

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 10. 011

survivin 蛋白在人非小细胞肺癌中的表达及其与 bcl-2、HSP90 蛋白表达和细胞凋亡的关系

綦 俊¹,张在空¹,余 畅²

Expression of survivin Protein in Non-small Cell Lung Cancer and Relationship with bcl-2, HSP90 Protein and Apoptosis

QI Jun¹, ZHANG Zai-Kong¹, YU Chang²

Department of Thoracic ,Chongqing Tumor Institute, Chongqing 400030, China; 2. Department of Physiology, Chongqing University of Medical Science

Corresponding Author: YU Chang, E-mail: shanda752005@163. com

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of survivin, bcl-2, HSP90 protein and apoptosis in non-small cell lung cancer(NSCLC). **Methods** Western blot to detect the expression of survivin, bcl-2, HSP90 protein in 80 cases of NSCLC and 20 cases of benign lung lesion. TUNEL assay was applied to detect cell apoptosis. **Results** Survivin was expressed in 57 of 80 (71. 25%) cases of NSCLC and in 0 of 20 (0%) cases of benign lung lesion. There was negative correlation between the expression of survivin and apoptosis index. The positive rate of bcl-2 in lung carcinoma was 56. 25% (45/80), much higher than that in benign lung lesion (10%) and the level of expression of bcl-2 and HSP90 in NSCLC was higher than that in benign lung lesion. There was significant correlation among the expression of survivin, HSP90 and bcl-2 in NSCLC. **Conclusion** survivin protein overexpression plays an important role in the occurrence and progression of NSCLC. There was significant correlation between the expression of survivin and the reducing of cell apoptosis, survivin may be identified as a new therapeutic target. The expression of survivin, bcl-2 and HSP90 was positive correlative, they cooperated in the occurrence and progress of NSCLC.

Key words: NSCLC; survivin; bcl-2; HSP90; Apoptosis

摘 要:目的 探讨 survivin 蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达,以及与 bcl-2、HSP90 蛋白表达及细胞凋亡的相互关系。**方法** 应用 Western blot 法检测 80 例 NSCLC 肿瘤组织、20 例肺良性病变组织中 survivin、HSP90、bcl-2 蛋白表达情况,用 TUNEL 法检测细胞凋亡的情况,并将结果进行相关分析。**结果** survivin 蛋白在肺良性病变组织中不表达,在 71. 25% (57/80)的 NSCLC 组织中有表达;survivin 表达水平与细胞凋亡指数呈负相关。肺癌组织 bcl-2 蛋白阳性表达率 56. 25% (45/80)明显高于肺良性病变组织的 10. 00% (2/20),且癌组织中表达水平较肺良性病变组织高,两者比较差异有统计学意义;肺癌组织中 HSP90 蛋白表达水平明显高于肺良性病变组织。肺癌组织中 HSP90、bcl-2 蛋白与 survivin 蛋白表达显著相关($P<0. 05$)。 **结论** survivin 蛋白在肺癌组织中表达上调,提示该基因对 NSCLC 的发生发展起重要作用。survivin 蛋白表达增高与细胞凋亡减少密切相关,survivin 有望成为肺癌基因治疗的新靶点;survivin 蛋白的表达与 HSP90、bcl-2 蛋白的表达均呈正相关,三者 in 肺癌的发生中可能起协同作用。

关键词: 非小细胞肺癌; survivin; bcl-2; HSP90; 凋亡

中图分类号: R734. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)10-0851-04

0 引言

细胞凋亡是机体维持细胞群体数量稳态的重要

手段。凋亡调节紊乱有助于细胞的恶性转化和肿瘤的进展,是恶性肿瘤形成的重要机制之一。survivin 蛋白是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,其组织分布具有明显的细胞选择性:在正常成人已分化的成熟组织(胸腺、生殖腺除外)不表达,而在人类多种肿瘤中有表达,且 survivin 蛋白的表达与患者的预后密切相关^[1]。热

收稿日期:2008-07-24;修回日期:2008-11-19
作者单位:1. 400030 重庆市肿瘤研究所胸外科;2. 重庆医科大学基础医学院生理教研室
通信作者:余畅, E-mail: shanda752005@163. com
作者简介:綦俊(1975-),男,硕士,主治医师,主要从事胸部肿瘤临床及科研工作

休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一组在进化上高度保守的蛋白质,其主要功能是作为分子伴侣,提高细胞生存率。根据同源程度及分子量大小可将 HSP 分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、小分子 HSP、泛素等多个亚家族。HSP90 是目前研究较多的一类热休克蛋白,与肿瘤的发生发展密切相关^[2]。bcl-2 是一种凋亡抑制基因,它抑制许多因素引起的细胞凋亡,异常延长细胞的生存时间,促进有转化作用的基因突变的积累,并协助细胞逃避免疫系统的监视作用,从而参与肿瘤的发生发展^[3]。本实验采用 Western blot 法检测了 80 例非小细胞肺癌组织中 survivin、HSP90、bcl-2 蛋白表达以及探讨它们与肿瘤细胞凋亡之间的相互关系,旨在探讨其在肺癌发生、发展、临床诊断及预后评估中的价值。

1 资料与方法

1.1 资料

选择经手术切除和病理证实的非小细胞肺癌患者 80 例,患者年龄 35~76 岁,平均(56.15±7.09)岁。男 52 例,女 27 例。鳞癌 46 例,腺癌 34 例。临床分期:依据 1997 年国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期标准 I 期 19 例,II 期 15 例,III 期 38 例,IV 期 8 例。有淋巴结转移 44 例,无淋巴结转移 36 例。另选肺良性病变患者 20 例作为对照,年龄 25~75 岁。其中肺结核 7 例,支气管扩张症 7 例,肺炎性假瘤 6 例。取以上患者手术切除的新鲜病变组织标本分别用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,制成厚 4 μm 的切片和液氮冷冻。石蜡切片用 TUNEL 法测细胞凋亡情况;液氮冷冻组织用 Western blot 法行 survivin、HSP90 及 bcl-2 蛋白的定量分析。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 法

取适量(400 mg)组织样品,用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白。用 Bradford 法行总蛋白定量。调整每个泳道上样量为 20 μg 左右。聚丙烯酰胺凝胶电泳:采用 5% 积层胶和 10% 分离胶;积层胶电泳电压为 60 V,分离胶电泳电压为 120 V,总计电泳时间为 2 h 左右。将蛋白质转移至硝酸纤维素膜:制作电转三明治,硝酸纤维素膜位于阳极侧,凝胶位于阴极侧;采用 30 V 电压,电转 12 h。将转有蛋白条带的膜常规封闭、洗膜后分别与 1:100 兔抗人 survivin 抗体、1:200 兔抗人 HSP90 抗体和鼠抗人 bcl-2 抗体及 1:100 鼠抗人 β-actin 抗体 4℃ 孵育过夜,洗膜后分别加入相应 1:1 000 羊抗兔 IgG/HRP 或 1:1 000 羊抗鼠 IgG/HRP 37℃ 孵育 4 h。洗膜后

DAB 显色。用 Bio-Rad 图像分析系统照相,用 Quantity One 软件分析,以相应蛋白条带的灰度值/β-actin 蛋白条带的灰度值表示相对蛋白含量。

1.2.2 TUNEL 法测细胞凋亡

按照 TUNEL 试剂盒说明步骤进行操作:石蜡切片脱蜡-固定-加蛋白酶 K 工作液-固定-加平衡液-加 TdT 酶反应液-加 2×SSC 溶液终止反应-浸洗后加 Streptavidin-HRP 溶液-加 DAB 工作液,直到呈浅棕色背景-终止反应-苏木精复染-1% 酚油精分色-镜下观察细胞核复染情况-干燥-二甲苯透明,盖玻片中性树胶封片。

1.3 统计学方法

采用 SAS 8.0 进行统计分析,使用方差分析和两两比较的 *t* 检验以及相关分析。

2 结果

2.1 Western blot 结果

2.1.1 survivin 蛋白的表达

肺癌组织的 survivin 蛋白阳性表达率为 71.25%,但在肺良性病变组织中未见阳性表达,两组比较差异有统计学意义,见图 1。

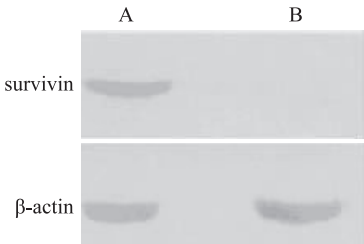


图 1 survivin 蛋白的表达

Figure 1 Expression of survivin in lung carcinoma (A) and in benign lung lesion (B)

2.1.2 bcl-2 蛋白的表达

bcl-2 蛋白在肺癌组织的阳性表达率为 56.25%,显著高于肺良性病变组织中的 10.0%(*P*<0.05);肺癌组织中 bcl-2 蛋白表达的平均光密度值为(0.738±0.034),明显高于肺良性病变组织(0.416±0.023)(*P*<0.05),见图 2。

2.1.3 HSP90 蛋白的表达

HSP90 蛋白在肺癌组织和肺良性病变组织中均有表达,但 HSP90 蛋白在肺癌组织中表达的平均光密度值为(0.815±0.023),显著高于肺良性病变组织中的(0.527±0.059)(*P*<0.05),见图 3。

2.2 survivin 蛋白的表达与细胞凋亡

survivin 蛋白阳性的肺癌组织的凋亡率平均为(1.019±0.342),survivin 阴性表达的 NSCLC 患者平均凋亡率为(1.837±0.728),肺良性病变组织

的平均凋亡率为(3.723 ± 0.579),差异有统计学意义($P<0.05$);随着肿瘤分期的进展,survivin 表达水平逐渐增高,细胞凋亡指数逐渐降低,两者呈负相关,见表 1。

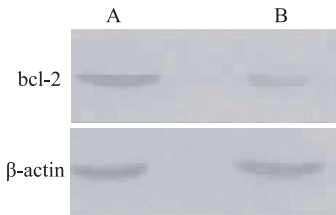


图 2 bcl-2 蛋白的表达

Figure 2 Expression of bcl-2 in lung carcinoma (A) and in benign lung lesion (B)

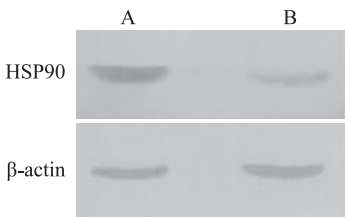


图 3 HSP90 蛋白的表达

Figure 3 Expression of HSP90 in lung carcinoma (A) and in benign lung lesion (B)

表 1 不同肿瘤分期 survivin 表达与细胞凋亡指数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of survivin and apoptosis index in different tumor staging ($\bar{x} \pm s$)					
Tumor staging	n	survivin	AI	r	P
I	19	0.278 ± 0.017	1.654 ± 0.033		
II	15	0.644 ± 0.025	1.329 ± 0.041		
III	38	1.096 ± 0.034	0.977 ± 0.025	-0.435	<0.05
IV	8	1.562 ± 0.029	0.681 ± 0.056		
P		<0.05	<0.05		

2.3 survivin、bcl-2、HSP90 蛋白表达的关系
survivin、bcl-2、HSP90 蛋白在肿瘤组织中的表达明显高于肺良性病变中的表达水平,且呈正相关,见表 2。

表 2 survivin、bcl-2、HSP90 蛋白表达及相关关系

Table 2 Expression of survivin, bcl-2, HSP90 and their relationship

	Lung cancer tissue	Lung benign lesion tissue	P
survivin	0.916 ± 0.039	0	<0.05
bcl-2	0.738 ± 0.031	0.416 ± 0.023	<0.05
HSP90	0.815 ± 0.023	0.527 ± 0.059	<0.05
	r = 0.753	P < 0.05	

3 讨论

细胞增殖失控是肿瘤最明显的特征之一,凋亡

的抑制和减弱是导致肿瘤细胞异常增殖的重要机制。凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAPs)家族有 8 个成员,分别是 HIAP-1、HIAP-2、XIAP、ML-IAP (melanocytes IAP)、survivin 和 NAIP、BRUCE (Apollon)、ILP-2/Ts-IAP^[4]。survivin 是新近发现的 IAP 家族成员,具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双重功能,其分子量为 16.5 kD,含 142 个氨基酸。在正常成人,除了在胎盘、胸腺、增生期和分泌期的子宫内膜中有较弱的表达外,其余组织均未发现。研究显示,在 60 多种肿瘤组织中,survivin 均呈高表达,表明 survivin 在癌组织中可能处于失控的表达状态。survivin 对肿瘤细胞的凋亡抑制和异常增殖起着重要作用,肿瘤患者的 survivin 高表达往往提示预后不良^[5]。我们的实验发现,肺癌组织中 survivin 蛋白阳性表达率为 71.25%,但在肺良性病变组织中,未见阳性表达,说明 survivin 蛋白在肺癌组织具有特异性高表达特征。在 survivin 蛋白表达增高的同时,细胞凋亡减少,且 survivin 蛋白表达水平越高,肿瘤细胞的凋亡率越低,提示 survivin 蛋白在肺癌组织中可以通过抑制凋亡来促进细胞的恶性增殖。其机制可能有如下几个方面:(1)抑制 Fas, bax, Caspase-7 及抗癌药物诱导的细胞凋亡;(2)抑制线粒体细胞色素 C 的释放和 Apaf-1 的激活;(3)直接与细胞死亡蛋白激酶 Caspase-3 及 Caspase-7 相结合并抑制它们的活性,从而阻断细胞死亡共同通路的下游;(4)与细胞周期调控因子 CDK4 结合形成 survivin-CDK4 复合物,使得 p21^{waf1} 从 p21^{waf1}-CDK4 的复合物中释放出来而与 Caspase-3 结合并抑制 Caspase-3 的活性^[6],而激活 XIAP,抑制凋亡诱导因子 AIF 的核转位也可能是 survivin 抑制细胞凋亡的机制之一^[7]。

HSP90 广泛存在于原核与真核细胞中,在哺乳动物细胞内含量丰富,可以占到细胞胞质总蛋白的 1%~2%,而在肿瘤细胞中其含量更是较正常细胞高出 2~10 倍,这一特性提示 HSP90 对肿瘤细胞的增殖和存活起着重要的作用^[8]。已有研究证实许多在肿瘤生长转移的信号通路中起重要作用的蛋白激酶、膜受体和核内受体及转录因子都是 HSP90 的效应蛋白^[9]。HSP90 可以稳定效应蛋白的构象,防止它们由泛素化的途径降解使其以活性形式存在,从而对多种肿瘤生长转移的血液供应、营养支持、信号刺激和物质代谢起重要作用^[10],促进肿瘤生长、增殖和转移^[11-12]。在本实验中,HSP90 蛋白在肺癌组织和肺良性病变组织中均有表达,但 HSP90 蛋白在肺癌组织中表达的水平显著高于肺良性病变组织($P<0.05$),HSP90 蛋白表达和 survivin 表达呈正

相关。其机制可能为 survivin 的表达有赖于多条信号通路的激活, HSP90 蛋白作为分子伴侣, 可以帮助并维持诸如 JAK-STAT、MAPK/ERK 以及 PI3K/B-Akt 等信号转导通路的激活, 从而促进 survivin 的高表达。

bcl-2 是参与调节凋亡过程的基因家族的第一个成员, bcl-2 蛋白抑制凋亡, 减少细胞对生长因子的需求, 延长细胞的生存。bcl-2 抑制凋亡的特性在肿瘤细胞的恶性转化中起重要作用。bcl-2 过表达可抑制细胞凋亡, 尤其是抑制 DNA 损伤的细胞凋亡。从而使细胞增殖和凋亡不平衡, 即细胞增殖速度虽然没有改变, 但由于凋亡细胞的减少仍会导致细胞数的增多, 延长了细胞生存时间, 这不仅打破了细胞之间正常的动态平衡, 而且给细胞恶性转化提供了时间和可能性, 并协助细胞抵抗免疫系统的监视作用, 最终导致肿瘤的形成^[13]。在本实验中, bcl-2 蛋白在肺癌组织的阳性表达率为 56.25%, 显著高于肺良性病变组织中的 10.00% ($P<0.05$), 且肺癌组织中 bcl-2 蛋白表达水平也明显高于肺良性病变组织, 与 survivin 的表达呈正相关。同时可见在 bcl-2 表达较高的细胞中, 凋亡率较低。Tanaka 等^[14]报道, survivin 基因位于染色体 17q25, 而 bcl-2 基因位于染色体 18q21, 两者基因位点并不一致, 提示可能有其他的转录元件促使这两个基因产物在肿瘤中共同表达。另一方面, survivin 基因和 bcl-2 基因均由 TATA 缺乏, GC 富集的启动子序列所调控, 并且主要在增殖活跃的细胞中转录, 提示可能存在转录活化的共同机制。尽管存在共同表达的途径, 但 survivin 和 bcl-2 分别行使不同的抗凋亡功能。在 NSCLC 中, 这两条抗凋亡路径可能会聚起来, 协同转化为强大的抗凋亡作用, 促进了 NSCLC 的发生。检测 survivin 和 bcl-2 的表达, 对 NSCLC 的临床诊断和判断预后具有重要意义, 也为其靶向治疗提供更好的途径。

综上所述, 我们得出以下结论: survivin 蛋白在肺癌组织中表达上调, 提示 survivin 基因可能通过抑制肺癌细胞凋亡, 对肺癌的发生发展起重要作用, survivin 基因有望成为肺癌基因治疗的新靶点; survivin 蛋白的表达与 HSP90 蛋白、bcl-2 蛋白的表达

呈正相关, 与肿瘤细胞的凋亡率呈负相关, survivin、HSP90 和 bcl-2 蛋白三者在肺癌的发生发展中协同作用, 从多个环节、多种途径共同抑制凋亡促进肿瘤细胞的恶性增殖。

参考文献:

[1] Ambrosini G, Adida C, Ahieri DC, et al. A novel anti-apoptosis gene Survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[2] Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(6): 283-290.

[3] Kukhta VK, Marozkina NK, Sokolchik IG, et al. Molecular mechanisms of apoptosis [J]. Ukr Biokhim Zh, 2003, 75(6): 5-9.

[4] Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(4): 231-243.

[5] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer [J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8581-8589.

[6] 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.

[7] Shankar SL, Mani S, OGuin KN, et al. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways [J]. Neurochem, 2001, 79(2): 426-436.

[8] 于晓姝. 热休克蛋白对细胞凋亡的调控作用 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1): 1-4.

[9] Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2003, 228(2): 111-133.

[10] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. Nature, 2001, 411(6835): 342-348.

[11] Isaacs JS, Xu W, Neckers L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics [J]. Cancer Cell, 2003, 3(3): 213-217.

[12] Gamier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, et al. Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain [J]. J Biol Chem, 2002, 277(14): 12208-12214.

[13] 刘静, 王艳. survivin 和 Bcl-2 基因在非小细胞肺癌中的表达和相关性 [J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(11): 131-134.

[14] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127-134.

[编辑校对: 刘红武]