· 临床研究 ·

生存素和 PEDF 蛋白在食管癌中的表达及临床意义

李 牧, 李安桂, 王 玮

(桂林医学院附属医院心胸外科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨生存素(Survivin)和色素上皮衍生因子(PEDF)在食管癌组织中的表达及其临床意义。方法 利用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学法检测 86 例食管癌组织、6 例正常组织及 6 例炎症组织中 Survivin 和 PEDF 蛋白的表达。结果 食管癌组织中 Survivin 和 PEDF 蛋白的阳性表达率均显著高于正常组织($P < 0.05$)。食管癌中 Survivin 与 PEDF 蛋白的表达与肿瘤 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移有关,而与患者的年龄、性别无关。86 例食管癌组织中 Survivin 和 PEDF 蛋白的表达呈显著负相关($r = -0.353, P = 0.003$)。结论 Survivin 与 PEDF 蛋白在肿瘤的生成中具有拮抗作用,二者同时检测对判断食管癌的恶性程度及其预后具有重要意义。

关键词:食管肿瘤;免疫组织化学;生存素;色素上皮衍生因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)01-0031-02

Expressions of Survivin and PEDF protein in esophageal neoplasms tissue and its clinical significance

Li Mu, Li Angui, Wang Wei

(Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To explore expression of Survivin and pigment epithelium-derived factor(PEDF) in esophageal carcinoma tissue and its clinical significance. **Methods** Streptavidin-peroxidase immunohistochemistry method was employed to detect Survivin and PEDF protein expression in 86 cases of esophageal carcinoma tissue, 6 cases of normal and inflammation tissue. **Results** The positive rates of Survivin and PEDF protein expression in esophageal carcinoma tissue were significant higher than those in normal tissue($P < 0.05$). Survivin and PEDF protein expression in esophageal carcinoma tissue were related to TNM staging, tumor differentiation and lymph node metastasis, and showed no correlation with age and gender of patients. There was a negative correlation between Survivin and PEDF protein expression in 86 cases of esophageal carcinoma tissue($r = -0.353, P = 0.003$). **Conclusion** Survivin and PEDF protein have antagonistic role in tumor formation, and their co-detection can be of great importance for estimation of malignant degree and prognosis of esophageal carcinoma.

Key words: esophageal neoplasms; immunohistochemistry; surviving; pigment epithelium-derived factor

肿瘤的发生是一个多因素、多步骤、复杂的病理过程。凋亡调节机制的紊乱、肿瘤新生血管的生成会导致肿瘤的发生。生存素(Survivin)作为凋亡抑制蛋白(inhibition of apoptosis protein, IAP)家族中的一员,被认为是目前活性最强的抗凋亡因子,在肿瘤的凋亡调节中起着重要的作用^[1]。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是近年来发现的人体内重要的血管增生抑制因子,具有抑制肿瘤血管生成,促进肿瘤细胞分化、凋亡以及抑制肿瘤细胞侵袭、转移的作用^[2]。目前同时探讨食管癌组织中 Survivin 和 PEDF 蛋白表达及其相关性的报道少见。本研究采用高通量组织芯片,利用免疫组织化学技术检测食管癌组织、炎症组织及正常组织中 Survivin 和 PEDF 蛋白的表达,并分析其相关性和临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 98 例标本组织均选自桂林医学院附属医院 2006 年 1 月至 2008 年 6 月手术切除标本的存档蜡块。所有标本均经 10% 甲醛溶液固定及石蜡包埋,苏木素-伊红(hematoxylineosin, HE)染色的切片均经 2 位副高级职称及以上的病理专家确诊为食管鳞癌组织及距癌灶边缘 3 cm 以上的正常黏膜组织。上述标本包括 86 例不同类型食管癌组织(其中,鳞状细胞癌 81 例,腺癌 5 例)、6 例正常组织及 6 例确诊为慢性食管炎的组织。食管癌患者中男 78 例,女 8 例;年龄 26~

77 岁,中位 55 岁;患者术前均未接受化学疗法、放射疗法及其他免疫治疗;有淋巴结转移 29 例,无淋巴结转移 57 例;肿瘤分化程度:I 级 10 例,II 级 23 例,III 级 53 例。

1.2 主要试剂 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)免疫组织化学方法进行检测。兔抗人 Survivin 单克隆抗体、鼠抗人 PEDF 单克隆抗体及 SP 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,第二抗体购自美国 Pierce 公司。

1.3 PEDF 和 Survivin 蛋白的 SP 免疫组织化学检测 将标本蜡块切成 4 μm 厚的石蜡切片,依次进行二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化;加入 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液,于高压锅内加压至 0.142 Mpa,高温抗原修复;然后,根据 SP 试剂盒说明书进行免疫组织化学法染色。第一抗体工作浓度均为 1:100。用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)代替第一抗体作为阴性对照,已知阳性的乳腺浸润性导管癌组织作为阳性对照。

1.4 结果判断 Survivin 蛋白以细胞质和(或)细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性染色,根据肿瘤细胞染色的程度作为判断标准:(-)表示没有观察到阳性细胞,(+)表示细胞质染色为均匀浅黄色或浅棕色的阳性细胞数不大于 5%,(++)表示细胞质染色成棕色的阳性细胞数大于 25%;在本研究中,将阳性细

胞数超过 25% 的作为高表达, ≤25% 为低表达。PEDF 以细胞质和(或)细胞膜中出现棕黄色颗粒为阳性染色, 细胞染色程度的判定同 Survivin。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。组间频数之间的显著性检验采用 χ^2 检验, 不同蛋白质在食管癌组织中表达的相关性采用 Spearman 等级相关法进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 食管癌组织、正常组织及炎症组织中 Survivin 和 PEDF 蛋白的表达 Survivin 蛋白在食管癌组织、正常组织及炎症组织中的表达阳性率分别为 62.8% (54/86) 和 16.7% (1/6), 二者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PEDF 蛋白在食管癌组织、正常组织及炎症组织中的表达阳性率分别为 44.2% (38/86) 和 0.0% (0/6), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 Survivin、PEDF 蛋白表达与食管癌患者临床病理特征的关系 Survivin、PEDF 蛋白表达与食管癌临床病理特征的相关性分析见表 1。Survivin、PEDF 蛋白在食管癌组织中的表达与患者性别、年龄无关。Survivin、PEDF 蛋白表达与肿瘤 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移有关。

表 1 Survivin、PEDF 蛋白表达与食管癌患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Survivin[n(%)]	P	PEDF[n(%)]	P
性别			>0.05		>0.05
男	78	50(64.1)		32(41.0)	
女	8	5(62.5)		3(37.5)	
年龄(岁)			>0.05		>0.05
>55	61	38(62.3)		27(44.3)	
≤55	25	16(64.0)		11(44.0)	
TNM 分期			<0.05		<0.05
I~II	40	18(45.0)		28(70.0)	
III~IV	46	36(78.3)		10(21.7)	
分化程度			<0.05		<0.05
I、II 级	33	10(30.3)		24(72.7)	
III 级	53	44(83.0)		14(26.4)	
淋巴结转移			<0.05		<0.05
有	29	24(82.8)		5(17.2)	
无	57	30(52.6)		33(42.9)	

2.3 食管癌组织芯片中 Survivin 和 PEDF 蛋白表达的相关性分析 Survivin 和 PEDF 蛋白在食管癌组织中共为阳性表达或共为阴性表达的占 20.9% (18/86), 其中 32 例 Survivin 蛋白阴性表达的组织中有 26 例 PEDF 蛋白呈阳性表达, 54 例 Survivin 蛋白阳性表达的组织中有 12 例 PEDF 蛋白呈阳性表达, 见表 2。用 Spearman 等级相关法进行统计学检验, 结果表明二者呈负相关 ($r = -0.353, P = 0.003$)。此外, Survivin 和 PEDF 蛋白同时呈阳性表达的患者共 12 例, 提示肿瘤恶性程度增加时, Survivin 蛋白表达增加, 而 PEDF 蛋白的表达减少。

表 2 食管癌组织中 Survivin 与 PEDF 蛋白表达的关系

蛋白	PEDF(+)	PEDF(-)	合计
Survivin(+)	12	42	54
Survivin(-)	26	6	32
合计	38	48	86

3 讨 论

在有机体内, 细胞凋亡与细胞增殖之间的动态平衡是维持

机体稳态的重要方式, 二者的失衡是导致肿瘤发生的基础。Survivin 作为 IAP 家族的一员, 是至今发现的最强的凋亡抑制因子, 它既可以通过半胱-天冬氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate specific protease, Caspase)细胞凋亡信号通路来阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程^[3], 还可以通过与细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)形成复合体, 使 P21 从 CDK4 复合体中释放出来并与线粒体 Caspase-23 结合, 抑制 Caspase-23 活性, 阻止细胞凋亡^[4]。由此可见, Survivin 在细胞凋亡的调节过程中发挥关键性作用。现有的研究表明, Survivin 在胎儿及许多恶性肿瘤(如结肠癌、胃癌、肺癌、胰腺癌等)中呈高表达, 而在正常组织中低表达, 甚至不表达, 而陈轩等^[5]的研究也说明了这一点。由于它在肿瘤细胞中表达的特异性及其所具有的对肿瘤生成至关重要的抗凋亡、促细胞增殖及血管生成等的作用, Survivin 越来越引起人们的关注。刘敏等^[6]研究表明, Survivin 在涎腺腺样囊性癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织, 但与患者的临床病理特征无关。本研究显示, 食管癌组织中 Survivin 表达水平明显高于正常及炎症组织, 与国内、外大多数学者在其他恶性肿瘤研究中报道的结果一致。此外, 本研究还显示 Survivin 的表达与患者性别、年龄无关, 但与肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移有关, 这提示 Survivin 的过表达与食管癌的恶性分化、侵袭转移等恶性潜能密切相关, 是评价患者预后不良的一个重要指标。

PEDF 的抗血管生成活性仅靶向于新生血管而不影响预先存在的血管, 从而使其成为肿瘤靶向治疗的一个有吸引力的候选因子。PEDF 比其他已知的内源性血管生成抑制剂作用更大, 即使在血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)-1、FGF-2 和白细胞介素(interleukin, IL)-8 等促血管生成因子存在的情况下, PEDF 仍然能够抑制内皮细胞的迁移。多种肿瘤的临床研究表明, PEDF 表达水平的降低与肿瘤内较高的微血管密度和易转移表型相关^[7]。内源性 PEDF 在对抗骨肉瘤入侵软骨的过程中发挥了重要作用。而通过基因转移或直接给予 PEDF 蛋白治疗动物移植性肝癌、肺癌等的实验均显示其具有明显的抗肿瘤效应。除了 PEDF 对肿瘤的直接效应外, 更重要的是 PEDF 通过抑制肿瘤血管生成, 使肿瘤内的微血管密度减低从而遏制肿瘤的生长和转移。本实验发现 PEDF 在不同分化程度食管癌组织中表达的差异具有显著性, 食管癌组织分化程度越低, 恶性程度越大, 组织中 PEDF 的含量越少。因此, 作者认为 PEDF 的表达水平在一定程度上反映了食管癌组织的恶性程度, 这对临床上组织学难以鉴别良、恶性的病例有重要的参考意义。本研究对食管癌组织 Survivin 和 PEDF 蛋白的相关性检验表明, 二者在食管癌组织中的表达呈负相关, 说明二者相互影响, 并各自发挥独特的生物学作用, 共同参与了食管癌恶性生物学行为构成的分子机制。

研究发现基因转移 PEDF 治疗移植性神经母细胞瘤可使瘤内 VEGF 表达降低, 导致肿瘤血管生成受到抑制^[8], 人们还发现 PEDF 可抑制内源性 Caspase 抑制剂的表达而引发内皮细胞凋亡, 终止血管生成^[9]。PEDF 可以逆转缺氧环境下内皮细胞血小板反应素(thrombosponain, TSP)-1 表达的下调^[10], 由于 TSP-1 也是一个强力的内源性血管生成抑制剂, 因此, PEDF 可以通过维持 TSP-1 的表达水平而间接发挥抗血管生成作用。

PEDF 是能够通过不同破坏性途径靶向肿瘤的内生性多功能蛋白, 能够抑制肿瘤细胞增殖、抗血管生成(下转第 36 页)

参考文献:

- [1] 万文徽. 肿瘤标志临床应用与研究进展[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2005.
- [2] Ratziu V, Lalazar A, Wong L, et al. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(16):9500-9505.
- [3] Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, et al. Frequent inactivation of the tumor suppressor Kruppel-like factor 6 (KLF6) in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2004, 40(5):1047-1052.
- [4] Narla G, Friedman SL, Martignetti JA. Kruppel cripples prostate cancer: KLF6 progress and prospects[J]. Am J Pathol, 2003, 162(4):1047-1052.
- [5] 何华. 如何正确地对免疫组化结果进行半定量评分[J]. 中外健康文摘: 临床医师, 2008, 5(7):162-162.
- [6] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [7] Ito G, Uchiyama M, Kondo M, et al. Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(11):3838-3843.
- [8] Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, et al. Kruppel-like factor 6(KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2004,

126(4):1090-1103.

- [9] Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, et al. Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma[J]. Int J Cancer, 2007, 121(6):1390-1395.
- [10] 潘修成, 陈智, 陈峰, 等. 原发性肝癌组织中 Kruppel 样因子 6 基因的变异及其抗细胞增殖功能的改变[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(2):109-113.
- [11] Song J, Kim CJ, Cho YG, et al. Genetic and epigenetic alterations of the KLF6 gene in hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(8):1286-1289.
- [12] Boyault S, Héroult A, Balabaud C, et al. Absence of KLF6 gene mutation in 71 hepatocellular carcinomas [J]. Hepatology, 2005, 41(3):681-682.
- [13] Li D, Yea S, Dolios G, et al. Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation [J]. Cancer Res, 2005, 65(20):9216-9225.
- [14] 冯洁, 汤正好, 臧国庆, 等. KLF6、Sp1 蛋白在肝癌、肝硬化组织中的表达及意义[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2008, 17(2):148-151.
- [15] Cho YG, Choi BJ, Song JW, et al. Aberrant expression of krUppel-like factor 6 protein in colorectal cancers [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(14):2250-2253.

(收稿日期:2012-07-18 修回日期:2012-10-22)

(上接第 32 页)

和促进肿瘤细胞分化, 这种多功能蛋白在对抗肿瘤方面显示出巨大潜能。深入研究 PEDF 产生不同生物反应的各种机制和相互作用对其临床应用具有重大意义。

本实验对食管癌组织 Survivin 与 PEDF 蛋白的相关性研究发现, 这 2 种蛋白的表达呈明显负相关($r = -0.353$, $P = 0.003$)。PEDF 蛋白可抑制食管癌的进展, 而 Survivin 蛋白则促进其发生、发展, PEDF 蛋白表达的缺失和 Survivin 的高表达均与食管癌的浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关。因此, 联合检测这 2 种蛋白的表达情况, 对于判断食管癌患者的预后以及指导治疗等均有一定的临床意义。本研究同时也为食管癌的靶向治疗和抗血管生成抑制剂的临床应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Ikehara M, Oshita F, Kameda Y, et al. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung[J]. Oncol Rep, 2002, 9(4):835-838.
- [2] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor[J]. Nat Med, 2002, 8(4):349-357.
- [3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7 [J]. Biochemistry, 2001, 40(4):1117-1123.
- [4] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates pro-

caspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death [J]. Oncogene, 2000, 19(10):1346-1353.

- [5] 陈轩, 王子卫, 张可. 生存素基因 mRNA 和蛋白在胃癌中表达及其意义[J]. 重庆医学杂志, 2008, 37(13):1453-1455.
- [6] 刘敏, 李萍, 兰显国, 等. Survivin 和 VEGF 在涎腺腺样囊性癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学杂志, 2010, 39(10):1231-1232.
- [7] Halin S, Rudolfsson SH, Doll JA, et al. Pigment epithelium-derived factor stimulates tumor macrophage recruitment and is downregulated by the prostate tumor microenvironment[J]. Neoplasia, 2010, 12(4):336-245.
- [8] Streck CJ, Zhang Y, Zhou J, et al. Adeno-associated virus vector-mediated delivery of pigment epithelium-derived factor restricts neuroblastoma angiogenesis and growth [J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(1):236-243.
- [9] Filleur S, Volz K, Nelius T, et al. Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(12):5144-5152.
- [10] Aparicio S, Sawant S, Lara N, et al. Expression of angiogenesis factors in human umbilical vein endothelial cells and their regulation by PEDF [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(2):387-394.

(收稿日期:2012-08-25 修回日期:2012-10-21)