

· 论 著 ·

## Survivin 及 E-cadherin 在子宫腺肌病中的表达及相关性

夏红蕾<sup>1</sup>, 冯颖<sup>2</sup>, 安自珍<sup>1</sup>, 贾渊雯<sup>1</sup>, 谢佳成<sup>1</sup>

1. 兰州市妇幼保健院病理科, 甘肃 兰州 730030; 2. 兰州大学第一医院病理科, 甘肃 兰州 730000

**摘要:** **目的** 观察凋亡抑制基因生存素(Survivin)和 E-钙粘附素(E-cadherin)在子宫腺肌病的表达及其相关性。**方法** 以兰州市妇幼保健院 2013 年 5 月至 2014 年 3 月 68 例子宫病变患者为研究对象应用免疫组化 EnVision 二步法,检测 38 例子宫腺肌病病灶及在位内膜组织中 Survivin 及 E-cadherin 蛋白的表达,并与 30 例无症状肌瘤患者的正常子宫内膜组织进行对照;应用 Western blot 法检测 Survivin 及 E-cadherin 在子宫腺肌病病灶与正常内膜的表达。统计学分析以  $\alpha = 0.05$  为检验水准,当采用  $R \times C$  表  $\chi^2$  检验的分割法时,检验水准调整为  $\alpha' = 0.0125$ 。**结果** 子宫腺肌病病灶组织中, Survivin 蛋白的阳性表达率(89.47%)明显高于在位内膜(55.26%)及正常内膜(6.67%,  $P$  均  $< 0.0125$ )。腺肌病病灶组织中 E-cadherin 蛋白阳性表达率(47.37%)明显低于在位内膜(71.05%)及正常内膜(96.67%,  $P$  均  $< 0.0125$ )。腺肌病病灶中 Survivin 和 E-cadherin 表达呈线性负相关( $r = -0.988, P < 0.01$ ); Western blot 结果显示 Survivin 蛋白在腺肌病病灶的相对表达量明显高于正常内膜, E-cadherin 在腺肌病病灶的相对表达量明显低于正常内膜。**结论** Survivin 及 E-cadherin 可能与子宫腺肌病的发生、发展有关。

**关键词:** 子宫腺肌病; 生存素; E-钙粘附素; 子宫内膜; 免疫组化; 蛋白印迹法

**中图分类号:** R 711.74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)10-1311-04

## Expressions and its correlation of Survivin and E-cadherin proteins in adenomyosis

XIA Hong-lei\*, FENG Ying, AN Zi-zhen, JIA Yuan-wen, XIE Jia-cheng

\* Department of Pathology, Lanzhou Maternal and Child Health Care Hospital, Lanzhou, Gansu 730030, China

**Abstract: Objective** To study the expressions of apoptosis-inhibited gene Survivin and E-cadherin in adenomyosis and its correlation. **Methods** Immunohistochemical EnVision two step method was used to detect the expressions of Survivin and E-cadherin proteins in ectopic foci and in place endometrial tissues of 38 adenomyosis patients and compared with normal endometrial tissues of 30 asymptomatic myoma patients. Western blot method was used to detect the expressions of Survivin and E-cadherin proteins in ectopic foci and normal endometrial tissues. The criterion for statistical test was defined as  $\alpha = 0.05$ , when using  $R \times C$  table-partitioning chi-square test, the criterion was adjusted for  $\alpha' = 0.0125$ . **Results** The positive expression rate of Survivin protein in ectopic foci of adenomyosis (89.47%) was significantly higher than those in place endometrial tissues of adenomyosis (55.26%) and normal endometrial tissues (6.67%, all  $P < 0.0125$ ). The positive expression rate of E-cadherin protein in ectopic foci of adenomyosis (47.37%) was significantly lower than those in place endometrial tissues of adenomyosis (71.05%) and normal endometrial tissues (96.67%, all  $P < 0.0125$ ). In the foci of adenomyosis, the expressions of Survivin and E-cadherin presented linear negative correlation ( $r = -0.988, P < 0.01$ ). Western blot showed that the relative expression level of Survivin protein in ectopic foci was significantly more than that in normal endometrial tissues, and the relative expression level of E-cadherin protein in ectopic foci was significantly less than that in normal endometrial tissues. **Conclusion** Survivin and E-cadherin may be related to the occurrence and development of adenomyosis.

**Key word:** Adenomyosis; Survivin; E-cadherin; Endometrium; Immunohistochemistry; Western blot method

子宫腺肌病是育龄妇女的常见病、多发病,临床上主要表现为痛经、不孕、不育。子宫腺肌病是一种良性疾病,却具有种植、浸润、转移、复发等恶性生物

学行为。其发病机制尚不明确。目前研究证实,生存素(Survivin)和 E-钙粘附素(E-cadherin)都与恶性肿瘤的发生、发展有关。本研究应用免疫组化法和蛋白

印迹法,检测 Survivin 和 E-cadherin 在子宫腺肌病组织中的表达,并探讨其意义。

## 1 资料与方法

1.1 标本来源 收集兰州市妇幼保健院病理科 2013 年 5 月至 2014 年 3 月 68 例行全子宫切除、病历资料完整的患者的存档蜡块为研究对象。腺肌病组 38 例为研究组,年龄 33~48 岁,平均 42 岁;增殖期 22 例,分泌期 16 例。无症状肌瘤组 30 例为对照组,年龄 35~47 岁,平均 44 岁;增殖期 16 例,分泌期 14 例。所有病例的诊断均由两名以上专科病理医师诊断无异议后确定。所有患者术前 3 个月未服用任何激素类药物。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法 所有标本均经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,常规 4  $\mu\text{m}$  厚连续切片,HE 和免疫组织化学(EnVision 二步法)染色,所选抗体 Survivin, E-cadherin,均为工作液,购于福建迈新生物技术。所有步骤严格按说明书操作。用已知 Survivin 和 E-cadherin 表达阳性的卵巢癌作阳性对照,用 PBS 代替抗体为阴性对照。

1.2.2 免疫印迹试验(Western blot) 选取腺肌病患者异位内膜、在位内膜的新鲜组织、对照组正常对照内膜的新鲜组织, -80 $^{\circ}\text{C}$  冻存组织,进行分离,匀浆,裂解,离心及蛋白质定量,随后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹检测。使用 ImageJ1.38x 凝胶成像系统检测各条带的灰度值,并用相对灰度值(目的条带灰度值/同一样品  $\beta$ -actin 条带灰度值)反映目的蛋白的表达水平。

1.3 结果判定 Survivin 以细胞质或核内出现棕黄色颗粒视为阳性结果, E-cadherin 以细胞膜出现棕黄色染色视为阳性结果。随机观察 10 个高倍镜视野,按每高倍镜视野阳性细胞数百分比分为(-):阳性细胞数 $\leq 5\%$ ; (+): $5\% <$  阳性细胞数 $\leq 25\%$ ; ( + + ):

$25\% <$  阳性细胞数 $\leq 50\%$ ; ( + + + ): 阳性细胞数 $> 50\%$ 。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。腺肌病异位内膜、在位内膜和正常内膜三组率的比较用  $R \times C$  表的  $\chi^2$  检验及其分割法;各组分泌期与增殖期的比较,采用 Fisher 确切概率法。相关性采用 Spearman 等级相关分析。以  $\alpha = 0.05$  为检验水准,当采用  $\chi^2$  检验分割法时,检验水准调整为  $\alpha' = 0.0125$ 。

## 2 结果

2.1 免疫组化结果 Survivin 蛋白在正常对照内膜腺上皮细胞胞质呈微弱棕色颗粒样表达,在腺肌病病灶和在位内膜腺上皮细胞胞质呈中、强度表达(图 1)。Survivin 蛋白在腺肌病病灶的表达显著高于在位内膜( $P < 0.0125$ );在腺肌病病灶和在位内膜的表达均显著高于正常内膜( $P$  均  $< 0.0125$ )。见表 1。在正常子宫内膜中, E-cadherin 蛋白主要分布在腺上皮细胞的胞膜,呈环状表达(图 2)。腺肌病病灶和在位内膜 E-cadherin 的表达均显示增殖期明显低于分泌期( $P$  均  $< 0.05$ );腺肌病病灶 E-cadherin 的表达明显低于在位内膜( $P < 0.0125$ );腺肌病病灶和在位内膜表达强度明显弱于正常内膜( $P$  均  $< 0.0125$ )。见表 2。

2.2 Western blot 结果 以  $\beta$ -actin 为内参, Survivin 蛋白在腺肌病病灶的表达明显高于正常内膜, E-cadherin 蛋白在腺肌病病灶的表达明显低于正常内膜。见图 3。相对灰度值  $\beta$ -actin 为 15 790, E-cadherin 腺肌病病灶为 8 324, 正常内膜为 13 170; Survivin 腺肌病病灶内膜为 6 569, Survivin 正常内膜为 2 722。

2.3 Survivin 和 E-cadherin 蛋白表达的相关性分析 等级相关分析显示,研究组腺肌病病灶中 Survivin 蛋白和 E-cadherin 蛋白的表达呈线性负相关( $r = -0.988, P < 0.01$ )。

表 1 Survivin 在增殖期和分泌期的表达

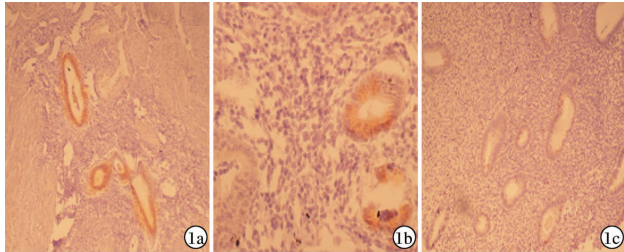
| 组别  | 标本    | 分期  | 例数 | Survivin 表达(例) |   |    |     | 阳性率(%)              | 总体阳性率(%)            |
|-----|-------|-----|----|----------------|---|----|-----|---------------------|---------------------|
|     |       |     |    | -              | + | ++ | +++ |                     |                     |
| 研究组 | 腺肌病病灶 | 增殖期 | 22 | 3              | 6 | 7  | 6   | 86.36 <sup>①②</sup> | 89.47 <sup>①②</sup> |
|     |       | 分泌期 | 16 | 1              | 4 | 4  | 7   | 93.75               |                     |
|     | 在位内膜  | 增殖期 | 22 | 10             | 4 | 5  | 3   | 54.55 <sup>②</sup>  | 55.26 <sup>②</sup>  |
|     |       | 分泌期 | 16 | 7              | 5 | 2  | 2   | 56.25               |                     |
| 对照组 | 正常内膜  | 增殖期 | 16 | 15             | 1 | 0  | 0   | 6.25                | 6.67                |
|     |       | 分泌期 | 14 | 13             | 1 | 0  | 0   | 7.14                |                     |

注:与在位内膜比较,<sup>①</sup> $P < 0.0125$ ;与正常内膜比较,<sup>②</sup> $P < 0.0125$ 。

表 2 E-cadherin 在增殖期和分泌期的表达

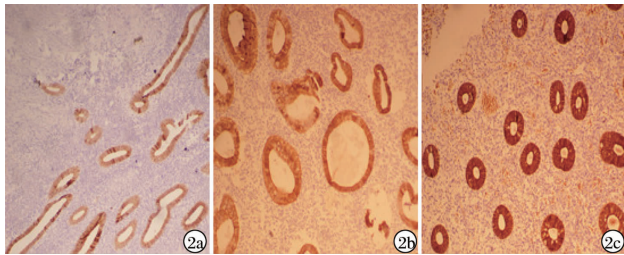
| 组别  | 标本    | 分期  | 例数 | E-cadherin 表达(例) |   |    |     | 阳性率(%)              | 总体阳性率(%)            |
|-----|-------|-----|----|------------------|---|----|-----|---------------------|---------------------|
|     |       |     |    | -                | + | ++ | +++ |                     |                     |
| 研究组 | 腺肌病病灶 | 增殖期 | 22 | 15               | 3 | 2  | 2   | 31.82 <sup>①②</sup> | 47.37 <sup>②③</sup> |
|     |       | 分泌期 | 16 | 5                | 4 | 5  | 2   | 68.75               |                     |
|     | 在位内膜  | 增殖期 | 22 | 9                | 5 | 4  | 4   | 59.09 <sup>①②</sup> | 71.05 <sup>②</sup>  |
|     |       | 分泌期 | 16 | 2                | 5 | 6  | 3   | 87.50               |                     |
| 对照组 | 正常内膜  | 增殖期 | 16 | 1                | 6 | 5  | 4   | 93.75               | 96.67               |
|     |       | 分泌期 | 14 | 0                | 4 | 5  | 5   | 100.00              |                     |

注:与同组分泌期比较;<sup>①</sup> $P < 0.05$ ;与正常内膜比较,<sup>②</sup> $P < 0.0125$ ;与在位内膜比较,<sup>③</sup> $P < 0.0125$ 。



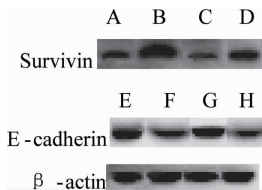
注:1a:腺肌病病灶;1b:腺肌病在位内膜;1c:正常内膜。

图 1 Survivin 在三种组织中的表达(EnVision 法, ×100)



注:2a:腺肌病病灶;2b:腺肌病在位内膜;2c:正常内膜。

图 2 E-cadherin 在三种组织中的表达(EnVision 法, ×100)



注:A、C、E、G 为正常内膜;B、D、F、H 为腺肌病病灶。

图 3 Western blot 法检测腺肌病病灶和正常内膜 Survivin 及 E-cadherin 的表达情况

### 3 讨论

Survivin 基因是 1997 年 Ambrosini 等<sup>[1]</sup>利用效应细胞蛋白酶受体-1(ERP-1)cDNA 筛选克隆出的一种凋亡抑制基因。Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins,IAP)家族的新成员,是目前发现最强的凋亡抑制因子。Survivin 位于 17q25 染色体上,与细胞分裂、增生有关。Survivin 主要分布于胚胎及分化不成熟的组织中,在正常成人分化成熟组织一般不表达<sup>[2]</sup>。研究表明 Survivin 在许多恶性肿瘤组织中过度表达<sup>[3]</sup>。陈阳静等<sup>[4]</sup>对 50 例喉鳞癌患者研究得出,Survivin 在喉鳞癌组织中过表达,在正常喉黏膜组织阴性表达,在癌旁组织表达介于两者之间,说

明 Survivin 的表达呈肿瘤细胞依赖性。汤森等<sup>[5]</sup>采用免疫组化 SP 法检测 Survivin 在子宫腺肌病中的表达发现:腺肌病中异位内膜 Survivin 高表达。唐利等<sup>[6]</sup>研究得出异位组、在位组的 Survivin 表达均明显高于对照组。本研究采用免疫组化 EnVision 法,腺肌病病灶 Survivin 蛋白阳性表达率 89.47%,在位内膜表达率 55.26%,均明显高于正常在位内膜的表达率(6.67%),这一结果与以上研究结论一致。Western blot 检测结果也得出同样的结论。异位内膜细胞凋亡抑制作用增强,细胞存活期延长,细胞死亡与增生失衡,过度的增生使增生性疾病发生。由此推测,Survivin 引起的凋亡抑制可能是腺肌病发生的一个因素。

E-cadherin 是钙黏附蛋白分子家族中跨膜蛋白亚型的一种,主要存在于人和动物的上皮细胞,对维持上皮细胞的形态和结构完整性起着重要作用。人的 E-cadherin 编码基因定位于 16 号染色体。当其表达下降或缺失时,使同种细胞无法相互粘连,进一步使细胞易于分散而向外周浸润,可导致肿瘤细胞侵袭性生长与转移,这已在许多恶性肿瘤的研究中得到证实<sup>[7]</sup>。华金莲<sup>[8]</sup>和王秀伟<sup>[9]</sup>的研究结果显示,E-cadherin 在子宫腺肌病患者在位内膜和异位内膜的表达均高于正常内膜,且异位内膜又显著高于在位内膜。而本研究免疫组化法和 Western blot 实验结果均与之相反:E-cadherin 在异位病灶的表达明显低于在位内膜和对照内膜,这一结果与国内其他学者的相关研究<sup>[10-11]</sup>结果一致。E-cadherin 表达下调,使子宫内膜上皮细胞之间粘附性降低,易于从在位解离,种植于肌层形成腺肌病病灶,提示腺肌病的发生发展可能与 E-cadherin 的异常表达有关。

研究发现,在肝硬化、肝癌和胃癌中,E-cadherin 和 Survivin 的表达呈负相关性<sup>[12-13]</sup>,关于子宫腺肌病中 E-cadherin 和 Survivin 的相关性,国内外尚未见报道。本研究结果显示,38 例 E-cadherin 和 Survivin 在子宫腺肌病病灶表达呈负相关,提示腺肌病发生发展过程中二者可能存在一定关系。推测 E-cadherin 低表达或缺失使内膜上皮细胞粘附性降低,细胞游走

性增强,而 Survivin 促进细胞增殖存活,从而形成新的病灶,使腺肌病发生发展。

#### 参考文献

- [1] Ambrosini G, Adidia C, Altieri DC. A novel Anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in Cancer and Lymphoma [J]. *Nature Med*, 1997, 3(8):917-921.
- [2] Li E. Role of Survivin and its splice variants in tumori - genesis [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(2):212-216.
- [3] Wu J, Zhao S, Zhang J, et al. Over-expression of survivin is a factor responsible for differential responses of ovarian cancer cells to S-allylmercaptocysteine (SAMC) [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 100(2):294-302.
- [4] 陈阳静,李宏慧,赵瑞敏,等. Survivin 蛋白在喉癌组织中的表达及临床意义分析 [J]. *中国临床研究*, 2016, 29(1):72-74.
- [5] 汤淼,王敏. 生存素在子宫腺肌病异位病灶中的表达及其意义 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2007, 3(8):213-215.
- [6] 唐利,龙玉芬,李燕,等. Survivin 与 Smac 在子宫腺肌病中的表达及意义 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(20):3320-3322.

- [7] 王爽,吕丽春,周伟,等. 转录因子 snail 及黏附分子 E-cadherin 在鼻咽癌中的表达 [J]. *广东医学杂志*, 2011, 31(7):845-847.
- [8] 华金莲,王秀伟. 子宫腺肌病患者在位及异位内膜中 E-cadherin 的表达及意义 [J]. *山东医药*, 2008, 48(18):69-70.
- [9] 王秀伟. 子宫腺肌病患者上皮型钙粘附因子、诱生型一氧化氮合酶表达的研究 [D]. 济南:山东大学, 2004.
- [10] 余星,陈雄,黄娟. 子宫内位异位性疾病患者子宫内位组织 EGFR 和 EMT 相关蛋白表达及意义 [J]. *山东医药*, 2015, 55(44):18-20.
- [11] 龚青. E-cadherin、Snail 在子宫腺肌病中的表达及意义初步研究 [D]. 武汉:华中科技大学, 2012.
- [12] Peroukides S, Bravou V, Alexopoulos A, et al. Survivin overexpression in HCC and liver cirrhosis differentially correlates with p-STAT<sub>3</sub> and E-cadherin [J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(3):299-307.
- [13] 熊萍香,周玉平,熊江琴,等. 血吸虫病患者不同胃黏膜病变中 Survivin、p53、E-cadherin 蛋白表达及临床意义 [J]. *实用临床医学*, 2015, 16(3):15-18.

收稿日期:2016-06-15 修回日期:2016-07-14 编辑:石嘉莹

(上接第 1310 页)

#### 参考文献

- [1] 杨念念,严亚琼,龚洁,等. 中国 2003~2007 年卵巢癌发病与死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(6):401-405.
- [2] Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, et al. Ovarian cancer [J]. *Lancet*, 2014, 384(9951):1376-1388.
- [3] Sammut SJ, Feichtinger J, Stuart N, et al. A novel cohort of cancer-testis biomarker genes revealed through meta-analysis of clinical data sets [J]. *Oncoscience*, 2014, 1(5):349-359.
- [4] 黄巍,范蓉. 癌-睾丸抗原与卵巢癌 [J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(21):3053-3055.
- [5] Straughn JM Jr, Shaw DR, Guerrero A, et al. Expression of sperm protein 17 (Sp17) in ovarian cancer [J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(6):805-811.
- [6] Garg M, Chaurasiya D, Rana R, et al. Sperm-associated antigen 9, a novel cancer testis antigen, is a potential target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5):1421-1428.
- [7] 陆嵘,房静远. 表观遗传修饰与肿瘤 [J]. *生命科学*, 2006, 18(1):10-14.

- [8] 刘运强,张思仲. 癌/睾丸抗原基因研究进展 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(3):S80-S82.
- [9] Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, et al. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel subcategory, cancer/testis/stem gene [J]. *Tissue Antigens*, 2013, 81(6):428-434.
- [10] Yang P, Huo Z, Liao H, et al. Cancer/testis antigens trigger epithelial-mesenchymal transition and genesis of cancer stem-like cells [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(10):1292-1300.
- [11] Odunsi K, Matsuzaki J, James SR, et al. Epigenetic potentiation of NY-ESO-1 vaccine therapy in human ovarian cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(1):37-49.
- [12] Yawata T, Maeda Y, Okiku M, et al. Identification and functional characterization of glioma-specific promoters and their application in suicide gene therapy [J]. *J Neurooncol*, 2011, 104(2):497-507.
- [13] Kanojia D, Garg M, Gupta S, et al. Sperm-associated antigen 9 is a novel biomarker for colorectal cancer and is involved in tumor growth and tumorigenicity [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(3):1009-1020.

收稿日期:2016-06-26 修回日期:2016-07-10 编辑:石嘉莹