

Survivin、Fas 在宫颈癌中的表达及意义

张文渊, 黄筱纭, 平金良

(湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000)

摘要: [目的] 探讨 Survivin、Fas 在宫颈癌组织中的表达及其与临床病理因素之间的关系。[方法] 采用免疫组织化学 SP 法分别检测 30 例宫颈癌组织、25 例宫颈上皮内瘤变组织、16 例正常宫颈组织中 Survivin、Fas 的阳性表达情况, 分析宫颈癌组织中 Survivin、Fas 的阳性表达与各临床病理因素之间的关系。[结果] Fas 在正常宫颈组织中高表达, 而在宫颈癌组织中低表达; Survivin 在正常宫颈组织中不表达, 而在宫颈癌组织中高表达; 两者在宫颈不同病变中的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Survivin 的表达与宫颈癌临床分期有关; Fas 的表达与病理分级、临床分期以及是否淋巴结转移有关。宫颈癌中 Survivin 和 Fas 的阳性表达呈负相关 ($r = -0.408, P = 0.025$)。[结论] Survivin 高表达和 Fas 低表达可以引起细胞凋亡的抑制, 在宫颈癌的发生发展中起一定作用。降低 Survivin 表达和提高 Fas 表达可望成为治疗宫颈癌的新靶点。

关键词: Survivin; Fas; 宫颈肿瘤; 凋亡

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)08-0605-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.08.B005

Expressions of Survivin and Fas in Cervical Carcinoma and Their Significance

ZHANG Wen-yuan, HUANG Xiao-hong, PING Jin-liang

(Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of Survivin and Fas in cervical cancer tissues and the relationship with clinical pathological factors. [Methods] Expressions of Survivin and Fas were detected by immunohistochemical technology SP detection method in 30 patients with cervical cancer, 25 patients with cervical intraepithelial neoplasia and 16 healthy controls. The relationship between positive expression of Survivin and Fas in cervical cancer tissues and clinical pathological factors was analyzed. [Results] Fas was highly expressed in the normal cervical tissues and lowly expressed in cervical cancer tissues; while Survivin was negative expression in normal cervical tissues and highly expressed in cervical cancer tissues, with significant difference ($P < 0.05$). Survivin expression correlated with clinical staging, while Fas expression correlated with grade, clinical staging and lymph node metastasis. Survivin expression and Fas expression showed negative correlation ($r = -0.408, P = 0.025$). [Conclusion] High expression of Survivin and low expression of Fas may induce apoptosis inhibition, and they may play roles in carcinogenesis and progression of cervical cancer. Downregulating Survivin expression and up-regulating Fas expression maybe become new targets in the treatment for cervical cancer.

Subject words: Survivin; Fas; cervical neoplasms; apoptosis

宫颈癌的发生发展从早期的不典型增生到癌变的终末期, 存在一系列基因表达的失衡。其中促凋亡基因表达减少, 抗凋亡基因表达增加使细胞增生和凋亡失衡, 是肿瘤发生的重要原因之一。Survivin(生存素)具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的作用, 而 Fas(脂肪酸合成酶)是最重要的促细胞凋亡基因之一, Survivin 与 Fas 共同作用于在凋亡通路中发挥决

定作用的 Caspase-3 和 Caspase-7。本研究拟观察 Survivin、Fas 在正常宫颈组织、CIN 组织和宫颈癌组织中的表达, 探讨两者在宫颈癌发生发展过程中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2009 年 6 月至 2011 年 5 月浙江省湖州市

通讯作者: 张文渊, 住院医师, 硕士; 湖州市中心医院妇产科, 浙江省湖州市吴兴区红旗路 198 号 (313000); E-mail: zhangwenyuan1976@126.com

收稿日期: 2013-04-16; **修回日期:** 2013-06-12

中心医院病理科存档的临床病理资料完整的宫颈癌组织标本 30 例、CIN 组织标本 25 例和正常宫颈组织标本 16 例。宫颈癌的临床分期按 FIGO 分期(2003), I a 期 17 例, I b~II a 期 13 例;根据组织病理学类型和细胞分化程度,鳞癌 25 例,其中高分化 7 例,中分化 10 例,低分化 8 例;腺癌 3 例(高分化 1 例、中分化 1 例、低分化 1 例),内膜样腺癌部分透明细胞癌 1 例,腺鳞癌 1 例;患者术前均未接受放、化疗。年龄 26~70 岁,中位年龄 45 岁。选择同期因良性病变行全子宫切除的宫颈标本 16 例作为对照,经病理证实为正常宫颈组织。

1.2 试 剂

兔抗人 Fas 多克隆抗体、鼠抗人 Survivin 单克隆抗体、免疫组化染色试剂盒(SP-9000 即用型)、试剂盒包括试剂 A(封闭用正常山羊血清工作液)、试剂 B(生物素标记山羊抗兔 IgG)、试剂 C(辣根酶标记链霉卵白素工作液)、DAB 显色剂、柠檬酸钠缓冲溶液(pH6.0),以上试剂均购自北京中杉金桥生物科技公司。中性树胶、PBS 缓冲液(pH7.2~7.4)均为病理科日常常备工作液。

1.3 方 法

1.3.1 标本采集与处理

所有组织标本均经 10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,连续切片 4 张,厚度 4μm,1 张行 HE 染色,分类诊断,然后由 3 位有经验的病理医师对全部标本的病理诊断进行复查,诊断一致的病例方纳入研究样本。2 张用于免疫组化实验;1 张用于对比试验,另 1 张备用。

1.3.2 实验步骤

实验步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.3.3 免疫组化结果判定

根据阳性细胞百分比及染色强度进行综合评分,以细胞被染成黄色或棕色为阳性细胞。细胞染色强度分为 4 级:无着色为 0 级计为 0 分,浅黄色为 1 级计为 1 分,棕黄色为 2 级计为 2 分,棕褐色为 3 级计为 3 分。在 400 倍光镜下随机观察 5 个不同的

视野,根据阳性细胞占总细胞数的百分比分为 5 个等级:<5%为 0 级;5%~25%为 1 级;26%~50%为 2 级;51%~75%为 3 级;>75%为 4 级,分别取相应分值为 0、1、2、3、4 分。根据上述 2 项指标积分划分为 4 级:≤1 为阴性;2~5 分为弱阳性 (+);6~10 分为阳性(++);大于 10 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计数资料用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Survivin、Fas 在宫颈癌组织、CIN 组织和正常宫颈组织中的表达情况

Survivin 在宫颈癌组织中阳性表达率为 70.00%,在 CIN 组织中阳性表达率为 40.00%,在正常宫颈组织中不表达,存在统计学差异($P=0.000$)。

Fas 在宫颈癌组织中阳性表达率为 46.67%,在 CIN 组织中阳性表达率为 64.00%,在正常宫颈组织中阳性表达率为 87.50%,存在统计学差异($P=0.024$)(Table 1, Figure 1~4)。

2.2 Survivin 与 Fas 在宫颈癌中表达的相关性分析

21 例 Survivin 表达阳性的宫颈癌病例中,7 例 Fas 蛋白呈阳性表达,两者共表达为 33.33%。9 例 Survivin 表达阴性病例中,2 例 Fas 蛋白呈阴性表达,同时不表达为 22.22%。经 Spearman 相关分析,两者之间成负相关($r=-0.408, P=0.025$)(Table 2)。

2.3 宫颈癌组织中 Fas 和 Survivin 的阳性表达与临床病理因素的关系

Fas 在宫颈癌中的阳性表达与患者年龄、肿瘤生长、肿瘤类型无关。Fas 在宫颈癌 I a 期中阳性率为 64.70%,在宫颈癌 I b~II a 期中阳性率为 23.07%,两组之间的差异有统计学意义($P=0.033$)。Fas 在有淋巴结转移的宫颈癌中阳性率为 25.00%,在无淋巴结转移的宫颈癌中阳性率为 61.11%,差异有统计学意

Table 1 The expression of Survivin and Fas in cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia and normal cervix tissues

Groups	Survivin expression				Positive rate (%)	χ^2	P	Fas expression				Positive rate (%)	χ^2	P
	-	+	++	+++				-	+	++	+++			
Normal cervix tissues	16	0	0	0	0.00			2	8	5	1	87.50		
CIN tissues	15	5	3	2	40.00	20.997	0.000	9	9	7	0	64.00	7.45	0.024
Cervical cancer tissues	9	7	8	6	70.00			16	12	2	0	46.67		

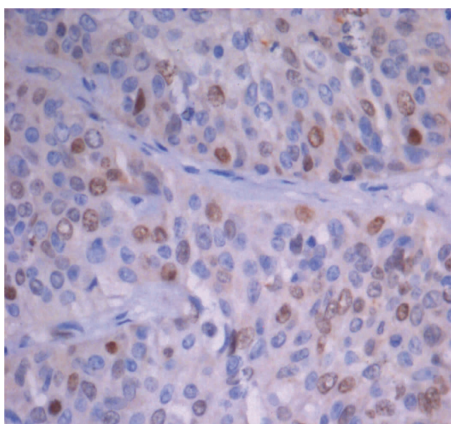


Figure 1 Positive expression(++) of Survivin in cervical cancer tissue (×400)

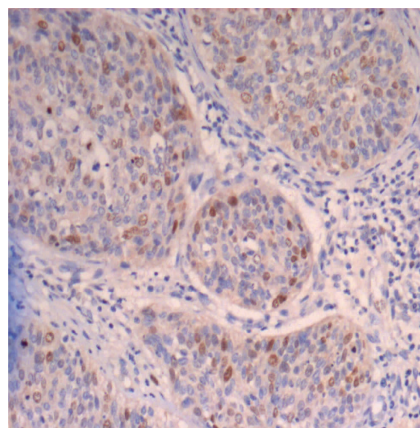


Figure 2 Positive expression(+++) of Survivin in cervical cancer tissue (×200)

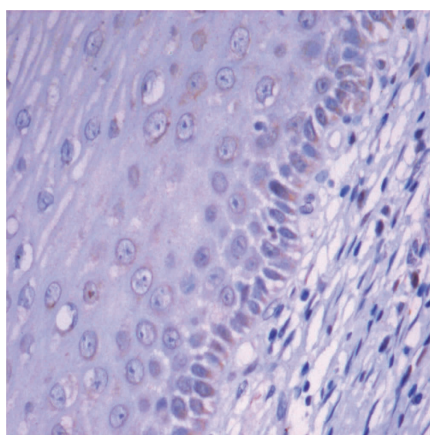


Figure 3 Positive expression of Fas in cervical cancer tissue (×200)

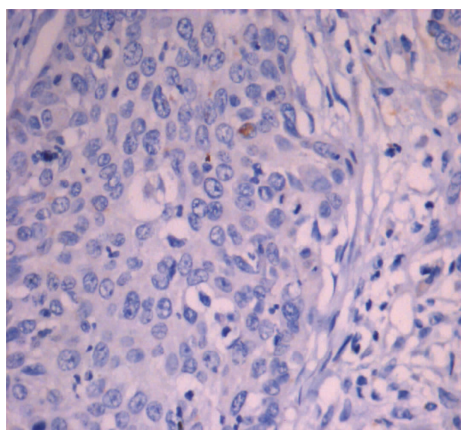


Figure 4 Negative expression of Fas in cervical cancer tissue (×200)

Table 2 The correlation of Survivin and Fas expression in cervical cancer

Survivin	Fas		<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-		
+	7	14	-0.408	0.025
-	7	2		
Total	14	16		

义 ($P=0.024$)。Fas 在宫颈癌组织中的阳性表达与病理分级亦相关($P<0.05$),宫颈癌病理分级越高,Fas 的阳性表达越弱。

Survivin 在宫颈癌中的表达与患者年龄、肿瘤生长类型、组织类型、病理分级、有无淋巴结转移无关。Survivin 在宫颈癌 I a 期中阳性率为 52.94%, 在宫颈癌 I b~II a 期中阳性率为 92.31%, 差异有统计学意义($P=0.042$)(Table 3)。

3 讨 论

Survivin 具有抑制凋亡和调节细胞分裂的作用。Survivin 抑制凋亡主要通过两条途径: ①通过其 BIR 结构直接与凋亡终末效应器 Caspase-3 结合在一起, 干扰 Survivin 和微管蛋白的反应, 导致细胞分裂异常, 且伴有多倍体细胞形成。②Survivin 与细胞周期调控因子 CDK4 形成 Survivin/CDK4 复合体, 使得 PZI 从 CDK4 的复合体中释放出来, PZI 易位到线粒体内与 Caspase-3 酶原结合, 抑制其活性, 阻止由 Fas 介导的细胞凋亡^[1]。细胞凋亡最终主要通过活化 Caspase 家族(半胱氨酸蛋白酶家族)而完成, 其中 Caspase-3 是各条凋亡通路的枢纽, Caspase-3 能

Table 3 The relationship between positive expression of Fas and Survivin in cervical cancer and their clinical pathological factors

Factors	n	Fas expression		χ^2	P	Survivin expression		χ^2	P
		Positive number	Positive rate (%)			Positive number	Positive rate (%)		
Age(years)									
≤40	13	8	61.53	2.039	0.269	9	69.23	0.006	1.000
>40	17	6	35.29			12	70.58		
Type of tumor growth									
Exogenous	12	6	50.00	0.368	0.832	8	66.70	0.159	0.924
Endogenous	10	5	50.00			7	70.00		
Ulcerative	8	3	37.50			6	75.00		
Clinical stage									
I a	17	11	64.70	5.129	0.033	9	52.94	5.436	0.042
I b~II a	13	3	23.07			12	92.31		
Type of organization									
Squamous cell carcinoma	25	13	52.00	1.714	0.336	18	72.00	0.286	0.622
Others types	5	1	20.00			3	60.00		
Pathological grade(Squamous cell carcinoma)									
I	7	6	85.71	7.147	0.028	5	71.43	0.926	0.629
II	13	6	46.15			8	61.54		
III	10	2	20.00			8	80.00		
Lymph node metastasis									
Yes	12	3	25.00	6.451	0.024	9	75.00	1.296	0.418
No	18	11	61.11			10	55.56		

水解大量蛋白底物,是引发凋亡的蛋白酶级联反应中的核心蛋白酶^[2]。各种凋亡刺激激活 Caspase 后,最终皆通过激活 Caspase-3 而诱导细胞凋亡。因此,在肿瘤组织中 Survivin 过度表达可使肿瘤细胞不断分裂增殖,加快肿瘤的生长。

本实验探讨了 Survivin 在宫颈癌发生发展过程中的表达情况。结果显示, Survivin 在正常宫颈组织中未检测到,在 CIN 组织中表达为 40.00%,提示 Survivin 的表达可出现于宫颈病变向恶性转化的早期,这在几种癌前病变中如:鲍文氏病、结肠息肉、乳腺腺瘤中已得到了证实,这一现象也为宫颈癌的预防及早期诊断提供了新的理论依据。Survivin 在宫颈癌中的阳性表达明显增高,提示在肿瘤细胞中 Survivin 高表达,与消耗了大量的 Caspase-3 酶原,使细胞难以凋亡,这不仅有利于细胞的异常增殖,还有利于异常基因的进一步积聚,促使细胞向恶性转化,促使宫颈癌的发生和发展。本实验的有关临床资料分析发现,临床分期越晚, Survivin 的阳性率越高, Survivin 因子表达阳性率增高预示宫颈癌有较高的侵袭性和不良的预后,这与杜俊瑶等^[3]和郭素芳等^[4]

的研究结果相一致。

Fas 是细胞凋亡的信号分子, Fas 基因位于人染色体 10q24 上, Fas 和 FasL 在膜外结合形成 Fas 三聚体是 Fas 在体内发挥作用的惟一途径。Fas 将凋亡信号传递到膜内,诱导 Fas 的死亡结构域和死亡结构域相关蛋白以二聚体的形式结合,再与 Caspase-8 蛋白酶结合,形成死亡诱导信号复合体,最后激活 Caspase-3,从而导致表达 Fas 的靶细胞凋亡^[2]。

国内研究显示, Fas 在正常宫颈组织中阳性率较高,但均为弱表达,而在宫颈癌组织中 Fas 的阳性率显著下降。Fas 在宫颈癌、CIN、正常宫颈组织中表达有显著差异,并且与宫颈癌病理分级有关。本研究显示, Fas 在正常宫颈组织的阳性率为 87.5%,其阳性率虽高,但大都为弱表达,而在宫颈癌组织中 Fas 阳性率为 46.67%,较正常宫颈组织显著下降,表达强度也较正常宫颈组织降低; Fas 在 CIN 组织的阳性率为 64.00%,表达强度处于正常组和宫颈癌组之间; Fas 在正常宫颈组织、CIN 组织、宫颈癌组织中表达有显著差异 ($P<0.05$), Fas 的阳性率随肿瘤的形成有明显降低的趋势,并且与宫颈癌的病理分级和临

床分期有关。由此提示,宫颈癌细胞中 Fas 表达降低,使其难以正常凋亡,破坏了细胞内稳态,最终导致肿瘤的发生及发展。此结论与国内外有关文献报道相一致^[3,4]。

Fas/FasL 系统是细胞内最重要的凋亡诱导系统之一,已在肿瘤治疗中显示了一定的作用。但由于其特异性差,全身应用毒性大,限制了其全身应用。研究发现,用基因转染的方法将 Fas 基因导入肿瘤细胞而可以上调其表达,使 Fas 和 FasL 在局部发挥作用从而诱导肿瘤细胞凋亡,这样,既提高了治疗的特异性又避免了全身副作用。Aragane 等^[5]用巨细胞病毒作为载体将 Fas 基因导入表达 FasL 的黑色素瘤细胞中,结果 Fas 表达率上调,细胞凋亡率明显高于对照组。

Survivin 是目前发现的功能最强的凋亡抑制因子之一,也是最有希望的肿瘤靶向治疗的靶点之一。国外学者针对肿瘤细胞 Survivin 基因的 RNA 干扰的体外实验研究已经达到了一定水平。Tsuji 等^[6]的研究证实,Survivin RNA 干扰可以明显地抑制胰腺癌的增殖。Kappler 等^[7]在肉瘤的 Survivin 基因 RNA 干扰中同样发现 G₂/M 期阻滞。有研究者应用 Survivin 基因的 RNA 干扰技术作用于肿瘤细胞,发现肿瘤细胞在 G₂/M 期阻滞和凋亡比例增加^[8]。研究者已经开发出多种以 Survivin 为靶位点的拮抗分子,如显性抑制突变体、靶向 Survivin 的反义寡核苷酸、干扰 RNA 等,这些策略具有良好的安全性、靶向性和特异性。

综上所述,从分子生物学角度,细胞的凋亡刺激最终主要通过活化 Caspase 家族导致细胞凋亡,其中 Caspase-3 是各条凋亡通路的枢纽,Survivin 通过其 BIR 结构直接抑制 Caspase-3 的活性而抑制凋亡的发生。Fas 则与其配体 FasL 结合,再与凋亡相关蛋白结合,形成死亡诱导信号复合体,发生 Caspase 级联反应,最终作用于 Caspase-3,使表达 Fas 的细胞发生凋亡。Survivin 与 Fas 在同一组织中呈负相关。本研究进一步证实促凋亡蛋白 Fas 在宫颈癌中低表达,凋亡抑制蛋白 Survivin 在宫颈癌中高表达,两者呈负相关。Survivin 在癌组织中的表达是一个渐进的过程,往往与肿瘤的恶性程度、预后密切相关,随着癌前病变细胞(CIN 细胞)向宫颈癌细胞的转化,Survivin 的表达逐渐升高,Survivin 阳性提示

组织学尚正常的组织存在癌变的可能,因而具有早期诊断价值,而且也是诊断预后的重要参考指标。

因此,从理论上讲,减少凋亡抑制蛋白 Survivin 的阳性表达,增加促凋亡蛋白 Fas 的阳性表达,有望成为宫颈癌治疗上的新靶点。国外有关专家已经利用 RNA 干扰技术在体外实验中证实了上述理论的可行性。但 Survivin、Fas 能否作为宫颈癌治疗的靶点及判断预后的指标,还有待今后进行大样本、多中心、前瞻性的对照研究加以证实。

参考文献:

- [1] Suzuki A, Ito T, Kawano H, 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.
- [2] 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.
- [3] Du JY, Yao JF, Xin Y. Expression and clinical significance of Survivin and Fas in cervical dysplasia and cervical cancer [J]. *Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics*, 2005, 21(11):672-674. [杜俊瑶, 姚嘉斐, 辛彦. Survivin 与 Fas 在宫颈不典型增生和宫颈癌中的表达及临床意义 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2005, 21(11): 672-674.]
- [4] Wu SF, Zhang JW, Qiu M, et al. Survivin, Fas and FasL expression and its relationship in the cervical cancer organizations [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2010, 30(9):1138-1142. [邬素芳, 张稼闻, 邱敏, 等. 宫颈癌组织中 Survivin、Fas 和 FasL 的表达及其关系 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2010, 30(9): 1138-1142.]
- [5] Aragane Y, Maeda A, Cui CY, et al. Inhibition of growth of melanoma cells by CD95(Fas/APO-1) gene transfer in vivo [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(6):1008-1014.
- [6] Tsuji N, Asanume K, Kobayashi D, et al. Introduction of a Survivin gene-specific small inhibitory RNA inhibits growth of pancreatic cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B):3967-3972.
- [7] Kappler M, Bache M, Bartel F, et al. Knockdown of Survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of P53 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(3):186-193.
- [8] Rosa J, Canovas P, Islam A, et al. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(3):1483-1493.