

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 04. 012

Elf-1 与 survivin 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

孔丽君¹, 胡金霞¹, 杨东霞², 张菡菡¹, 于 媛¹

Expression of Elf-1 and survivin and Their Clinical Implication in Non-small Cell Lung Cancer

KONG Li-jun¹, HU Jin-xia¹, YANG Dong-xia², ZHANG Han-han¹, YU Yuan¹

1. Department of Biochemistry, Binzhou Medical College, Yantai 264003, China, 2. Department of Pathology

Abstract: Objective To study the expression of Elf-1 and relationship with survivin and biological behavior in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Tissue microarray from 72 cases of NSCLC was developed. The expression of Elf-1 and survivin were detected by immuno-histochemistry staining with PV-9000 method. **Results** Elf-1 was mostly located in nucleus and in cytoplasm. The positive expression of Elf-1 was observed in 53 cases (73. 61%), and its intensity of expression was related to the differentiation stages of the cancer ($\chi^2 = 14. 849, P = 0. 021$), and significant differences were observed between different clinical stages ($\chi^2 = 24. 127, P = 0. 000$). The intensity of Elf-1 expression was significantly higher in the group with lymph node metastasis than that without ($\chi^2 = 18. 342, P = 0. 000$); Positive expression of survivin was also observed in 44 cases (61. 11%), its intensity of expression was related to the differentiation stages of the cancer ($\chi^2 = 16. 251, P = 0. 012$), and significant differences were noticed between different clinical stages ($\chi^2 = 20. 570, P = 0. 000$). The intensity of survivin expression was significantly higher in the group with lymph node metastasis than that without ($\chi^2 = 8. 723, P = 0. 033$); Positive correlation was found between the expression intensity of Elf-1 and survivin ($\tau = 0. 255, P < 0. 05$). **Conclusion** The expression intensity of Elf-1 is closely correlated with survivin. The expression of Elf-1 and survivin is related to differentiation degree, clinical stage and lymph node metastasis of non-small-cell lung cancer. Elf-1 and survivin might serve as important parameters in evaluating biological behaviors of non-small-cell lung cancer.

Key words: Non-small cell lung carcinoma; Ephrin-A2; Protein array analysis; Immunohistochemistry

摘 要:目的 探讨转录因子 Elf-1 与凋亡抑制因子 survivin 在非小细胞肺癌中的表达及它们与临床病理因素之间的关系。**方法** 收集 72 例非小细胞肺癌组织,应用组织芯片仪制备组织芯片,采用免疫组化 PowerVision™-9000(PV-9000)法检测 Elf-1、survivin 的表达。**结果** 在 72 例非小细胞肺癌组织中,Elf-1 阳性染色定位于肺癌细胞核及胞质,阳性表达 53 例 (73. 61%),其表达强度与非小细胞肺癌的分化程度有关 ($\chi^2 = 14. 849, P = 0. 021$)。不同临床分期的非小细胞肺癌组织中 Elf-1 表达强度差异有统计学意义 ($\chi^2 = 24. 127, P = 0. 000$),Elf-1 表达强度在淋巴结有转移组显著高于淋巴结无转移组 ($\chi^2 = 18. 342, P = 0. 000$);survivin 阳性染色定位于肺癌细胞核及胞质,阳性表达 44 例 (61. 11%),其表达强度与非小细胞肺癌的分化程度有关 ($\chi^2 = 16. 251, P = 0. 012$),不同临床分期的非小细胞肺癌组织中 survivin 表达强度差异有统计学意义 ($\chi^2 = 20. 570, P = 0. 000$),survivin 表达强度在淋巴结有转移组显著高于淋巴结无转移组 ($\chi^2 = 8. 723, P = 0. 033$);非小细胞肺癌组织中 Elf-1 与 survivin 的表达强度呈极显著性正相关 ($\tau = 0. 255, P < 0. 05$)。**结论** Elf-1 的表达强度与 survivin 的表达程度密切相关,均与肺癌细胞分化程度、临床分期及淋巴结转移有关,提示两者均可成为评估非小细胞肺癌生物学行为的重要指标。

关键词: 非小细胞肺癌;膜附着型本体 A2;蛋白质阵列分析;免疫组织化学

收稿日期:2008-03-31;修回日期:2008-06-25
作者单位:1. 264003 山东烟台,滨州医学院生物化学与分子生物学教研室,2. 病理学教研室
作者简介:孔丽君(1967-),女,硕士,副教授,主要从事肿瘤的基因诊断与治疗

中图分类号:R734. 21 文献标识码:A
文章编号:1000-8578(2009)04-0306-04

0 引言

通过长期的探索和研究发现癌基因激活、抑癌基因失活及凋亡调节改变的共同作用是恶性肿瘤发生的分子基础。Elf-1 是原癌基因 Ets 转录家族成员之一,在肿瘤的侵袭、转移和血管生成过程中起重要作用^[1]。survivin 是目前发现的最强的凋亡抑制因子,与肿瘤细胞的增殖及浸润转移密切相关。本研究建立了含有 72 例人体非小细胞肺癌(NSCLC)标本的组织芯片,采用免疫组化 PowerVision™-9000(PV-9000)法检测 Elf-1、survivin 的表达,探讨两者与 NSCLC 的组织学分级、淋巴结转移、临床分期等的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

研究的标本随机取自青岛大学医学院附属医院胸外科 2003~2005 年间手术切除并经病理证实的 NSCLC 标本 72 例(术前均未行放、化疗)。均经 40 g/L 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,苏木精-伊红染色后复核病理诊断并按 WHO 标准分型、分级。72 例病人中男 59 例,女 13 例;年龄 39~76 岁,≤55 岁者 27 例,>55 岁者 45 例,平均 57.5 岁。鳞癌 30 例(Ⅰ级 5 例、Ⅱ级 13 例、Ⅲ级 12 例),腺癌 42 例(Ⅰ级 11 例、Ⅱ级 13 例、Ⅲ级 18 例)。肿瘤直径≤5 cm 者 50 例,>5 cm 者 22 例。所有病例均有淋巴结情况记录,其中有转移者 39 例,无转移者 33 例。按 1997 年肺癌国际分期修正系统进行临床分期:Ⅰ期 29 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 24 例。

1.2 试剂来源

兔抗人 Elf-1、羊抗人 survivin 购自美国 Santa Cruz 公司;PowerVision™-9000 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司

1.3 检测方法

1.3.1 组织芯片的设计及制备 依据制备原则,为了能更好代表原蜡块的病变特点,将组织芯片(癌典型区域)的直径定为 2 mm,同时根据收集的标本例数(72 例)将其设计为两个组织阵列(N1 和 N2),并且为了便于确定芯片的阵列顺序,在每一个蜡块的起始位置各放置一例人肾组织作为标记(Marker)。两个蜡块阵列设计均为 6 行×8 例,分别包含 48 和 26 个组织芯,组织芯之间的间距为 1mm。N1 包含 1 例 Marker 和 47 例 NSCLC 组织,N2 包含 1 例 Marker 和 25 例 NSCLC 组织。应用组织芯片制作仪制备 48(6×8)点阵列的 NSCLC 组织芯片蜡块 2 个,即由 72 例 NSCLC 标本组成的组织芯片一套。

1.3.2 PowerVision™-9000 免疫组化检测方法 石蜡切片脱蜡,系列乙醇水化至蒸馏水;体积分数 0.03 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,微波修复,1:100 兔抗人 Elf-1 抗体或 1:100 羊抗人 survivin 抗体依次滴加试剂Ⅱ、Ⅲ孵育,DAB 显色,镜下观察,自来水终止显色。Mayer 苏木素复染,中性树胶封固。阴性对照省略一抗,以 PBS 代替;阳性对照用已知阳性片按上述步骤操作。

1.4 评估标准

以肺癌细胞核及胞质内呈棕黄色颗粒状着色为 Elf-1 表达阳性;细胞浆及细胞核内染色为棕黄色颗粒状着色为 survivin 表达阳性。参照有关文献^[2]制定免疫组化判定标准:每张切片随机选取 10 个高倍(400 倍)视野,每个高倍视野计数 100 个癌细胞,分别观察 Elf-1 和 survivin 阳性细胞染色强度,并计数两者的阳性细胞数。首先按染色强度记分:无染色为 0 分;淡黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;深棕黄或棕褐色为 3 分。再按阳性细胞百分率计分:≤5%为 0 分;6%~30%为 1 分;31%~70%为 2 分;≥71%为 3 分。以阳性细胞百分率记分和强度记分相加所得总分进行判断,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.5 统计学方法

所有数据均应用 SPSS for windows 11.0 统计分析软件在计算机上进行,各指标与临床病理特征间的关系采用 Kruskal-Wallis 及 Mann-Whitney 秩和检验;各指标间的相互关系采用 Kendall 相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织芯片质量

组织芯片排列整齐,无缺损现象,苏木精-伊红染色的组织点阵排列整齐。

2.2 Elf-1 在 NSCLC 中的表达及与临床病理特征间的关系

Elf-1 在细胞阳性染色为棕黄色,颗粒状,定位于 NSCLC 细胞核及胞质。Elf-1 在 72 例 NSCLC 中,19 例表达为(-),25 例为(+),19 例为(++),9 例为(+++),Elf-1 阳性表达率为 73.61%。

不同组织学分级的 NSCLC 组织中 Elf-1 的表达强度差异有统计学意义($\chi^2 = 14.849, P = 0.021$)。其中Ⅰ、Ⅱ级间,Ⅰ、Ⅲ级间比较差异有统计学意义($P = 0.046, 0.013$),而Ⅱ、Ⅲ级间差异无统计学意义($P = 0.299$)。Elf-1 的表达增强与 NSCLC 易发生淋巴结转移有关,淋巴结有转移组

Elf-1 的表达强度显著高于淋巴结无转移组 ($\chi^2 = 18.342, P = 0.000$); 临床分期的 I、II、III 期 NSCLC 组织 Elf-1 的表达强度差异有统计学意义 ($\chi^2 = 24.127, P = 0.000$)。Elf-1 的表达与病人的年龄、性别、原发瘤大小及组织病理学类型均无关 (P 均 >0.05), 见表 1。

表 1 Elf-1 在 NSCLC 中的表达与患者临床病理特征间的关系

Table 1 The relation of expression of Elf-1 and clinical charateristics of pathology in NSCLC						
Character	n	The expression of Elf-1				$(\chi^2)/P$
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Pathological types						
Squamous cell carcinoma	30	9	9	9	3	1.102/0.777
adenocarcinoma	42	10	16	10	6	
Histological grade						
grade I	16	3	5	7	1	14.849/0.021
grade II	26	7	8	10	1	
grade III	30	2	8	9	11	
Gender						
male	59	15	22	16	6	2.067/0.559
female	13	4	3	3	3	
Lymphnode metastasis						
yes	39	4	10	11	14	18.342/0.000
no	33	15	10	7	1	
Tumor diameter(cm)						
≤5	50	13	18	12	6	0.397/0.941
>5	22	6	7	7	3	
Age						
≤55	27	7	10	8	2	1.028/0.751
>55	45	12	15	11	7	
Clinical stage						
phase I	29	9	9	9	2	24.127/0.000
phase II	19	5	7	4	3	
phase III	24	5	9	6	4	

2.3 survivin 在 NSCLC 中的表达及与临床病理特征间的关系

survivin 在细胞阳性染色为棕黄色, 颗粒状, 定位于 NSCLC 细胞质及细胞核, 部分细胞膜少量表达。survivin 在 72 例 NSCLC 组织中, 28 例表达为 (-), 20 例为 (+), 19 例为 (++) , 5 例为 (+++); 阳性表达率为 61.11%。不同组织学分级的 NSCLC 组织中, survivin 的表达强度差异有统计学意义 ($\chi^2 = 16.251, P = 0.012$), 其中 I、II 级, I、III 级间比较差异有统计学意义 ($P = 0.010, 0.037$), 而 II、III 级间差异无统计学意义 ($P = 0.959$)。survivin 的表达增强与 NSCLC 易发生淋巴结转移有关, 淋巴结有转移组 survivin 的表达强度显著高于淋巴结无转移组 ($\chi^2 = 8.723, P = 0.033$)。不同临床分期的 NSCLC 组织中 survivin 的表达强度在 I、II、III 期间比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 20.570,$

$P = 0.000$); survivin 的表达与病人的年龄、性别、原发瘤大小及组织病理学类型均无关 (P 均 >0.05), 见表 2。

表 2 survivin 在 NSCLC 中的表达与患者临床病理特征间的关系

Table 2 The relation ship of the expression of survivin and clinical charateristics of pathology in NSCLC						
Character	n	The expression of Elf-1				$(\chi^2)/P$
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Pathological types						
Squamous cell carcinoma	30	12	8	8	2	0.046/0.997
adenocarcinoma	42	16	12	11	3	
Histological grade						
grade I	16	3	4	8	1	16.251 / 0.012
grade II	26	4	11	10	1	
grade III	30	2	7	9	12	
Gender						
male	59	23	16	16	4	1.513 / 0.679
female	13	5	4	2	2	
Lymph node metastasis						
yes	39	8	10	13	8	8.723 / 0.033
no	33	12	13	7	1	
Tumor diameter(cm)						
≤5	50	19	14	13	4	0.330 / 0.954
>5	22	9	6	6	1	
Age						
≤55	27	12	7	6	2	0.695 / 0.874
>55	45	16	13	13	3	
Clinical stage						
phase I	29	12	9	7	1	20.570/ 0.000
phase II	19	7	5	6	1	
phase III	24	9	6	6	3	

2.4 Elf-1、survivin 在非小细胞肺癌中表达的相关性

经 Kendall 等级相关分析 $\tau = 0.255, P = 0.012$ 。Elf-1 与 survivin 在 NSCLC 中的表达强度呈显著性正相关, 见表 3。

表 3 Elf-1、survivin 在非小细胞肺癌中表达的相关性

Table 3 The correlation between the expression of Elf-1 and survivin in NSCLC				
Expression of survivin	Expression of Elf-1			
	Negative	Weak positive	Positive	Strong positive
Negative	16	8	3	1
Weak positive	2	9	6	3
Positive	0	7	9	3
Strong positive	1	1	1	2

$\tau = 0.255, P = 0.012$

3 讨论

近些年来发展起来的组织芯片技术又称组织微阵列(TMA), 它可以在一张切片上高通量获取组织学、基因和蛋白表达信息。Richter 等^[3]应用大容量的组织芯片, 将含有 2 317 个膀胱癌组织的芯片进

行 FISH 和免疫组化染色, 仅用两周时间便完成了对细胞周期素 E (CCNE) 基因扩增和过表达的研究, 显示了组织芯片检测的快速高效。目前国内已有应用 TMA 对前列腺癌、乳癌、食管癌、结直肠癌等不同肿瘤进行研究的报道, 也无不体现出它平行、高效、节约病理资源的特点^[4]。TMA 与传统的病理学技术、组织化学及免疫组化技术相结合, 具有广阔的应用前景。

现在人们对很多肿瘤标记物进行了研究, 但对 Elf-1 本身的研究较少, 多是对其所在的 Ets 家族进行的研究^[5]。Elf-1 是 Ets 信号依赖转录调控因子家族中的一员, 参与肿瘤形成和病毒基因的激活^[6]。Elf-1 还通过转录激活一些与细胞外基质降解有关的酶, 使肿瘤细胞得以分解并穿透结缔组织屏障而向深部组织发生浸润转移。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一组重要的细胞外基质降解酶, 其在肿瘤转移中的作用是破坏局部组织结构, 促进肿瘤生长; 破坏基底膜屏障, 利于肿瘤转移; 通过对细胞外基质的改建, 促进肿瘤新生血管形成^[7]。Elf-1 的过度表达已经在前列腺癌、乳腺癌、骨肉瘤, 人子宫颈腺癌传代细胞系有过报道。Takai 等^[8]研究 Elf-1 在子宫内膜癌中的表达时发现, Elf-1 在子宫内膜癌中通过控制 UPA 基因的表达, 进而促进细胞外基质蛋白水解、肿瘤移行、向内外浸润和有丝分裂原激活, 使肿瘤浸润和转移。survivin 是一种强的凋亡抑制因子, 是迄今发现的最小的 hIAP 蛋白, 同细胞周期调控和细胞凋亡都相关。survivin 与 Cdk4 相互作用可导致 k2/CyclinE 激活与 Rb 磷酸化, 磷酸化的 Rb 蛋白失去对细胞生长的抑制作用, 导致细胞失控性生长, 打破了细胞增殖与凋亡平衡, 导致肿瘤的发生。survivin 在许多恶性肿瘤组织中主要表达于细胞周期中的 G₂/M 期^[9], 抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖, 参与调节细胞的有丝分裂及血管形成。Tamm 等^[10]用免疫组化方法检测 60 个肿瘤细胞株的 survivin 水平, 发现包括乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤等均有不同程度表达, 这一普遍现象显示 survivin 基因在恶性肿瘤中可能处于失控的表达状态。

本文结果显示 Elf-1 主要表达于 NSCLC 细胞核及(部分)细胞浆, survivin 主要表达于细胞浆或细胞核, 部分细胞膜少量表达, 两者均在坏死区域周围和浸润边缘部的癌细胞中表达明显增多; 随 NSCLC 细胞分化程度的降低, 两者阳性表达强度均增加; 淋巴结有转移组 Elf-1 及 survivin 的表达强度

显著高于淋巴结无转移组, 两者的表达强度均与患者的临床分期有关, 推测 Elf-1 及 survivin 的表达均可能与肿瘤的生物行为有关, 是肿瘤具有攻击性的特征。本研究还显示 Elf-1 及 survivin 的表达强度呈显著性正相关, 提示 Elf-1 与 survivin 在 NSCLC 的发生、演进过程中存在一定的相互联系, 在抑制 NSCLC 血管内皮细胞和肿瘤细胞的凋亡、促使肿瘤细胞生长增殖、促进肿瘤血管生成及转移过程中可能具有一定的协同作用, 导致他们表达强度基本一致的某些因素也可能是相同的。因此联合检测 Elf-1、survivin 可作为判定非小细胞肺癌恶性程度, 评估其侵袭性及转移性的一种新的标记物。但是本次实验没有与其他的肿瘤标记物相比, 不能得出 Elf-1 及 survivin 染色是最好的检测方法。还因为短期的随访和病例数量有限, 本实验也未能揭示 Elf-1 及 survivin 表达的高低与病人的预后、生存率的关系, 希望进一步在长时间的随访和大量病例研究结果, 证明对 Elf-1 及 survivin 表达的分析能成为一个有用的诊断标记物和一个重要的预后指标。

参考文献:

- [1] Singh S, Barrett J, Sakata K, et al. ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis[J]. Curr Drug Targets, 2002, 3(5): 359-367.
- [2] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N, et al. Expression of a novel anti-apoptosis gene, Survivin, correlated with tumor cell apoptosis and P53 accumulation in gastric carcinomas [J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 1802-1086.
- [3] Richter J, Wagner U, Kononen J, et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer[J]. Am J Pathol, 2000, 157(3): 787-794.
- [4] 江晨, 崔琳, 纪萍, 等. 胃癌组织中 HGF/c-Met 的组织芯片检测及其与肿瘤血管生成关系[J]. 齐鲁医学杂志, 2005, 20(3): 211-213.
- [5] 张健, 高福禄, 刘芝华. Ets 转录因子家族在发育和肿瘤中作用的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(10): 1624-1627.
- [6] Xu LH, Courtney B, Wei HN, et al. Critical role for the Ets transcription factor ELF-1 in the development of tumor angiogenesis [J]. Blood, 2006, 107(8): 3153-3160.
- [7] 周红梅, 李卫花, 翟玉珍. Elf-1 在肿瘤浸润转移中的转录调控研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(13): 996-997.
- [8] Takai N, Miyazaki T, Nishida M, et al. Clinical relevance of Elf-1 overexpression in endometrial carcinoma[J]. Gynecologic Oncology, 2003, 89(3): 408-413.
- [9] 董德琼, 薛东鹰, 杨渝浩. Survivin 蛋白在肺腺癌中的表达及临床意义[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(2): 92-95.
- [10] Tamm I, wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), bax, caspase, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5315-5320.

[编辑: 刘红武; 校对: 安 凤]