

# Survivin 蛋白在喉癌组织中的表达及临床意义分析

陈阳静, 李宏慧, 赵瑞敏, 赵谦

西安交通大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 陕西 西安 710000

**摘要:** **目的** 探讨 Survivin 蛋白在喉鳞癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学法分别检测 2015 年 1 月至 2009 年 12 月收治的 50 例喉鳞癌患者鳞癌组织、癌旁组织、正常喉黏膜组织中 Survivin 的表达水平, 结合临床资料和随访资料分析其与临床病理特征的关系。**结果** 喉鳞癌组织中 Survivin 的表达显著高于癌旁组织和正常喉黏膜组织。在喉癌组织中, Survivin 的表达率在不同年龄、性别、原发部位中比较差异无统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ ); 在 TNM 不同分期及不同分化级别中表达率也相近 ( $P$  均  $>0.05$ )。反映 Survivin 表达强度的阳性指数 (IP) 分别随喉鳞癌 TNM 分期和分化级别的增高而上升, 差异均有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ )。Survivin 的表达率和表达张度在有无淋巴结转移与生存是否  $\geq 5$  年中比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论** Survivin 可作为临床诊断喉鳞癌的重要参考指标之一, 对判断喉鳞癌淋巴结转移及预后更具指导意义。

**关键词:** 喉癌; Survivin 蛋白; 表达; 淋巴结转移; 临床病理; 阳性指数

**中图分类号:** R 739.65 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)01-0072-03

喉癌是耳鼻喉科常见的恶性肿瘤之一, 在我国其发病率仅次于鼻咽癌, 且发病率有逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。喉癌的发生是多种内、外源性致瘤因素共同作用的结果。研究显示饮酒、吸烟、病毒感染、空气污染、职业因素、放射线、缺乏微量元素以及性激素紊乱等外源性因素, 以及癌基因的激活或抑癌基因失活、凋亡相关基因的异常表达等内源性因素均可导致喉癌的发生、发展<sup>[3-4]</sup>。因此, 凋亡相关基因的异常表达是喉癌发生机制研究中的重要环节。

Survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族成员之一, 属于凋亡抑制基因<sup>[5]</sup>。Survivin 作为一个潜在的靶分子, 在肿瘤的诊断、治疗、预后判断等方面具有重要的研究价值。目前, Survivin 与喉癌的发生、发展、转移以及预后是否相关存在争议, 林欣然、张美佳等<sup>[6-7]</sup>报道 Survivin 的高度表达与肿瘤的分期、分级呈正相关, 证实其与肿瘤的进展程度和增生程度密切相关; 而谢洪<sup>[8]</sup>报道在喉癌组织中 Survivin 过度表达与喉癌的发生部位、分级、分期、淋巴结转移均没有关联性。本研究采用免疫组织化学定性和半定量方法检测喉鳞癌组织中 Survivin 的表达, 探讨其与喉癌的发生、发展、转移以及预后的相关性, 为揭示 Survivin 蛋白的临床意义提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2005 年 1 月至 2009 年 12 月在我院病理证实为喉鳞癌的患者为本研究对象。癌组织取自肿瘤组织的中心部位, 同时取同一患者距肿瘤边缘 0.5 cm 以上的组织作为癌旁组织, 取距肿瘤边缘 2 cm 以上的组织作为正常对照组织 (镜检证实未发现癌细胞)。共计 50 例, 其中男性 42 例, 女性 8 例; 年龄 ( $55.00 \pm 8.27$ ) 岁。所有喉癌患者均为首次接受手术治疗, 术前均未接受化学治疗或者放射治疗。其中声门上型 15 例, 声门型 26 例, 声门下型 9 例。按照 1998 年国际抗癌协会发布的 UICC 喉癌 TNM 分期, 其中 I 期患者 15 例, II 期患者 12 例, III 期患者 13 例, IV 期患者 10 例。按照病理高、中、低分级, 其中高分化鳞癌 12 例, 中分化鳞癌 17 例, 低分化鳞癌 21 例。病理证实颈淋巴结转移者 17 例。

**1.2 主要试剂** 兔抗人 Survivin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 试剂盒、DAB 显色液均购自上海拜力生物科技有限公司。

**1.3 免疫组织化学法** 石蜡标本 4  $\mu\text{m}$  厚、连续切 5 张, 二甲苯脱蜡, 下行梯度酒精水化。蒸馏水漂洗 5 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 10 min, 蒸馏水冲洗 5 min, PBS 浸泡 5 min。每张切片滴加 1 滴封闭血清, 室温下孵育 5 min, PBS 浸泡 5 min。进行抗原微波热修复: 将切片放入盛有 EDTA 缓冲溶液的容器中, 持续加热 ( $92 \sim 98 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 ~ 15 min), 取出容器, 室温下冷却 30 min。PBS 冲洗

3 次,每次 3 min。滴加一抗工作液(1:100),4 °C 过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加辣根酶标记的二抗,37 °C 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加 2 滴 DAB 工作液显色 5 min。蒸馏水冲洗 5 min,苏木素复染,蒸馏水充分冲洗,上行梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.4 阳性结果判定 随机选取 5 个高倍视野(40 × 10),选定所测上皮的外周轮廓后进行自动分析,得出阳性反应面积及相应的灰度值、测定面积。按下列公式计算,阳性指数(PI) = 阳性灰度值 × 阳性反应面积/测定面积,取 5 次测定平均值,得出阳性表达的量化数据。PI 值越大,表明阳性表达强度越高。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 15.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,用单因素方差分析;计数资料用四格表  $\chi^2$  检验和 R × C 表  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Survivin 蛋白在喉癌组织中的表达 Survivin 蛋白染色主要定位在喉鳞癌细胞浆中,但也有部分蛋白染色定位在细胞核内。Survivin 在喉鳞癌组织中的阳性表达率为 80%,阴性表达率为 20%;Survivin 在癌旁组织中的表达阳性率为 30%,阴性表达率为 70%;Survivin 在正常喉黏膜组织中的阳性表达率为 0%,阴性表达率为 100%。Survivin 在喉鳞癌组织中的 PI 为  $100.9 \pm 12.4$  显著高于癌旁组织( $53.7 \pm 5.1$ )和正常喉黏膜组织(0)( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

2.2 Survivin 蛋白与喉鳞癌临床病理学特征的关系 在喉癌组织中,Survivin 的表达在不同年龄、性别、原发部位表达率比较差异无统计学意义;在 TNM 分期(I 期、II 期、III 期、IV 期)与高、中、低分化中的表达率比较差异也无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ),但表达强度比较差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。肿瘤分期越低,组织分化程度越高,IP 值越小;肿瘤分期越高,组织分化程度越低,IP 值越大。Survivin 在是否淋巴结转移与是否  $\geq 5$  年生存的表达率和表达强度比较差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1、2。

## 3 讨论

Survivin 基因是至今发现最强的凋亡抑制基因,定位于 17q25,靠近端粒,是由 4 个外显子和 3 个内含子组成,编码 142 个氨基酸,分子质量为 16 500<sup>[9-10]</sup>。Survivin 基因编码的蛋白具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双重功能<sup>[11]</sup>。Survivin 的分

布具有明显的组织、细胞选择性,主要分布于胚胎组织、分化未成熟的组织以及各种肿瘤组织内<sup>[12]</sup>。在人体内除胎盘及胸腺中有弱表达外,所有分化成熟

表 1 Survivin 的表达率与喉鳞癌临床病理数据的关系

项目	例数	阳性		阴性		P 值
		例	%	例	%	
年龄						
<55 岁	25	20	80.00	5	20.00	>0.05
$\geq 55$ 岁	25	21	84.00	4	16.00	
性别						
男	42	31	73.81	11	26.19	>0.05
女	8	6	75.00	2	25.00	
部位						
声门上型	26	20	76.92	6	23.08	>0.05
声门型	22	17	77.27	5	22.73	
声门下型	2	2	100.00	0	0	
分期						
I 期	12	7	58.33	5	41.67	>0.05
II 期	20	15	75.00	9	25.00	
III 期	10	8	80.00	4	20.00	
IV 期	8	7	87.50	3	12.50	
分级						
高分化	29	20	68.97	9	31.03	>0.05
中分化	10	8	80.00	2	20.00	
低分化	11	8	72.73	3	27.27	
淋巴结转移						
N0	33	20	60.61	13	39.39	<0.05
N1~3	17	16	94.12	1	5.88	
生存时间						
$\geq 5$ 年	34	28	82.35	6	17.65	<0.05
<5 年	16	8	50.00	8	50.00	

表 2 Survivin 的表达强度与喉鳞癌临床病理数据的关系

项目	例数	PI( $\bar{x} \pm s$ )	P 值
年龄			
<55 岁	25	97.1 ± 6.4	>0.05
$\geq 55$ 岁	25	94.0 ± 7.9	
性别			
男	42	98.3 ± 8.1	>0.05
女	8	97.9 ± 5.0	
部位			
声门上型	26	99.6 ± 9.5	>0.05
声门型	22	96.1 ± 8.2	
声门下型	2	97.3 ± 4.7	
分期			
I 期	12	75.8 ± 2.0	<0.05
II 期	20	88.3 ± 3.2	
III 期	10	100.4 ± 5.9	
IV 期	8	120.7 ± 6.7	
分级			
高分化	29	85.1 ± 5.0	<0.05
中分化	10	99.0 ± 4.7	
低分化	11	116.4 ± 3.2	
淋巴结转移			
N0	33	88.4 ± 6.7	<0.01
N1~3	17	118.3 ± 6.4	
生存时间			
$\geq 5$ 年	34	90.7 ± 5.9	<0.01
<5 年	16	124.0 ± 8.2	

的组织,包括心、肝、肺、脑、脾、胰、肾、外周血白细胞、淋巴结、骨骼肌中均无表达,这与其他凋亡抑制蛋白家族成员在正常人组织中广泛分布的特征有所不同,而 Survivin 在所有人类肿瘤中几乎都过表达,呈肿瘤细胞依赖性。至今已发现 Survivin 的过表达可在膀胱癌、食管癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、大细胞非霍奇金淋巴瘤、白血病、神经母细胞瘤、黑色素瘤、结肠癌、胃癌、肝癌、口腔癌、甲状腺癌、喉癌、肺癌、骨肉瘤、前列腺癌中出现<sup>[13-17]</sup>。本研究结果也证实喉鳞癌组织中 Survivin 过表达,而在正常喉黏膜组织中 Survivin 呈阴性表达,喉鳞癌癌旁组织中其表达的量介于两者之间,说明 Survivin 呈喉鳞癌组织依赖性表达。

本研究结果显示, Survivin 的表达与喉鳞癌患者的年龄和性别均无相关性,任何年龄以及男、女患者癌组织中 Survivin 的阳性表达率和表达强度均无差异。Survivin 的表达与喉鳞癌的原发部位也无相关性,原发部位在声门上、声门、声门下者 Survivin 的阳性表达率和表达强度均无差异。Survivin 的表达与临床分期、分级无必然相关性,因其 Survivin 阳性表达率无差异,也就是说, Survivin 的阳性表达不能作为判断肿瘤进展和分化程度的指标。但是, Survivin 的阳性表达强度却与临床分期、分级呈相关性,在 Survivin 阳性表达的癌组织中,肿瘤分期越低,组织分化程度越高, Survivin 表达强度越低;肿瘤分期越高,组织分化程度越低, Survivin 表达强度越高。Survivin 的表达与是否淋巴结转移及患者是否生存 $\geq 5$ 年密切相关,因其 Survivin 阳性表达率和表达强度均有显著性差异,故 Survivin 的阳性表达可作为判断肿瘤转移及判断预后的参考指标。

综上所述, Survivin 蛋白在喉鳞癌组织中过表达,其可作为临床诊断喉鳞癌的重要参考指标之一,对判断喉鳞癌淋巴结转移及预后更具指导意义。

## 参考文献

[1] 官亮,王雪峰,李里,等. 辽西地区 2002 ~ 2011 年喉癌发病趋势

分析[J]. 现代预防医学, 2013, 40(22): 4269 - 4272.

- [2] 卢善婷,魏矿荣,余炳辉,等. 中山市 1970 年 ~ 1999 年喉癌发病趋势分析[J]. 现代肿瘤医学, 2004, 12(2): 158 - 160.
- [3] 冯帅,郭星,王琰,等. 喉癌发病危险因素的病例对照研究[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(6): 474 - 475, 484.
- [4] 梁国祥,刘丽,蔡海燕. 喉癌病因分析[J]. 临床医学, 2011, 31(6): 98.
- [5] Lehner R, Enomoto T, McGregor JA, et al. Correlation of survivin mRNA detection with histologic diagnosis in non-male endometrium and endometrial carcinoma[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002, 81(2): 162 - 167.
- [6] 林欣然,张龙城,全超坤,等. 喉癌组织中 Survivin 和 PTEN 基因的表达及其临床意义[J]. 武汉大学学报(医学版), 2014, 35(2): 312 - 313, 317.
- [7] 张美佳,张爱华,万歆,等. 喉癌组织中 Survivin 和 caspase-7 的表达与相关性研究[J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(5): 110 - 111.
- [8] 谢洪. 凋亡抑制基因 Survivin 在喉癌中的表达及与 caspase-3, p53, cyclin E 及 ki-67 之间的关系[D]. 北京:中国协和医科大学, 2005: 20 - 31.
- [9] Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: a molecular biomarker in cancer[J]. Indian J Med Res, 2015, 141(4): 389 - 397.
- [10] Altieri DC. Survivin-The inconvenient IAP[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 39: 91 - 96.
- [11] 周明利,张树友. Survivin 基因在肿瘤中的作用研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(7): 779 - 782.
- [12] 赵祯,匡安仁. 凋亡抑制蛋白 Survivin 研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(24): 4761 - 4764.
- [13] 张淑群,强水云,杨文彬,等. Survivin 蛋白在乳腺癌发生、发展不同阶段的表达及意义[J]. 癌症, 2004, 23(6): 697 - 700.
- [14] Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer[J]. Prog Cell Cycle Researh, 2003, 5: 447 - 452.
- [15] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression in early stage non-small cell lung cancer[J]. J Pathol, 2003, 200(5): 620 - 626.
- [16] 王建伟,孙立江. Survivin 在肾细胞癌患者手术前后外周血中的变化[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(11): 1788 - 1789.
- [17] 谢平,白帆,张杰,等. HPV16/18DNA、Bcl-2、Survivin mRNA 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国临床研究, 2015, 28(3): 293 - 297.

收稿日期: 2015 - 08 - 10 修回日期: 2015 - 08 - 20 编辑: 周永彬