

Survivin 与 PTEN 在喉部鳞状细胞癌变中的表达关系初探*

郭强中¹ 李云英¹

【摘要】 目的:研究声带息肉、成人型喉乳头状瘤和喉鳞状细胞癌3种疾病中 Survivin 和 PTEN 的表达特点,以了解喉鳞状细胞从增生到癌变的可能机制。方法:选取符合临床与病理诊断的声带息肉患者18例、成人型喉乳头状瘤患者10例和喉鳞状细胞癌患者18例,将每个患者的病理蜡块标本各连续切片2张,分别进行 Survivin 和 PTEN 免疫组织化学检测。比较致癌基因 Survivin 和抑癌基因 PTEN 在这3种疾病同一区域鳞状上皮细胞中的表达差异。结果:声带息肉的 Survivin 和 PTEN 阳性率均显著低于喉乳头状瘤和喉鳞状细胞癌($P < 0.05$),而喉乳头状瘤的 Survivin 和 PTEN 阳性率均低于喉鳞状细胞癌,但均没有显著性差异($P > 0.05$),Survivin 和 PTEN 形成近似声带息肉<成人型喉乳头状瘤<喉鳞状细胞癌的表达趋势。在声带息肉、喉乳头状瘤及喉鳞状细胞癌3种疾病中,PTEN 的阳性率均显著低于 Survivin($P < 0.05$)。结论:Survivin 和 PTEN 在喉良性增生性疾病的鳞状细胞中部分表达,而在良性和恶性肿瘤中过度表达,体现出随恶性程度增加而逐渐升高的表达趋势,Survivin 和 PTEN 虽然功能相反,但作用机制不同,非对立消长关系,PTEN 体现出一定的竞争表达特点,并从属于 Survivin 的表达,两者的统一部分决定了喉鳞状细胞的恶变程度。

【关键词】 声带息肉;喉肿瘤;Survivin;PTEN

【中图分类号】 R767.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-1781(2012)15-0704-04

Analysis on expression of Survivin and PTEN in vocal cords polyps, papilloma of larynx and laryngeal squamous cell carcinoma

GUO Qiangzhong LI Yunying

(Department of Otolaryngology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 510120, Guangzhou, China)

Corresponding author: LI Yunying, E-mail: docliyuning@126.com

Abstract Objective: Through exploring the differentiation on positive expressing rates between oncogene Survivin and tumor-suppressor gene PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome Ten) on vocal cord polyps(VCP), adult type laryngeal papilloma (ALP), and Laryngeal Squamous Cell Carcinoma (LSCC), to reveal the mechanism in canceration of human laryngeal squamous cells, from benign proliferative lesion, benign tumor to malignant tumor in larynx. **Method:** After picking out 18 cases of VCP, 10 cases of ALP, and 18 cases of LSCC for immunohistochemical process of Survivin and PTEN with two continuous section preparations, the differentiations of positive expression rates of Survivin and PTEN in the same human laryngeal squamous cells areas among three diseases were compared. **Result:** The positive expressing rates of Survivin and PTEN in VCP were obviously more lower than in ALP and LSCC($P < 0.05$), which showed no obvious difference between each other($P > 0.05$). The positive expressing rates of Survivin were always higher than PTEN in VCP, ALP and LSCC evidently($P < 0.05$). **Conclusion:** PTEN, expressing for competition purpose, shows a subordinative relationship with Survivin. Although they have opposite functions in determine whether the canceration of laryngeal squamous cells take place or not, Survivin is always playing the leading role and making predominant impact on development of benign proliferative lesion, benign and malignant tumor in larynx.

Key words vocal cords polyps;laryngeal neoplasm;Survivin; PTEN

喉癌病因起源复杂,是涉及到宿主细胞抑癌基因、致癌基因、HPV 病毒癌基因等多个基因、多条通路的多步骤事件^[1],而 Survivin 的过表达是喉癌的一个早期分子事件^[2]。Survivin 和 PTEN 均参与细胞周期调控和细胞凋亡,作用环节一致,但生

物学效应相反^[3],两者的表达具有拮抗作用:一方面,凋亡抑制基因 Survivin 抑制了表皮基底细胞的正常成熟,部分地表现为致癌性,出现异常增殖;另一方面,肿瘤抑制基因 PTEN 通过不同的途径部分的拮抗 Survivin 蛋白的活性,从而使上皮细胞的变化表现出一个良性过程并长期存在,但不出现恶性特征,一旦两者之间失去平衡,则有可能出现恶性表现。在喉鳞状细胞恶变过程中 Survivin 与

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:30873288)

¹ 广州中医药大学第二附属医院耳鼻咽喉科(广州,510120)

通信作者:李云英, E-mail: docliyuning@126.com

PTEN 之间到底是一种怎样的动态变化关系,需要不断深入探讨。

1 资料与方法

1.1 临床资料

标本选自广东省中医院及广州市第一人民医院病理科 2008-01—2011-01 病理蜡块标本,均符合声带息肉、成人型喉乳头状瘤和喉鳞状细胞癌的临床诊断标准^[4-5]与病理诊断标准^[6-7]:①声带息肉患者 18 例,年龄 24~56 岁,平均 42.2 岁;②成人喉乳头状瘤患者 10 例,年龄 30~66 岁,平均 54.4 岁;③喉鳞状细胞癌患者 18 例,年龄 46~78 岁,平均 59.6 岁。

1.2 免疫组织化学检测

1.2.1 主要仪器设备 HH-S11-Cr2 II 型电热恒温水箱(汕头市医用设备有限公司);E200 型显微镜(日本 Nikon 公司);FinesseE 型切片机(德国 Leica 公司);ECLIPSE 80i 型多功能显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2.2 主要试剂 PBS 缓冲液,0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0),PTEN 抗体,Survivin 抗体,MaxVision™ 试剂盒,DAB 显色试剂盒,AEC 显色试剂盒,AEC 水性封片剂。

1.3 免疫组织化学操作步骤

烤片后将组织切片置于二甲苯中浸泡 2 次,5 min/次,再置入梯度乙醇中浸泡 25 min;蒸馏水洗 3 次,5 min/次。用 3% H₂O₂ 室温封闭 10 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min。抗原微波热修复:将组织切片放入 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0),在微波炉里加热 5 min 至沸腾,冷却后取出。PBS 洗 3 次,每次 3 min。滴加一抗(1:15 PTEN 抗体、1:15 Survivin 抗体),37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,每次 3 min。滴加二抗,37℃ 孵育 15 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min。除去 PBS 液,以 Survivin 为一抗的标本滴加新鲜配制的 DAB 溶液,室温下染色 2~3 min;以 PTEN 为一抗的标本滴加新鲜配制的 AEC 溶液,37℃ 环境下染色 10~15 min,

均在显微镜下观察并掌握染色时间。自来水冲洗,苏木精-伊红复染 20~30 s。脱水、透明、封片、镜检。

1.4 免疫组织化学结果判定

采用人工半定量积分法^[8-9]进行综合评价:用已知阳性切片作阳性对照,Survivin 为胞质胞核着色,PTEN 为胞核着色,根据阳性细胞比率和着色深度计分,每张切片均随机观察发生病变的鳞状细胞区 5 个高倍视野(×400),Survivin 与 PTEN 所选的观察视野基本相同,再确定每个视野中阳性表达细胞数所占的比例,取其平均数即得该切片阳性细胞百分率(阳性率),按下列梯度计分:0~5%为 0 分,6%~55%为 1 分,56%~70%为 2 分,71%~85%为 3 分,86%~100%为 4 分。阳性细胞表达 DAB 着色深度:基本不着色为 0 分,浅棕色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;AEC 着色深度:基本不着色为 0 分,暗红色为 1 分,棕红色为 2 分,红褐色为 3 分。阳性总分:为阳性率积分与着色深度积分的乘积,0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~6 分为阳性(++),7~9 分为中度阳性(+++),10~12 分为强阳性(++++)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件对两两差异进行方差分析。

2 结果

Survivin 和 PTEN 在不同疾病的喉鳞状细胞中均有不同表达。Survivin 和 PTEN 在不同疾病中的表达情况,见表 1~2。Survivin 和 PTEN 阳性率和阳性总分体现出如下特点:声带息肉<喉乳头状瘤<喉鳞状细胞癌;在 3 种疾病中,PTEN 的阳性率和阳性总分均低于 Survivin。喉鳞状细胞癌与喉乳头状瘤比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。声带息肉免疫组织化学结果,见图 1。喉乳头状瘤免疫组织化学结果,见图 2。喉鳞状细胞癌免疫组织化学结果,见图 3。

表 1 Survivin 及 PTEN 在不同疾病中的表达情况

项目	声带息肉	喉乳头状瘤	喉鳞状细胞癌
阳性率/%			
Survivin	73.6111±8.5415	83.5000±7.0907 ²⁾	88.6111±4.4740 ²⁾
PTEN	59.4444±7.6483	72.5000±12.0762 ²⁾	77.2222±7.7121 ²⁾
着色深度			
Survivin	1.8333±0.7071	2.0000±0.8165	2.5000±0.6184 ²⁾
PTEN	1.9444±0.8726	2.1000±0.8756	2.0556±0.6391
阳性总分			
Survivin	4.8889±2.3487	6.8000±3.4254	8.9444±2.6673 ²⁾
PTEN	3.2778±2.0809	5.9000±3.6347 ¹⁾	6.0000±2.0580 ²⁾

与声带息肉比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 不同病种的 Survivin 和 PTEN 阳性结果

组别	Survivin					合计	PTEN				
	-	+-	+	++	+++		-	+-	+	++	+++
声带息肉	0	6	9	3	0	18	0	9	9	0	0
喉乳头状瘤	0	3	3	2	2	10	0	3	3	3	1
喉鳞状细胞癌	0	1	3	8	6	18	0	3	11	4	0
合计	0	10	15	13	8	46	0	15	23	7	1

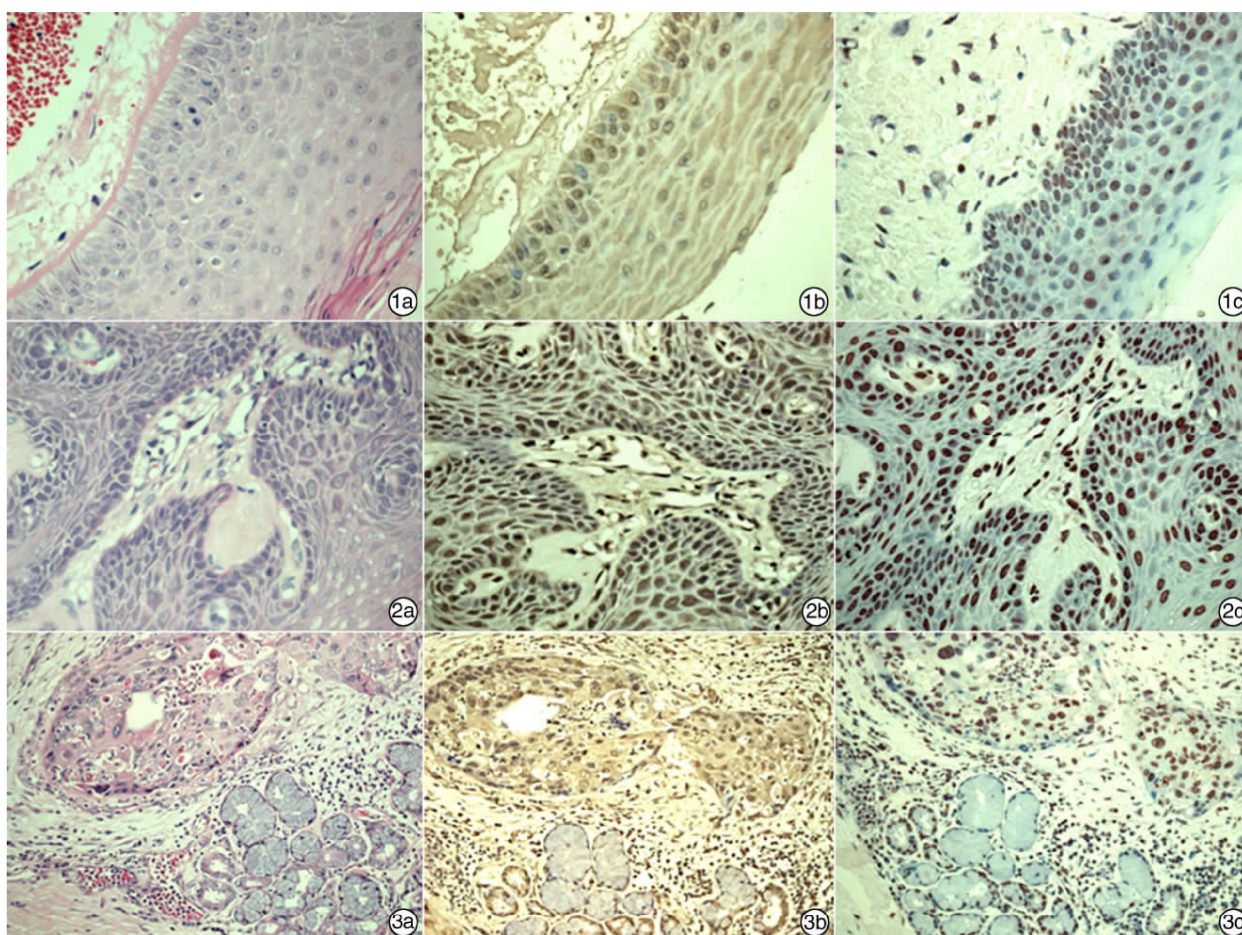


图 1 声带息肉免疫组织化学结果 1a:苏木精-伊红染色 ×400;1b:Survivin 阳性 ×400;1c:PTEN 阳性 ×400;
 图 2 喉乳头状瘤免疫组织化学结果 2a:苏木精-伊红染色 ×400;2b:Survivin 阳性 ×400;2c:PTEN 阳性 ×400;
 图 3 喉鳞状细胞癌免疫组织化学结果 3a:苏木精-伊红染色 ×200;3b:Survivin 阳性 ×200;3c:PTEN 阳性 ×200。

3 讨论

3.1 Survivin 和 PTEN 在 3 种疾病中的表达特点

结果显示致癌基因 Survivin 和抑癌基因 PTEN 在声带息肉的鳞状细胞中表达较低,而在成人型喉乳头状瘤和喉鳞状细胞癌的鳞状细胞中表达较高。其原因在于:Survivin 和 PTEN 均具有亲肿瘤性的特点,且主要在鳞状上皮来源的棘细胞中强烈表达,而棘细胞的单位面积分布在声带息肉、成人型喉乳头状瘤和喉鳞状细胞癌中近似递增,由此可以粗略的看出上述两种基因阳性表达的趋势:声带息肉<成人型喉乳头状瘤<喉鳞状细胞癌。如若扩大样本量,有可能使这种趋势变得显著。

3.2 Survivin 与 PTEN 在喉部病变中表达的关系

从声带息肉、成人型喉乳头状瘤及喉鳞状细胞癌 3 种疾病来看, Survivin 的阳性率均要高于 PTEN,但实际上 PTEN 的阳性率并不低,由此推断: Survivin 和 PTEN 虽然功能相反,但不是处于同一机制中的 2 个对立面,而是作用相反并处在 2 个不同的作用机制中的 2 个基因,正因为如此才未出现二者的阳性率近似负相关的关系。Survivin 与 PTEN 的共同作用推动着疾病向不同的方向发展。当 Survivin 高表达时,导致癌变的概率升高,应激性的引起 PTEN 的高表达,其欲发挥抑制肿瘤形成与发展的作用。通过实验发现,二者并不是平

等的关系,而应该是从属关系,因为无论是声带息肉,还是喉乳头状瘤或鳞状细胞癌, Survivin 的阳性率都要高过 PTEN,因此推测 PTEN 可能是在 Survivin 阳性表达之后出现的应答反应,目的是为了控制 Survivin 的阳性表达并通过抵消其致癌作用来平衡喉部鳞状细胞的生长状态。

3.3 喉癌变规律探讨

鳞状上皮表层细胞由位于其下的棘层细胞不断增生、移行和分化而来,在棘细胞不断的表层化过程中, Survivin 和 PTEN 均没有高强度的阳性表达,其原因就是棘细胞表层化属于正常生理过程,而非癌变过程,因此在正常的上皮层,乃至声带息肉表面鳞状细胞层数增加的上皮层中, Survivin 和 PTEN 的阳性表达程度都是呈由基膜向表面角化层逐渐递减的趋势特点。

当鳞状上皮层发生喉乳头状瘤般以棘层细胞异常增生为主的病变, Survivin 和 PTEN 即随之广泛表达,原因在于棘细胞异常广泛的增生是一种肿瘤样改变的过程,在致癌基因 Survivin 强烈表达的同时,抑癌基因 PTEN 出于竞争的目的也随之强烈表达,但在肿瘤不断生长的过程中, Survivin 的表达始终处于优势地位,从而部分的弱化了 PTEN 的表达。

当鳞状上皮层不仅发生棘层细胞的异常增生,同时还伴发棘细胞的变异时, Survivin 和 PTEN 的表达也随之升高,尤其是当癌细胞表现出强烈的侵袭性(比如侵犯喉部腺体、肌肉、软骨)时,两大基因的表达竞争更是趋于激烈,表现出比在喉乳头状瘤中更高的阳性表达率。

在鳞状上皮细胞的正常增生、异常增生、异常增生伴变异的不同发展阶段,喉部鳞状上皮棘层细胞的异常变化起到了核心作用, Survivin 和 PTEN 在棘细胞以及棘细胞来源的癌细胞中始终处于高表达状态,这种高表达会随着棘细胞的增多和变异的增加而不断得到强化,体现出 2 种功能相反的基因在鳞状上皮棘细胞癌变过程中的相互竞争状态。 Survivin 的表达使鳞状上皮正常及癌变的棘细胞避开凋亡、逃离生长监控而异常增殖,从而促进喉乳头状瘤及喉鳞状细胞癌的发生与发展^[10-12]; PTEN 则通过细胞周期调控促进增生和癌变的棘细胞凋亡,抑制喉乳头状瘤及喉鳞状细胞癌的血管形成,缩小侵袭范围和减少转移。虽然 Survivin 和 PTEN 可以同时并存于同一个鳞状上皮棘细胞中,但 Survivin 在胞质和胞核的广泛表达使其始终处于优势地位,相比仅表达于胞核的 PTEN 来说,在决定喉部病变的发展方向 and 趋势上具有更大的主导作用。 Survivin 与 PTEN 的不断相互竞争即成为决定喉鳞状细胞癌变程度的核心机制之一。

3.4 选择发生病变的鳞状上皮作为镜检目标的意义

既往的相关研究常常采用高倍镜下任意数个视野来观察 Survivin 或 PTEN 的阳性率,这样做的弊端就是观察目标不一致(比如将坏死区细胞也纳入,或者将间质细胞纳入),容易降低实际的阳性率,造成原本应该高表达的区域低阳性率。因此,只有对观察目标进行严格的界定,才能保证不同疾病阳性表达率之间的可比性。

参考文献

- [1] POETKER D M, SANDLER A D, SCOTT D L, et al. Survivin expression in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2002, 111: 957-961.
- [2] 刘学军, 张初琴, 万汉锋, 等. 喉癌中 survivin 基因的表达及其与高危型人乳头瘤病毒感染的相关性研究 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(20): 3416-3418.
- [3] VAUGHT C, WEINBERGER P, SEYBT T P, et al. Prognostic implications of survivin expression in squamous cell carcinoma of the larynx [J]. *Laryngoscope*, 2010, Suppl 4: S188-189.
- [4] 李云英, 廖月红. 中西医结合耳鼻咽喉口齿科学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2008: 143-156.
- [5] 于萍, 王荣光. 嗓音疾病与嗓音外科学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 102-104, 193-195, 203-204.
- [6] LEON BARNES, JOHN W. EVESON, PETER REICHAERT. 头颈部肿瘤病理学和遗传学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 136-167.
- [7] 韩德民, SATALOFF R, 徐文. 嗓音医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 132, 190, 199.
- [8] 丁玉平, 邹赛英, 赵瑾. PTEN 和 survivin 在胃印戒细胞癌组织中的表达及其意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2009, 16(1): 51-54.
- [9] 何龙, 王继群, 山艳春. 喉鳞癌中 PTEN 和 survivin 的表达及临床意义 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(4): 743-747.
- [10] WANG Y H, CHEN D J, YI T N, et al. The relationship among human papilloma virus infection, survivin, and p53 gene in lung squamous carcinoma tissue [J]. *Saudi Med J*, 2010, 31: 1331-1336.
- [11] FROST M, JARBOE E A, ORLICKY D, et al. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117: 738-744.
- [12] UEMURA N, KODAMA S, NOMI N, et al. Correlation between anti-survivin antibody and survivin mRNA expression in head and neck cancer patients [J]. *Acta Otolaryngol*, 2010, 130: 959-965.

(收稿日期: 2012-01-09)