

survivin 与 caspase - 3 在分化型甲状腺癌中的表达及其意义

申亚伟 李宗宇 马建仓 黄 新 赵 军

摘 要 **目的** 研究 survivin 及 caspase - 3 在分化型癌组织中的阳性表达及两者的相互关系。**方法** 选取西安市中心医院 2010 年 1 月 ~ 2016 年 10 月间分化型甲状腺癌石蜡包埋标本 56 例。应用免疫组织化学法 (SP 法), 检测 survivin、caspases - 3 在分化型甲状腺癌中的表达。**结果** 结节性甲状腺肿组、甲状腺癌旁组 survivin 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 结节性甲状腺肿组 survivin 表达与 DTC 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 结节性甲状腺肿组、甲状腺癌旁组 caspase - 3 蛋白的表达经检验两者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 结节性甲状腺肿组 caspase - 3 蛋白表达与 DTC 组 (30/56, 53.5%) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); survivin 和 caspase - 3 在 DTC I ~ II 期的阳性表达率与 DTC III ~ IV 期的阳性表达率及有无淋巴结转移组中比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); caspase - 3 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。survivin 表达与 caspase - 3 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.325, P < 0.01$)。**结论** survivin 与 caspase - 3 介导的细胞凋亡途径参与了甲状腺癌的发生、发展过程。

关键词 Survivin Caspase - 3 分化型甲状腺癌 免疫组化

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.027

Expression and Significance of Survivin and Caspase - 3 in Differentiated Thyroid Carcinoma. Shen Yawei, Li Zongyu, Ma Jiancang, et al. Central Hospital of Xi'an, Shaanxi 710000, China

Abstract **Objective** To evaluate the positive expression and the relationship of Survivin and caspase - 3 in differentiated carcinoma. **Methods** Fifty - six cases of paraffin - embedded specimens of differentiated thyroid carcinoma from January 2010 to October 2016 were selected from Xi'an Central Hospital. The expression of survivin and caspases - 3 in differentiated thyroid carcinoma was detected by immunohistochemistry (SP method). **Results** The expression of Survivin protein in nodular goiter group and thyroid carcinoma group was not significantly different ($P > 0.05$). The expression of Survivin in nodular goiter group was significantly different from that in DTC group ($P < 0.05$). The expression of caspase - 3 protein in the nodular goiter group was significantly higher than that in the DTC group (30/56, 53.5%), and the expression of caspase - 3 protein in the goiter group and thyroid carcinoma group was significantly different ($P < 0.05$). The positive expression rate of survivin and caspase - 3 in DTC I - II was significantly different from that in DTC III - IV and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was no significant difference in caspase - 3. ($P > 0.05$). Survivin expression was negatively correlated with caspase - 3 protein expression ($r = -0.325, P < 0.01$). **Conclusion** Survivin and caspase - 3 are involved in the development of thyroid carcinoma by apoptotic pathway

Key words Survivin ;Caspase - 3 ; Differentiated thyroid carcinoma ; Immunohistochemistry

分化型甲状腺癌 (differentiated thyroid carcinoma, DTC) 是内分泌系统中最常见的一类恶性肿瘤, 目前 DTC 人群发生率为 1/25 万 ~ 1/30 万, 男女性别之比为 1:2 ~ 3^[1]。近年来, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 基因及基因表达的研究成为癌症研究的热点。survivin 与 caspase - 3 是介导细胞凋亡途径的一类蛋白水解酶, 已证实参与了多种肿瘤的发生和发

展^[2]。笔者通过采用免疫组化的方法, 检测 survivin 与 caspase - 3 在 DTC 中的表达及分析二者的相互关系, 为进一步研究甲状腺癌的发病机制提供依据。

资料与方法

1. 一般资料: 选取西安市中心医院 2010 年 1 月 ~ 2016 年 10 月间术后石蜡包埋的分化型甲状腺癌标本 56 例。其中乳头状癌 48 例, 滤泡状癌 8 例, 癌旁正常组织标本各 28 例, 其中男性 19 例, 女性 37 例, 患者年龄 23 ~ 81 岁, 平均年龄 52.4 岁, 淋巴结转移 24 例, 无淋巴结转移 32 例。病理分期按 2002 年

基金项目: 陕西省社会发展科技公关项目 (2015SF068)

作者单位: 710000 西安市中心医院 (申亚伟、黄新); 710000 西安交通大学第二附属医院 (李宗宇、马建仓、赵军)

通讯作者: 黄新, 电子信箱: xinxinyellow@163.com

UICC 制定国际 TNM 分期^[3]: I 期 15 例, II 期 18 例, III 期 19 例和 IV 期 4 例。排除术前经过任何放疗、化疗及内分泌治疗的患者。另选取结节性甲状腺标本 29 例, 其中男性 5 例, 女性 24 例, 患者年龄 25 ~ 81 岁, 平均年龄 53.2 岁。癌旁组和结甲组认为正常组织标本, 作为对照组。

2. 主要试剂和仪器: ①兔抗人多克隆抗体 survivin、兔抗人多克隆抗体 caspase - 3、显色剂 DAB、SP 染色试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司, PBS 缓冲液、DAB(3,3'-二氨基联苯胺)酶底物显色试剂盒、甲醇 - H₂O₂ 溶液均自行进行配置; ②病理组织切片机 (Shandon Citadel 2000HE); ③医用微波炉 (Leica 2045, 美国); ④生物显微镜 (Nicon, 日本); ⑤ - 20℃ 低温冰箱 (美菱 BCD - 226A, 中国); ⑥显微镜照相系统 (Olympus - BH - 2, 日本)。

3. 试验方法及结果判定: 免疫组化方法采用 SP 法对目标蛋白进行染色。表达阳性病例判断参照 Piliotti 等的标准^[4]: 在 40 × 10 高倍显微镜下观察计数, 计数的方法每张切片随机选择 5 个视野, 每个视野计数 ≥ 300 个。survivin、caspase - 3 阳性染色正常位于胞质内, 为浅黄棕褐色颗粒, 少数出现胞核染色。表

达阳性病例判断标准: 阴性无染色, 弱阳性 (+) 为染色浅或阳性细胞 ≤ 35%, 中度阳性 (++) 为染色较深以及阳性细胞为 35% ~ 60% (不包括 30%), 染色较深以及阳性细胞 > 60% 为强阳性 (+++)。

4. 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析。对于计数资料采用 χ^2 检验, 两因素间的相关性采用 Spearman 等级相关检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. survivin 和 caspase - 3 在不同甲状腺组织中的表达: survivin 在 DTC 中呈强阳性表达 (表 1、图 1): 结节性甲状腺肿组、甲状腺癌旁组 survivin 蛋白的表达两者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 结节性甲状腺肿组 survivin 蛋白表达与 DTC 组 (39/49, 79.6%) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。caspase - 3 在 DTC 中呈弱表达 (表 1, 图 2)。结节性甲状腺肿组、甲状腺癌旁组 caspase - 3 蛋白的表达两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 结节性甲状腺肿组 caspase - 3 蛋白表达与 DTC 组 (30/56, 53.5%) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 survivin 和 caspase - 3 在不同甲状腺组织细胞中的表达

组别	n	survivin 蛋白				阳性率 (%)	caspase - 3 蛋白				阳性率 (%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
结节性甲状腺肿	29	27	3	0	0	11.1	4	10	13	2	86.2
甲状腺癌旁组织	28	24	2	1	0	12.5	5	10	8	5	82.2
甲状腺癌组织	56	9	17	20	10	83.9*	26	13	14	3	53.5*
乳头状癌	48	8	15	18	7		24	11	11	2	
滤泡状癌	8	1	2	2	3		2	2	3	1	

与结节性甲状腺肿组比较, * $P < 0.05$

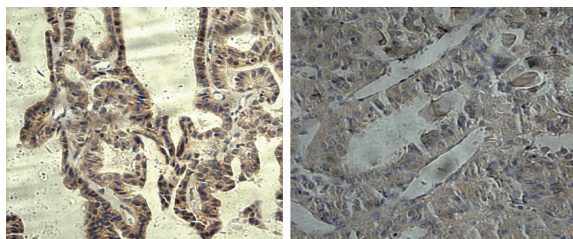


图 1 乳头状甲状腺癌和滤泡状甲状腺癌中 survivin 强阳性表达
免疫组织化学, ×400

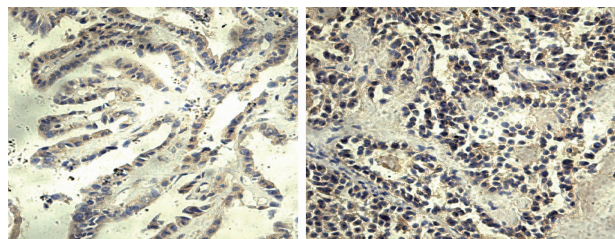


图 2 乳头状甲状腺癌和滤泡状甲状腺癌中 caspase - 3 弱阳性表达
免疫组织化学, ×400

2. survivin 和 caspase - 3 与 DTC 临床病理分期的关系: survivin 和 caspase - 3 在 DTC 临床分期阳性表达率差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在有无淋巴结

转移表达率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), caspase - 3 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 survivin 和 caspase - 3 在不同临床特点中的表达

临床特点	n	survivin 蛋白					P	caspase - 3 蛋白					P
		-	+	++	+++	阳性率 (%)		-	+	++	+++	阳性率 (%)	
临床分期													
I ~ II 期	29	10	8	6	3	65.5		11	7	9	2	62.1	
III ~ IV 期	27	3	6	11	7	88.9	<0.05	14	5	7	1	48.1	<0.05
淋巴转移													
有	31	2	11	12	6	93.5		15	9	5	2	51.6	
无	25	10	7	6	2	60.0	<0.05	12	6	5	2	52.0	>0.05

3. survivin 和 caspase - 3 在 DTC 表达中的相关性: survivin 表达与 caspase - 3 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.325, P < 0.01$), 即在甲状腺癌中 survivin 蛋白表达越高, 相应 caspase - 3 蛋白表达越低(表 3)。

表 3 survivin 和 caspase - 3 蛋白在甲状腺癌中的相互关系 (n)

survivin 表达	n	caspase - 3 表达	
		阳性	阴性
阳性	36	25	11
阴性	20	12	8

讨 论

近年来临床观察发现 DTC 发生率呈逐年上升趋势, 但其发病机制目前尚不完全清楚。目前研究证实细胞的信号凋亡通路的异常与其发病机制密切相关^[5]。本实验通过免疫组化的方法, 研究凋亡途径中的两个重要蛋白 survivin 和 caspase - 3 在结节性甲状腺肿、癌旁组织中及分化型甲状腺癌中的表达及其相关性, 为进一步阐明及探索 DTC 的发病基础提供线索。目前研究发现 survivin 是细胞凋亡途径中主要的抑制分子, 可以抑制细胞的凋亡发生, 延缓细胞的寿命, 是细胞凋亡途径中的关键分子^[6]。survivin 的过度表达的结果是细胞不断增殖, 死亡减少, 参与了肿瘤的恶性增生和发展^[7]。研究发现, 多数肿瘤增生细胞中均可检测到 survivin 的表达^[8]。因此, 探索其参与凋亡途径中的作用发现, survivin 的表达可能与阻断细胞分裂有关^[9]。

研究发现, 试验中在细胞分离过程中加入阻断剂, 可以分别将 Hela 细胞阻断在 G₁ 期、S 期、G₂/M 期, 然后检测 survivin 在细胞中的表达, 其结果可上调 40 倍^[10]。survivin 端粒启动子的独特之处在于含有细胞周期依赖素 (CDE) 和细胞周期同源区域 (CHR), 这些区域与典型的 G₂/M 期特征表达基因具有一致性^[11]。因此, 通过这一研究发现, survivin 蛋白可能在细胞分裂过程中通过阻断 G₁ 期调节蛋白,

进而抑制细胞增生基本启动子, 从而保持细胞分裂周期的延长, 促进细胞增殖。大量研究表明, survivin 蛋白与多种肿瘤的发生相关, 不仅高表达于甲状腺, 还可在子宫、胃组织、结直肠中高表达^[12]。有研究通过分析 survivin 参与的凋亡途径与恶性间皮组织及食管癌发生的研究中发现, survivin 在肿瘤细胞中的表达高于炎性组织, 正常组织中的表达, 提 survivin 参与的凋亡途径参与了肿瘤的发生机制^[13, 14]。另外有研究者发现, survivin mRNA 在正常组织中未被检出, 而在肿瘤组织则表现为高表达, 且和肿瘤的分期早晚密切相关, 表现为分期愈晚, 其阳性表达愈强^[15]。这与笔者的研究结果基本相似, survivin 在结节性甲状腺肿组、甲状腺癌旁组 survivin 蛋白的表达阳性例数分别为 2/20 (10.0%)、10/49 (20.4%), 阳性表达率较低, 且染色较弱, 而在甲状腺癌组的阳性表达率为 (39/49, 79.6%), 染色较强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且其和分化型甲状腺癌的分期及淋巴结转移相关, 在 III 和 IV 期中表达率为 88.9%, 有淋巴结转移的组中表达率为 93.5%, 分期愈晚, 淋巴结转移的标本中 survivin 的表达愈强, 其表达率远远高于分期较早和无淋巴结转移的患者标本 (I ~ II 期为 65.5, 无淋巴结转移 60.0%)

caspase - 3 (半胱天冬酶 - 3) 是参与细胞凋亡信号途径的另一种重要信号分子, 其在凋亡信号途径中起着关键作用, 其在多种组织肿瘤细胞中广泛表达^[16]。研究表明, caspase - 3 在参与细胞凋亡途径中处于路径的下游, 多种因素参与的细胞凋亡途径启动后, 其下游的信号分子 caspase - 3 等被激活, 从而参与降解底物促使细胞凋亡。凋亡信号途径中, caspase 活化后可被 survivin 抑制, 并且 survivin 对 caspase - 3 的前体酶形式和活化形式均有抑制作用^[17]。有研究者用免疫组化方法证明 survivin 与 caspase - 3 在非小细胞肺癌中的表达水平呈负相关, 证实 survivin 在凋亡途径中通过抑制 caspase - 3 的激活, 从而抑制细胞凋亡, 破坏细胞增殖与凋亡的平衡,

参与了肿瘤的发生和发展。

本研究结果显示,在结节性甲状腺肿的患者标本中 caspase-3 的表达为 86.2%,大于甲状腺癌旁组织 82.2% 和分化型甲状腺的 53.5%,说明 caspase-3 可以促进组织细胞凋亡,但在肿瘤组织中其表达降低,从而使肿瘤的凋亡途径受到抑制,导致细胞过度增殖。且通过本实验证明 caspase-3 在分期愈晚和恶性程度愈高的癌症组织中表达率愈低。另外,笔者通过分析 survivin 和 caspase-3 在分化型甲状腺癌中的表达相关性,证实 survivin 蛋白的阳性表达与 caspase-3 蛋白的阳性表达有显著相关性 ($P < 0.01$),且呈负相关, survivin 蛋白表达愈高的甲状腺癌组中 caspase-3 表达越低,因此可以认为 survivin 抑制了 caspase-3 的激活,从而导致细胞的恶性增殖,导致正常细胞发展为肿瘤细胞;

目前的肿瘤与信号途径的研究中,关于甲状腺癌中 survivin 及 caspase-3 的研究未见报道,但其表达与其他肿瘤的关系发已获得一些有意义的结果。通过本实验可见 survivin 的高表达及同步 caspase-3 的表达下降与分化型甲状腺癌的发生、发展和转移有重要的关系。由于经费的不足、科研实验器材的限制,本实验仅采用免疫组织化学的方法进行研究,如果能够进一步从基因的角度研究,可能会得到凋亡途径中二者更确切的数据。总而言之,就目前研究表明, survivin 及 caspase-3 在分化型甲状腺癌的发生、发展过程中起到了重要作用。

参考文献

- 伍波,樊友本. 我国甲状腺癌治疗现状:不足、不规范和过度并存[J],中华内科杂志,2017,1(56):11-14
- 张丹,吕亮,申兴斌,等. 大肠癌中 survivin、NF- κ B 及 caspase-3 的表达及意义[J],中国老年医学杂志,2017,2(37):549-552
- Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer [J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(11):646-653
- 张丹,马瑞,林从尧. 甲状腺癌组织中 Survivin 蛋白的表达及其意义的 Meta 分析[J]. 医学综述, 2016, 10(22):1973-1980
- 郭丽霞,兰竞丽,胡兆鹏,等. 血管内皮生长因子、S100A4 及生存素在甲状腺癌组织中的表达及其意义[J]. 中国基层医药, 2016, 10(23):1479-1482
- 史永亮. 血清 survivin 及抗体在甲状腺乳头状癌诊断中的临床价值[J]. 河北医药, 2013, 12(35):1854-1855
- Wiedemuth R, Klink B, Topfer K, et al. Survivin safeguards chromosome numbers and protects from aneuploidy independently from p53 [J]. Mol Cancer, 2014, 13(1):107-108
- Yu S, Zhang Z, Zhang B, et al. Clinical significance of PI3K/Akt and survivin in primary adenocarcinoma of lung carcinoma [J]. Med Oncol, 2014, 31(6):983-985
- 田忠成,邵云飞,党雪菲,等. Survivin 在甲状腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2014, 3(18):390-393
- Shintani M, Sangawa A, Yamao N, et al. Immunohistochemical expression of nuclear and cytoplasmic survivin in gastrointestinal carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12):2919-2927
- Gu Y, Jin S, Wang F. Clinicopathological significance of PI3K, Akt and survivin expression in gastric cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(4):471-475
- Grutter MG. Caspase: key players in programmed cell death [J]. Curr Opin Struct Biol, 2000, 10(6):649-655
- Boidot R, Végan F, Lizard N, et al. Transcriptional regulation of the survivin gene [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(1):233-240
- 郑国文. 大肠癌中 LIVIN 和 Survivin 的表达及相关性研究[J]. 实用医院临床杂志, 2014, 11(2):86-87
- 常玉珍,李秀梅,封敏,等. survivin、NF- κ B 和 STAT-3 mRNA 在宫颈癌中的表达及其临床意义[J]. 癌变·畸变·突变, 2014, 26(3):189-192
- 崔东旭,朱立君,刘宝林. 胆管癌中 Livin 蛋白和血管内皮生长因子的表达及与 caspase-3 的相关性研究[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(6):1165-1167
- 王传艳,孟令新,丁兆军. PTEN, survivin 和 caspase-3 在食管鳞癌中的表达[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(4):493-496

(收稿日期:2017-03-28)

(修回日期:2017-04-27)

(上接第 15 页)

- Lee SY, Kwon S, Kim KH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2006, 97(6):794-799
- Park SJ, Lee KS, Kim SR, et al. AMPK activation reduces vascular permeability and airway inflammation by regulating HIF/VEGFA pathway in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma [J]. Inflamm Res, 2012, 61(10):1069-1083
- Kim SR, Lee KS, Lee KB, et al. Recombinant IGF1R-3 inhibits allergic lung inflammation, VEGF production, and vascular leak in a mouse model of asthma [J]. Allergy, 2012, 67(7):869-877
- Rajakumar A, Whitlock KA, Weissfeld LA, et al. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2 α , in placentas from women with preeclampsia [J]. Bio Reprod, 2001, 357(1):499-506
- Liu W, Wang SJ, Lin QD. Study on the expressions of PHD and HIF

in placentas from normal pregnant women and patients with preeclampsia [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(3):278-284

- Sandoval RM, Wagner MC, Patel M, et al. Multiple factors influence glomerular albumin permeability in rats [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2012, 23(3):447-457
- Zeng H, He X, Tuo Q, et al. LPS causes pericyte loss and microvascular dysfunction via disruption of Sirt3/angiopoietins/Tie-2 and HIF-2 α /Notch3 pathways [J]. Sci Rep, 2016, 12(6):20931
- Jing D, Wobus M, Poitz DM, et al. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro [J]. Haematologica, 2011, 97(3):331-339
- Ding M, Coward RJ, Jeansson M, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2-a is essential for integrity of the glomerular barrier [J]. Am J Physiol - Renal Physiol, 2013, 304(1):F120

(收稿日期:2017-03-22)

(修回日期:2017-04-08)