

抑凋亡蛋白 Survivin 及 P-糖蛋白 在骨肉瘤中的表达与骨肉瘤化疗耐药性关系的研究

李 伟,贺 艳,张世权,刘安庆,郝淑芹
(深圳市第二人民医院骨关节科,广东 深圳 518000)

【摘要】 目的 探讨抑凋亡蛋白 Survivin 及多药耐药基因 *mdr1* 表达的 P-糖蛋白(P-gp)的表达与骨肉瘤临床病理特征间的关系。方法 应用免疫组织化学技术(SP法)检测 34 例骨肉瘤组织及 30 例骨软骨瘤(对照组)组织中抑凋亡蛋白 Survivin 及多药耐药基因 *mdr1* 表达的 P-糖蛋白的表达,统计分析 Survivin、P-gp 在骨肉瘤组织中表达的相关性和其表达情况与病例临床特征的相关性。结果 ① 34 例骨肉瘤组织标本中 19 例 Survivin 蛋白表达阳性为 55.9% (19/34), 27 例 P-gp 表达阳性为 79.4% (27/34); 对照组 30 例标本中未检测到 Survivin 蛋白表达、P-gp 表达($P < 0.01$)。② 39 例骨肉瘤患者中发生转移的病例 16 例,其 Survivin 蛋白、P-gp 表达水平显著高于未发生转移病例($P < 0.05$)。结论 抑凋亡蛋白 Survivin 及多药耐药基因 *mdr1* 表达的 P-gp 的在骨肉瘤组织中呈现高表达,且两者表达水平与骨肉瘤病理分级和转移成正比。

【关键词】 骨肉瘤; P-糖蛋白; Survivin 蛋白

【中图分类号】 R738 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)06-001-03

Expression of Survivin and P-glycoprotein in osteosarcoma and its relationship with chemoresistance. LI Wei, HE Yan, ZHANG Shi-quan, LIU An-qing, HAO Shu-qin. Department of Orthopaedics, the Second People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of Survivin and P-glycoprotein (P-gp) in osteosarcoma and its relationship with the clinical and pathological features of osteosarcoma. **Methods** The expression of antiapoptotic protein Survivin and P-gp (expressed by multidrug resistance gene *mdr1*) were detected in 34 cases of osteosarcoma (the study group) and 30 cases of osteochondroma (the control group) using immunohistochemistry (SP method). The relationship between the expression of Survivin and P-gp, as well as its relevance to the clinical and pathological features of osteosarcoma was analyzed. **Results** ① The positive expression of Survivin protein was found in 19 of the 34 cases of osteosarcoma, accounting for 55.9% (19/34), and the positive expression of P-gp was found in 27 cases (79.4%, 27/34). Specimens in the control group were found with no expression of Survivin and P-gp protein. ② 16 cases in the study group were found with osteosarcoma metastasis. in which the expression of Survivin and P-gp protein was significantly higher than those patients without metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** Survivin and P-gp show high expression in osteosarcoma, and the expression levels of the two proteins is positively related to tumor grade and metastasis of osteosarcoma.

【Key words】 Osteosarcoma; P-glycoprotein; Survivin protein

骨肉瘤是骨组织最常见的恶性肿瘤,好发于青少年,其恶性程度较高,且在早期易发生转移,影响了骨肉瘤的治疗效果和患者的预后。近年来大量研究表明,多药耐药是影响骨肉瘤化疗效果的重要原因。Survivin 蛋白是目前在凋亡蛋白家族中发现的最强的凋亡抑制因子^[1],可以调节细胞有丝分裂,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤增殖。多药耐药基因 *mdr1* 表达的 P-糖蛋白是化疗耐药的最有力指标^[2]。本研究通过对骨肉瘤及骨软骨瘤标本中 Survivin 蛋白和 P-糖蛋白的表达,旨在发现二者

在产生化疗多药耐药之间的内在关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集我院病理科 2008-2011 年存档的骨肉瘤标本 34 例作为研究对象,其中男 23 例,女 21 例,年龄 12~42 岁,平均(21.4±3.5)岁,标本位于股骨 21 例,胫骨 7 例,肱骨 2 例,腓骨 1 例,骶骨 3 例。根据肿瘤分化程度: I、II 级 9 例, III、IV 级 25 例。选取骨软骨瘤标本 30 例作为对照组。所有组织均经福尔马林固定后,石蜡包埋。

基金项目:深圳市科技局 2011 年科技计划项目(编号:201103117)

作者简介:李 伟(1976—),男,吉林省吉林市人,副主任医师,硕士。

1.2 方法 应用免疫组织化学技术(SP法)检测68例骨肉瘤组织及30例骨软骨瘤组织中Survivin蛋白及P-gp的表达。每例标本取两张切片分别做Survivin蛋白及P-gp免疫组织化学染色,染色试剂(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法):用兔抗人Survivin多克隆抗体、鼠抗人P-gp抗体(Boehringer Mannheim公司),SP免疫组化试剂盒(博士德试剂公司)。实验步骤严格按照说明书执行,微波枸橼酸盐进行抗原修复,二氨基联苯胺显色。标本阳性确认方法^[2]:首先将标本在10倍物镜下观察,40倍物镜下计数,如果任意视野胞核和(或)胞质染色比率超过肿瘤细胞总数的10%记为阳性,否则记为阴性。

1.3 统计学方法 采用SPSS11.0统计软件,两组均数比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果 34例骨肉瘤组织标本中19例Survivin蛋白表达阳性为55.9% (19/34),27例P-gp表达阳性为79.4% (27/34);对照组30例标本中未检测到Survivin蛋白表达、P-gp表达($P < 0.01$),见表1。

表1 Survivin蛋白、P-gp在骨肉瘤及骨软骨瘤标本中表达情况[例(%)]

组别	例数	Survivin蛋白	P-gp
骨肉瘤	34	19(55.9)	27(79.4)
骨软骨瘤	30	0(0)	0(0)
χ^2 值		15.763	18.073
P		<0.01	<0.01

2.2 Survivin蛋白、P-gp表达与骨肉瘤临床特征关系 34例骨肉瘤患者中发生转移的病例16例,其Survivin蛋白、P-gp表达水平显著高于未发生转移病例($P < 0.05$)。并且Survivin蛋白、P-gp表达在骨肉瘤标本中呈正相关($P < 0.05$),见表2。

表2 Survivin蛋白、P-gp表达与肿瘤转移的关系

组别	例数	Survivin蛋白	P-gp
无转移	18	8(44.4)	12(66.6)
有转移	16	12(75.0)	14(87.5)
χ^2 值	-	7.732	5.341
P	-	<0.05	<0.05

3 讨论

20世纪70年代以来,随着肿瘤手术技术及化疗技术的飞速发展,肿瘤生存率得到明显提升,但近十年来,肿瘤生存率进入一个相对平台期。细胞凋亡及肿瘤多药耐药是目前制约骨肉瘤临床疗效的两个重要因素,而Survivin及P-gp被证实分别在拮抗细胞凋亡和介导肿瘤多药耐药方面起到了重要的作用。

Survivin蛋白是有耶鲁大学Ambrosini等发现的,是目前在抑凋亡蛋白家族中发现的最强的凋亡抑制因子^[3]。Survivin存在于几乎所有的恶性肿瘤组织中。研究证实,它可以参与细胞有丝分裂,同时通过直接抑制Caspase-3和Caspase-7途径,起到抑制肿瘤细胞凋亡的作用。除此之外,Survivin还可以参与IL-3的缺失、Fas的激活以及Caspase-3、Caspase-7、Caspase-8等的过度表达^[4],对抗广泛的凋亡诱导因素,而该机制被认为是产生化疗药物耐药的重要机制。Trieb等^[5]研究发现Survivin表达高的直肠癌细胞株,细胞增殖增加,凋亡减少,对化疗药物敏感性下降。因此Survivin的表达可能与骨肉瘤的临床特定及耐药性有直接关系。本研究34例骨肉瘤组织标本中19例Survivin蛋白表达阳性55.9%,对照组30例标本中未检测到Survivin蛋白表达。由此提示Survivin蛋白有可能参与了骨肉瘤的发生于发展,同时与骨肉瘤的恶性行为和预后有关。在对Survivin表达与骨肉瘤病例临床特征的相关性分析中,34例骨肉瘤患者中发生转移的病例16例,其Survivin蛋白、P-gp表达水平显著高于未发生转移病例($P < 0.05$),且Survivin蛋白标本中呈正相关。提示Survivin在骨肉瘤发生、发展中起到一定作用,也可能降低化疗药物对肿瘤细胞的敏感性。但具体机制有待于进行更深入的研究。

P-gp是由*mdr1*基因编码的一种能量依赖性转运蛋白,位于细胞膜上^[6]。它是目前唯一得到临床证实的多药耐药机制,当化疗药物进入肿瘤细胞时,P-gp可以与不同的化疗药物集合并通过ATP依赖型药物泵将化疗药物排出细胞,从而阻碍药物的作用,是肿瘤细胞产生耐药。Baldini等^[3]通过对92例高分化的骨肉瘤病例研究表明,P-gp高表达的病例生存率明显降低。而Ling等^[7]研究发现P-gp高表达的淋巴瘤患者较地表达患者更易复发,且生存率更低。而本研究中34例骨肉瘤患者中17例P-gp表达阳性为79.4%;对照组30例标本中未检测到P-gp表达,68例骨肉瘤患者中发生转移的病例16例,其P-gp表达水平显著高于未发生转移病例($P < 0.05$)。提示P-gp高表达是骨肉瘤MDR产生的主要原因。

综上所述,抑凋亡蛋白Survivin及多药耐药基因*mdr1*表达的P-gp的在骨肉瘤组织中呈现高表达,且两者表达水平与骨肉瘤病理分级和转移成正比。

参考文献

- [1] 高庆,邢兰英,王咏雪. P-糖蛋白、Survivin蛋白在卵巢上皮性癌中的表达及其与卵巢癌耐药的关系[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28(5): 578-581.

姜黄素对 HL60 细胞 PI3K/AKT 信号传导通路的影响

闵 旻^{1,2}, 高清平^{1*}

(1. 武汉大学人民医院血液内科, 湖北 武汉 430060;

2. 咸宁学院第一附属医院血液内科, 湖北 咸宁 437100)

【摘要】 目的 研究姜黄素诱导白血病HL-60细胞凋亡与PI3K/AKT信号传导通路的相关性,为AML的靶向治疗提供新思路。**方法** MTT实验检测姜黄素对HL-60细胞增殖的抑制作用;经姜黄素处理后,用倒置显微镜进行细胞形态学观察,并用Western blot检测CAV-1、AKT、p-AKT蛋白水平。**结果** MTT实验证明了姜黄素对HL60细胞增殖具有抑制作用,且随作用浓度的增强而增强;姜黄素作用HL-60细胞,用倒置显微镜观察细胞出现了凋亡形态学改变;并且Western blot检测显示CAV-1蛋白水平增高,而AKT、p-AKT蛋白水平降低。**结论** 姜黄素可通过上调HL-60细胞中CAV-1的表达,而抑制PI3K/AKT信号通路,进而抑制HL-60细胞增殖并促进其凋亡。

【关键词】 姜黄素;HL-60;PI3K;AKT;p-AKT

【中图分类号】 R282.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)06-003-03

Effects of curcumin on PI3K/AKT signaling pathway in HL60 Cells. MIN Min^{1,2}, GAO Qing-ping^{1*}. 1. Department of Hematology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, CHINA; 2. Department of Hematology, the First Hospital Affiliated to Xianning University, Xianning 437100, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effects of curcumin on the PI3K/AKT signaling pathway in HL60 cells and the apoptosis of HL60 cells. **Methods** The inhibitory effects of curcumin on the proliferation of HL60 cells were determined by MTT assay. After being treated by curcumin, the morphological and structural changes of the cells were observed by inverted microscope. The levels of CAV-1, AKT and p-AKT protein were measured by Western blot. **Results** MTT assay revealed that curcumin has growth-inhibiting effects on HL60 cells, and the effects were enhanced with the increase of concentration. Apoptotic morphology changes were observed by inverted microscope. The level of CAV-1 protein was increased, while the levels of AKT and p-AKT protein were reduced. **Conclusion** Curcumin can inhibit PI3K/AKT signaling pathway by upregulating the expression of CAV-1, resulting in inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis in HL60 cells.

【Key words】 Curcumin; HL-60; PI3K; AKT; p-A

姜黄素从姜黄(一种草本植物)中提取,具有性味温、苦及辛的特点,可以使气血通顺,消除瘀滞,还可以止痛及通经。姜黄素具有多种药理作用,能够抗肿

瘤、抗炎、抗HIV等,且毒性比较低,对正常的组织细胞不会产生严重的影响^[1]。其机制特别对一些肿瘤细胞产生很强的抑制作用从而诱发肿瘤细胞凋亡,肿

作者简介: 闵 旻(1979—),女,湖北省黄石市人,讲师,本科。

*通讯作者: 高清平,教授。E-mail: gaoqingping@163.com

[2] Tetsuhisa Y, Yoshinobu M, Motoyuki N, et al. Down regulation of survivin expression by induction of the effect or cell protease receptor-1 reduces tumor growth potential and results in an increased sensitivity to anticancer agents in human colon cancer [J]. Euro J Cancer, 38(17): 2316-2324.

[3] Baldini N, Scotlandi K, Manara MC, et al. Expression of P-glytoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical out-come [J]. N Engl J Med, 1995, 333(3): 1380-1385.

[4] 田洪涛, 杨述华, 吴 强. Survivin 在骨肉瘤中的表达及其与血管内皮生长因子的相关性研究[J]. 华中科技大学学报(医学版),

2004, 33(3): 320-323.

[5] Trieb K, Lehner R, Stulnig T, et al. Survivin expressin in human osteosarcoma is a marker for survival [J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29: 379-382.

[6] Wang TT, Wei J, Qian XP, et al. Differential gene expression of the inhibitor of apoptosis proteins in docetaxel -resistant gastric cancer cells [J]. Zhonghua Zhongliu Zazhi, 2008, 30(8): 573- 577.

[7] Ling V. Does P- glycoprotein predict r esponse to chemotherapy [J]. Natl Cancer Inst, 1989, 81: 84-85.

(收稿日期: 2011-11-30)