

· 论 著 ·

四分位法判定 Survivin 蛋白表达与胃癌预后的关系研究

赵高平, 贾贵清, 江桃, 黎熊, 兰春斌, 胡阳, 王康

四川省医学科学院 四川省人民医院胃肠外科, 四川 成都 610072

摘要: **目的** 探讨 Survivin 蛋白表达与胃癌预后的关系。**方法** 采用 Western blot 方法检测 134 例胃癌患者的胃癌组织和癌旁组织的 Survivin 蛋白相对表达量, 根据四分位法将 Survivin 蛋白表达划分为 q1、q2、q3 和 q4 四个区间, 采用 Log-rank 检验比较四个区间的 3 年累积生存率, 采用多因素 Logistics 回归模型分析影响预后的危险因素。**结果** Survivin 蛋白在胃癌组织和癌旁组织的相对表达量分别为 0.674 ± 0.047 和 0.193 ± 0.002 , 差异具有统计学意义 ($t = 9.125, P = 0.000$)。胃癌患者 q1、q2、q3 和 q4 四个区间 Survivin 蛋白相对表达量分别为 0.458 ± 0.026 、 0.621 ± 0.033 、 0.736 ± 0.038 、 0.831 ± 0.046 , 其 3 年累积生存率分别为 84.85%、67.65%、50.00% 和 39.39%, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 17.746, P = 0.000$)。多因素 Logistics 回归分析显示 TNM 分期 (III + IV)、淋巴结转移和肿瘤直径 (>5 cm) 是预后的独立危险因素 ($P < 0.05$), 以 q1 = 1, q2、q3 和 q4 的 OR 值分别为 0.782、0.518 和 0.389 (P 均 < 0.05), 表明 Survivin 蛋白与胃癌预后密切相关并呈表达量依赖性。**结论** Survivin 蛋白在胃癌组织中呈高表达, 并且与胃癌预后密切相关, 是预后的独立危险因素。

关键词: Survivin 蛋白; 凋亡抑制蛋白; 胃癌; 四分位法; 预后; 累积生存率

中图分类号: R 735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)09-1157-04

Relationship between survivin protein expression and prognosis in gastric cancer patients by quartile division method assessment

Zhao Gao-ping, Jia Gui-qing, Jiang Tao, Li Xiong, Lan Chun-bin, Hu yang, Wang Kang

Department of Gastrointestinal Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610072, China

Abstract: Objective To study the relationship between survivin protein expression and prognosis in patients with gastric cancer. **Methods** The gastric cancer tissues and paracancerous tissues samples from 134 patients with gastric cancer were collected. The quantitative Western blot was used to detect the survivin protein relative expression quantity in gastric cancer tissues and paracancerous tissues. The survivin protein expression quantities were divided into four intervals by quartile division method: q1, q2, q3 and q4. Log-rank test was used to compare patients' 3-year cumulative survival rates in the four intervals. Multiple factor logistic regression model was used to analyze the risk factors influencing prognosis. **Results** There was significant difference in survivin protein relative expression quantities in gastric cancer tissues and paracancerous tissues [(0.674 ± 0.047) vs (0.193 ± 0.002) , $t = 9.125, P = 0.000$]. The relative expression quantities of survivin protein in q1, q2, q3 and q4 intervals were 84.85%, 67.65%, 50.00%, 39.39%, respectively. Log-rank test showed that there was significant difference in patients' 3-year cumulative survival rates in q1, q2, q3, q4 intervals ($\chi^2 = 17.746, P = 0.000$). The multiple factors Logistics regression analysis showed that TNM staging (III + IV), lymph node metastases and tumor diameter (>5 cm) were the independent risk factors influencing prognosis (ORs: 0.658, 0.486, 0.586; all $P < 0.05$), and survivin protein was closely related to the prognosis of gastric cancer with expression quantity-dependent manner (by q1 = 1, OR q2, q3 q4: 0.782, 0.518, 0.389; all $P < 0.05$). **Conclusion** Survivin protein presents high-expression in gastric cancer tissues and is closely associated with the prognosis of gastric cancer. Survivin protein is the independent risk factor influencing prognosis.

Key words: Survivin protein; Inhibitor of apoptosis proteins; Gastric cancer; Quartile division method; Prognosis; Cumulative survival rate

细胞增殖和死亡的平衡是维持机体稳态的重要原因,细胞凋亡是机体重要的自稳机制,可以主动清除生物学功能异常的细胞,以保持正常的机体功能,避免潜在疾病的发生^[1-3]。Survivin 蛋白是凋亡抑制蛋白家族的成员之一,其表达于绝大多数恶性肿瘤组织,并且具有明显的特异性,故而在恶性肿瘤的诊断和预后中都具有一定的临床价值^[4-5]。近年来,陆续有文献报道 Survivin 蛋白与胃癌预后关系的研究^[6],但一般局限于采用免疫组化染色法对 Survivin 蛋白表达的定性结果与预后的关系研究,鲜有 Survivin 蛋白定量结果与预后关系的研究报道,本文将采用 Western blot 技术检测 Survivin 蛋白的相对表达量,并采用四分位数法探讨其与胃癌预后的关系。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 1 月至 2012 年 12 月四川省人民医院胃肠外科收治的胃癌患者 134 例,所有患者均经过临床病理组织检查证实为胃癌,保存有胃癌组织和癌旁组织(距离肿瘤病灶 > 5 cm),患者在留取标本检查前未进行放化疗等治疗。包括男性 74 例,女性 60 例,年龄 34 ~ 74 (56.61 ± 7.48) 岁, TNM 分期 I 期 22 例、II 期 35 例、III 期 58 例、IV 期 19 例;低分化 46 例、中分化 51 例、高分化 37 例;淋巴结远处转移 43 例、未转移 91 例;肿瘤直径 > 5 cm 48 例, ≤ 5 cm 86 例。

1.2 Survivin 蛋白检测方法 采用 Western blot 法对 Survivin 蛋白进行定量检测。剪碎标本,加入细胞裂解液 RIPA,离心后取上清,用蛋白质定量试剂盒(BAC)法测定蛋白质浓度。用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白质,分别加入稀释的兔抗人 Survivin 多克隆抗体和标记的驴抗兔二抗, PVDF 膜上显影,采用 Odyssey 分析软件进行条带灰度值的分析,并与其内参的灰度值进行比较。

1.3 Survivin 蛋白四分位区间的确定 将检测到的 Survivin 蛋白定量值按照从小到大顺序进行排列,根据公式 $Q1 = (n + 1) \times 25\%$ 、 $Q2 = (n + 1) \times 50\%$ 和 $Q3 = (n + 1) \times 75\%$ 确定四分位区间的 3 个临界点,其中 $n = 134$,各结果取整数部分,得出 Q1、Q2 和 Q3 分别为 33、67 和 101,划分为 4 个区间 q1、q2、q3 和 q4 的样本数分别为 33、34、34 和 33 例。

1.4 随访资料 所有患者均获得至少 3 年的随访(或随访至死亡),采用定期门诊复查、电话、E-mail 等方式进行随访,统计 3 年的生存率。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 12.0 统计学软件包对

结果进行分析处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;Survivin 蛋白定量分层方法采用四分位法;生存率曲线采用 Kaplan-Meier 法,生存率比较采用 Log-rank 检验;相关危险因素分析采用多因素 Logistics 回归分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

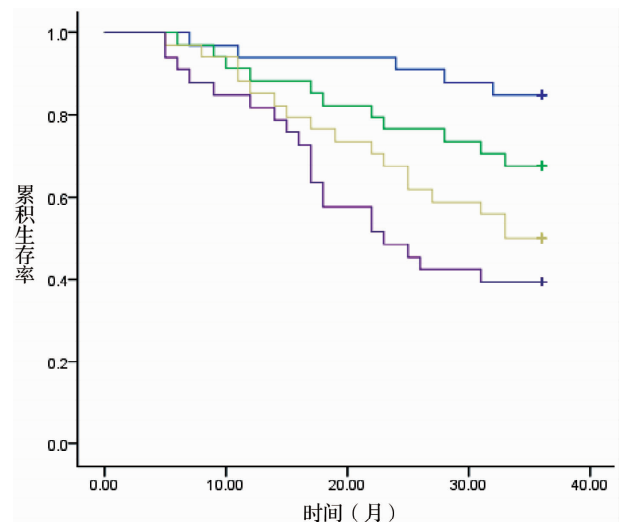
2.1 Survivin 蛋白在胃癌组织和癌旁组织的表达差异 Survivin 蛋白在胃癌组织和癌旁组织的表达量分别为 0.674 ± 0.047 和 0.193 ± 0.002 ,差异具有统计学意义($t = 9.125, P = 0.000$)。

2.2 Survivin 蛋白四分位区间的 Survivin 蛋白相对表达量及 3 年生存率比较 Survivin 蛋白表达 q1、q2、q3、q4 四个区间相对表达水平见表 1。q1、q2、q3 和 q4 四个区间的 3 年累积生存率分别为 84.85%、67.65%、50.00% 和 39.39%,经过 Log-rank 检验比较显示差异具有统计学意义($\chi^2 = 17.746, df = 3, P = 0.000$),四个区间的 3 年累积生存率 Kaplan-Meier 曲线图见图 1。

2.3 预后的多因素 Logistics 回归分析 以 3 年累积生存率作为因变量(Y),survivin 蛋白表达(q1 = 0, q1 = 1, q2 = 2, q3 = 3)、TNM 分期(I + II = 0, III + IV = 1)、淋巴结转移(无 = 0,有 = 1)、分化程度(中 + 低 = 0,高 = 1)和肿瘤直径(≤ 5 cm = 0, > 5 cm = 1)作为

表 1 Survivin 蛋白四分位区间的 3 年累积生存率比较

区间	例数	范围($\bar{x} \pm s$)	生存(例)	死亡(例)	生存率(%)
q1	33	0.318 ~ 0.518(0.458 ± 0.026)	28	5	84.85
q2	34	0.536 ~ 0.658(0.621 ± 0.033)	23	11	67.65
q3	34	0.663 ~ 0.759(0.736 ± 0.038)	17	17	50.00
q4	33	0.765 ~ 0.863(0.831 ± 0.046)	13	20	39.39



注:四条曲线由上到下依次为 q1、q2、q3 和 q4。

图 1 四个区间的 3 年累积生存率 Kaplan-Meier 曲线图

表 3 预后的多因素 Logistics 回归分析

相关因素	β	S. E.	OR	95% CI for OR	Wald χ^2 值	P 值
Survivin 蛋白表达						
q1	-	-	1	-	-	-
q2	-0.246	0.196	0.782	0.668 ~ 0.915	6.404	0.038
q3	-0.658	0.225	0.518	0.439 ~ 0.611	12.998	0.002
q4	-0.944	0.185	0.389	0.287 ~ 0.527	27.582	0.000
TNM 分期(Ⅲ + Ⅳ)	-0.419	0.174	0.658	0.497 ~ 0.871	13.839	0.000
淋巴结转移	-0.722	0.228	0.486	0.411 ~ 0.575	13.889	0.000
分化程度	-0.341	0.357	0.711	0.589 ~ 0.858	2.676	0.089
肿瘤直径(>5 cm)	-0.534	0.172	0.586	0.466 ~ 0.737	18.050	0.000

自变量(X),建立多因素 Logistics 回归模型。结果显示以 q1 = 1, q2、q3 和 q4 的 OR 分别为 0.782、0.518 和 0.389(P 均 < 0.05),表明 Survivin 蛋白与胃癌关系密切并呈表达量依赖性。此外 TNM 分期(Ⅲ + Ⅳ)、淋巴结转移和肿瘤直径(>5 cm)也是预后的独立危险因素($P < 0.05$),而分化程度与预后无关($P > 0.05$)。见表 3。

3 讨论

人类 Survivin 基因定位于 17q25 染色体,长度约 14.7 kb,包括 4 个外显子和 3 个内含子,与其他凋亡抑制蛋白家族成员不同,Survivin 蛋白 N 末端仅有一个 BIR 结构域,C 末端有一个长的 α 螺旋结构,前者具有抗凋亡作用,而后者则可能与纺锤体的微管蛋白发生作用,故而其具有抗凋亡和调控细胞周期的双重作用^[8-9]。所以 Survivin 蛋白抑制凋亡主要通过两方面来实现,一是通过 Caspase 途径,通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-5 的活性,二是通过促进细胞有丝分裂来实现抗凋亡^[10-11]。从而导致肿瘤细胞增殖增加,凋亡减少,诱导癌症的发生发展。近年来研究显示,Survivin 蛋白在胃癌中呈高表达,其阳性率在 40% ~ 65%^[12],并且国内外大多数研究也集中于对 Survivin 蛋白阳性结果与预后的关系研究,本文将采用 Western blot 定量检测 Survivin 蛋白,并采用四分位法分析不同表达量与预后的关系。

结果显示,Survivin 蛋白在胃癌组织和癌旁组织的相对表达量分别为 0.674 ± 0.047 和 0.193 ± 0.002 ,说明胃癌组织中 Survivin 蛋白呈高表达状态。通过四分位法将 Survivin 蛋白表达分为 q1、q2、q3 和 q4 四个区间,其相对表达量分别为 0.458 ± 0.026 、 0.621 ± 0.033 、 0.736 ± 0.038 和 0.831 ± 0.046 ,其 3 年的累积生存率分别为 84.85%、67.65%、50.00% 和 39.39%,差异显著,可见随着 Survivin 蛋白表达的增加,生存率逐渐下降,这相对于免疫组化染色阳性结果与预后的关系来说,其相互关系可能更为透彻。

进一步的 Logistics 回归分析显示,以 q1 作为基线进行对照,q2、q3 和 q4 的 OR 分别为 0.782、0.518 和 0.389,说明相对于 q1,q2、q3 和 q4 的 3 年累积生存率均明显下降,表明 Survivin 蛋白与胃癌预后密切相关,并且与 Survivin 蛋白的表达量呈依赖性。既往的 Meta 分析研究显示,通过免疫组化染色显示,Survivin 蛋白阳性表达的生存率明显低于阴性表达患者,并认为 Survivin 蛋白是胃癌预后的独立危险因子^[13]。

综上所述,Survivin 蛋白在胃癌组织中呈高表达,并且与胃癌预后密切相关,是预后的独立危险因素。但由于本研究采用 Survivin 蛋白定量四分位法来判断其与胃癌预后的关系,目前公开报道的此方面的临床研究尚不足,故需要进一步通过研究来证实 Survivin 蛋白定量与预后的关系。

参考文献

- [1] Wang TA, Zhang XD, Guo XY, et al. 3-bromopyruvate and sodium citrate target glycolysis, suppress survivin, and induce mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cells and inhibit gastric orthotopic transplantation tumor growth [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35 (3): 1287 - 1296.
- [2] Li C, Li J, Wu D, et al. The involvement of survivin in insulin-like growth factor 1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (1): 1091 - 1096.
- [3] Li Y, Zhou Y, Zheng J, et al. Downregulation of survivin inhibits proliferation and migration of human gastric carcinoma cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (2): 1731 - 1736.
- [4] Gu Y, Jin S, Wang F, et al. Clinicopathological significance of PI3K, Akt and survivin expression in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68 (4): 471 - 475.
- [5] Zhang J, Zhu Z, Sun Z, et al. Survivin gene expression increases gastric cancer cell lymphatic metastasis by upregulating vascular endothelial growth factor-C expression levels [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9 (2): 600 - 606.
- [6] Meng JR, Tang HZ, Zhou KZ, et al. TFF3 and survivin expressions associate with a lower survival rate in gastric cancer [J]. *Clin Exp Med*, 2013, 13 (4): 297 - 303.

移、肿瘤细胞的分化等影响 PHC 患者的预后。本研究的不足之处在于未能分析 HIF-1 α 以及 HuR 蛋白与 PHC 患者临床病理特征间的关系,具有一定的局限性。

综上所述,肝癌组织中 HuR 和 HIF-1 α 表达率异常增高,且与患者的无瘤生存时间密切相关。术后结合免疫组化分析病灶组织中的 HuR 和 HIF-1 α 表达情况,可为评估患者的术后无瘤生存时间以及临床预后提供参考。

参考文献

[1] 姚杨,苏杰,徐锐,等.水通道蛋白 1 与血管内皮生长因子在乙肝相关性肝癌中的表达及其意义[J].实用医学杂志,2015,31(19):3189-3192.

[2] 邓龙飞,丁晨虹,谢渭芬,等.PEP-1 介导的重组肝细胞核因子 4 α 蛋白转导对肝癌细胞的抑制作用[J].第二军医大学学报,2015,36(9):929-935.

[3] 张勇,孟凡迪,张靖垚,等.靶向下调 Cep55 表达水平对肝癌细胞增殖能力的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2016,37(1):45-48.

[4] 颜伟,刘安文,蔡婧,等.泛素特异性蛋白酶 18 在肝癌细胞中的表达及其对生物学活性的影响研究[J].中国全科医学,2015,18(33):4077-4083.

[5] Ramirez-Tagle R, Escobar CA, Romero V, et al. Chalcone-induced apoptosis through caspase-dependent intrinsic pathways in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2):260.

[6] 肖金成,李靖,黎海亮,等.重组人血管内皮抑素介入栓塞治疗对肝癌患者血清血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶含量的影响及其临床价值[J].中国现代医学杂志,2015,25(31):70-73.

[7] He X, Qu F, Zhou F, et al. High leukocyte mtDNA content contributes to poor prognosis through ROS-mediated immunosuppression in hepatocellular carcinoma patients [J]. Oncotarget, 2016, 7(16):22834-22845.

[8] 陈军泽,覃贵慧,骆敏,等.MMP-8 在不同转移潜能人肝癌细胞株的差异化表达及其对肝癌细胞迁移侵袭的影响[J].中国药理学通报,2015,31(7):1035-1036.

[9] Sai W, Wang L, Zheng W, et al. Abnormal expression of golgi protein 73 in clinical values and their role in HBV-related hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis [J]. Hepat Mon, 2015, 15(12):e32918.

[10] 解英俊,鄂长勇,盛基尧,等.沉默 Cdc42 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J].中华外科杂志,2015,53(12):957-962.

[11] 张文广,李传飞,刘敏,等.AQP9 过表达抑制肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠皮下移植瘤的生长及其作用机制的研究[J].肿瘤,2015,35(7):723-731.

[12] Kalaiselvan A, Anand T, Gokulakrishnan K, et al. Modulatory role of shorea robusta bark on glucose-metabolizing enzymes in diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11(Supple 3):S496-S500.

[13] Zhao J, Wu J, Cai H, et al. E3 ubiquitin ligase shiah-1 is down-regulated and fails to target natural HBx truncates for degradation in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer, 2016, 7(4):418-426.

[14] 王海燕,谢丛华.血管内皮细胞钙黏蛋白和血管内皮生长因子在肝癌中的表达及其对血管内皮细胞的影响[J].中华实验外科杂志,2015,32(12):3028-3031.

[15] 李红玲,李世波,智日增.原发性肝癌患者人高迁移率族蛋白 1 及肿瘤坏死因子样凋亡诱导因子的表达[J].中华实验外科杂志,2015,32(7):1712.

收稿日期:2016-04-10 修回日期:2016-06-09 编辑:王国品

(上接第 1159 页)

[7] Tong WW, Tong GH, Chen XX, et al. HIF2 α is associated with poor prognosis and affects the expression levels of survivin and cyclin D1 in gastric carcinoma [J]. Int J Oncol, 2015, 46(1):33-42.

[8] Weng Y, Fei B, Chi AL, et al. Inhibition of gastric cancer cell growth in vivo by overexpression of adeno-associated virus-mediated survivin mutant C84A [J]. Oncol Res, 2013, 20(9):411-417.

[9] Cao W, Fan R, Wang L, et al. Expression and regulatory function of miRNA-34a in targeting survivin in gastric cancer cells [J]. Tumour Biol, 2013, 34(2):963-971.

[10] Li SX, Chai L, Cai ZG, et al. Expression of survivin and caspase 3 in oral squamous cell carcinoma and peritumoral tissue [J]. Asian Pac J

Cancer Prev, 2012, 13(10):5027-5031.

[11] Liarmakopoulos E, Theodoropoulos G, Vaiopoulou A, et al. Effects of stromal cell-derived factor-1 and survivin gene polymorphisms on gastric cancer risk [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3):887-892.

[12] Sun XP, Dong X, Lin L, et al. Up-regulation of survivin by AKT and hypoxia-inducible factor 1 α contributes to cisplatin resistance in gastric cancer [J]. FEBS J, 2014, 281(1):115-128.

[13] Krieg A, Baseras B, Tomczak M, et al. Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric cancer: a meta-analysis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(9):5501-5511.

收稿日期:2016-06-20 修回日期:2016-07-18 编辑:王国品