

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2015) 03 - 0219 - 04

生存素蛋白在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达及意义

王素芬¹, 刘银华¹, 何雷¹, 陈冰², 张帆¹

(1. 皖南医学院附属弋矶山医院 病理科, 安徽 芜湖 241001; 2. 皖南医学院 病理学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨生存素(survivin) 蛋白在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL) 中的表达及其与细胞增殖及凋亡的关系。方法: 采用免疫组织化学的方法, 对 48 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL) 和 10 例淋巴结反应性增生(RHL) 组织中生存素蛋白、caspase-3、ki-67 的表达进行检测, 分析生存素蛋白表达与 caspase-3 及 ki-67 增殖指数的关系。结果: 生存素蛋白在 10 例 RHL 中均无表达, 48 例 DLBCL 中的阳性表达率为 79.2% (38/48), 其在 DLBCL 中的阳性表达率明显高于在 RHL 中的表达 ($P < 0.05$); caspase-3 在 48 例 DLBCL 和 10 例 RHL 中的阳性表达率分别为 50% (24/48) 和 80% (8/10) ($P > 0.05$), 两者无明显差别。生存素蛋白阳性表达的 DLBCL 中 ki-67 增殖指数 (80.66 ± 11.04) % 明显高于阴性表达组 (62.00 ± 6.32) % ($P < 0.05$); 生存素蛋白表达与 caspase-3 无明显相关 ($P > 0.05$)。结论: 生存素蛋白在 DLBCL 中表达较高, survivin 可能通过促进肿瘤细胞的增殖, 从而在 DLBCL 的发生发展中起到重要的作用。

【关键词】弥漫性大 B 细胞淋巴瘤; 生存素蛋白; caspase-3; ki-67 增殖指数

【中图分类号】R 733.1 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.03.004

Expression and significance of survivin protein in diffuse large B cell lymphoma

WANG Sufen, LIU Yinhu, HE Lei, CHEN Bing, ZHANG Fan

Department of Pathology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression of survivin protein in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and its relationship with tumor cell apoptosis and proliferation. **Methods:** Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of survivin, caspase-3 and ki-67 in the samples from 48 DLBCL patients and 10 with reactive hyperplasia of lymph node (RHL), and the proliferation index was analyzed between survivin protein expression and tumor cell apoptosis and tumor cell proliferation. **Results:** Survivin expression was free in the tissues of RHL, whereas accounted for 79.2% (38/48) in DLBCL ($P < 0.05$). The expression of caspase-3 in DLBCL and RHL were 50% (24/48) and 80% (8/10), respectively. The difference was not significant ($P > 0.05$). Positive survivin expression was 50% (24/48) in the 48 DLBCL cases and 80% (8/10) in the 10 RHL ($P > 0.05$), and the proliferation index for ki-67 was significantly higher than that in survivin protein negative cases (80.66 ± 11.04 vs. 62.00 ± 6.32) ($P < 0.05$). Survivin expression was not associate with caspase-3 expression in DLBCL ($P > 0.05$). **Conclusion:** Higher expression of survivin protein in DLBCL may lead to tumor cell proliferation and function a lot in the development of DLBCL.

【Key words】diffuse large B cell lymphoma; survivin protein; caspase-3; ki-67

生存素(survivin) 蛋白是当前发现的最强大的凋亡抑制因子, 是凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis proteins, IAP) 家族中最重要的新成员之一。与凋亡抑制蛋白家族其他成员不同的是, 该家族大多数成员在生理情况下广泛分布在成人各种组织中, 不同组织中仅仅表现为其表达水平的差异; 而生存素蛋白仅在胎盘、肾上腺髓质、胸腺组织和结肠黏膜隐窝的上皮细胞中有少量表达; 一旦细胞发生恶变, 生存素的表达即刻显著增加^[1]。研究表明, 生存素

蛋白对肿瘤细胞凋亡的抑制主要是通过直接抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3) 的活性而实现的^[2]。本研究采用免疫组化的方法, 对 48 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 中生存素蛋白、caspase-3、ki-67 的表达情况进行检测, 分析生存素蛋白表达与 caspase-3 的表达及肿瘤细胞 ki-67 增殖指数的关系。

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目(WK2012F16)

收稿日期: 2014-12-17

作者简介: 王素芬(1986-), 女, 住院医师, (电话) 0553-5739792, 13645536816, (电子信箱) wangsufen0808@163.com;

张帆, 男, 主任医师, 硕士生导师, (电子信箱) zhangfan401401@aliyun.com, 通讯作者。

1 资料与方法

1.1 标本 收集2012年12月~2013年12月间在我院初次明确诊断的DLBCL患者的蜡块。其中男性29例,女性19例,发病年龄37~81岁,中位年龄为67岁。另选取10例淋巴结反应性增生(reactive hyperplasia of lymph node,RHL)标本作为对照。

1.2 主要试剂 生存素单克隆抗体即用型工作液、caspase-3单克隆抗体工作液、ki-67单克隆抗体工作液及免疫组织化学二步法染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法 采用免疫组织化学Polink-1显色系统(PV-6000)二步法,将蜡块常规切片(厚约4 μm)脱蜡,高压热修复,一抗4℃孵育过夜,二抗37℃孵育30 min,DAB显色,苏木素复染;用PBS代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

1.4.1 生存素蛋白染色的判定标准 生存素蛋白以胞质和(或)胞核出现棕黄色颗粒为阳性。随机选取10个高倍视野,计算1000个肿瘤细胞中的阳性细胞数并换算成百分数(%)。阳性细胞百分数≤10%为阴性,阳性细胞百分数>10%为阳性。

1.4.2 caspase-3染色的判定标准 caspase-3以胞质出现棕黄色颗粒为阳性。随机选取10个高倍镜视野,计算1000个肿瘤细胞中阳性细胞数并换算成百分数(%) ;caspase-3阳性细胞百分数≤10%为阴性,caspase-3阳性细胞百分数>10%为阳性。

1.4.3 ki-67染色的判定标准 ki-67以胞核出现棕黄色颗粒为阳性。随机选择10个高倍镜视野,计算1000个肿瘤细胞中阳性细胞数并换算成百分数(%) ,即为ki-67增殖指数(proliferative index,PI) ,即PI=(阳性肿瘤细胞数量/总的肿瘤细胞数量) × 100% 。

1.5 统计学方法 采用SPSS 18.0统计学软件对数据进行统计学分析,caspase-3蛋白在RHL及DLBCL组中的表达差异采用χ²检验,DLBCL中生存素蛋白表达与caspase-3表达的相关性采用Spearman相关分析,ki-67在生存素蛋白阳性组与阴性组之间的差异采用t检验,以P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生存素蛋白在DLBCL和淋巴结反应性增生中的表达 生存素蛋白在10例RHL中均无表达(0/10),48例DLBCL患者标本中的阳性表达率为79.2%(38/48),38例阳性表达的标本中32例表现

为胞核表达,6例胞核及胞质均表达,无胞质型(图1、2),生存素蛋白在DLBCL中的阳性表达率明显高于RHL中生存素蛋白的表达(P<0.05)。

2.2 caspase-3在DLBCL和正常淋巴结反应性增生中的表达 caspase-3蛋白在10例RHL中有8例表达,阳性率为80.0%(8/10),48例DLBCL患者标本中有24例表达(图3),阳性表达率为50.0%(24/48),两者之间无统计学差异(χ²=3.01,P>0.05)。

2.3 DLBCL中生存素蛋白与caspase-3表达的关系 DLBCL中生存素蛋白及caspase-3表达均阳性者有21例,两者均阴性有7例,生存素蛋白表达阳性而caspase-3表达阴性者有3例,生存素蛋白阴性而caspase-3阳性者有17例(表1);Spearman相关分析结果显示,生存素蛋白表达与caspase-3蛋白表达无相关性(r=0.205,P=0.160)。

表1 生存素蛋白及caspase-3在48例DLBCL中的表达

生存素蛋白表达	caspase-3 表达	
	阳性	阴性
阳性	21	3
阴性	17	7

2.4 生存素蛋白表达与ki-67增殖指数的关系 38例生存素蛋白表达阳性的DLBCL其ki-67增殖指数为(80.66±11.04)%(图4),10例生存素蛋白表达阴性的DLBCL其增殖指数为(62.00±6.32)%(表2),两组ki-67增殖指数之间差异明显(t=-5.10,P<0.05)。

表2 生存素蛋白表达程度与PI的关系

生存素蛋白表达	n	ki-67增殖指数(PI,%)
阳性	38	80.66±11.04*
阴性	10	62.00±6.32

* 与阴性组相比P<0.05

3 讨论

DLBCL是最常见的高度恶性的非霍奇金淋巴瘤(NHL),在西方等发达国家占成人非霍奇金淋巴瘤的30%~40%^[3],在中国等发展中国家,其患病率较欧美国家更高。DLBCL发病年龄范围比较宽,中位年龄为60~70岁,也可见于儿童;男性比女性发病率稍高。本研究中男性29例,女性19例,发病年龄在37~81岁,中位年龄为67岁。DLBCL恶性程度高,侵袭性强,治愈率低,且易复发,故寻找与DLBCL诊断、治疗及预后相关的指标亦是近年研究的热点之一。

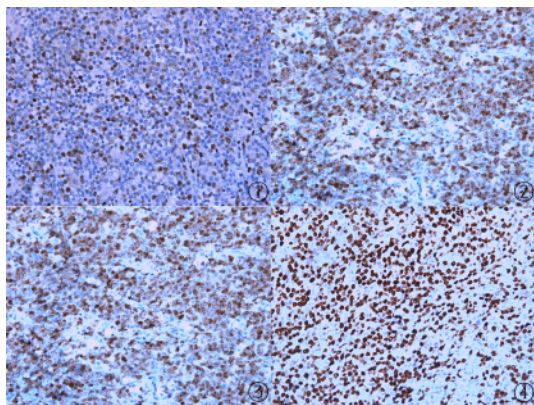


图1 生存素蛋白阳性(核型) (×400)
 图2 生存素蛋白阳性(核浆型) (×400)
 图3 caspase-3 阳性位于细胞浆(×400)
 图4 ki-67 阳性位于细胞核(×400)

生存素基因由 Ambrosini 等^[1]于 1997 年在人类基因组文库中通过杂交筛选分离出来,是目前发现的最小的也是最重要的凋亡抑制蛋白家族成员。国内外研究均显示,生存素蛋白仅在胎盘及正常成人的少数组织中有少量表达;细胞一旦发生恶变,其表达显著增加,研究表明绝大多数肿瘤组织中均存在生存素蛋白表达,不同的肿瘤组织中阳性表达率有所差别;恶性肿瘤的侵袭性越强,预后越差,生存素蛋白阳性表达率亦越高^[4-5]。本研究结果表明,10 例 RHL 中均无生存素蛋白表达,48 例 DLBCL 患者标本中生存素蛋白的阳性表达率为 79.2%;与韩继明等^[6]研究结果一致,提示生存素可能在 DLBCL 的发生发展中起到一定的作用。

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)是 caspase 家族中的重要成员之一,在细胞凋亡信号的传递及凋亡途径中起着核心作用。与生存素蛋白不同,caspase-3 广泛地存在于人体各种细胞,其分布及表达同时亦具有一定的组织特异性,新陈代谢越高,其表达越高。caspase-3 在细胞质中常以非活化酶原的形式存在,细胞受到刺激后发生损伤可被激活或直接被凋亡信号激活,一旦被激活,细胞死亡将不可避免。本研究结果表明,caspase-3 在 10 例 RHL 标本中有 8 例表达,阳性率为 80.0%(8/10),在 48 例 DLBCL 患者标本中 caspase-3 有 24 例表达,其阳性表达率为 50.0%(24/48),两者之间无明显差异($P > 0.05$);陈金元等^[10]在胃间质瘤中研究表明,生存素高表达可能与 caspase-3 的下调有关,本研究生存素蛋白表达与 caspase-3 表达大致呈负相关趋势,但是无统计学意义($r = 0.205, P = 0.160$),可能与本研究中样本量偏少有关,需要在以后研究中适当增加样本量以进一步观察生存素蛋

白表达与 caspase-3 表达的关系。

生存素蛋白存在两种不同的亚细胞定位,即定位于胞质和(或)胞核。目前关于其亚细胞定位的意义尚存在争议。有研究认为^[7-8]生存素的前体 mRNA 可产生两个不同的剪切变体,survivin δ EX3 和 survivin 2B,前者主要定位于胞核,可表达 137 个氨基酸的生存素蛋白,仍保留抗凋亡特性;后者主要定位于胞质,可表达 165 个氨基酸的生存素蛋白,抗凋亡功能明显下降;但亦有人^[9]认为生存素蛋白被 P34-cyclinB 磷酸化是抑制凋亡的首要调节,且只有胞质中生存素蛋白表达与 P34 有关,即生存素蛋白只有位于 caspase 存在的胞质中才能有效阻断细胞凋亡。本研究生存素蛋白仅在胞核中表达有 32 例,胞核及胞质中均表达者有 6 例;无单纯胞质表达;与陈金元等^[10]在胃肠道间质瘤研究中亚细胞定位一致。

作为凋亡抑制蛋白家族成员之一,生存素蛋白具有调节细胞增殖与细胞凋亡的双重功能;在细胞周期的 G2/M 期为保证正常细胞的分裂起着重要作用。ki-67 作为肿瘤细胞增殖指数,是目前较为肯定的核增殖标志。在本研究中 DLBCL 生存素蛋白阳性表达的 ki-67 增殖指数高于生存素蛋白阴性组,说明生存素蛋白阳性者肿瘤细胞增殖相对较活跃;提示生存素蛋白亦可能通过促进肿瘤细胞的增殖而在 DLBCL 发生发展过程中起着一定的作用,生存素蛋白可能也是 DLBCL 预后不良的指标之一。Shoeneman 等^[11]采用生存素反义寡核苷酸对犬恶性肿瘤的研究,陈曦海等^[12]对人胃癌细胞 SGC7901 的研究中均发现生存素反义寡核苷酸能下调肿瘤中生存素蛋白的表达,抑制肿瘤细胞生长且诱导凋亡,肿瘤化疗的敏感度也可明显增强;因此深入研究生存素蛋白与 DLBCL 的发生、发展的关系也可能为 DLBCL 的治疗寻找有效靶点、为 DLBCL 基因治疗开辟新的途径。

【参考文献】

[1] Ambrosini G,Adida C,Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
 [2] Kdenko VM, Uzzo RG, Bukowski R, et al. Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy [J]. Apoptosis, 2000, 5(1): 17-20.
 [3] Moller MB, Pedersen NT, Christensen BE, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation: a population-based study of 1575 cases [J]. Br J Haematol 2004, 124(2): 151-159.

X-STOP 棘突间撑开器治疗椎间盘突出症的临床疗效

李 毅, 王 弘, 徐宏光, 刘 平, 王凌挺

(皖南医学院附属弋矶山医院 脊柱外科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 研究通过运用 X-STOP 棘突间撑开器治疗腰椎间盘突出症的临床疗效。方法: 选择 2008 年 1 月~2011 年 12 月期间, 我院采用国产 X-STOP 棘突间撑开器治疗腰椎间盘突出症患者 18 例, 其中男 8 例, 女 10 例。观察并记录患者术前、术后 6 个月及末次随访时腰腿痛情况、手术节段椎间高度变化及椎间盘 Pfirrmann 评分。结果: 平均随访(4.7 ± 1.1) 年。随访期间无 1 例患者复发。术后患者腰腿痛明显缓解, 末次随访 ODI 评分、手术节段椎间高度及椎间盘 Pfirrmann 评分与术前比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 终板夹角术前与末次随访比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: X-STOP 棘突间撑开器治疗腰椎间盘突出症疗效满意, 并且能有效预防病变节段椎间盘的再次退变。

【关键词】棘突间撑开器; 腰椎间盘突出症; 临床疗效

【中图分类号】R 687.3 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.03.005

Clinical outcomes of X-STOP for herniated intervertebral disc disease

LI Yi, WANG Hong, XU Hongguang, LIU Ping, WANG Lingting

Department of Spinal Surgery, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To evaluate the clinical effects by applying interspinous spacer(X-STOP) implantation to treatment of herniated intervertebral disc. **Methods:** A total of 18 cases (8 males, 10 females) with herniated disk undergone treatment with domestic X-STOP were included from January 2008 to December 2011. The clinical data were retrospectively examined regarding low back pain scores maintained before operation, 6 months after operation and final follow-up as well as restoration of intervertebral disc height, lumbar movement range and Pfirrmann grading on MRI. **Results:** No relapse occurred in all patients in the follow-up periods (mean 4.7 ± 1.1 years). The difference was significant in terms of back pain relief, final scores by Oswestry disability index (ODI), restoration of intervertebral disc height and scoring by Pfirrmann grading system as compared with preoperative observations($P < 0.05$), yet the vertebral endplate angle measured before operation remained no significance with the findings by final follow-up($P > 0.05$). **Conclusion:** X-STOP interspinous implant can be effective for lumbar intervertebral disc and prevent the diseased disc from re-degeneration.

【Key words】 interspinous spacer; herniated intervertebral disc; clinical effect

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2013A253)

收稿日期: 2014-10-10

作者简介: 李 毅(1989-), 男, 2012 级硕士研究生, (电话) 15955395865, (电子信箱) 191660459@qq.com;

王 弘, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) wanghong553@126.com, 通讯作者。

[4] Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM *et al.* Expression of the anti-apoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma [J]. Gut 2000, 46(5) : 645 - 650.

[5] Xia C, Xu Z, Yuan X *et al.* Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides [J]. Mol Cancer Ther 2002, 1(9) : 687 - 694.

[6] 韩继明, 杨玲, 张静, 等. 非霍奇金淋巴瘤组织中 survivin 基因表达水平及临床意义 [J]. 陕西医学杂志, 2014, 41(43) : 1467 - 1469.

[7] Mahotka C, Wenzel M, Springer E *et al.* Survivin-delta Ex3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor surviving with different antiapoptotic properties [J]. Cancer Res, 1999, 59: 6097.

[8] Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy [J]. Trends MolMed 2001, 7(12) : 542 - 547.

[9] 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.

[10] 陈金元, 徐宏. Survivin 和 Caspase-3 在胃间质瘤中的表达及意义 [J]. 中国实用医药 2008, 3(31) : 1673 - 1675.

[11] Shoemaker JK, Ehrhart EJ 3rd, Charles JB *et al.* Survivin inhibition via EZN-3042 in canine lymphoma and osteosarcoma [J]. Vet Comp Oncol 2014, 6(13) : 12104.

[12] 陈曦海, 马荣, 于守江, 等. 反义 Survivin 核酸对荷瘤裸鼠放疗敏感性影响的初步研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2009, 43(3) : 229.