·临床研究·

NSCLC survivin表达特点及其与细胞周期的关系研究

刘婷婷[1],孟玲楠[2],李 瑛[2],珊 丹[2],高纯子[2],韩 波[2*]
(哈尔滨医科大学:[1]附属第二医院干部五病房,[2]附属第一医院肿瘤二科,哈尔滨 150001)

【摘 要】 **目的** 探讨survivin在非小细胞肺癌(NSCLC)中和正常肺组织中的表达,以及survivin与NSCLC临床病理特征、肿瘤细胞周期分布之间的关系。**方法** 应用免疫组化SP方法检测43例NSCLC组织和10例正常肺组织中survivin的表达,分析survivin与NSCLC临床病理学特征的关系。同时应用流式细胞术(FCM)检测NSCLC细胞survivin阳性组与survivin阴性组细胞周期分布状态,计算S期细胞比例(SPF)和增殖指数(PI)。**结果** (1)NSCLC组织中survivin的阳性表达率为51.2%,正常肺组织无survivin表达,差异具有统计学意义($P<0.05$)。(2)survivin的表达与患者性别和淋巴结转移情况明显相关($P<0.05$);survivin的表达与患者年龄、病理类型、T分期均无明显相关($P>0.05$)。(3)通过使用流式细胞术对6例survivin表达阳性的NSCLC组织以及6例survivin表达阴性的NSCLC组织的细胞进行细胞周期检测,结果发现,survivin阳性组PI值为11.80±4.25,阴性组为5.68±2.56,差异有统计学意义($P<0.05$);survivin阳性组SPF为13.93±3.21,阴性组为6.44±2.52,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** (1) Survivin在NSCLC组织中的表达明显高于正常肺组织。(2)Survivin在NSCLC中的表达与性别、淋巴结转移状态明显相关。(3)NSCLC组织中survivin阳性表达组SPF、PI均高于阴性表达组,提示survivin阳性表达通过抑制细胞凋亡提高了肿瘤细胞的增殖活性。

【关键词】 NSCLC;凋亡;生存素;细胞周期;免疫组化;流式细胞术
【中图分类号】 R734.2 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.07.129

Expression profiles of survivin and its relation with cell cycle in non-small cell lung cancer

LIU Ting-Ting[1], MENG Ling-Nan[2], LI Ying[2], SHAN Dan[2], GAO Chun-Zi[2], HAN Bo[2*]
(Harbin Medical University: [1]the Fifth Cadre Ward, the Second Affiliated Hospital, [2]the Second Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Harbin 150001, China)

【**Abstract**】 **Objective** To detect the expression of survivin in normal lung and non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues, and investigate the relationship of its expression with the clinical pathological characteristics of NSCLC as well as the cancer cell cycle. **Methods** Immunohistochemical SP staining was used to detect the expression of survivin in 43 samples of NSCLC tissues and 10 samples of normal lung tissues. The relationship of survivin expression and clinicopathological characteristics of NSCLC was analyzed. In order to evaluate the correlation of survivin expression with cancer cell cycle, flow cytometry was used to detect the cells isolated from 6 NSCLC samples with 6 samples without survivin expression to calculate the values of S-phase fraction (SPF) and proliferation index (PI). **Results** (1) The positivity rate of survivin expression was 51.16% in NSCLC tissues, and 0.00% in normal lung tissues, with significant difference between them ($P<0.05$). (2) The expression of survivin was obviously correlated with patient's gender and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with patient's age, pathological classification and T staging ($P>0.05$). (3) The results of flow cytometry indicated that there were statistical significances in PI value (11.80±4.25 *vs* 5.68±2.56) and SPF value (13.93±3.21 *vs* 6.44±2.52) between the cells isolated from the NSCLC samples with or without survivin expression ($P<0.05$). **Conclusion** (1) The expression of survivin is significantly higher in the NSCLC tissue than in normal lung tissue. (2) Survivin expression is obviously correlated with gender and lymph node metastasis. (3) The PI and SPF values are significantly higher in survivin positive than negative NSCLC cells, which indicate that survivin positive expression promotes the proliferative activity of tumor cells through inhibition of apoptosis.

【**Key words**】 non-small cell lung cancer; apoptosis; survivin; cell cycle; immunochemistry; flow cytometry

Corresponding author: *HAN Bo*, *E-mail*: *bohan1964@163.com*

收稿日期: 2016-02-17; **修回日期**: 2016-06-02
通信作者: 韩 波, E-mail: bohan1964@163.com

肺癌是世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤[1,2]，其中非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）占肺癌的80%～85%[3]。Survivin是迄今为止发现的作用最强的细胞凋亡抑制因子，同时，由于其在正常分化成熟的组织中不表达而特异性地表达于多种肿瘤组织中而倍受关注[4]。Survivin不仅在NSCLC组织中高表达，还可能与其预后密切相关，但有关其发挥生物效应的机制尚不十分明确。我们拟在分析NSCLC中survivin表达特点的同时，探讨survivin的表达与肺癌细胞周期的相互关系，以期研究肿瘤细胞凋亡抑制与肿瘤细胞增殖周期间可能存在的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2011年12月至2012年8月在哈尔滨医科大学第一附属医院胸外科接受肺癌切除术的NSCLC患者43例，中位年龄54.2（22～73）岁，其中男性25例，女性18例；腺癌27例，鳞癌16例。根据2012年NCCN（National Comprehensive Cancer Network）发布的NSCLC诊疗指南T分期，T1期19例，T2期20例，T3期4例；无淋巴结转移（N－）期17例，有淋巴结转移（N＋）期26例。所有病例术前均未接受过放化疗。详细资料见表1。

表1 survivin在NSCLC中的表达与临床病理特征间的关系

Table 1 The correlation of survivin expression with the clinicopathological charactersitics in NSCLC

Clinicopathological characteristic	*n*	Positive expression of Survivin [*n*(%)]	χ^2	*P* value
Gender				
Male	25	7(28.0)	12.82	<0.05
Female	18	15(83.3)		
Age(years)				
<60	30	15(50.0)	0.05	>0.05
≥60	13	7(53.8)		
Pathological type				
Adencarcinoma	27	11(40.7)	3.15	>0.05
Squamous cell carcinoma	16	11(68.8)		
T stage				
T1	19	8(41.2)	1.58	>0.05
T2	20	12(60.0)		
T3	4	2(50.0)		
N stage				
N0	27	10(37.0)	5.79	<0.05
N1	16	12(75.0)		

1.2 主要试验试剂

兔抗人单克隆survivin抗体（中杉金桥生物技术开发公司）；SP试剂盒与DAB试剂盒（福州迈新生物技术开发公司）；流式细胞碘化吡啶（PI）染色试剂盒（联科生物技术有限公司）。

1.3 免疫组化检测survivin的表达

所有标本经4%甲醛溶液固定，组织石蜡包埋，5 μm连续切片2张，链霉菌抗生物素蛋白－过氧化物酶连结法（streptavidin-perosidase，SP）检测survivin的表达，严格按说明书操作。已知survivin阳性切片为阳性对照，以PBS缓冲液代替一抗为阴性对照。

以肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒为survivin表达阳性。按照无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计0，1，2，3分；着色面积按无着色、<25%、25%～50%、50%～75%、75%～100%分别计0，1，2，3，4分。将染色强度计分与阳性细胞百分比计分相乘，以所得的总分进行判断：0分为阴性（－）；1～2分为弱阳性（＋）；3～6分为中等阳性（＋＋）；7～12分为强阳性（＋＋＋）。数据处理时将＋、＋＋及＋＋＋合并＋作统计分析。

1.4 流式细胞术检测细胞周期分布

采用胰蛋白酶消化法制备单细胞悬液，使用流式细胞仪（美国BD公司）PI染色法对细胞内DNA含量进行检测，将细胞周期各时相区分为G_1/G_0期，S期和G_2/M期，并通过特殊软件计算各时相的百分率。进一步应用公式分别计算survivin阳性表达组与阴性表达组S期细胞比例（S phase fraction，SPF）和增殖指数（proliferation index，PI）。两者均表示细胞的增殖活性。$SPF = S/(G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$。$PI = (S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$）。

1.5 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件。计数资料以百分率表示，进行卡方检验；计量资料以均数±标准差表示，采用*t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Survivin在NSCLC和正常肺组织中的表达

10例正常肺组织中survivin蛋白无表达（图1A）。Survivin在NSCLC中阳性染色定位于细胞质（图1B，1D）。43例NSCLC组织中，22例survivin表达阳性（51.2%）；癌组织survivin表达与正常肺组织相比，差异有统计学意义（$\chi^2 = 6.67$，$P<0.05$）。

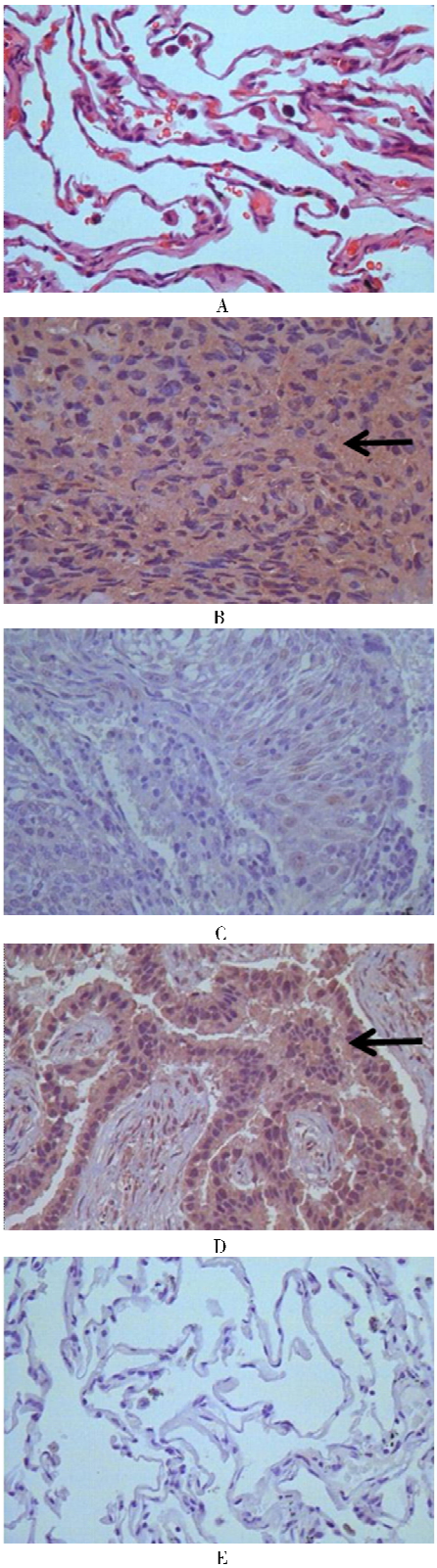


图1 正常肺组织及NSCLC组织中survivin的表达

Figure 1 The expression of survivin in normal lung tissue and NSCLC tissue(SP ×200)

A: normal lung tissue, negative expression; B: NSCLC tissue (squamous cell carcinoma), positive expression; C: NSCLC tissue (squamous cell carcinoma), negative expression; D: NSCLC tissue (adenocarcinoma), positive expression; E: NSCLC tissue (adenocarcinoma), negative expression

2.2 Survivin的表达与临床病理特征的关系

统计学分析结果显示，survivin表达与患者的性别、淋巴结转移状态明显相关($P<0.05$)；而与患者的年龄、病理类型、原发肿瘤T分期均无明显相关($P>0.05$；表1)。

2.3 流式细胞术检测NSCLC细胞周期分布

Survivin表达阳性的NSCLC组织以及表达阴性的NSCLC组织的细胞周期检测结果详见图2。Survivin表达阳性组与阴性组细胞周期中处于S期细胞所占的比例及S期与G_2/M期细胞所占的比例差异具有统计学意义[SPF：(13.93±3.21)% *vs* (6.44±2.52)%；PI：(11.80±4.25)% *vs* (5.68±2.56)%；$P<0.05$]，说明两组细胞的增殖活性有差异。

3 讨 论

Survivin是目前为止发现的功能最强的细胞凋亡抑制因子。鉴于survivin在正常组织呈现低表达甚至不表达、却高表达于绝大多数恶性肿瘤中这一独特的生物学特性，它已然成为人们研究治疗肿瘤的新靶点[5]。

本研究结果显示survivin在NSCLC肿瘤中的表达阳性率为51.2%，而在正常肺组织中无表达，差异具有统计学意义，提示survivin在NSCLC的发生、发展中可能扮演着重要的作用。目前文献报道的NSCLC中survivin阳性表达率为40%～95%[6-7]，本研究结果接近Kren等[8]的研究。本研究发现survivin主要表达于细胞质中，但也有研究报道survivin表达在细胞核中或者细胞核和细胞质中均有表达[8,9]。分析原因，可能是由于survivin存在两种亚细胞定位：细胞核和(或)细胞质中[10]。位于细胞质中的survivin与分裂的纺锤体微管结合，影响纺锤体的形成和分离，并通过作用于capases有效地阻断细胞凋亡；而位于细胞核中的survivin既可以扰乱细胞的分化，还可以通过底物竞争的方式影响细胞凋亡[11]。这也说明了细胞质中和细胞核中的survivin有着不同的作用，提示在不同的肿瘤中，survivin的定位不同，预后亦不同。

Survivin的表达与NSCLC临床病理特征之间是否存在相关性，目前还存在着诸多争议。只有少数的研究报道了NSCLC中survivin的表达情况与病理类型之间的关系。Han等[12]的研究显示suivivin在鳞癌中表达高于腺癌。本试验虽然鳞癌的suivivin阳性表达率高于腺癌，但差异无统计学意义，与Kren等[7]的研究结论相一致。

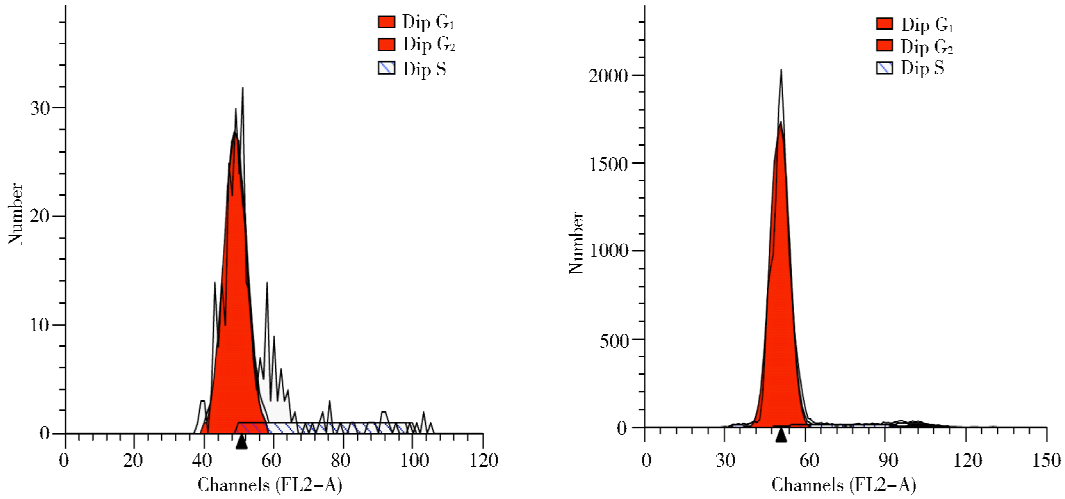


图 2 流式细胞仪检测 NSCLC 肿瘤细胞周期分布

Figure 2 The cell cycle distribution of NSCLC cells by flow cytometry

A: NSCLC cells with positive expression of survivin; B: NSCLC cells with negative expression of survivin

本研究结果显示淋巴结阳性组 survivin 表达率明显高于淋巴结阴性组，提示 survivin 可能参与到肿瘤细胞淋巴转移的过程中。有研究证实体内的 survivin 能与 XIAP 凋亡抑制蛋白相互作用，从而提升肿瘤细胞的侵袭力，增强远处转移能力；试验表明在乳腺癌中 survivin 能调控 VEGF-C 在蛋白及 mRNA 水平上的表达，促进肿瘤淋巴管的形成、导致淋巴结的转移。但是，关于其调控淋巴结转移的具体生物学机制还不甚明了，survivin 在 NSCLC 中是否有与其他癌症相同的分子生物学机制参与淋巴结转移，还有待继续探索。

Survivin 具有细胞周期依赖性，也是已知的 IAP 家族中唯一与纺锤体微管相关的蛋白质。本试验通过流式细胞术对 NSCLC 中 survivin 表达阳性组与阴性组的细胞进行细胞周期分布的检测并计算 SPF 和 PI 值，结果显示 survivin 阳性组的 PI 与 SPF 均高于阴性组，且 survivin 阳性组 G_2/M 期细胞比例明显高于 survivin 阴性组，说明在 G_2/M 期 survivin 表达增加。提示肿瘤细胞中过度表达的 survivin 克服了细胞周期 G_1 和 G_2 两个关键点，通过加强对细胞凋亡的抑制，提高肿瘤细胞的增殖活性。

本试验初步研究了 NSCLC 中 survivin 的表达特点以及与细胞周期的相互关系，以期探讨肿瘤细胞凋亡抑制与肿瘤细胞增殖周期间可能存在的相关性。但是，细胞凋亡与细胞增殖以及与肿瘤发生、发展之间的内在联系是十分复杂的，对于 survivin 所引发的一系列生物效应还有待更深入的研究。

【参考文献】

[1] Fassina A, Corradin M, Zardo D, *et al*. Role and accuracy of rapid on-site evaluation of CT-guided fine needle aspiration cytology of lung nodules[J]. Cytopathology, 2011, 22(5): 306 – 312.

[2] Jemal A, Bray F, Center MM, *et al*. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 – 90.

[3] Travis WD, Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2011, 32(1): 22 – 31.

[4] Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: new biological insights and recent therapeutic advances[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 91 – 112.

[5] Rosato A, Menin C, Boldrin D, *et al*. Survivin expression impacts prognostically on NSCLC but not SCLC[J]. Lung Cancer, 2013, 79(2): 180 – 186.

[6] Altieri DC. Validating survivin as cancer therapeutic target[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 4(1): 46 – 54.

[7] Kren L, Brazdil J, Hermanova M, *et al*. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004, 12(1): 44 – 49.

[8] Vischioni B, van der Valk P, Span SW, *et al*. Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival in advanced non-small cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2004, 15(11): 1654 – 1660.

[9] Shinohara ET, Gonzales A, Massion PP, *et al*. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in non-small cell carcinoma[J]. Cancer, 2005, 15(8): 1685 – 1692.

[10] Fortugno P, Wall NR, Glodini A, *et al*. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt3): 575 – 585.

[11] O'connor DS, Grossman D, Plescia J, *et al*. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(24): 13103 – 13107.

[12] Han PH, Li XJ, Qin H, *et al*. Up-regulation of survivin in non-small cell lung cancer and its clinicopathological correlation with p53 and Bcl-2[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2009, 25(8): 710 – 713.

（编辑：王雪萍）