

Survivin、BRCA1 及 class III β -tubulin 在非小细胞肺癌组织中的表达及与紫杉醇耐药的关系

周正仕, 廖小方, 郑勤红, 何慧娟
(衢州市人民医院, 浙江 衢州 324000)

摘要: [目的] 探讨 Survivin、BRCA1 及 class III β -tubulin 蛋白在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的表达及与紫杉醇耐药的关系。[方法] 应用免疫组织化学法检测 64 例 NSCLC 患者 Survivin、BRCA1 及 class III β -tubulin 蛋白的表达; 给予紫杉醇为基础的化疗方案, 分析上述蛋白表达与紫杉醇化疗敏感性的关系。[结果] Survivin 阳性与 class III β -tubulin 阳性患者对紫杉醇方案治疗的有效率 (RR) 分别低于 Survivin 阴性患者 (27.8% vs 71.4%, $P < 0.05$) 与 class III β -tubulin 阴性患者 (23.5% vs 73.3%, $P < 0.01$); 而 BRCA1 阳性患者对紫杉醇方案治疗的 RR 高于 BRCA1 阴性患者 (60.0% vs 31.0%, $P < 0.05$)。多因素分析表明 class III β -tubulin 是 NSCLC 紫杉醇治疗无进展生存期 (PFS) 的独立影响因素 ($\chi^2 = 4.852$, $P = 0.027$), 分期是与总生存期 (OS) 相关的独立影响因素 ($\chi^2 = 4.105$, $P = 0.035$)。[结论] NSCLC 患者 Survivin、class III β -tubulin 蛋白表达阳性及 BRCA1 蛋白表达阴性预示对紫杉醇治疗相对不敏感。

关键词: Survivin; BRCA1; class III β -tubulin; 肺肿瘤; 紫杉醇; 耐药

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)11-0806-05

Expression of Survivin, BRCA1 and class III β -tubulin in Non-small Cell Lung Cancer and Its Relationship with Resistance to Paclitaxel

ZHOU Zheng-shi, LIAO Xiao-fang, ZHENG Qin-hong, et al.
(Quzhou People's Hospital, Quzhou 324000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the relationship between the expression of Survivin, BRCA1 and class III β -tubulin proteins and resistance to paclitaxel in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). [Methods] The expressions of Survivin, BRCA1 and class III β -tubulin in 64 cases with NSCLC were detected by immunohistochemical method. Patients received paclitaxel-based chemotherapy. The relationship between the expression of 3 kinds of proteins and sensitivity of paclitaxel-chemotherapy was analyzed. [Results] The response rate (RR) of paclitaxel-based chemotherapy in patients with positive Survivin expression or positive class III β -tubulin expression was lower than that in negative Survivin expression patients (27.8% vs 71.4%, $P < 0.05$) or negative class III β -tubulin expression patients (23.5% vs 73.3%, $P < 0.05$). RR in positive BRCA1 expression patients was higher than that in negative BRCA1 expression patients (60.0% vs 31.0%, $P < 0.05$). Multivariate analysis showed that class III β -tubulin was independent factor for progression-free survival ($\chi^2 = 4.852$, $P = 0.027$) and stage was independent factor for overall survival ($\chi^2 = 4.105$, $P = 0.035$). [Conclusion] Positive expressions of Survivin and class III β -tubulin and negative BRCA1 expression in NSCLC patients might be associated with resistance to paclitaxel-based chemotherapy.

Subject words: Survivin; BRCA1; class III β -tubulin; lung neoplasms; paclitaxel; drug resistance

目前, 紫杉醇已广泛应用于非小细胞肺癌、头颈部肿瘤、部分妇科肿瘤的治疗, 效果肯定, 但骨髓抑制等不良反较大, 价格也相对昂贵, 对耐药患者而言有弊无利。从肿瘤相关基因、信号传导通路分子、肿瘤细胞凋亡因子等角度去预测患者对包括紫杉醇在

内的各种化疗药物治疗的敏感性, 仍是目前肿瘤治疗研究领域的热点, 已有大量国内外文献报道了相关临床试验结果。紫杉醇耐药机制非常复杂, 据报道主要与基因表达有关^[1]。本研究通过检测非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤组织中 Survivin、BRCA1 及 class III β -tubulin 蛋白的表达情况, 了解其与紫杉醇耐药

收稿日期: 2012-01-05; 修回日期: 2012-03-10

的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

随机选取 2005 年 6 月至 2008 年 6 月在衢州市人民医院经气管镜、颈部淋巴结、胸部 CT 引导下肺部肿块穿刺组织标本 64 例。其中男性 37 例,女性 27 例;年龄 39~72 岁,中位年龄 58 岁;鳞癌 31 例,腺癌 33 例;Ⅲ期 30 例、Ⅳ期 34 例。所有标本均为常规石蜡包埋的存档组织块。所有病例既往无手术或化疗史。患者均接受以紫杉醇为基础的化疗,化疗前均签署化疗知情同意书。每 21~28d 重复,3~4 个疗程后进行疗效评价。

1.2 Survivin、BRCA1 及 class III β -tubulin 检测

兔抗人 Survivin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司、鼠抗人 BRCA1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, class III β -tubulin 多克隆抗体购自美国 SantaCruz 公司。用已知 Survivin、BRCA1、class III β -tubulin 蛋白阳性的切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。严格按试剂盒说明书进行操作。所有标本均经常规中性甲醛固定,石蜡包埋,常规切片 4 μ m。应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(免疫组化 SP 法),检测收集的石蜡标本相关蛋白指标表达情况。

1.3 判断标准

Survivin 表达阳性为细胞质或细胞核中出现棕黄色, BRCA1 表达阳性为细胞核中出现棕黄色, class III β -tubulin 表达阳性为在细胞质中出现棕黄

色。三者免疫组化结果根据阳性细胞数和染色强度分别评分,随机选择 5 个高倍视野,阳性细胞百分比 <5% 计 0 分, 5%~25% 计 1 分, 26%~50% 计 2 分, 51%~75% 计 3 分, >75% 计 4 分。细胞无着色计 0 分,浅黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分。两项得分之积为 0 者为阴性(-), 1~2 为可疑(\pm), 3~5 为弱阳性(+), 6~8 为阳性(++), 9~12 为强阳性(+++)。(-)、(\pm)为阴性,(+),(++),(+++为阳性。

疗效评价参照 RECIST 标准分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)和进展(PD)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS14.0 统计软件进行统计分析,生存时间计算从完成 2~3 周期化疗方案至患者死亡或随访结束为止。计数资料比较采用 χ^2 检验,以 COX 比例风险模型对预后进行相关因素分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肺癌组织中 Survivin、BRCA1、class III β -tubulin 蛋白表达情况以及与患者临床特征之间的关系

在 64 例 NSCLC 患者中, Survivin 蛋白阳性表达率 56.3%, 与患者年龄、性别、分期、病理类型均无关 ($P>0.05$); BRCA1 蛋白阳性表达率 54.7%, 与患者年龄、性别、分期、病理类型均无关 ($P>0.05$); class III β -tubulin 蛋白阳性表达率 53.1%, 与患者年龄、性别、分期均无关 ($P>0.05$)。其中腺癌 class III β -tubulin 蛋白阳性表达率为 72.7%, 明显高于鳞癌(32.3%), 两者比较有显著差异 ($P<0.05$) (表 1、图 1、图 2)。

表 1 肺癌组织中 Survivin、BRCA1、class III β -tubulin 蛋白阳性表达情况以及与患者临床特征之间的关系

临床病理特征	例数	Survivin				BRCA1				class III β -tubulin			
		阳性数	阳性率(%)	χ^2	P	阳性数	阳性率(%)	χ^2	P	阳性数	阳性率(%)	χ^2	P
年龄(岁)													
<60	38	20	52.6	0.498	0.481	22	57.9	0.388	0.533	20	52.6	0.009	0.924
≥ 60	26	16	61.5			13	50.0			14	53.8		
性别													
男性	37	19	51.4	0.855	0.355	20	54.1	0.014	0.905	18	48.6	0.706	0.401
女性	27	17	63.0			15	55.6			16	59.3		
分期													
Ⅲ期	30	16	53.3	0.195	0.659	17	56.7	0.089	0.765	14	46.7	0.946	0.331
Ⅳ期	34	20	58.8			18	52.9			20	58.8		
病理													
鳞癌	31	15	48.4	1.510	0.219	19	61.3	1.058	0.304	10	32.3	10.512	0.001
腺癌	33	21	63.6			16	48.5			24	72.7		

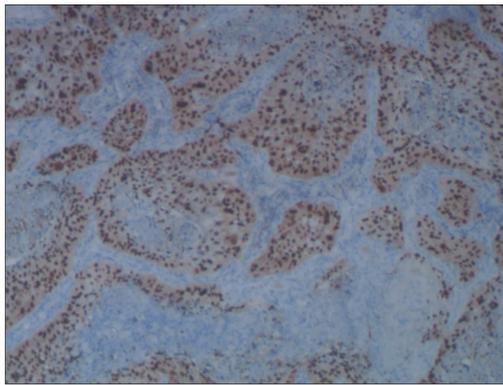


图1 BRCA1 阳性表达(细胞核呈棕黄色)

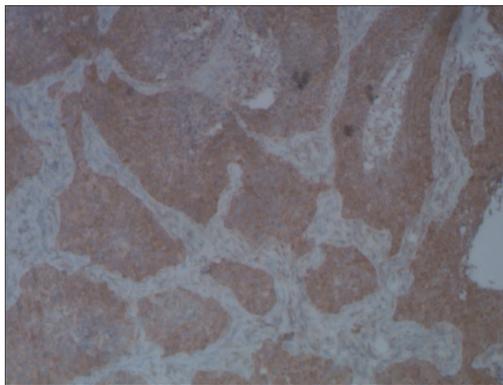


图2 class III β-tubulin阳性表达(细胞质呈棕黄色)

2.2 Survivin、BRCA1、class III β-tubulin 表达情况与患者紫杉醇方案治疗结果的关系

中位随访 482d,11 例患者病情进展,52 例患者死亡。中位无进展生存期(PFS) 254d,不同年龄、性别、病理类型、疾病分期患者中位 PFS 并不一致。Survivin 阳性患者对紫杉醇方案治疗的有效率(RR) 低于阴性患者(分别为 27.8%和 71.4%, $P<0.05$),阳性者中位 PFS 及中位总生存期(OS)分别为 215d 和 429d,均较阴性患者(分别为 277d 和 451d)缩短,两者比较均无统计学差异($P>0.05$);BRCA1 阳性患者对紫杉醇方案治疗的 RR 高于阴性患者(分别为 60.0%和 31.0%, $P<0.05$),阳性患者中位 PFS 及中位 OS 分别为 255d 和 434d,中位 PFS 略较阴性者(226d)延长,但中位 OS 较阴性者(445d)缩短,两者比较无统计学差异($P>0.05$);class III β-tubulin 阳性患者对紫杉醇方案治疗的 RR 低于阴性患者(分别为 23.5%和 73.3%, $P<0.01$),阳性患者中位 PFS 及中位 OS 分别为 127d 和 304d,均较阴性(分别为 371d 和 592d)患者缩短,两者比较有统计学差异($P<0.05$)。见表 2。

应用多因素 COX 比例风险函数模型分析影响 NSCLC 紫杉醇治疗的预后因素,结果表明,在包括年龄、病理类型、分期、Survivin、BRCA1、class III β-tubulin 在内的因素中,class III β-tubulin 是与 PFS 相关的独立影响因素($\chi^2=4.852,P=0.027$),分期是与 OS 相关的独立影响因素($\chi^2=4.105,P=0.035$)。见表 3。

表 2 Survivin、BRCA1、class III β-tubulin 等与紫杉醇方案治疗疗效的关系

临床病理特征	例数	RR (%)	χ^2	P	中位 PFS(d)	χ^2	P	中位 OS(d)	χ^2	P
Survivin										
阳性	36	27.8	4.704	0.038	215	1.437	0.487	429	1.628	0.412
阴性	28	71.4			277			451		
BRCA1										
阳性	35	60.0	9.704	0.017	255	0.606	0.436	434	0.403	0.529
阴性	29	31.0			226			445		
class III β-tubulin										
阳性	34	23.5	8.704	0.026	127	33.300	0.001	304	15.700	0.010
阴性	30	73.3			371			592		
年龄(岁)										
<60	38	44.7	2.309	0.193	248	0.683	0.409	463	1.813	0.207
≥60	26	50.0			233			403		
病理类型										
鳞癌	31	45.2	0.802	0.376	253	1.379	0.241	458	0.627	0.415
腺癌	33	48.5			231			421		
分期										
III期	30	46.7	2.175	0.201	264	4.528	0.079	471	3.121	0.109
IV期	34	47.1			222			410		

3 讨论

紫杉醇是从红豆杉树皮中提取的一种抗微管药物,目前已广泛用于肺癌、乳腺癌等各种肿瘤的治疗。微管是真核细胞的一种纤维蛋白,与细胞的有丝分裂密切相关,紫杉醇在与微管蛋白质结合后,形成稳定的微管束,使之不被解聚,促进其聚合从而使肿瘤细胞停止在 G₂ 期和 M 期,抑制其复制,从而阻断癌细胞增殖^[2]。大量研究证实,紫杉醇耐药除与本身细胞内微管蛋白及其同型的

表3 影响 PFS 和 OS 的多因素分析结果

项目	影响因素	回归系数 β	标准误 SE	Wald	P	OR
PFS	Survivin	0.017	0.022	0.606	0.436	0.983
	BRCA1	0.116	0.076	2.330	0.127	1.123
	class III β -tubulin	-1.739	0.396	4.852	0.027	0.176
	年龄	-0.010	0.025	0.147	0.702	0.990
	病理类型	0.096	0.070	1.850	0.174	1.100
	分期	-0.366	0.312	1.381	0.243	0.693
OS	Survivin	0.418	0.303	1.904	0.168	1.518
	BRCA1	0.018	0.327	0.003	0.956	1.018
	class III β -tubulin	-0.390	0.341	1.351	0.245	0.672
	年龄	-0.015	0.032	0.365	0.657	0.848
	病理类型	0.073	0.293	0.063	0.802	1.076
	分期	-1.769	0.370	4.105	0.035	0.170

变化有关外,与个体的基因如 *Survivin*、*BRCA1* 及 *class III β -tubulin* 表达情况密切相关。

Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IAP)家族的新成员,是目前为止最强的凋亡抑制因子,它功能复杂,具有抑制细胞凋亡,促进细胞转化并且参与细胞的有丝分裂、血管的生成和肿瘤细胞耐药性的产生等作用。*Survivin* 基因的表达具有高度的肿瘤特异性,在多数肿瘤组织中过表达,而在大多数正常组织中不表达。*Survivin* 抑制凋亡的机制可能是通过直接抑制 Caspase-3、Caspase-7 的活性或与细胞周期调控因子 CDK4 形成 *Survivin*-CDK4 复合物,使得 p21 从 CDK4 的复合体中释放出来,进一步与线粒体 Caspase-3 结合,抑制其活性,从而阻止细胞凋亡^[3]。熊慧华等^[4]通过脂质体介导将 *Survivin* 短发卡 RNA 表达质粒 p*Survivin* shRNA 转染人乳腺癌细胞系 MCF-7 并检测 *Survivin* mRNA 及蛋白的表达情况,结果发现与未转染细胞及转染阴性对照质粒细胞相比之下,转染 p*Survivin* shRNA 质粒的细胞 *Survivin* mRNA 和蛋白表达明显下降;在同一紫杉醇作用浓度下,细胞增殖抑制率和细胞凋亡率明显增高。提示短发卡 RNA 干扰技术阻抑乳腺癌细胞中 *Survivin* 的表达,可增强乳腺癌细胞对紫杉醇的敏感性。本研究发现,在 64 例 NSCLC 患者中 *Survivin* 蛋白阳性表达者对紫杉醇方案治疗的 RR 明显低于阴性者。阳性者中位 PFS 及中位 OS 较阴性者缩短,但两者差异不明显。考虑 *Survivin* 导致肿瘤对紫杉醇产生耐药性,但这种耐药缺乏特异性。

BRCA1 是多功能的肿瘤抑制基因,参与较多的

细胞功能活动,包括 DNA 修复、细胞周期检查点控制、染色体重塑、基因的转录活化、维持基因组的稳定性。*BRCA1* 还是肿瘤细胞能否对细胞毒性药物反应的决定分子;它能增强对紫杉醇诱导凋亡的敏感性,同时能抑制顺铂诱导的凋亡^[5]。Rosell 等^[6]研究报道,*BRCA1* 高表达的 NSCLC 患者预后相对差,*BRCA1* 也是 NSCLC 患者对化疗敏感性的预测因子。*BRCA1* 高表达者预示对紫杉醇敏感,但对铂类耐

药;*BRCA1* 低表达者刚好相反。本研究发现,*BRCA1* 蛋白阳性表达率 54.7%,与患者年龄、性别、分期、病理类型均无关($P>0.05$);*BRCA1* 阳性患者对紫杉醇方案治疗的 RR 高于 *BRCA1* 阴性患者(分别为 60.0%和 31.0%, $P<0.05$),阳性患者中位 PFS 略较阴性者延长,但中位 OS 较阴性者缩短,两者比较无统计学差异($P>0.05$)。目前考虑 *BRCA1* 阳性为预后不良因子。

Promkan 等^[7]研究认为,*BRCA1* 是通过 SIRT1 (silent mating-type information regulation 2 homologue 1) 来调节 *Survivin* 的表达从而影响肿瘤细胞的凋亡。*BRCA1* 促进 p21/Waf1、p27^{Kip1} 的表达,抑制 *Survivin* 的表达;*BRCA1* 表达的缺失导致了 *Survivin* 表达的上升,也导致了紫杉醇敏感性的下降。同时,*BRCA1* 阳性表达患者中 *Survivin* 的表达低于阴性患者,但差异不具有统计学意义($P>0.05$),考虑本研究样本含量有限,*BRCA1* 蛋白表达与 *Survivin* 蛋白是否存在负相关,需进一步扩大研究来证实。

细胞内微管蛋白分为 α 、 β 两个亚型,是细胞骨架的重要组成部分,是有丝分裂时纺锤体的基本组成单位,也是抗微管药物的主要作用靶点。大量研究报道,*class III β -tubulin* 基因编码的蛋白与抗微管化疗药物敏感性最为密切^[8]。Stengel 等^[9]将 pALTER-Tubb3 或 siRNA-Tubb3 转染 MCF-7 (ER 阳性)和 MDA-MB-23(ER 阴性)乳腺癌细胞株,成功地获得高表达和低表达 *class III β -tubulin* 的乳腺癌细胞株,进一步实验发现 *class III β -tubulin* 高表达的 MCF-7 和 MDA-MB-23 与对照组相比,对紫杉醇更

不敏感。class III β -tubulin 低表达 MCF-7 和 MDA-MB-23 对紫杉醇最敏感,前者 IC_{50} 为 4.8pmol/L,与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),而后者由于 class III β -tubulin 基因沉默导致紫杉醇浓度降到 0.1pmol/L 仍未获得 IC_{50} 值。Seve 等^[10]将 91 例晚期 NSCLC 分为试验组和对照组,在 47 例用紫杉醇方案的试验组中, class III β -tubulin 的表达与紫杉醇方案治疗反应密切相关,低表达者有效率为 61.9%,而高表达者有效率仅为 12.5%,前者的 PFS 和 OS 较后者明显延长 ($P<0.01$);而在 44 例使用吉西他滨方案的对照组,其 class III β -tubulin 蛋白的表达水平和疗效无关,高或低表达者有效率均为 33.3%。本研究结果显示, class III β -tubulin 蛋白阳性表达率 53.1%,其中腺癌明显高于鳞癌。class III β -tubulin 阳性患者对紫杉醇方案治疗的 RR 显著低于阴性患者(分别为 23.5%和 73.3%, $P<0.01$),阳性患者中位 PFS 及中位 OS 均较阴性患者缩短,提示 class III β -tubulin 阳性对紫杉醇耐药。

多因素分析显示影响 NSCLC 紫杉醇治疗的预后因素中, class III β -tubulin 是与 PFS 相关的独立影响因素,分期是与 OS 相关的独立影响因素。

不同人群由于基因的多态性及基因表达的差异,即使同一疾病,在接受同一种化疗方案后也会产生不同的治疗效果。为避免耐药人群接受毒性较大的化疗药物以及资源浪费,基因检测在指导临床化疗方案的选择显得日益重要。总之,了解紫杉醇药物与基因表达的关系能为肿瘤的个体化治疗提供理论指导。

参考文献:

- [1] Kashkin KN, Musatkina EA, Komelkov AV, et al. Genes potentially associated with resistance of lung cancer cells to paclitaxel [J]. Dokl Biochem Biophys, 2011, 437:105-108.
- [2] Ahmed AA, Wang X, Lu Z, et al. Modulating microtubule stability enhances the cytotoxic response of cancer cells to paclitaxel [J]. Cancer Res, 2011, 71 (17):5806-5817.
- [3] Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, et al. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death[J]. Oncogene, 2000, 19(10):1346-1353.
- [4] 熊慧华,于世英,庄亮,等. Survivin 在紫杉醇介导 MCF-7 细胞凋亡中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23 (6):718-720.
- [5] Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 2003, 63(19):6221-6228.
- [6] Rosell R, Cobo M, Isla D, et al. Pharmacogenomics and gemcitabine[J]. Ann Oncol, 2006, 17(Suppl 5):v13-v16.
- [7] Promkan M, Liu G, Patmasiriwat P, et al. BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 2009, 125(12):2820-2828.
- [8] Koh Y, Jang B, Han SW, et al. Expression of class III beta-tubulin correlates with unfavorable survival outcome in patients with resected non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(3):320-325.
- [9] Stengel C, Newman SP, Leese MP, et al. Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents[J]. Br J Cancer, 2010, 102(2):316-324.
- [10] Seve P, Mackey J, Isaac S, et al. Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(12):2001-2007.