

脑胶质瘤中凋亡抑制生存基因和细胞周期蛋白 b1 的表达及临床意义

文志华, 宋小兵, 江普查, 袁先厚 (武汉大学中南医院神经外科实验室, 武汉 430071)

【摘要】 目的 探讨凋亡抑制生存基因(survivin)在人脑胶质瘤中的表达及其与细胞周期蛋白(cyclin) b1 蛋白表达的相关性。**方法** 采用免疫组织化学 SABC 法检测 survivin、cyclin b1 表达蛋白在 41 例胶质瘤和 10 例正常脑组织中的表达。**结果** survivin 基因表达蛋白在正常脑组织中无表达; 41 例胶质瘤中 25 例呈阳性表达, 占 61.0%。病理分级 I ~ II 级和 III ~ IV 级间的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。胶质瘤组织 survivin 蛋白的表达与 cyclin b1 蛋白表达密切相关 ($r_s = 0.836, P < 0.01$)。**结论** survivin 蛋白异常表达在胶质瘤的发生中起重要作用, 它可能与 cyclin b1 共同在胶质瘤细胞有丝分裂的 G₂/M 期中起特殊促进作用。

【关键词】 胶质瘤; survivin; cyclin b1

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.06.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)06-0765-03

Expression and clinical significance of survivin and cyclin b1 in human glioma WEN Zhi-chua, SONG Xiao-bing, JIANG Pu-cha, YUAN Xian-hou (Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of survivin gene in human gliomas and its correlation with cyclin b1. **Methods** The expression of survivin and cyclin b1 in 41 cases of glioma tissue and 10 cases of normal brain tissue were assessed by immunohistochemistry staining (SABC) method. **Results** The survivin gene expression protein had no expression in the normal brain tissue, among 41 cases of glioma, 25 cases had the surviving positive expression, accounting for 61.0% (25/41). The expression had statistical difference between the grade I - II and grade III - IV ($P < 0.05$). There also was close correlation between surviving protein expression and cyclin b1 protein expression ($r_s = 0.836, P < 0.01$). **Conclusion** The abnormal expression of survivin plays an important role in the development of glioma, which together with cyclin b1 may play a promotion role in the stage G₂/M of glioma cell mitosis.

【Key words】 glioma; sruvivin; cyclin b1

凋亡抑制和增殖能力增强是肿瘤发生的两种主要机制。凋亡抑制蛋白(IAP)是抑制细胞凋亡的重要成分, 凋亡抑制生存基因(survivin)是 IAP 家族的新成员, 它能抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖, 参与调节细胞的有丝分裂, 并且可能参与血管的形成^[1]。本研究主要探讨 survivin 和另一 G₂/M 期高表达因子细胞周期蛋白(cyclin)b1 与胶质瘤病理分级的关系及二者之间的相关性, 旨在进一步研究 survivin 的表达机制, 为胶质瘤靶向 survivin 的阻断性抗体免疫治疗或基因治疗的提供一个理想的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料 41 例组织标本胶质瘤来源于 2011~2015 年本院神经外科接受手术、且术前未行放射治疗和化学治疗的患者, 其中男 24 例, 女 17 例; 年龄 11~73 岁, 平均 (34.5 ± 6.5) 岁。所有肿瘤标本均由病理医师按神经系统肿瘤分类分级标准 (WHO1993 年) 进行组织学分类和分级, 41 例肿瘤标本划分为低度恶性 (I、II 级) 21 例, 高度恶性 (III、IV 级) 20 例, 其中星形细胞瘤 17 例, 少突胶质细胞瘤 7 例, 胶质母细胞瘤 10 例, 室管膜瘤 7 例。另选取 10 例脑创伤后行内减压术的患者的正常脑组织作为对照组。

1.2 方法 所有组织标本常规石蜡包埋, 作 5 μm 连续切片, 1 张作 HE 染色, 余切片分别做 survivin 和 cyclin b1 免疫组织化学染色, 另 1 张作阴性对照, 以消除误差。survivin 多克隆抗

体、SABC 试剂盒购自武汉博士德公司, cyclin b1 单克隆抗体购自福州迈新公司, 实验按试剂盒说明书进行。阴性对照采用 PBS 取代第一抗体。

1.3 结果判定 所有切片均由两个人分别阅片和判定。survivin 和 cyclin b1 均以细胞质出现棕黄色为阳性。即 400 倍显微镜下随机选择 5~10 个高倍视野, 每张载玻片计数 500 个细胞, 按染色阳性细胞所占细胞总数的百分率来判断表达的阳性率, 阳性细胞数不低于 10% 为阳性, 其中 10% ~ < 30% 为 (+), 30% ~ < 60% 为 (++), 不低于 60% 为 (+++), 无阳性细胞或阳性细胞数低于 10% 为阴性 (-)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行处理及统计学分析, 计数资料采用百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 survivin 和 cyclin b1 在正常脑组织及脑肿瘤中的表达 survivin 在正常脑组织中无表达, cyclin b1 在正常脑组织有 2 例表达。在脑胶质瘤组织中, survivin 和 cyclin b1 均在瘤细胞的胞浆中有表达, 阳性表达如箭头所示, 见图 1~4。

2.2 survivin 和 cyclin b1 蛋白表达与肿瘤恶性程度的关系 survivin 在正常脑组织中无表达, 41 例胶质瘤中, 25 例表达阳性, 占 61.0%, 病理分级 I、II 级与 III、IV 级阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$); cyclin b1 在正常脑组织有 2 例表达, 在胶

质瘤Ⅰ、Ⅱ级与Ⅲ、Ⅳ级阳性率分别差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。



图 1 survivin 在星形细胞瘤Ⅱ中的表达(SP×400)

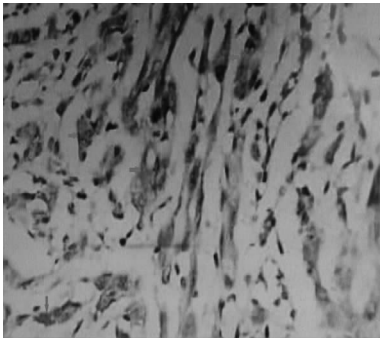


图 2 survivin 在胶质肉瘤Ⅲ级中的表达(SP×400)

2.3 survivin 与 cyclin b1 蛋白表达的相关性 胶质瘤组织中

survivin 与 cyclin b1 蛋白表达密切相关($r_s = 0.836, P<0.01$),两者呈正相关。见表 2。

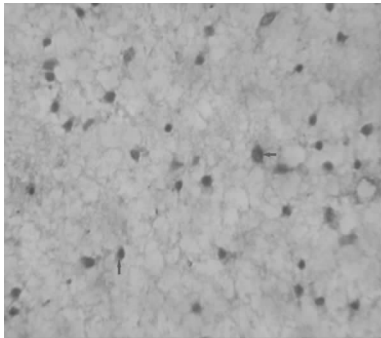


图 3 cyclin b1 在星形细胞瘤Ⅰ级中的表达(SP×400)

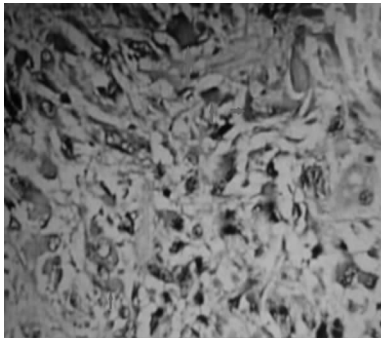


图 4 cyclin b1 在星形细胞瘤Ⅳ级中的表达(SP×400)

表 1 survivin 和 cyclin b1 在胶质瘤的表达

组别	survivin 表达		χ^2	P	cyclin b1 表达		χ^2	P
	(-)	(+)			(-)	(+)		
正常脑组织	10	0	8	2	7.74	<0.01*		
低恶性(Ⅰ~Ⅱ)	12	9	5.94	<0.05	10	11	5.03	<0.05#
高恶性(Ⅲ~Ⅳ)	4	16			3	17		

注:正常组织与恶性组织比较,* $P<0.01$;低恶性组织与高恶性组织比较,# $P<0.05$ 。

表 2 survivin 和 cyclin b1 在脑胶质瘤表达的相关关系

cyclin b1	surviving				合计
	(-)	(+)	(++)	(+++)	
(-)	12	1	0	0	13
(+)	3	5	1	0	9
(++)	1	3	5	2	11
(+++)	0	1	1	6	8
合计	16	10	7	8	41

注: $r_s=0.836, P<0.01$ 。

3 讨 论

胶质瘤是常见的神经系统恶性肿瘤,其预后随着级别的升高而逐渐变差,目前治疗的手段主要是手术切除及术后放射治疗和化学治疗。而胶质瘤大多呈浸润性生长,与正常脑组织无明显的边界,即使从影像学和中肉眼观察到假的边界,肿瘤细胞的浸润生长也早已突破了这一边界,从而限制了术中对于肿瘤范围的识别和切除程度的判断。而位于重要功能区的肿瘤,则更难以做到全切。由于受到医疗条件和患者术前身体条

件的限制,部分患者仅能做到部分切除或者减压。而术后放射治疗与化学治疗的效果则不尽相同,受到肿瘤自身对放射治疗与化学治疗的敏感程度,患者对放射治疗与化学治疗的耐受程度等因素的制约^[2]。因此,从分子水平研究胶质瘤的发生和生长过程,为临床提供可能的诊断和治疗就显得尤为重要。

survivin 基因有 4 个外显子和 3 个内含子,是由 142 个氨基酸组成的相对分子质量为 16.2×10^3 的胞质蛋白。能抑制 caspase 的活性,与细胞分裂微管蛋白结合,阻断细胞凋亡^[3-4]。因其结构较为独特,且能选择性地胚胎组织和多种肿瘤中表达而在正常终末分化组织中不表达,抑制其表达能明显促进包括胶质瘤在内的肿瘤细胞发生凋亡。这一特点为肿瘤的诊断和治疗提供了新的价值^[5]。本研究结果也证实 survivin 在正常脑组织中未见表达,而在胶质瘤中表达占 61.0%。

survivin 只在细胞 G₂/M 周期高表达,具有细胞周期依赖性。survivin 参与肿瘤微血管形成和对细胞周期 G₂/M 的调控,直接作用于蛋白酶-3、7,抑制其活性,克服凋亡关卡,导致细胞的异常增殖^[6-7]。本研究表明,随着脑胶质瘤级别的提高,survivin 阳性率也逐步上升。survivin 在脑胶质瘤中的表达相对量、表达强度与肿瘤病理分级密切相关。在高级别肿瘤中,

其表达相对量与强度均明显高于低级别肿瘤。survivin 在胶质瘤低恶性与高恶性组别中差异有统计学意义($P<0.05$),提示它在胶质瘤恶变过程中起着重要的作用。

G_2/M 调控点是细胞内外信号调控细胞增殖的关键点,与肿瘤的发生发展关系密切。cyclin b1 活性的发挥对细胞能否通过 G_2/M 检验点进入 M 期起重要作用。cyclin b1 与细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)结合形成成熟促进因子(MPF),MPF 激活为真核细胞启动有丝分裂所必需。cyclin b1 在部分恶性肿瘤中呈过度表达,引起细胞内 MPF 的累积,核内重要蛋白结构的改变。cyclin b1 作为一种细胞周期进程调节剂在肿瘤细胞内的表达量是判断肿瘤恶性程度高低的指标之一^[8]。本研究发现 cyclin b1 的表达与胶质瘤的分级差异有统计学意义($P<0.01$),表明 cyclin b1 可作为反映胶质瘤增殖能力的指标。

有学者认为,survivin 在有丝分裂结构上与 CDK 相连,cyclin b1 与 CDK 结合并激活之,引导 CDK 发挥激酶作用,磷酸化不同底物(尤其是与启动有丝分裂有关的蛋白),进而启动有丝分裂^[9]。本文 survivin 与 cyclin b1 表达的相关性研究表明,二者密切正相关($r_s=0.836$),提示协同促进肿瘤细胞的恶性进展,支持上述学者观点,二者可能协同在 G_2/M 期转化促进,发挥抗凋亡作用。

综上所述,survivin 与 cyclin b1 在 G_2/M 期高表达,提示二者在 G_2/M 期可能通过一定机制协同促进肿瘤细胞的进展。对该领域的深入研究,有望通过调节 survivin 的表达来阻碍肿瘤细胞的增殖,为胶质瘤免疫治疗或基因治疗提供一个理想的靶点。

参考文献

[1] Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer[J].

(上接第 764 页)

抗体,以提高相关疾病的检出率^[9]。在 IIF 筛查阴性时,可基本排除 SLE。在 IIF 筛查阳性,而 LIA 检测结果为阴性时,可结合检测类风湿因子、抗角蛋白抗体、抗环瓜氨酸肽抗体等,以辅助 RA 诊断^[10]。

参考文献

[1] 张延林. 自身免疫性疾病抗核抗体与抗 ENA 抗体相关分析[J]. 医药论坛杂志, 2008, 29(24): 51-52.

[2] Hahm D, Anderer U. Establishment of HEp-2 cell preparation for automated analysis of ANA fluorescence pattern[J]. Cytometry, 2006, 69(3): 178-181.

[3] 董晓微, 胡朝军, 张道强, 等. 抗核抗体与特异性自身抗体检测结果不一致的临床意义分析[J]. 检验医学, 2011, 26(9): 606-609.

[4] 谭太昌, 吴雅娟, 腾飞鹏. 抗核抗体检测策略研究[J]. 成都医学院学报, 2013, 26(5): 517-520.

[5] Žigon P, Lakota K, Cucnik S, et al. Comparison and evaluation of different methodologies and tests for detection of anti-dsDNA antibodies on 889 Slovenian patients' and blood donors' sera[J]. Croat Med J, 2011, 52(6): 694-

Med Electron Microsc, 2001, 34(4): 207-212.

[2] 赵继宗. 神经外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 393.

[3] Hanser HP, Bardrotton M, Pyronolakis G, et al. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors[J]. J Cell Biol, 1998, 141(6): 1415-1422.

[4] Li F, Ambrosinin G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 2011, 396(6711): 580-584.

[5] Adida C, Crotty PL, Mc Grath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 43-49.

[6] 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, 2012, 113(Pt23): 4363-4371.

[7] Uren AG, Wong L, Pakusch M, et al. Survivin and the inner Centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype[J]. Current Biology, 2000, 10(21): 1319-1328.

[8] Aunter T, Pines J. Cyclins and cancer II cyclin D and CDK inhibitors come and age[J]. Cell, 2012, 79(4): 573-582.

[9] Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of surviving[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 97(24): 13103-13107.

(收稿日期: 2015-10-30 修回日期: 2015-12-10)

702.

[6] Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, et al. Evaluation of a novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens[J]. Ann NY Acad Sci, 2005, 1050(8): 340-347.

[7] 周仁芳, 胡朝军, 张蜀澜, 等. 抗核抗体筛查试验与特异性抗体确认试验的相关性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(12): 1344-1348.

[8] Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples[J]. Clin Chem, 2005, 51(12): 2426-2427.

[9] 王兰兰. 自身免疫性疾病实验室检测路径与临床应用[J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(3): 131-134.

[10] Galati S, Beauvillain C, Renier G, et al. Comparison and relevance of rheumatoid factors, antikeratin antibodies and anti-cyclic citrullinated peptides antibodies in rheumatoid arthritis[J]. Ann Biol Clin Paris, 2008, 66(2): 157-164.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-20)