

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.35.006

喉癌组织 Survivin 基因表达水平与凋亡相关因子水平的关系*

牟基伟,张美佳,吴建
(佳木斯大学附属第一医院耳鼻喉科,黑龙江佳木斯 154003)

[摘要] **目的** 研究喉癌组织 Survivin 基因表达水平与 bcl-2、p53、caspase-3 等凋亡相关因子水平的关系。**方法** 选取佳木斯大学附属第一医院 2013 年 1 月至 2018 年 1 月 126 例喉癌患者手术切除的癌组织标本与 100 例声带息肉标本为研究对象,采用免疫组织化学法检测喉癌组织与声带息肉中 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 表达,采用实时荧光定量聚合酶链反应技术检测 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 表达量,分析 Survivin 基因表达与喉癌患者临床病理特征的关系,比较喉癌组织与声带息肉中 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 阳性率及表达量,对喉癌组织 Survivin 与 bcl-2、p53、caspase-3 基因表达及表达量进行相关性分析。**结果** Survivin 阳性组 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、中低分化、淋巴结转移患者比例显著高于 Survivin 阴性组($P<0.05$)。喉癌组织 Survivin、bcl-2、p53 阳性率分别为 68.3%、58.7%、63.5%显著高于声带息肉的 46.0%、38.0%、42.0% ($P<0.05$),caspase-3 阳性率为 41.3%显著低于声带息肉的 75.0% ($P<0.05$)。经 Spearson 相关性分析,喉癌组织 Survivin 表达与 bcl-2、p53 表达呈正相关,与 caspase-3 表达呈负相关。喉癌组织 Survivin、bcl-2、p53 表达量显著高于声带息肉($P<0.05$),caspase-3 表达量显著低于声带息肉($P<0.05$)。喉癌组织 Survivin 表达量与 bcl-2、p53 表达呈正相关,与 caspase-3 表达呈负相关。**结论** Survivin 基因与 bcl-2、p53、caspase-3 等凋亡相关因子存在一定相关性,可通过抑制细胞凋亡与促进细胞增殖,参与喉癌发生、发展。

[关键词] 喉肿瘤;免疫组织化学;细胞凋亡;survivin;bcl-2;p53;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3
[中图法分类号] R739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)35-4463-04

Relationship between Survivin gene expression level and levels of apoptosis related factors in laryngeal carcinoma tissues*
MU Jiwei, ZHANG Meijia, WU Jian
(Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154003, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between the Survivin gene expression level and levels of apoptosis related factors such as bcl-2, p53 and caspase-3 in laryngeal carcinoma tissues. **Methods** The carcinoma tissue specimens operatively resected in 126 cases of laryngeal carcinoma and 100 cases of vocal cord polyp specimen in the First Affiliated Hospital of Jiamusi University from January 2013 to January 2018 were selected as the study objects. The expressions of Survivin, bcl-2, p53 and caspase-3 in laryngeal carcinoma tissues and vocal cord polyp tissues were detected by adopting the immunohistochemical method. The expression levels of Survivin, bcl-2, p53 and caspase-3 was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The relationship between Survivin gene expression and clinicopathological characteristics in the patients with laryngeal carcinoma was analyzed. The positive rates and expression levels of Survivin, bcl-2, p53 and caspase-3 were compared between laryngeal carcinoma tissues and vocal cord polyp tissues. The correlation of Survivin with expression and expression quantities of bcl-2, p53 and caspase-3 gene in laryngeal carcinoma tissues was analyzed. **Results** The proportions of the patients with the TNM stage Ⅲ-Ⅳ, middle and low differentiation and lymph node metastasis in the Survivin positive group were significantly higher than those in the Survivin negative group ($P<0.05$). The positive rates of Survivin, bcl-2 and p53 in laryngeal carcinoma tissues were 68.3%, 58.7% and 63.5% respectively, which were significantly higher than 46.0%, 38.0% and 42.0% in the vocal cord polyp tissues ($P<0.05$). The positive rate of caspase-3 was significantly lower than that in vocal cord polyp tissues (41.3% vs. 75.0%, $P<0.05$). The Spearson correlation analysis showed that the expression of Survivin in the laryngeal carcinoma tissues was positively correlated with the expression of

* 基金项目:黑龙江省卫生和计划生育委员会科研课题(2014-249)。 作者简介:牟基伟(1969—),副主任医师/副教授,硕士,主要从事喉肿瘤的基础与临床研究。

bcl-2 and p53, and negatively correlated with the expression of caspase-3. The expression quantities of Survivin, bcl-2 and p53 in laryngeal carcinoma tissues were significantly higher than those in the vocal cord polyps ($P<0.05$), while the expression quantity of Caspase-3 was significantly lower than that in the vocal cord polyps ($P<0.05$). The expression quantity of Survivin in laryngeal carcinoma tissues was positively correlated with the expressions of bcl-2 and p53, and was negatively correlated with the expression of Caspase-3. **Conclusion** There is a certain correlation between the survivin gene and apoptosis related factors such as bcl-2, p53 and caspase-3, which can participate in the development and progression of laryngeal carcinoma by inhibiting cell apoptosis and promoting cell proliferation.

[Key words] laryngeal neoplasms; immunohistochemical method; survivin; bcl-2; p53; caspase-3

喉癌是头颈部常见恶性肿瘤,指发生在喉部的恶性肿瘤,以鳞状细胞癌最为常见,其发生机制目前尚不明确,可能与吸烟、饮酒、大气污染、病毒感染、放射损伤、接触有毒化学物质等相关^[1-3]。随着癌基因研究的深入,越来越多的研究发现喉癌发生与凋亡相关基因失活等存在紧密联系,Survivin 是近年来新发现的凋亡抑制蛋白家族成分,可以抑制细胞凋亡,调节细胞周期,参与恶性肿瘤发生、发展^[4-5]。目前针对喉癌组织 Survivin 基因表达与凋亡相关因子水平研究较少,因此本文选取佳木斯大学附属第一医院 2013 年 1 月至 2018 年 1 月 126 例喉癌患者手术切除的癌组织石蜡标本为研究对象,探讨 Survivin 基因表达水平与 bcl-2、p53、caspase-3 等凋亡相关因子的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 材料取自佳木斯大学附属第一医院 2013 年 1 月至 2018 年 1 月 126 例喉癌患者手术切除的癌组织石蜡标本,均经病理组织学证实为鳞状细胞癌,所有患者术前均未接受放化疗。其中男 77 例,女 51 例,年龄 37~69 岁,平均(53.54±9.64)岁;肿瘤部位:声门上型 53 例,声门型 43 例,声门下型 30 例;TNM 分期:Ⅰ期 14 例,Ⅱ期 38 例,Ⅲ期 54 例,Ⅳ期 20 例;分化程度:高分化 64 例,中分化 38 例,低分化 24 例;淋巴结转移:颈淋巴结转移阳性 30 例,颈淋巴结转移阴性 96 例。另选取 100 例声带息肉标本,病理证实为炎症或正常黏膜组织。本研究获得黑龙江省佳木斯大学附属第一医院伦理委员会批准。

1.2 实验方法 切片常规脱蜡,蒸馏水洗涤 2~3 次,经微波抗原热修复后,采用免疫组织化学法检测 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 蛋白表达,用已知阴性组织作为阴性对照,用已知胃癌阳性片作为阳性对照,试剂盒购自上海研卉生物科技有限公司,具体操作步骤严格按照说明书进行。在高倍镜下选取 5 个视野,计数 500 个细胞,记录染色细胞百分比,Survivin 主要在细胞质中着色,bcl-2 主要在细胞质或细胞膜中着色,p53 主要在细胞核中着色,caspase-3 主要在细胞质中着色,采用 Sinicrope 改良法判断 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 蛋白阳性,染色细胞小于 5%为阴性,染色细胞大于或等于 5%为阳性。染色结

果由 2 名病理科专家进行双盲判定,意见不统一时商讨后达成一致。采用实时荧光定量聚合酶链反应技术检测 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 表达量,试剂盒由武汉华美生物工程有限公司提供,具体操作步骤严格按照说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件对研究数据进行分析 and 处理,计数资料以率表示,比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验,相关性分析采用 Spearson 相关系数,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

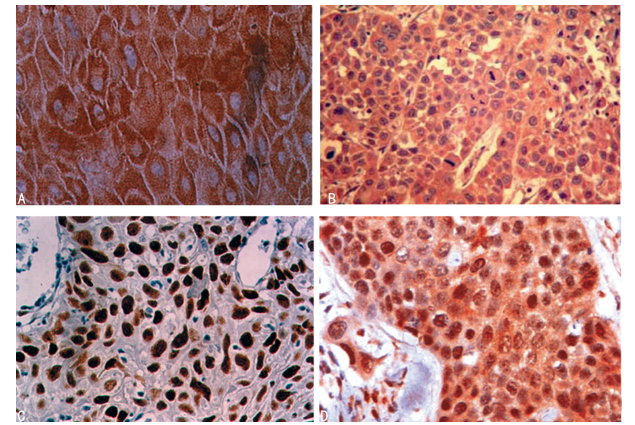
2.1 Survivin 基因表达与喉癌患者临床病理特征的关系 126 例喉癌癌组织标本中共检出 Survivin 阳性 86 例,阳性率为 68.3%(86/126)。Survivin 阳性组年龄、性别、肿瘤部位与 Survivin 阴性组比较差异无统计学意义($P>0.05$),TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、中低分化、淋巴结转移患者比例显著高于 Survivin 阴性组($P<0.05$),见表 1。

表 1 Survivin 基因表达与喉癌患者临床病理特征的关系[n(%)]				
临床病理特征	Survivin 阳性 (n=86)	Survivin 阴性 (n=40)	χ^2	P
年龄(岁)				
<60	40(46.5)	14(35.0)	1.477	0.224
≥60	46(53.5)	26(65.0)		
性别				
男	56(65.1)	24(60.0)	0.308	0.579
女	30(34.9)	16(40.0)		
肿瘤部位				
声门上型	42(48.8)	14(35.0)	3.667	0.160
声门型	30(34.9)	14(35.0)		
声门下型	14(16.3)	12(30.0)		
TNM 分期(期)				
Ⅰ~Ⅱ	28(32.6)	24(60.0)	8.482	0.004
Ⅲ~Ⅳ	58(67.4)	16(40.0)		
分化程度				
高分化	34(39.5)	30(75.0)	13.739	0.000

续表 1 Survivin 基因表达与喉癌患者临床病理特征的关系[n(%)]

临床病理特征	Survivin 阳性 (n=86)	Survivin 阴性 (n=40)	χ^2	P
中低分化	52(60.5)	10(25.0)		
淋巴结转移				
无	48(55.8)	34(85.0)	10.233	0.001
有	38(44.2)	6(15.0)		

2.2 喉癌癌组织与声带息肉中 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 阳性率比较 喉癌癌组织 Survivin、bcl-2、p53 阳性率显著高于声带息肉($P<0.05$), caspase-3 阳性率显著低于声带息肉($P<0.05$), 见图 1、表 2。



A:Survivin 阳性,染色部位在细胞浆;B:bcl-2 阳性,染色部位在细胞浆和细胞膜;C:p53 阳性,染色部位在细胞核;D:caspase-3 阳性,染色部位在细胞浆

图 1 喉癌癌组织染色

表 2 喉癌癌组织与声带息肉中 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 阳性率比较[n(%)]

类别	n	Survivin 阳性	bcl-2 阳性	p53 阳性	caspase-3 阳性
喉癌癌组织	126	86(68.3)	74(58.7)	80(63.5)	52(41.3)
声带息肉	100	46(46.0)	38(38.0)	42(42.0)	75(75.0)
χ^2		11.366	9.584	10.367	25.768
P		0.001	0.002	0.001	0.000

2.3 喉癌癌组织 Survivin 基因表达与 bcl-2、p53、caspase-3 的关系 经 Spearson 相关性分析,喉癌癌组织 Survivin 表达与 bcl-2、p53 表达呈正相关,与 caspase-3 表达呈负相关,见表 3。

2.4 喉癌癌组织与声带息肉中 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 表达量比较 喉癌癌组织 Survivin、bcl-2、p53 表达量显著高于声带息肉($P<0.05$), caspase-3 表达量显著低于声带息肉($P<0.05$), 见表 4。

2.5 喉癌癌组织 Survivin 表达量与 bcl-2、p53、caspase-3 的关系 经 Spearson 相关性分析,喉癌癌组织 Survivin 表达量与 bcl-2、p53 呈正相关($r=0.385、0.407,P<0.05$), 与 caspase-3 呈负相关($r=$

$-0.471,P<0.05$)。

表 3 喉癌癌组织 Survivin 基因表达与 bcl-2、p53、caspase-3 的关系(n)

凋亡相关因子	Survivin 阳性 (n=86)	Survivin 阴性 (n=40)	r	P
bcl-2				
阳性	60	14	0.329	0.000
阴性	26	26		
p53				
阳性	64	16	0.333	0.000
阴性	22	24		
caspase-3				
阳性	24	28	-0.398	0.000
阴性	62	12		

表 4 喉癌癌组织与声带息肉中 Survivin、bcl-2、p53、caspase-3 表达量比较($\bar{x}\pm s$)

类别	n	Survivin 表达量	bcl-2 表达量	p53 表达量	caspase-3 表达量
喉癌癌组织	126	1.09±0.17	1.46±0.22	2.13±0.32	1.24±0.30
声带息肉	100	0.88±0.15	1.21±0.20	1.67±0.28	1.85±0.24
t		9.711	8.830	11.337	15.848
P		0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨 论

肿瘤是一类细胞周期疾病,经历多基因、多步骤突变,细胞呈失控性生长,其中细胞凋亡失衡是肿瘤发生、发展的重要机制^[6-7]。凋亡抑制蛋白家族是一类抑制凋亡的调节因子,Survivin 是上世纪九十年代末发现的凋亡抑制蛋白家族新成员,定位于人类染色体 17q25,由 142 个氨基酸组成,只表达于肿瘤与胚胎组织,与其他凋亡抑制蛋白家族成员比较,Survivin 结构简单,具有其他成员无可比拟的抗凋亡能力。近年来研究显示,在肺癌、喉癌、胃癌、结直肠癌、鼻咽癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤均可发现 Survivin 过表达, Survivin 已成为肿瘤诊断与治疗的新靶点^[8-10]。

本研究采用免疫组织化学法检测喉癌癌组织中 Survivin 基因,Survivin 阳性率为 68.3%,与以往研究结果相似^[11-12]。喉癌癌组织 Survivin 阳性患者 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移与 Survivin 阴性患者比较差异有统计学意义($P<0.05$),随着肿瘤进展,Survivin 表达增强,抑制异常突变细胞凋亡,使细胞分裂得以继续,加快喉癌发展,增加癌转移风险。细胞凋亡过程受细胞凋亡促进因子与凋亡抑制因子共同影响。Survivin 可作为喉癌临床病理指标,对喉癌发生、发展及转移具有一定诊断与预测价值。本研究显示,喉癌组织 Survivin、bcl-2、p53 阳性率显著高于声带息

肉,caspase-3 阳性率显著低于声带息肉,提示 Survivin 及 bcl-2、p53、caspase-3 等凋亡相关因子与喉癌发生、发展存在一定联系。bcl-2 是一种细胞凋亡的拮抗基因,在人体内以二聚体形式发挥作用,可以延长细胞生命周期,使受损细胞对凋亡刺激因素产生耐受性,从而延长细胞寿命^[13-14]。本研究显示,喉癌组织 Survivin 表达与 bcl-2 表达呈正相关,可能由于 Survivin 基因所在染色体不稳定,导致 bcl-2 基因转录激活,二者协同发挥抗凋亡效应。p53 是一种肿瘤抑制基因,定位与人类染色体 p13,由 391 个氨基酸组成,可以使细胞分裂终止于复制前期与合成期,诱导细胞凋亡,修复 DNA 损伤^[15-16]。自然型 p53 半衰期短,免疫组织化学难以检出,本研究所检测到的 p53 为突变型 p53。p53 发生基因突变时,自然型 p53 功能丧失活性,促使细胞向恶性转化,并积聚于细胞内,延长半衰期,使免疫组织化学法可以有效检测。本研究显示,喉癌组织 Survivin 表达与 p53 表达呈正相关,可能与喉癌发生后自然型 p53 失活相关。caspase-3 是细胞凋亡过程中一种重要效应因子,以酶原形式存在,对细胞死亡刺激发生应答而被激活,使多种与细胞周期相关蛋白失活,促使细胞失活^[17]。相关研究显示,肿瘤组织内的 caspase-3 表达量显著低于正常组织^[18]。本研究显示,喉癌组织 Survivin 表达与 caspase-3 表达呈负相关,主要由于 Survivin 对 caspase-3 活化形式具有抑制作用,阻止其自然激活,并与 caspase-3 特异性结合,造成其活性丧失,抑制细胞凋亡。

综上所述,Survivin 基因表达与喉癌病情进展存在一定联系,可作为喉癌预后指标。Survivin 基因表达与 bcl-2、p53 表达呈正相关,与 caspase-3 表达呈负相关,可通过调节凋亡相关因子,促进肿瘤发展。

参考文献

- [1] CHATENOU D L, GARAVELLO W, PAGAN E, et al. Laryngeal carcinoma mortality trends in European countries[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(4): 833-842.
- [2] SMITH M M, ABROL A, GARDNER G M. Assessing delays in laryngeal carcinoma treatment[J]. *Laryngoscope*, 2015, 126(7): 1612-1615.
- [3] YAMAZAKI H, SUZUKI G, NAKAMURA S, et al. Radiotherapy for laryngeal carcinoma-technical aspects and alternate fractionation[J]. *J Radiat Res*, 2017, 58(4): 495-508.
- [4] MARIONI G, OTTAVIANO G, MARCHESERAGONA R, et al. Nuclear survivin expression correlates with endoglin-assessed microvascularisation in laryngeal carcinoma. [J]. *J Clin Pathol*, 2017, 70(12): 1033-1037.
- [5] JAISWAL P K, GOEL A, MITTAL R D. Survivin: A molecular biomarker in carcinoma[J]. *Indian J Med Res*, 2015, 141(4): 389-397.
- [6] ZHANG J, WANG S, HAN F, et al. MicroRNA-542-3p suppresses cellular proliferation of bladder carcinoma cells through post-transcriptionally regulating survivin[J]. *Gene*, 2016, 579(2): 146-152.
- [7] SINGH N, KRISHNAKUMAR S, KANWAR R K, et al. Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant carcinomas[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(5): 578-87.
- [8] NESTAL D M G, DELBUE D, SILVA K L, et al. FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast carcinoma survival and chemoresistance. [J]. *Cell Sig*, 2015, 27(12): 2496-2505.
- [9] KATO J, KUWABARA Y, MITANI M, et al. Expression of survivin in esophageal carcinoma; Correlation with the prognosis and response to chemotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2015, 95(2): 92-95.
- [10] 胡慈浩, 王文华, 王全, 等. Survivin 和 Aurora-b 在喉癌组织中的表达及其临床意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(10): 737-743.
- [11] 周彬, 侯学东, 时胜武, 等. 喉癌切缘组织中 Survivin 和基质金属蛋白酶-2 表达与喉癌局部复发的关系[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(13): 1160-1163.
- [12] 王菊香, 杨宝良, 裴士庚, 等. Survivin 与 p53 及 Ki67 蛋白在喉癌组织中的表达及相关性[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(17): 1545-1548.
- [13] GIOTAKIS A I, KONTOS C K, MANOLOPOULOS L D, et al. High BAX / BCL2, mRNA ratio predicts favorable prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma, particularly in patients with negative lymph nodes at the time of diagnosis[J]. *Clin Bio*, 2016, 49(12): 890-896.
- [14] MOU S, ZHOU Z, HE Y, et al. Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of laryngeal carcinoma cells through Bcl-2 and PI3K/Akt, and by upregulating miR-15a[J]. *Oncol Let*, 2017, 14(4): 4937-4942.
- [15] LV Y, JIA C, JIANG A, et al. Analysis of Association Between MGMT and p53 Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Laryngeal carcinoma. [J]. *Anti Res*, 2017, 37(8): 4399-4403.
- [16] 林丹丹, 张一桥. 胃癌组织中 p53 与 Ki-67 蛋白的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2015, 55(45): 48-49.
- [17] 张玲玲, 张亚男, 耿翠芝, 等. Caspase-3、DIAPH-3 蛋白在浸润性乳腺癌中的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(5): 36-41.
- [18] WANG H X, TANG C. Galangin suppresses human laryngeal carcinoma via modulation of caspase-3 and AKT signaling pathways[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 703-714.

(收稿日期: 2018-05-22 修回日期: 2018-08-25)