

Survivin 和 Bcl-2 蛋白在乳腺癌中的表达及意义

Expression of Survivin and Bcl-2 in Breast Cancer and Its Significance

LI Jing-yun, LUAN Tian-yan, YU Yang

李京云, 栾天燕, 于洋

(保定市肿瘤医院, 河北 保定 071000)

摘要: [目的] 分析 Survivin 和 Bcl-2 蛋白在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系。[方法] 采用免疫组织化学 PV 法检测 Survivin 和 Bcl-2 在 38 例浸润性乳腺癌及 10 例乳腺正常组织中的表达情况, 分析乳腺癌患者中 Survivin 和 Bcl-2 的表达与临床病理特征的关系, 以及两者间的相关性。[结果] 乳腺癌患者中 Survivin 蛋白阳性表达率 (86.84%) 明显高于乳腺正常组织 (10.00%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Survivin 蛋白的表达与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。乳腺癌患者中 Bcl-2 阳性表达率 (65.79%) 亦明显高于乳腺正常组织 (20.00%) ($P < 0.05$), Bcl-2 表达与组织学分级有关 ($P < 0.05$)。Survivin 和 Bcl-2 蛋白的表达无相关性 ($P > 0.05$)。[结论] Survivin、Bcl-2 蛋白在乳腺癌的诊断及预后判断方面具有重要意义。

关键词: 乳腺肿瘤; 免疫组织化学; Survivin; Bcl-2

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)09-0674-04

Survivin 蛋白是迄今发现最强的凋亡抑制因子。Survivin 蛋白与肿瘤的发生、发展密切相关^[1,2]。Bcl-2 是目前公认的抗凋亡基因, 所编码的 Bcl-2 蛋白可阻断多种原因导致的细胞凋亡过程。Bcl-2 主要通过抑制细胞凋亡而参与其促进细胞存活的作用是通过表达的产物阻断内源性核酸内切酶的 DNA 切割活性, 从而阻断细胞的程序性死亡^[3]。因此, Bcl-2 基因及其表达产物在恶性肿瘤的发生和发展方面有很重要的意义。免疫组化 PV 法, 较 SP 法操作简单, 灵敏度高, 阳性强度高, 而且能较快出结果, 较适用于临床病理诊断中应用。因此, 本研究应用免疫组化方法 (PV 法) 检测 Survivin 和 Bcl-2 蛋白在浸润性乳腺癌及正常组织中的表达, 分析其表达和乳腺癌病理、临床特征的关系, 为乳腺癌的早期诊断、转移的监测、预后评价等提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机抽取经病理证实的 38 例女性乳腺癌患者

通讯作者: 栾天燕, 副主任医师, 硕士; 保定市第三医院/肿瘤医院, 河北省保定市东风东路 648 号 (071000); E-mail: luan-tianyan@163.com。

收稿日期: 2012-04-25; **修回日期:** 2012-07-30

作为研究对象, 术前均未行放疗、化疗及内分泌治疗, 也未进行腋窝淋巴结活检手术以及腋窝的其他手术; 均行乳腺癌改良根治术或乳腺肿物切除术。术前临床资料完整, 术后相关病理资料完善。其中乳腺浸润性导管癌 24 例, 乳腺浸润性小叶癌 14 例, 癌周正常乳腺组织 10 例。患者年龄 23~79 岁, 中位年龄 51 岁。术后淋巴结阴性者 15 例, 1~3 个淋巴结转移者 10 例, 4~9 个淋巴结转移者 5 例, >9 个淋巴结转移者 8 例; 术后标本肿物直径 ≤ 2 cm 的 12 例, 2~5 cm 的 20 例, >5 cm 的 6 例; 未绝经 15 例, 绝经者 23 例。病理分期采用 2002 年第 6 版 AJCC 分期标准^[4], 其中 I~II 期 26 例, III~IV 期 12 例。使用 Nottingham 联合组织学分级标准^[5,6], 其中 I 级 15 例, II 级 15 例, III 级 8 例。

1.2 材料来源

采用免疫组化 PV 法检测 Survivin、Bcl-2 的表达水平, 兔抗人 Survivin 多克隆抗体、鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体及 PV 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。具体操作按说明书进行。用 PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性标本作阳性对照。

1.3 免疫组化方法

常规将石蜡切片在二甲苯液 I、II 号中浸泡脱蜡各 10 min; 之后于酒精梯度 I、II、III、IV 缸中浸泡

各 5min,自来水冲洗,用配好浓度的 PBS 冲洗 3 次,每次 3min。将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上,放入 0.01%枸橼酸盐的缓冲液中,置于高压锅内用电磁炉煮沸,沸腾后维持 2min。自然冷却至室温,PBS 冲洗 3 次,每次 3min。每张切片置于 3%过氧化氢液中,阻断内源性过氧化物酶活性,室温下于湿盒内避光孵育 15min,PBS 冲洗 3 次,每次 3min。每张切片加一抗(1:25 稀释的兔抗人 Survivin 多克隆抗体及 1:20 稀释的鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体),湿盒中孵育并置 4℃冰箱中过夜。阴性对照用 PBS 液代替一抗。PBS 冲洗 3 次,每次 3min。弃去 PBS 液,切片上滴加 50μl PV-6001 或 PV-6002 检测试剂,37℃孵育 30min。PBS 冲洗 3 次,每次 3min。弃去 PBS 液,将 DAB 底物工作液滴加于切片上(在 0.85ml 双蒸水中依次滴加浓缩缓冲液、DAB 底物、DAB 色原溶液各 1 滴,充分混匀,制成 DAB 底物混合工作液),镜下观察显色结果,待阳性部分出现特异性显色而背景无着色时,自来水冲洗,终止染色。将切片浸入苏木素溶液中 10~30s,复染细胞核。盐水酒精分化,自来水冲洗反蓝。梯度酒精脱水,二甲苯透明;在切片上滴加中性树胶,覆盖盖玻片,封片。

1.4 结果判定

每张切片随机观察 5~10 个高倍视野,以高倍视野下计数 1 000 个细胞中的阳性细胞百分比为标准;综合分析整张切片的阳性细胞数及染色强度,以定位明确、染色明显者为阳性。结果评价均采用 Fromowitz 等^[7]半定量计分法,具体标准如下:①阳性细胞百分率<5%为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。②阳性细胞的染色强度为无染色为 0 分;着色弱者为 1 分;着色介于弱者和强者之间为 2 分;着色强者为 3 分。两者积分相加,0 分为(-),2 分为(+),3~4 分为(++),5~7 分为(+++)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行分析,应用秩和检验、 χ^2 检验及 Spearman 等级相关分析分析 Sur-

vivin 和 Bcl-2 蛋白表达与临床病理特征的关系,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin 和 Bcl-2 蛋白在乳腺癌和乳腺正常组织中的表达

38 例浸润性乳腺癌组织中 Survivin 阳性表达率为 86.84%(33/38),10 例乳腺正常组织中 Survivin 阳性表达率为 10.00%(1/10),两者差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Survivin 蛋白的表达与淋巴结转移有关 ($P<0.05$),而与肿瘤大小、病理分期、月经情况及组织学分级无关 ($P>0.05$)。

38 例浸润性乳腺癌组织中 Bcl-2 阳性表达率为 65.79%(25/38),10 例乳腺正常组织中 Bcl-2 阳性表达率为 20.00%(2/10)。两者差异亦有统计学意义 ($P<0.05$)。Bcl-2 蛋白的表达与组织学分级有关 ($P<0.05$),而与淋巴结转移、肿瘤大小、病理分期及月经情况无关 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 Survivin 和 Bcl-2 表达的相关性

经 Spearman 相关性检验,Survivin 和 Bcl-2 蛋

表 1 Survivin 和 Bcl-2 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其与临床病理指标的关系

临床病理指标	例数	Survivin 表达			Bcl-2 表达		
		阳性数(%)	χ^2	P 值	阳性数(%)	χ^2	P 值
病理学类型							
浸润性小叶癌	14	12(85.71)			10(71.43)		
浸润性导管癌	24	21(87.50)	22.640	0.000	15(62.50)	7.031	0.030
乳腺正常组织	10	1(10.00)			2(20.00)		
淋巴结转移							
无	15	11(73.33)	7.837	0.006	9(60.00)	4.320	0.299
有	23	22(95.65)			16(69.57)		
肿瘤大小(cm)							
≤2	12	11(91.67)			7(58.33)		
2~5	20	17(85.00)	1.549	0.510	14(70.00)	4.238	0.402
>5	6	5(83.33)			4(66.67)		
病理分级							
I~II	26	22(84.62)	2.213	0.173	18(69.23)	2.198	0.136
III~IV	12	11(91.67)			7(58.33)		
月经状况							
未绝经	15	12(80.00)	3.658	0.486	10(66.67)	1.666	0.393
已绝经	23	21(91.30)			15(65.22)		
组织学分级							
I	15	14(93.33)			12(80.00)		
II	15	11(73.33)	10.565	0.225	11(73.33)	10.189	0.007
III	8	8(100.00)			2(25.00)		

白的表达无相关性($r=0.91$, $P=0.27$), 见表 2。

表 2 Survivin 与 Bcl-2 蛋白表达的相关性

Survivin	Bcl-2				r	P
	-	+	++	+++		
-	2	2	0	1	0.19	0.27
+	0	1	0	3		
++	6	4	1	0		
+++	4	3	4	7		

3 讨 论

Survivin 是一种凋亡抑制基因, 隶属于凋亡抑制蛋白(inhibitor apoptosis of protein, IAP)基因家族, 由 Ambrosini 等^[1]在 1997 年经效应细胞蛋白酶受体 1(effector cell protease receptor, EPR1)cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中首先克隆出来, 因可延长细胞的生存, 故又名生存素。有报道认为, Survivin 主要通过直接作用于凋亡蛋白酶级联效应因子 Caspase-3、Caspase-7 而发挥抗凋亡作用, 还有研究表明, Survivin 参与了肿瘤血管新生以及多药耐药的发生^[8,9]。因此, 明确其调控机制将为乳腺癌的基因治疗提供新靶点。

现有的文献报道, 乳腺癌组织 Survivin 蛋白总体表达率为 58.00%~90.20%^[10]。Al-Joudi 等^[11]应用免疫组化对 382 例浸润性乳腺癌回顾性分析发现阳性率为 68.1%。本研究采用免疫组化 PV 法检测 Survivin 在乳腺正常组织、乳腺浸润性导管癌及浸润性小叶癌组织中的阳性表达率分别为 10.00%、87.50%和 85.71%, 三组间 Survivin 的表达差异有统计学意义, 但浸润性导管癌与小叶癌之间比较差异无统计学意义。这与宫慧琳等^[12]报道的观点一致。可见 Survivin 蛋白可能在人类浸润性乳腺癌的发生、发展过程起了重要的作用, 检测其表达有利于人类浸润性乳腺癌的诊断; 这一结论同时也验证了 Survivin 蛋白的分布特征, 即正常组织中 Survivin 蛋白的阳性表达率低于浸润性乳腺癌, 这和上述文献报道一致。

Al-Joudi 等^[11]发现 Survivin 蛋白表达与淋巴结转移有关, 提示 Survivin 蛋白可能与乳腺癌的发展、预后有关。本研究结果显示, Survivin 的阳性表达率在无淋巴结转移组明显低于淋巴结转移组, 两者之间差异有统计学意义, 与上述报道一致。而 Survivin

蛋白表达和肿物大小、月经状况、病理分期及组织学分级之间无关, 与 Tanaka 等^[10]结果基本一致。

Bcl-2 基因属于原癌基因。Tsujimoto 等^[13]于 1985 年首次从人滤泡性 B 细胞淋巴瘤中克隆出来, 属于第一个拮抗凋亡的蛋白。Bcl-2 是目前公认的抗凋亡基因, 该基因及其表达产物可抑制多种组织细胞的凋亡而延长细胞的生命, 其抑制细胞凋亡是通过表达的产物^[3]。国外研究发现 Bcl-2 基因产物在淋巴造血组织、神经胶质瘤、胃癌、肾癌、乳腺癌组织中均有表达^[14]。

许多实验表明, Bcl-2 基因主要抑制细胞凋亡和延长细胞寿命。Bcl-2 主要表达于正常乳腺导管上皮细胞, 这些细胞是乳腺癌的起源细胞。王海燕等^[15]报道 Bcl-2 蛋白在乳腺癌组织中的表达明显高于正常乳腺组织, 本研究中浸润性导管癌、浸润性小叶癌 Bcl-2 的阳性表达率分别为 62.50%、71.43%, 明显高于乳腺正常组织的阳性表达率 20.00%。这与文献报道的 Bcl-2 的阳性率 37.0%~75.6%相一致^[16]。乳腺癌中 Bcl-2 蛋白的阳性表达率明显高于乳腺正常组织, 提示它可能参与了乳腺癌的发生、发展。

从理论上讲, Bcl-2 蛋白抑制凋亡, 使细胞永生, Bcl-2 表达越强, 肿瘤细胞生长越快, 恶性程度越高, 越容易发生浸润和转移, 预后亦越差。吴昊等^[17]研究发现, Bcl-2 蛋白表达与腋淋巴结转移情况呈正相关, 认为 Bcl-2 蛋白异常表达提示凋亡进程失调, 可能导致肿瘤进展。本研究结果显示, Bcl-2 的表达情况与淋巴结有无转移无关。病理分期 I~II 期患者 Bcl-2 的阳性表达率略高于 III~IV 期患者, 但无统计学差异。这和籍敏等^[18]报道的 Bcl-2 的阳性表达率与病理分期无相关性一致。

Bcl-2 的表达与预后因素有关, 但在判断其预后价值方面, 众说纷纭。吴昊等^[17]研究发现, Bcl-2 蛋白表达与腋淋巴结转移情况、组织学分级、术后局部复发与转移均呈正相关, 认为 Bcl-2 蛋白异常表达提示凋亡进程失调, 可能导致肿瘤进展; 而与之相反, Hellemans 等^[16]则认为 Bcl-2 蛋白高表达与预后较好有密切关系, 且与组织学分级呈负相关, 同时 Bcl-2 蛋白阳性表示癌细胞分化程度高、增殖能力和侵袭力弱。本研究显示, Bcl-2 在乳腺癌不同组织学分级中的阳性表达, I 级达 80%, II 级为 73.33%, 明显高于 III 级的 25.00%($P<0.05$), 表明了 Bcl-2 的表达与肿

瘤恶性程度有关,随着恶性等级增高,其阳性率逐渐降低。肿瘤恶性程度越高,其预后也就越差,生存期也就越短,因此提示 Bcl-2 高表达乳腺癌患者较低表达者生存期延长,解释此现象的一种观点是 Bcl-2 基因不仅抑制细胞凋亡,而且还延长细胞周期,由此延缓肿瘤细胞增殖。综上所述,本研究结果支持了 Bcl-2 高表达有利于乳腺癌预后的观点。

Survivin 与 Bcl-2 表达的相关性问题,至今未达成共识。Jiao 等^[19]采用免疫组化法检测神经胶质瘤中 Survivin 的表达,显示它与 Bcl-2 的表达显著正相关。Survivin 与 Bcl-2 表达的相关性在结肠癌、胃癌、非霍奇金淋巴瘤和乳腺癌中的研究都得到类似的结果。孙国贵等^[20]经 Spearman 等级相关统计结果显示,Survivin 与 CerbB-2 蛋白表达在乳腺癌中具有相关性。这表明引起 Survivin 和 Bcl-2 过表达的凋亡诱导因子相似,或者这两种不同的抑制凋亡途径有相互协同作用。也可能是转录水平的调节导致了 2 个基因在肿瘤中的表达。而且,Survivin 与 Bcl-2 都被富含 GC 而缺少 TATA 的启动子所调控,并都在增生活跃的细胞中转录。由此提示它们在转录激活上拥有共同和相似的机制。而谢平等^[21]报道在乳腺癌中 Survivin 蛋白的表达与 Bcl-2 蛋白的表达之间无相关性,说明在抑制细胞凋亡的过程中,它们是通过不同途径发挥各自的生物学作用。Survivin 直接抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 起作用^[22];Bcl-2 通过干扰细胞色素 C 的释放而阻断上游 Caspase 蛋白酶的激活,抑制细胞凋亡^[23]。而在本研究中我们分析 Survivin 与 Bcl-2 两者之间的关系,结果同样显示两者之间无相关性。关于两者的相关性的研究未见明确定论,有待进一步证实。希望在不久的将来,Survivin 及 Bcl-2 蛋白因其组织分布及作用机制的独特性在肿瘤诊断、预后评价及靶向治疗等方面会有进一步的研究及应用,为肿瘤的早期发现、早期诊治提供依据。

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] Slamon DJ,Clark GM,Wong SG,et al.Human breast cancer:correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu. Oncogene [J]. Science,1987,235(4785):177-182.
- [3] 吴昊,沈镇宙.乳腺癌中 Bcl-2 基因簇研究现状[J].中国

- 癌症杂志,1998,8(3):217-221.
- [4] 孙燕,石远凯.临床肿瘤内科手册[M].第 5 版.北京:人民卫生出版社,2007.426-430.
- [5] Elston CW,Ellis IO.Pathological prognostic factors in breast cancer.I.The value of histological grade in breast cancer:expression from a large study with long-term follow-up[J]. Histopathology,1991,19(5):403-410.
- [6] Fitzgibbons PL,Page DL,Weaver D,et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists consensus Statement 1999[J]. Arch Pathol Lab Med,2000,124(7):966-978.
- [7] Fromowitz FB,Viola MV,Chao S,et al. ras p21 expression in the progression of breast cancer [J]. Hum Pathol,1987,18(12):1268-1275.
- [8] Caldas H,Fanqusaro JR,Boué DR,et al. Dissecting the role of endothelial SURVIVIN Delta Ex3 in angiogenesis [J]. Blood,2007,109(4):1479-1489.
- [9] Liu F,Liu S,He S,et al. Survivin transcription is associated with P-glyco-protein /MDR1 overexpression in the multidrug resistance of MCF-7 breast cancer cells[J]. Oncol Rep,2010,23(5):1469-1475.
- [10] Tanaka K,Iwamoto S,Gon G,et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res,2000,6(1):127-134.
- [11] Al-Joudi FS,Iskandar ZA,Hasnan J,et al. Expression of survivin and its clinicopathological correlations in invasive ductal carcinoma of the breast [J].Singapore Med,2007,48(7):607-614.
- [12] 宫慧琳,张锁平,张冠军,等.Survivin、MMP-2 在乳腺癌中的表达及其相关性研究[J].重庆医科大学学报,2012,37(2):106-109.
- [13] Tsujimoto Y,Flinger LR,Yunis J,et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation [J]. Science,1984,226(4678):1097-1099.
- [14] Moreno A ,Fiqueras A ,Lloveras B ,et al. Apoptosis in ductal carcinoma in situ of the breast[J]. Breast J ,2001,7(4):245-248.
- [15] 王海燕,黄爱民,高美钦.Survivin、Bcl-2 和 Bax 蛋白在乳腺癌中的表达及其意义[J].解剖学杂志,2006,29(1):61-64.
- [16] Hellemans P, Van Dam PA ,Weyler J ,et al. Prognostic value of Bcl-2 expression in invasive breast cancer [J]. Br J Cancer,1995,72(2):354-360.
- [17] 吴昊,沈镇宙,邵志敏. 乳腺癌细胞凋亡及相关基因表达的预后研究[J]. 上海医学,1999,22(1):27-31.
- [18] 籍敏,王全红. Bcl-2 在乳腺癌中的表达及意义[J].山西医科大学学报,2007,38(4):337-338.
- [19] Jiao BH,Yao ZG,Geng SM,et al.Expression of survivin,a novel apoptosis inhibitor and cell cycle regulatory protein,in human gliomas[J].Chin Med,2004,117(4):612-614.
- [20] 孙国贵,胡万宁,李成林,等. Survivin 蛋白在乳腺癌中表达水平及与 CerbB-2 关系的 Meta 分析[J].中华全科医学,2012,10(4):533-535.
- [21] 谢平,阮秋蓉,李军川.Survivin、Bcl-2 在乳腺癌中的表达及意义[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(2):147-151.
- [22] 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(4):1117-1123.
- [23] Adams JM,Cory S.The Bcl-2 protein family:arbiters of cell survival[J]. Science,1998,281(5381):1322-1326.