

Cyclin D1 及 Survivin 蛋白表达 与鼻咽癌放疗敏感性的关系

许茂轩 林少民 梁莱 蔡俊宏 符生苗

基金项目:海南省自然科学基金(309086)

作者单位:570228 海口市,海南大学农学院(许茂轩)

570311 海口市,海南省人民医院放疗科(林少民)

570311 海口市,海南省人民医院医学检验部(梁莱 蔡俊宏 符生苗)

通讯作者:符生苗, E-mail: smf2000@126.com

【摘要】 目的 研究 Cyclin D1 和 Survivin 蛋白表达与鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)放疗敏感性的关系。方法 选取 72 例 NPC 患者放疗前活检组织标本(其中放疗敏感组 49 例,放疗不敏感组 23 例),常规 HE 染色确定组织分型;免疫组化技术 S-P 法检测 Cyclin D1 和 Survivin 蛋白表达情况;应用统计学软件进行统计学分析。结果 72 例 NPC 患者标本中,30 例 Cyclin D1 蛋白高表达,阳性表达率为 41.7%。在 NPC 放疗敏感组和放疗不敏感组的高表达率分别为 28.6%(14/49)和 69.6%(16/23),两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);72 例 NPC 患者标本中,34 例 Survivin 蛋白高表达,阳性率为 47.2%。在放疗敏感组和放疗不敏感组高表达率分别为 34.7%(17/49)和 73.9%(17/23),两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Cyclin D1 和 Survivin 蛋白的表达在 NPC 患者中呈正相关性, $r = 0.353$ ($P < 0.05$)。结论 Cyclin D1 和 Survivin 蛋白的表达与 NPC 放射敏感性呈负相关。Cyclin D1 和 Survivin 可以作为预测 NPC 患者放疗敏感性的分子标志物。

【关键词】 Cyclin D1; Survivin; 鼻咽癌; 放疗敏感性

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.01.003

Correlation between expression of Cyclin D1 protein and Survivin protein and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma

XU Mao-xuan¹, LIN Shao-min², LIANG Zhu³, et al. ¹College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China ²Department of Radiotherapy, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China ³Department of Medical Examination, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation between protein expression of Cyclin D1 and Survivin and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** 72 cases of NPC tissue specimens, including 49 cases of radio-sensitive specimens and 23 cases of radio-resistant specimens, which were obtained before radiotherapy. The expression of Cyclin D1 protein and Survivin protein were detected by immunohistochemical staining (S-P) method, and the results were analyzed. **Results** There were 30 cases were Cyclin D1 protein positive in the 72 cases, and the positive rate was 41.7%. The high expression rate of Cyclin D1 in radio-sensitive group and radio-resistant group were 28.6% (14/49) and 69.6% (16/23), and the difference had statistical significance ($P < 0.05$); There were 34 cases were Survivin protein positive in the 72 cases, and the positive rate was 47.2%. The high expression rate of Survivin in radio-sensitive group and radio-resistant group were 34.7% (17/49) and 73.9% (17/23), and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The expression of Cyclin D1 had positive correlation with the expression of Survivin in NPC patients, $r = 0.353$ ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Cyclin D1 and Survivin had negative correlation with radiosensitivity of NPC, which could be a useful predictor of radiosensitivity in NPC.

【Key Words】 Cyclin D1; Survivin; Nasopharyngeal carcinoma; Radiosensitivity

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方各省及东南亚地区常见的头颈部恶性肿瘤。放射治疗是治疗 NPC 的主要方法,但临床上不同的

NPC 患者对放疗敏感性存在明显的个体差异。故寻找预测 NPC 患者放疗敏感性的分子标志物,对制定合理的个体化放疗方案具有重要意义。本研究应

用免疫组化技术研究对比 NPC 放疗敏感者和放疗不敏感者 Cyclin D1 和 Survivin 蛋白的表达,并探讨其在预测 NPC 放疗敏感性中的意义,从而为实现早期准确预测 NPC 放疗敏感性提供理论依据。

1 材料与方

1.1 临床资料 选择 2009 年 3 月至 2011 年 9 月在海南省人民医院耳鼻喉科就诊,经活检病理确诊,并在该院放射科接受全程放疗治疗的患者 72 例,所有患者临床资料完整。且均为首诊,之前未曾接受过任何抗癌治疗。其中男性 55 例,女性 17 例,年龄 20~69 岁,中位年龄 41 岁。NPC 临床病理组织学检查按世界卫生组织 1991 年的国际组织分类标准分型,72 例患者标本中角化性鳞状细胞癌 5 例,非角化性鳞状细胞癌 67 例;其中分化型 47 例,未分化型 25 例。放疗结束时 NPC 完全消退 49 例(为放疗敏感组),鼻咽部癌残留 23 例(为放疗不敏感组)。NPC 的临床分期按“NPC2008 分期方案(中国广州)”,其中:I 期 7 例,II 期 13 例,III 期 31 例,IV 期 21 例。所有患者标本均为放疗前鼻咽活检存档石蜡活检组织标本。

1.2 放疗方案 放射治疗应用医用直线加速器 6MeV X 线,依照每次 200cGy、每日 1 次、每周 5 次的常规分割照射。鼻咽部剂量 D_T(7000~7800)cGy/(35~39)次/(7~8)w。

1.3 疗效评价 所有患者完成放射治疗后观察三个月复查鼻咽部 CT 扫描,观察癌肿消退情况,对放疗治疗近期疗效进行评价。疗效评价按照 RECIST 标准(2009 年修订版),CR(complete response):肿块完全消失;PR (partial response): 肿块缩小 ≥ 50%; NC (no change): 肿块缩小 < 50%, 或增大未超过 25%; PD (progressive disease): 一个或多个病变增大 ≥ 25%, 或出现新的病变。放疗疗效达到 CR 和 PR 为放疗敏感者,NC 和 PD 为放疗不敏感者。

1.4 试剂 Cyclin D1 抗体(兔抗人单克隆抗体)、Survivin 抗体(兔抗人多克隆抗体)、免疫组织化学超敏 UltraSensitive™ SP 试剂盒(羊抗兔)、抗原修复液、DAB 显色液、苏木素复染液均购自福州迈新生物技术开发公司。

1.5 方法 病例材料经 10%福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片。常规 HE 染色光学显微镜下观察确定分型。免疫组化染色采用 S-P 法,具体步骤均按照试剂盒操作说明书进行优化设计。实验用福州迈新生物技术开发公司提供的阳性对照切片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对

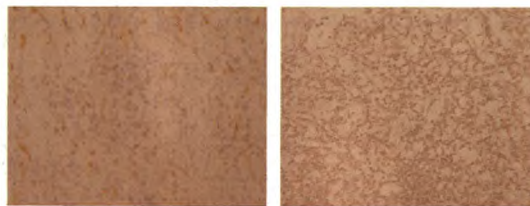
照,在相同条件下进行染色。

1.6 结果判定 所有免疫组化切片由三名病理科医师独立在光镜下观察计数。每个人均在 10×40 倍高倍镜下,每张切片随机选取 10 个视野,计数免疫组化标记定位准确的阳性细胞占癌细胞的百分比并计分。阳性细胞表达情况分四级: 阳性细胞百分比 0%~25% 记为“-”,26%~50% 记为“+”,51%~75% 记为“++”,76%~100% 记为“+++”,阳性细胞表达强度达到“++”者为高表达。

1.7 统计学处理 应用统计学软件 IBM SPSS Statistics 20 对数据进行统计分析,两组间率的比较采用 χ² 检验,两指标间的相关性采用 Spearman 相关性分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cyclin D1 蛋白在 NPC 放疗患者中的表达情况 Cyclin D1 蛋白阳性表达部位在细胞的胞核内,呈棕黄色,见图 1。72 例患者标本中,30 例高表达,阳性表达率为 41.7%,Cyclin D1 在 NPC 放疗敏感组和放疗不敏感组的高表达率分别为 28.6%(14/49)和 69.6%(16/23), 两组比较差异有统计学意义 (χ²=12.118,P<0.05)。见表 1。



低表达 高表达

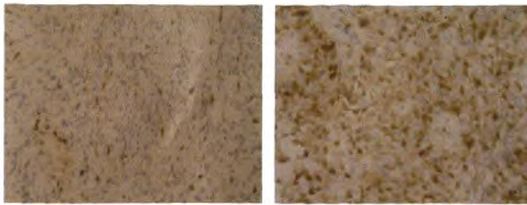
图 1 鼻咽癌 Cyclin D1 蛋白 DAB 显色(400×)

表 1 Cyclin D1 蛋白在鼻咽癌放疗患者中的表达情况

分组	例数	低表达		高表达		χ ² 值	P 值
		-	+	++	+++		
放疗敏感组	49	21	14	10	4		
放疗不敏感组	23	3	4	9	7	12.118	<0.05
合计	72	24	18	19	11		

2.2 Survivin 蛋白在 NPC 放疗患者中的表达情况 Survivin 蛋白阳性表达部位在细胞的胞核和胞浆内,呈棕黄色,见图 2。72 例患者标本中,34 例高表达,阳性表达率为 47.2%,Survivin 在 NPC 放疗敏感组和放疗不敏感组的高表达率分别为 34.7%(17/49)和 73.9%(17/23),两组比较差异有统计学意义(χ²=10.424,P<0.05)。见表 2。

2.3 Cyclin D1 蛋白和 Survivin 蛋白在 NPC 放疗患者中表达的相关性分析 72 例患者标本中,Cyclin D1 蛋白高表达 30 例,低表达 42 例;Survivin 蛋白高



低表达

高表达

图2 鼻咽癌 Survivin 蛋白 DAB 显色(400×)

表2 Survivin 蛋白在鼻咽癌放疗患者中的表达情况

分组	例数	低表达		高表达		χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++		
放疗敏感组	49	17	15	14	3		
放疗不敏感组	23	3	4	12	5	10.424	<0.05
合计	72	20	18	26	8		

表达 34 例,低表达 38 例,两者共同高表达 22 例,共同低表达 30 例。Cyclin D1 蛋白和 Survivin 蛋白表达在 NPC 患者中成正相关, Spearman 相关分析结果为: $r=0.353(P<0.05)$ 。见表 3。

表3 Cyclin D1 蛋白和 Survivin 蛋白在鼻咽癌放疗患者中相关性分析

Cyclin D1	Survivin				合计
	-	+	++	+++	
-	10	7	5	2	24
+	4	9	4	1	18
++	4	2	11	2	19
+++	2	0	6	3	11
合计	20	18	26	8	72

3 讨论

目前,放射治疗是 NPC 的主要治疗方法之一,而肿瘤对放疗的敏感性是肿瘤放射治疗成败的关键。在临床上,不同个体的 NPC 患者存在着放疗敏感性的差异。为了提高患者的放疗效果,实现早期预测不同个体患者放疗敏感性,制定合理的个体化的放疗方案。需要寻找一种快速、准确、灵敏的指标预测不同个体 NPC 患者对放疗的敏感性,并以此为依据并采取相应的个体化的放疗方案。

肿瘤是多基因表达异常所导致的一类细胞周期失控性疾病。细胞周期由诸多因子共同调控,其中 Cyclin 蛋白尤为重要,是调节细胞周期行进的重要正性调节因子,通过相应的细胞周期素依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinases, CDK)在细胞的分裂增殖中发挥重要的生物学作用。D 型周期蛋白有 D1、D2 和 D3 三种亚型,在不同的细胞类型中表达模式不同,所发挥的生物学功能也不尽相同。Cyclin D1 是细胞周期调节因子中与肿瘤最密切相关的基因^[1]。Cyclin D1 又称为 Bcl-1,由位于染色体 11q13

上的 CCND1 编码。细胞周期素 Cyclin D1 是一种核蛋白,可与 CDK4/6 形成活性复合物 Cyclin D1/CDK4/6,参与 G1 期和 S 期的 pRb 磷酸化作用,使细胞进入 S 期,是 G1/S 期行进的控制点,是细胞周期中 G1 期向 S 期转化的重要调节因子。Coco 等^[2]研究发现,Cyclin D1 在没有四环素培养的乳腺肿瘤细胞系 MCF7 中增加了 6 倍后,Cyclin D1 过表达细胞比非过表达细胞能更好的诱导细胞凋亡,对放射更敏感。同时丁丝露等^[3]也发现 Cyclin D1 表达程度与 NPC 细胞放疗敏感性呈正相关。但是, Siwanon 等人^[4]研究表明,耗竭生长在小鼠缺失视网膜母细胞瘤蛋白的人肿瘤的 Cyclin D1 后,细胞变得对放疗等 DNA 损伤因素更为敏感。Milas 等^[5]也发现 Cyclin D1 的表达程度与肿瘤放疗敏感性呈负相关。这些研究均表明,Cyclin D1 蛋白与肿瘤的放疗敏感性密切相关。本文研究结果显示 Cyclin D1 高表达与 NPC 患者的放疗敏感性呈显著相关性,即 Cyclin D1 低表达的 NPC 患者对放疗更敏感。可能与 Cyclin D1 高表达时 G1-S 期缩短,促进细胞增殖,导致细胞增殖失控进而促进肿瘤的生长有关。同时在细胞暴露于严重的、内源性的、癌基因诱导的 DNA 损伤以及由基因毒性疗法诱导的损伤时,Cyclin D1 能帮助 DNA 修复,有助于癌细胞存活,增加肿瘤对治疗的抗性。因此,Cyclin D1 可以作为评价 NPC 患者放疗敏感性的一种参考指标。

放射诱导肿瘤细胞凋亡是放疗的主要机制之一,肿瘤细胞凋亡程度与其放疗敏感性一致。众多研究表明对凋亡通路的靶向干涉治疗对提高肿瘤细胞的放疗敏感性有显著作用^[6]。细胞凋亡又受凋亡相关基因的调控。Survivin 是细胞凋亡抑制基因,定位于染色体 17q25,是凋亡抑制蛋白家族成员之一。Survivin 具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双重功能。Survivin 的表达具有周期性,在 G2/M 期特异性表达,表达于细胞有丝分裂时的纺锤体上,调节细胞有丝分裂。Survivin 通过与凋亡效应分子 Caspase 直接或间接结合以及阻断与 CDK2、CDK4 相互作用阻断凋亡信号转导通路等方式来抑制细胞凋亡。Survivin 表达于人与哺乳动物的胚胎发育组织和大多数肿瘤组织中,而在分化成熟的成人正常组织中不表达^[7]。Jin 等^[8]利用 RNA 干扰技术抑制 Survivin 表达后能显著提高肝癌 HepG2 细胞系对 high-LET 放射的放疗敏感性。Yu 等^[9]的研究也发现肾癌细胞系中的 Survivin 表达被抑制时能够提高细胞的放疗敏感性。而黄东海等^[10]利用细胞高通量大样本的组

织微阵技术发现 Survivin 在 NPC 放疗敏感组有明显高表达,与患者放疗敏感性呈正相关。本文研究的结果显示 Survivin 在 NPC 放疗不敏感组的表达明显高于放疗敏感组,即 Survivin 高表达与 NPC 的放疗敏感性呈负相关。Survivin 的过度表达抑制了肿瘤细胞凋亡途径,增加了其对放疗的抵抗作用。Survivin 的阳性表达多表达于胞核,可能与放射抗性有关。Survivin 是反映 NPC 放射敏感性和预测 NPC 放疗效果的重要指标。

Conway 等^[11]发现 Survivin 高表达可以引起 Cyclin D1 蛋白表达水平升高。Bao-En 等^[12]实验证实抑制 Cyclin D1 的表达诱导 G1 期细胞周期阻滞会降低 Survivin 的表达水平。可能是由于 Survivin 对细胞凋亡的抑制,引起 Cyclin D1 过表达,影响细胞周期,促使细胞持续增殖,从而导致肿瘤发生。本文研究中,Cyclin D1 蛋白表达和 Survivin 蛋白表达呈正相关性($r=0.353, P<0.05$)与上述两项研究结果基本一致。

放疗作为肿瘤治疗的重要方法之一,其作用机制主要是通过引起细胞的 DNA 损伤和细胞周期的改变,影响细胞的增殖状态,最终导致肿瘤细胞的增殖性死亡或凋亡。Cyclin D1 和 Survivin 可能正是在这些方面发挥作用从而导致肿瘤细胞对放疗的抵抗。Cyclin D1 和 Survivin 在放疗抵抗中的作用机制需要进一步研究明确。本文研究中,两基因的表达呈正相关性,可能是由于两基因在放疗敏感性上有协同作用,但尚无足够论据说明两基因是否有相互调控的作用。Cyclin D1 和 Survivin 在一定程度上不仅可以作为预测 NPC 患者放疗敏感性的分子标志物,为临床制定个体化的放射治疗方案提供理论依据,而且还可以以 Cyclin D1 或 Survivin 为靶点设计放疗方案抑制其表达,获得放疗增敏的效果。

4 参考文献

1 叶元胜,詹仁雅,童鹰. Cyclin D1 在颅脑胶质瘤中表达及细胞周期表达模式的研究. 浙江临床医学, 2005, 7: 899-900.

2 Coco Martin JM, Balkencudc A, Verschoor T, et al. Cyclin D1 over-expression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line. *Cancer Res*, 1999, 59: 1134-1140.

3 丁丝露,李光. Survivin, Cyclin D1 和 nm23-H1 蛋白表达程度与鼻咽癌放射治疗预后的相关关系. 中国医科大学, 2010: 42-47.

4 Siwanon Jirawatnotai, Yiduo Hu, Wojeiech Michowski, et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature*, 2011, 474: 230-234.

5 Milas L, Akimoto T, Hunter NR, et al. Relationship between cyclin D1 expression and poor radioresponse of murine carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, 52: 514-521.

6 Brendan P Eckelman, Guy S Salvesen, Fiona L Scott, et al. Human inhibitor of apoptosis proteins: why xiap is the black sheep of the family. *EMBO reports*, 2006, 7: 988-994.

7 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 127-134.

8 Jin XD, Li Q, Wu QF, et al. Inhibiting Survivin Expression Increases the Radiosensitivity of Human Hepatoma HepG2 Cells to High-LET Carbon Ions. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, 2009, 25: 166-169.

9 Yu Lei, Zhang Geng, Wu Guo-Jun, et al. Prognostic significance of survivin expression in renal cell cancer and its correlation with radioresistance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, 344: 23-31.

10 黄东海, 田勇泉, 邱元正, 等. 应用 PCNA 和 survivin 预测鼻咽癌放疗敏感性的研究. 同济大学学报(医学版), 2006, 25: 39-42.

11 Conway EM, Pollefeyt S, Comelissen J, et al. Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct anti-apoptotic functions. *Blood*, 2000, 95: 1435-1442.

12 Bao-En Shan, Ming-Xia Wang, Run-qing Li. Quercetin Inhibit Human SW480 Colon Cancer Growth in Association with Inhibition of Cyclin D1 and Survivin Expression through Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Cancer Investigation*, 2009, 27: 604-612.

(收稿日期: 2011-12-01)

(本文编辑: 陈淑莲)

消 息

欢迎订阅《实用检验医师杂志》

《实用检验医师杂志》2009年12月创刊,刊号:CN 11-5864/R,ISSN 1674-7151,季刊,国内外公开发行,邮发代号:6-245,10.00元/期,全年定价40元。欢迎单位和个人在当地邮局或《实用检验医师杂志》编辑部订阅,也可通过中国医师协会检验医师分会网站(www.cmdal.org;www.cmdal.com)信箱订阅。