

生存素基因蛋白和阻抑素在胃癌中的表达及意义

王 波¹, 邵 晴², 秦继宝¹ (1. 江苏省连云港市东方医院检验科 222042; 2. 江苏省连云港市第一人民医院消化科 222001)

【摘要】 目的 探讨生存素基因蛋白(Survivin)和阻抑素(Prohibitin)在胃癌组织中的表达及二者相关的临床意义。**方法** 用免疫组织化学 SP 法检测胃癌组织及癌旁组织、正常胃黏膜中 Prohibitin 与 Survivin 的表达, 比较其阳性表达率及 Prohibitin 与 Survivin 的关系。**结果** Survivin 在胃癌中阳性表达率为 75.5%(40/53), 明显高于癌旁组织和正常胃黏膜($P < 0.05$); Prohibitin 在胃癌中的表达率为 84.9%(45/53), 明显高于癌旁组织和正常胃黏膜($P < 0.01$); 胃癌组织中 Survivin 与 Prohibitin 的表达呈正相关($P < 0.01$)。**结论** Survivin 和 Prohibitin 在胃癌中过度表达, 提示二者在胃癌的发生、发展中起重要作用; Survivin 和 Prohibitin 通过抗凋亡机制协同参与胃癌的发生。

【关键词】 胃癌; 生存素基因蛋白; 阻抑素; 免疫组织化学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.23.024 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)23-2862-02

The expression and effect of survivin and prohibitin gene in gastric carcinoma WANG Bo¹, SHAO Qing², QING Ji-bao¹ (1. Department of Clinical Laboratory, East Hospital of Lianyungang City, Jiangsu 222042, China; 2. Department of Gastroenterology, The First People's Hospital of Lianyungang City, Jiangsu 222001, China)

【Abstract】 Objective To observe the expression and the relationship of survivin and prohibitin gene in gastric carcinoma. **Methods** The expressions of survivin and prohibitin were detected by SP immunohistochemistry in gastric carcinoma, paracancerous tissue and normal gastric mucosa tissues. **Results** The positive survivin expression rate was 75.5%(40/53) in tumor tissues, and that of prohibitin was 84.9%(45/53). Both were significantly higher than those in the paracancerous tissue and normal gastric mucosa tissues. The expressions of survivin and prohibitin in gastric carcinoma were closely correlated with each other($P < 0.01$). **Conclusion** The overexpression of survivin and prohibitin indicated that they both play important roles in the development of gastric carcinoma. They infect the carcinogenesis of gastric carcinoma through anti-apoptosis mechanism.

【Key words】 gastric carcinoma; survivin; prohibitin; immunohistochemistry

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发生、发展不仅有细胞的过度增殖, 同时还存在细胞凋亡异常。研究表明, 有多种癌基因参与细胞凋亡的调控。生存素基因蛋白(Survivin)是细胞内凋亡抑制蛋白家族的一个新成员, 可以通过有丝分裂促进细胞增生, 抑制细胞凋亡^[1]。研究发现阻抑素(Prohibitin)基因多态性突变与北美地区 50 岁以下妇女的乳腺癌发病率高度相关, Prohibitin 可以抑制雌激素受体介导的信号转导, 从而抑制细胞的生长^[2]。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择连云港市东方医院 2009 年 1 月至 2010 年 12 月收治的胃癌手术患者 53 例, 所有患者均经病理诊断证实为胃癌, 并且均为腺癌; 术前未行化疗、放疗。其中男 43 例, 女 10 例; 年龄 27~81 岁, 平均 60.2 岁, ≥ 60 岁 33 例, < 60 岁 20 例。分化程度: 高、中分化 35 例, 低分化 18 例。取患者中距癌组织远端 2~4 cm 处癌旁组织 34 例, 正常胃黏膜标本 15 例作为对照。

1.2 主要实验材料 兔抗人 Survivin 及 Prohibitin 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 SP 法检测胃癌组织中 Survivin 及 Prohibitin 的表达 取材后, 立即用 10% 甲醛固定 24 h 以上, 常规脱水, 石蜡包埋, 制作切片。选取一张进行常规 HE 染色, 确定组织学诊断及分化程度。

1.4 免疫组织化学检测步骤 切片脱蜡至水。0.3% 过氧化氢甲醇处理切片 10~20 min, 加入非免疫动物血清孵育 10 min, 加入一抗(Survivin, 1:200 稀释; Prohibitin, 1:100 稀释)37℃孵育 30~60 min, 加入生物素标记二抗孵育 20 min;

加入 SP 复合物孵育 20~30 min, DAB 显色 5 min, Harris 苏木素染核 5 min, 水洗, 分化, 蓝化, 脱水, 透明并封固。

1.5 免疫组织化学结果的判定 细胞内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞, 肿瘤细胞阳性程度: $< 5\%$ 为(-), $5\% \sim 25\%$ 为(+), $26\% \sim 50\%$ 为(++), $51\% \sim 75\%$ 为(+++), $> 75\%$ 为(++++)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 进行统计学分析, 差异性检验采用 χ^2 检验, 相关性采用 Spearman 相关分析。

2 结 果

2.1 Survivin 在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达 Survivin 表达阳性染色主要定位于胃癌细胞的细胞质中, 为粗细不一的棕黄色颗粒。53 例胃癌组织中有 40 例(75.5%)阳性表达, 而癌旁组织中 Survivin 阳性表达 3 例(8.8%), 正常胃黏膜中 Survivin 阳性表达 2 例(13.3%), 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 Survivin、Prohibitin 在正常胃黏膜、癌旁组织、胃癌组织中的表达

| 组织 | n | Survivin 表达 | | Prohibitin 表达 | |
|-------|----|----------------------|----|----------------------|----|
| | | 阳性[n(%)] | 阴性 | 阳性[n(%)] | 阴性 |
| 正常胃黏膜 | 15 | 2(13.3) ^a | 13 | 1(6.7) ^b | 14 |
| 癌旁组织 | 34 | 3(8.8) ^a | 31 | 5(14.7) ^b | 29 |
| 胃癌组织 | 53 | 40(75.5) | 13 | 45(84.9) | 8 |

注: 与胃癌组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.2 Prohibitin 在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达 Prohibitin 主要表达于胃癌细胞的细胞质中, 呈棕褐色、黄色或淡黄色颗粒状, 癌旁组织为阴性或弱表达。53 例胃癌组织中有 45

例(84.9%)阳性表达,而癌旁组织中 Prohibitin 阳性表达 5 例(14.7%),正常胃黏膜中 Prohibitin 阳性表达 1 例(6.7%),组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.3 胃癌组织中 Survivin 与 Prohibitin 的表达的相关性 在 Survivin 阳性表达的 40 例胃癌组织中,Prohibitin 阳性表达 35 例(87.5%)。分析表明,Survivin 的表达与 Prohibitin 的表达呈正相关($r = 0.889, P < 0.05$),见表 2。

表 2 Survivin、Prohibitin 表达的相关性分析

| Survivin 表达 | n | Prohibitin 表达 | |
|-------------|----|-----------------|----|
| | | 阳性 | 阴性 |
| 阳性 | 40 | 35 ^a | 5 |
| 阴性 | 13 | 3 | 10 |

注: Spearman 相关性分析, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨 论

生理状态下,在成人除子宫内膜组织、胎盘和胸腺组织中发现存在不同程度的 Survivin 基因表达外,大多数组织均测不到 Survivin 基因表达^[1]。Survivin 基因位于染色体 17q25 上,长约 15 kb,含有 3 个内含子和 4 个外显子,具有多转录起始位点^[2]。Survivin 蛋白 N 末端含有一个 BIR 结构域, BIR 是由 Cys/His 为基础形成的锌指结构重复数次形成,具有抑制凋亡的作用^[3]。研究证实, Survivin 直接作用于 Caspase, 主要抑制凋亡途径最终的下游效应子 Caspase3、Caspase7 的活性, 阻断细胞的凋亡过程^[4]。此外, Survivin 还可间接通过作用于细胞周期调节因子 CDK4, 形成 Survivin/CDK4 复合物, 使 p21 从 p21/CDK4 复合物中释放出来, 并作用 Caspase-3 前体(Procaspase-3), 抑制 Procaspase-3 激活, 阻断细胞凋亡。因此, Survivin 基因可以通过多种信号传导通路激发抑制细胞凋亡的作用^[5]。因此 Survivin 在胃癌细胞中多表达与细胞定位在肿瘤组织的发展方面有重要的作用。同时 Survivin 在调控细胞周期、参与血管形成与胃癌转移、诱导肿瘤细胞的化疗抵抗等方面也具有重要作用^[6]。

Prohibitin 的氨基酸序列非常保守, 是一类新型的分子伴侣蛋白, 同时具有转录调控作用^[7]。人类 Prohibitin 基因家族包含 Prohibitin 1 和 Prohibitin 2 两个成员, 分别编码 PHB 1 和 PHB 2 蛋白质^[8]。目前对 Prohibitin 的亚细胞定位和蛋白质结构尚不完全清楚, 有研究表明, 它既存在于线粒体内膜上, 发挥分子伴侣作用, 也存在于细胞核内, 发挥负性转录调控作用^[9]。Prohibitin 与增殖细胞核抗原的表达呈反向关系, 细胞增殖时 Prohibitin 表达明显降低, 分化时表达升高, 提示 Prohibitin 促进细胞分化, 抑制细胞凋亡^[10]。研究发现, Prohibitin 基因多态性突变与北美地区 50 岁以下妇女的乳腺癌发病率高度相关, Prohibitin 可以抑制雌激素受体介导的信号传导, 从而抑制细胞的生长; 在雌激素介导前列腺癌组织中 Prohibitin 复合物的表达下调超过 50%, 类似的下调现象同样存在于早期胃癌组织中^[11-12]。但也有一些研究得出的结果相反, 这可能与 Prohibitin 的磷酸化状态、细胞内浓度、细胞的类型以及肿瘤分期有关^[13]。肿瘤早期由于 Prohibitin 等抑癌物质的表达缺陷, 造成了细胞过度增生, 发生癌变, 随着病变的进展, Prohibitin 表达上调, 可能起到一定的负反馈作用。

本研究结果显示, 胃癌组织中 Survivin 与 Prohibitin 阳性表达率明显高于癌旁组织和正常胃黏膜; 并且癌组织中 Survivin 与 Prohibitin 的表达呈正相关。表明二者在胃癌的发生、发展中起重要作用; Survivin 和 Prohibitin 可能通过抗凋亡机制协同参与胃癌的发生。

目前, 针对 Survivin 和 Prohibitin 的靶向治疗尚处于初步

的实验研究阶段, 可以预见, 靶向治疗与其他促凋亡治疗相结合, 将能最大限度地发挥抗肿瘤效应, 还可弥补某些治疗上的不足。以 Survivin 为靶向的基因治疗研究, 为肿瘤的基因治疗开辟了新的途径。Survivin 与 Prohibitin 的表达量对胃癌诊断具有潜在临床价值, 为胃癌的临床诊断治疗奠定了实验基础, 但在表达量与分化程度的确切关系还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Yu J, Leung WK, Ebert MP, et al. Increased expression of Survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives[J]. Br J Cancer, 2002, 87(1): 91-97.
- [2] Shiraki K, Takase K, Nakano T. The emerging role of caspase inhibitors in gastrointestinal cancers[J]. J Gastroenterol, 2002, 37(5): 323-331.
- [3] Smbrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene Survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [4] Zhao J, Tenev T, Martins LM, et al. The ubiquitin-proteasome pathway regulates Survivin degradation in a cell cycle-dependent manner[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt23): 4363-4371.
- [5] Altieri DC. Validating surviving as a cancer therapeutic target[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(1): 46-54.
- [6] Chiu CW, Nozawa H, Hanahan D. Survival benefit with proapoptotic molecular and pathologic responses from dual targeting of mammalian target of rapamycin and epidermal growth factor receptor in a preclinical model of pancreatic neuroendocrine carcinogenesis[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(29): 4425-4433.
- [7] Gamble SC, Odontadis M, Waxman J. Androgens target prohibitin to regulate proliferation of prostate cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(17): 2996-3004.
- [8] Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, et al. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(1): 143-155.
- [9] Fusaro G, Dasgupta P, Tastogi S, et al. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling[J]. J Biol Chem, 2003, 278(48): 47853-47861.
- [10] Dixit VD, Sridaran R, Edmondson MA, et al. Gonadotrophin-releasing hormone attenuates pregnancy-associated thymic involution and modulates the expression of anti-proliferative gene product prohibitin[J]. Endocrinology, 2003, 144(4): 1496-1505.
- [11] Jupe ER, Badgett AA, Neas BR, et al. Single nucleotide polymorphism in prohibitin 39 untranslated region and breast-cancer susceptibility[J]. Lancet, 2001, 357(9268): 1588-1589.
- [12] Jang JS, Cho HY, Lee YJ, et al. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates[J]. Oncology Res, 2004, 14(10): 491-499.
- [13] Winter A, Kamarainen O, Hofmann A. Molecular modeling of prohibitin domains[J]. Proteins, 2007, 68(1): 353-362.