 survivin 基因的表达过程能更好的分析其在 NSCLC 组织中的作用机制,从而能研究具有针对性的抗体。由于 survivin 仅特异性地表达于肿瘤组织,在正常成人组织几乎不表达,使得应用 survivin 特异性抗体免疫治疗以及反义 survivin 基因治

疗具有良好的靶向性、特异性及安全性。

3.3 caspase-3 与 survivin 的相关性

体外实验证实 caspase 活化的两条途径都可被 survivin 抑制,并且 survivin 对 caspase-3 的前体酶原形式和活化形式均有抑制作用^[10,11]。目前王靖华^[12]等用免疫组化方法证明 survivin 与 caspase-3 在 NSCLC 中的表达水平呈负相关,证实 survivin 通过抑制 caspase-3 的激活,而抑制细胞凋亡,延长细胞的生命,破坏细胞增殖与凋亡的平衡,导致肿瘤的发生。本研究结果显示,在人 NSCLC 组织中 survivin 蛋白的阳性表达与 caspase-3 蛋白的阳性表达有显著相关性 ($P < 0.05$),且呈负相关 (Pearson's $r = -0.348$)。因此认为 survivin 抑制了 caspase-3 的激活,导致细胞的无限增殖;或其它途径导致 caspase-3 失活,触发某种反应从而促进了 survivin 的表达;如果能从分子角度研究二者的转录及翻译过程,研究二者之间的最佳平衡点,可能不仅对肺癌的诊治和预后判断具有重要意义,也会对预防肺癌的发生产生重要的影响。

4 问题与展望

因为肿瘤的发生是多因素作用的结果,此两个基因对非小细胞肺癌的作用机制可能只掀开冰山一角,如同大多数生物制剂一样,有效率较低。本实验采用的实验方法有限,如果从分子角度进一步研究,可能会得到更精确的结果。此外,本实验研究组织中的蛋白表达情况,不利于临床开展,如果能进一步研究血清中的两蛋白表达情况,对临床会有更重要的意义。

参考文献

[1] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(1-2):1-6

[2] Ambrosini G, Adida C, A novel anti-apoptosis gene, survivin expression in cancer and lymphoma[J]. *Net Mad*, 1997, 3(8):917-921

[3] Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, et al. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis[J]. *Brain Pathol*, 2000, 10(2):283-292

[4] Hengamer MO. Apoptosis: Corraling the corpses[J]. *Cell*, 2001, 104:325

[5] Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32(caspase-3), a cell death protease[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(8):1605-1613

[6] 张百红,姜宁西,邢传平,等.肺癌组织 Caspase-3 基因表达与细胞凋亡的关系[J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(1):35-39

[7] Morzo 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

[8] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression nearly stage non-small cell lung cancer[J]. *J Pathol*, 2003, 200(5):620-626

[9] Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierowski J, et al. Survivin anti-apoptotic gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer: in situ hybridization study[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 5(4):237-42

[10] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4):1117-1123

[11] 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

[12] 王靖华,陈龙邦,黄文斌,等. survivin 和 caspase-3 在非小细胞肺癌中的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系[J]. *中国肺癌杂志*, 2005, 8(5):435-439

(上接第4页)

参考文献

[1] Katchalski-Katzir E, Sharif I, Eisenstein M, et al. Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(6):2195-2199

[2] Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions[J]. *J Mol Biol*, 1982, 161(2):269-288

[3] Ewing TJ, Makino S, Skillman AC, et al. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases[J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2001, 15(5):411-428

[4] Helmer-Citterich M, Tramontano A. PUZZLE: a new method for automated protein docking based on surface shape complementarity[J]. *J Mol Biol*, 1994, 235(3):1021-1031

[5] Gabb HA, Jackson RM, Sternberg MJ. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information[J]. *J Mol Biol*, 1997, 272(1):106-120

[6] Lynn FTE, Jeffrey M, Victoria AR, et al. Surveying molecular interactions with DOT[C]. Proceedings of the 1995 ACM/IEEE conference on Supercomputing (CDROM). San Diego, California, United States: ACM Press, 1995:22

[7] Chen R, Li L, Weng Z. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm[J]. *Proteins*, 2003, 52(1):80-87

[8] Duan Y, Reddy BV, Kaznessis YN. Physicochemical and residue conservation calculations to improve the ranking of protein-protein docking solutions[J]. *Protein Sci*, 2005, 14(2):316-328

[9] Liang S, Grishin NV. Effective scoring function for protein sequence design[J]. *Proteins*, 2004, 54(2):271-281

[10] Liang S, Zhang J, Zhang S, et al. Prediction of the interaction site on the surface of an isolated protein structure by analysis of side chain energy scores[J]. *Proteins*, 2004, 57(3):548-557

[11] Lo Conte L, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites[J]. *J Mol Biol*, 1999, 285(5):2177-2198

[12] Moont G, Gabb HA, Sternberg MJ. Use of pair potentials across protein interfaces in screening predicted docked complexes[J]. *Proteins*, 1999, 35(3):364-373

[13] Chen R, Mintseris J, Janin J, et al. A protein-protein docking benchmark[J]. *Proteins*, 2003, 52(1):88-91

[14] Mintseris J, Wiehe K, Pierce B, et al. Protein-Protein Docking Benchmark 2.0: an update[J]. *Proteins*, 2005, 60(2):214-216

[15] Bahadur RP, Chakrabarti P, Rodier F, et al. A dissection of specific and non-specific protein-protein interfaces[J]. *J Mol Biol*, 2004, 336(4):943-955

[16] Zhou HX, Shan Y. Prediction of protein interaction sites from sequence profile and residue neighbor list[J]. *Proteins*, 2001, 44(3):336-343

[17] Word JM, Lovell SC, Richardson JS, et al. Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation[J]. *J Mol Biol*, 1999, 285(4):1735-1747

[18] Henikoff S, Henikoff CJ. Amino acid substitution matrices from protein blocks[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(22):10915-10919

[19] 黎明民,梁世德,张健,等.蛋白-蛋白作用界面特征及界面预测研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2006, 6(6):44-46