

FLIP、Smac 和 survivin 蛋白在肺小细胞癌及低分化鳞癌中表达规律及预后相关性研究

刘换新^{1,3}, 王 炜², 张 燕¹, 郭琳琅^{1*}

(¹南方医科大学附属珠江医院病理科, 广东 广州 510282; ²广州军区广州总医院病理科, 广东 广州 510010; ³武警广东总队医院病理科, 广东 广州 510507)

[摘要] 目的:通过检测小细胞肺癌(small cell lung carcinoma, SCLC)和低分化鳞状细胞癌(poorly differentiated squamous-cell carcinoma, PDSCC)中 FLICE 抑制蛋白 (FLICE inhibitory protein, FLIP)、促凋亡蛋白 Smac (second mitochondrial activator of caspase, Smac)、抗凋亡因子 survivin 的表达,探讨小细胞肺癌及低分化鳞癌中 FLIP、Smac 和 survivin 蛋白的表达规律及其与临床病理指标及预后的关系,为临床诊断、治疗及预后判断提供新的理论依据。方法:应用免疫组化 S-P 法检测肺小细胞肺癌及低分化鳞状细胞癌中 FLIP、Smac 和 survivin 阳性表达;应用蛋白印记(Western blot)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测正常肺组织及两种癌组织中 FLIP、Smac、survivin 蛋白和 mRNA 表达水平。结果:73 例肺癌患者 1 年生存率为 64.5%。其中小细胞肺癌 60.5%,低分化鳞状细胞癌 68.6%。FLIP、Smac 及 survivin 在小细胞肺癌及低分化鳞癌中的表达均与年龄、性别、是否吸烟及淋巴结转移无关($P > 0.05$),但 Smac 的表达与临床分期及生存率有关 ($P < 0.05$);Smac 在正常组织表达显著高于癌组织($P < 0.05$);FLIP 及 survivin 在正常组织中的表达显著低于癌组织 ($P < 0.05$)。结论:癌组织中 Smac 低表达提示低生存率,Smac 可作为独立预后指标;FLIP、Smac 和 survivin 联合检测有助于预后判断。

[关键词] 肺癌;FLIP;Smac;survivin

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1202-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130906

Correlation between expression of FLIP, Smac and survivin protein and prognosis in small-cell lung carcinoma and poorly differentiated squamous-cell carcinoma

Liu Huanxin^{1,3}, Wang Wei², Zhang Yan¹, Guo Linlang^{1*}

(¹Department of Pathology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282; ²Department of Pathology, the Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010; ³Department of Pathology, Guangdong Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Guangzhou 510507, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expressions of FLIP, Smac and survivin in small-cell lung carcinoma (SCLC) and poorly differentiated squamous-cell carcinoma (PDSCC), and analyze the correlation between the expressions of FLIP, Smac and survivin and clinical pathologic features and prognosis. **Methods:** The expressions of FLIP, Smac and survivin were detected by S-P immunohistochemical stain in SCLC and PDSCC. Protein and mRNA expressions of FLIP, Smac and survivin in normal lung tissue, SCLC and PDSCC were examined by Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. **Results:** One-year survival rate was 64.5%, 60.5%, and 68.6% in total population studied, SCLC, and PDSCC, respectively; the expressions of FLIP, Smac and survivin were not related to sex, age, lymph node metastasis and smoking either in SCLC or in PDSCC ($P > 0.05$). Smac was significantly correlated with clinical stages and survival rates after treatment ($P < 0.05$). Protein and mRNA expressions of Smac in normal lung tissues were significantly higher than those in tumor tissues ($P < 0.001$), while protein and mRNA expressions of FLIP and survivin in normal lung tissues were significantly lower than those in tumor tissues ($P < 0.001$). **Conclusion:**

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81172241)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: linlang@yahoo.com.cn

Low expression of Smac in carcinoma tissues indicates low survival rate, and Smac may be an independent prognostic indicator. The combination of the detection of FLIP, Smac and survivin in cancer tissues may be helpful to predict prognosis.

[Key words] lung carcinoma; FLIP; Smac; survivin

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1202-1207]

肺癌是目前全球发病率增长速度较快的癌症之一,对人类健康造成极大危害。小细胞肺癌(small cell lung carcinoma, SCLC)生长极快,恶性程度高,较早出现淋巴广泛转移,预后是肺癌类型中最差的一种^[1]。低分化鳞状细胞癌(poorly differentiated squamous-cell carcinoma, PDSCC)分化程度最低,形态与小细胞肺癌类似。虽然镜下两者很难区分,但生物学特性及预后却存在较大差异^[2]。基于两者生物学差异,探讨差异与预后的相关性具有重要临床意义。肺癌的发生发展受多种基因改变的影响,细胞增殖与凋亡的平衡被打乱是重要因素之一。FLIP 是近年新发现的一种凋亡抑制蛋白,结构序列上与 Caspase-8 很相似,能够抑制 Caspase-8 与死亡诱导信号复合物的结合,进而可以阻断 Fas 介导的凋亡信号转导,因此被公认与炎症、肿瘤等疾病的发生发展密切相关^[3]。Smac 则是一种由线粒体释放的促凋亡蛋白,有研究表明其体外具有抗肿瘤作用,但在肺癌中作用及机制尚不明确^[4]。survivin 也是一种凋亡抑制蛋白,可通过抑制凋亡、促进增殖参与肺癌的发生、发展。本研究拟通过对比 SCLC 和 PDSCC 中 FLIP、Smac 和 survivin 的表达规律,分析与预后的相关性,为筛选预后因素、临床诊断治疗提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象

选择武警广东总队医院及广州军区总医院病理科 2011 年 3 月~2012 年 3 月手术中切除肺癌组织 73 例及 28 例癌周肺组织样本作为研究对象,所有患者术前未经任何治疗。切除的组织经过组织脱水后,石蜡包埋。收集所有患者完整病例资料以及术后随访资料。73 例癌组织石蜡包埋切片后 CD56、CK、Syn 以及 CgA 免疫组化染色,经 2 位病理医师参照国际肺癌研究学会(IASLC)、美国胸科学会(ATS)和欧洲呼吸学会(ERS)于 2011 年 2 月公布的标准^[5]进行病理分级及临床分期,其中 SCLC 38 例,PDSCC 35 例。SCLC 患者中,男 32 例,女 6 例;吸烟者 33 例,不吸烟者 5 例;淋巴结转移 20 例,未转移 18 例;Ⅱ期 11 例,Ⅲ期 11 例,Ⅳ期 16 例。PDSCC 患者中,男 27 例,女 8 例,吸烟者 30 例,不吸烟者 5

例;淋巴结转移 20 例,未转移 15 例;Ⅱ期 11 例,Ⅲ期 17 例,Ⅳ期 7 例。术后随访,生存期超过 1 年的有 47 例,其中 SCLC 23 例,PDSCC 24 例。

鼠抗人 FLIP、Smac、survivin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),二抗(碧云天生物技术有限公司),ECL(福建迈新生物技术有限公司)。TRIzol RNA 试剂盒、RT 试剂盒、Taq 酶 PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化

石蜡包埋切片,采用 SABC 法染色,滴加一抗多克隆抗体、4℃过夜,PBS(pH=7.4)缓冲液冲洗 3 次,滴加生物素化二抗缓冲液冲洗 3 次,DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜下观察。按染色强度及阳性细胞数评分:①染色强度:0 为阴性,1 为弱阳性,2 为阳性,3 为强阳性;②阳性细胞数:0 为无阳性细胞,1 为阳性细胞数低于 25%,2 为阳性细胞数 25%~50%,3 为阳性细胞数超过 50%。①和②之和即为最后得分,得 3~6 分者评为免疫组织化学染色阳性。

1.2.2 蛋白印迹检测

取切除的肺组织,加入 0.5 ml 蛋白裂解液充分匀浆,冰上放置 20 min,9 000 g 离心 20 min,取上清液以 SDS-loading buffer 煮沸 5 min,备用。经 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 30 min 后,加入相应一抗,4℃过夜;洗膜后与辣根过氧化物酶标记的二抗作用,用 ECL 试剂显色, β -actin 作参比计算蛋白的相对表达值。

1.2.3 PCR 测定

取切除肺组织,加入 1 ml TRIzol 充分匀浆后,提取总 RNA,取 1 μ g RNA 按逆转录合成试剂盒说明合成 cDNA,然后以该 cDNA 为模板,PCR 仪中扩增:95℃预变性 10 min,95℃,10 s;52℃,15 s;72℃,20 s;40 个循环。以 GAPDH 作内参,通过计算二者比值计算每个基因的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中癌组织以及癌周正常肺组织中 FLIP、Smac 及 survivin 蛋白和 mRNA 表

达值的差异采用双侧 *t* 检验。FLIP、Smac 及 survivin 表达率与性别、年龄、是否吸烟、淋巴结转移、临床分期以及生存率的相关性采用 χ^2 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检查结果

FLIP 阳性信号定位于胞质及胞膜;Smac 阳性信

号定位于胞膜, survivin 阳性信号定位于胞质(图 1)。免疫组化结果显示, SCLC 与 PDSCC 中 FLIP 阳性表达分别为 21.05%(8/38)和 25.71%(9/35), Smac 阳性表达分别为 60.52%(23/38) 和 42.86%(15/35), survivin 阳性表达分别为 47.37%(18/38)和 68.57%(24/35), 其中 Smac 在 SCLC 与 PDSCC 组织中表达具有显著性差异($P < 0.05$), 而 FLIP、Survivin 在两种癌组织中表达均未见明显差异($P > 0.05$)。

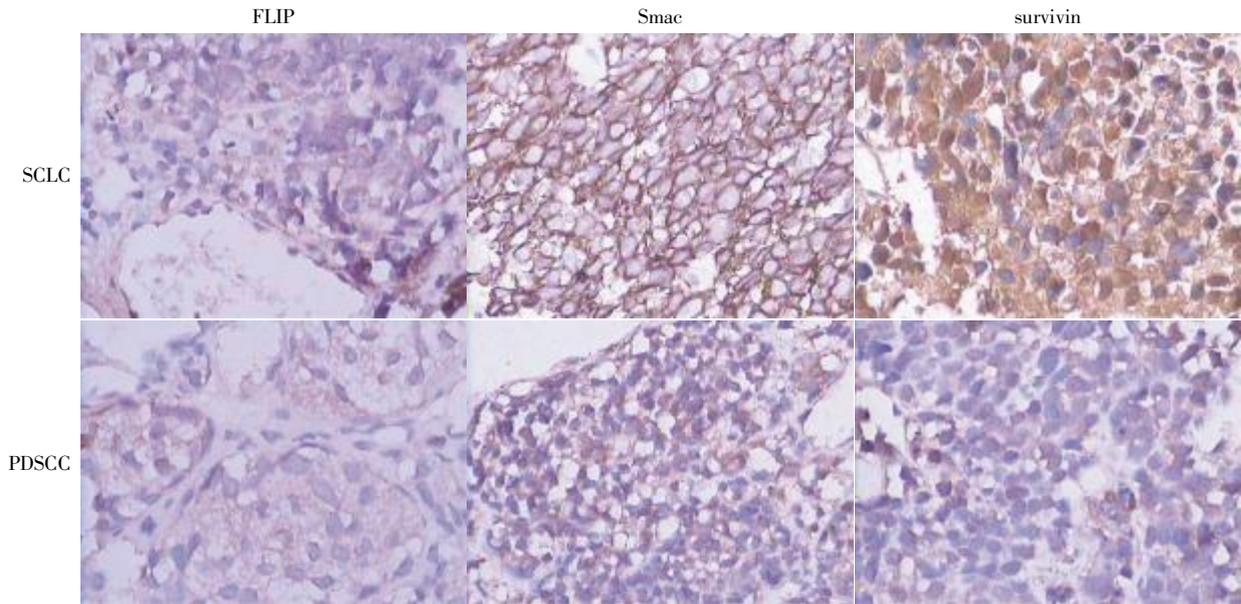


图 1 SCLC 及 PDSCC 组织 FLIP、Smac 和 survivin 的表达(免疫组化, ×400)

Figure 1 The expressions of FLIP, Smac and survivin in SCLC and PDSCC (immunohistochemical stain, ×400)

2.2 FLIP、Smac 及 survivin 表达与临床病理指标的关系

SCLC 与 PDSCC 组织中, FLIP 及 survivin 表达与性别、年龄、是否吸烟及淋巴结转移、临床分期以及 1 年生存率之间均无明显相关性 ($P > 0.05$); Smac 阳性表达与性别、年龄、是否吸烟及淋巴结转移也无显著相关性 ($P > 0.05$), 但无论在 SCLC 还是 PDSCC 组织, Smac 阳性表达率在各临床分期之间均有显著性差异 ($P < 0.05$), 与 1 年期生存率均显著相关 ($P < 0.05$) (表 1、2)。

2.3 Western blot 结果

SCLC 和 PDSCC 及正常肺组织中 3 种蛋白表达结果显示, FLIP 在正常组织表达低于癌组织, SCLC 中 FLIP 蛋白表达虽略高于 PDSCC, 但不具显著性差异, 与免疫组化结果一致。Smac 蛋白在正常组织中的表达高于癌组织, SCLC 中 Smac 蛋白表达高于 PDSCC ($P < 0.01$), 与免疫组化结果一致。癌组

织中 survivin 表达显著高于正常组织 ($P < 0.001$); SCLC 和 PDSCC 中 survivin 蛋白表达相差无几, 也与免疫组化结果一致(图 2)。

2.4 PCR 检测结果

采用 RT-PCR 检测 SCLC 和 PDSCC 及癌周正常肺组织中 FLIP mRNA 的表达, 结果显示其在正常组织的表达明显低于癌组织, SCLC 中表达高于 PDSCC。Smac mRNA 在正常肺组织中表达显著高于 SCLC 和 PDSCC, SCLC 中表达高于 PDSCC。survivin mRNA 在正常肺组织中表达显著低于 SCLC 和 PDSCC, SCLC 和 PDSCC 中 survivin mRNA 水平基本一致(图 3)。

3 讨论

肺癌的预后与多种因素相关。随着基因研究的不断深入, 通过对分子生物学指标的检测, 研究这些指标与预后的相关性是目前的大方向, 这些生物学

表 1 SCLC 组织中 FLIP、Smac 及 survivin 的表达与临床病理特征的关系

Table 1 Correlation between the expressions and clinical pathologic features of FLIP, Smac and survivin in SCLC

临床病理参数	n	FLIP				Smac				survivin			
		阳性	阴性	χ^2 值	P 值	阳性	阴性	χ^2 值	P 值	阳性	阴性	χ^2 值	P 值
性别													
男	32	5	27	3.592	0.058	20	12	1.389	0.238	15	17	0.020	0.888
女	6	3	3			3	3			3	3		
年龄(岁)													
≤55	13	3	10	0.048	0.826	7	6	0.369	0.544	6	7	0.012	0.914
> 55	25	5	20			16	9			12	13		
吸烟情况													
吸烟	33	6	27	1.090	0.296	20	13	0.001	0.979	16	17	0.514	0.422
不吸烟	5	2	3			3	2			2	3		
淋巴结转移													
转移	20	4	16	0.028	0.867	13	7	0.071	0.732	10	10	0.117	0.732
未转移	18	4	14			10	8			8	10		
临床分期													
Ⅱ期	11	2	9	0.349	0.840	4	7	9.347	0.009	5	6	1.057	0.591
Ⅲ期	11	3	8			5	6			4	7		
Ⅳ期	16	3	13			14	2			9	7		
生存期(年)													
> 1	23	5	18	0.017	0.898	17	6	8.197	0.004	10	13	0.354	0.552
≤1	15	3	12			4	11			8	7		

表 2 PDSCC 中 FLIP、Smac 及 survivin 的表达与临床病理特征的关系

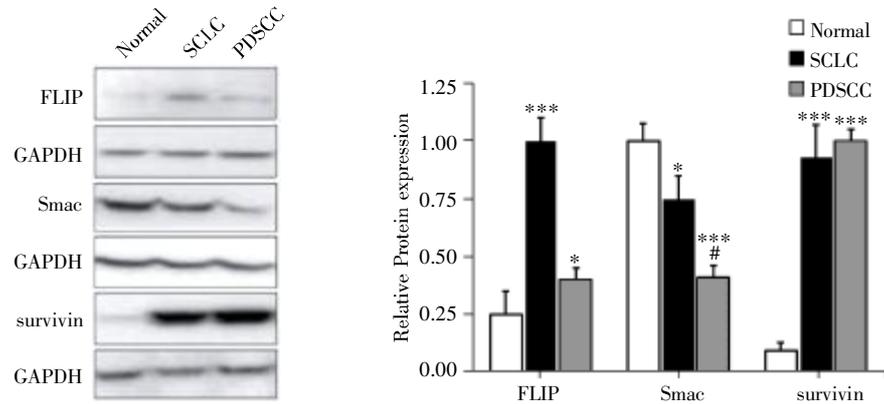
Table 2 Correlation between the expressions and clinical pathologic features of FLIP, Smac and survivin in PDSCC

临床病理参数	n	FLIP				Smac				survivin			
		阳性	阴性	χ^2 值	P 值	阳性	阴性	χ^2 值	P 值	阳性	阴性	χ^2 值	P 值
性别													
男	27	5	22	2.938	0.087	13	14	0.571	0.450	18	9	0.205	0.651
女	8	4	4			2	6			6	2		
年龄(岁)													
≤55	13	3	10	0.076	0.783	7	6	0.431	0.512	9	4	0.004	0.948
> 55	22	6	16			8	14			15	7		
吸烟情况													
吸烟	30	7	23	0.056	0.813	13	17	0.020	0.889	21	9	0.192	0.661
不吸烟	5	2	3			2	3			3	2		
淋巴结转移													
转移	20	5	15	0.012	0.911	10	10	0.972	0.324	15	5	0.334	0.563
未转移	15	4	11			5	10			9	6		
临床分期													
Ⅱ期	11	2	9	1.361	0.506	3	8	7.097	0.029	7	4	1.043	0.694
Ⅲ期	17	4	13			6	11			13	4		
Ⅳ期	7	3	4			6	1			4	3		
生存期(年)													
> 1	24	6	18	1.652	0.228	13	11	7.088	0.008	18	6	2.603	0.115
≤1	11	3	8			2	9			6	5		

指标对于提高临床诊断、监测病情进展以及评估预后具有十分重要的临床意义^[6-11]。

Smac/DIABLO 是 Caspase 家族第二个线粒体

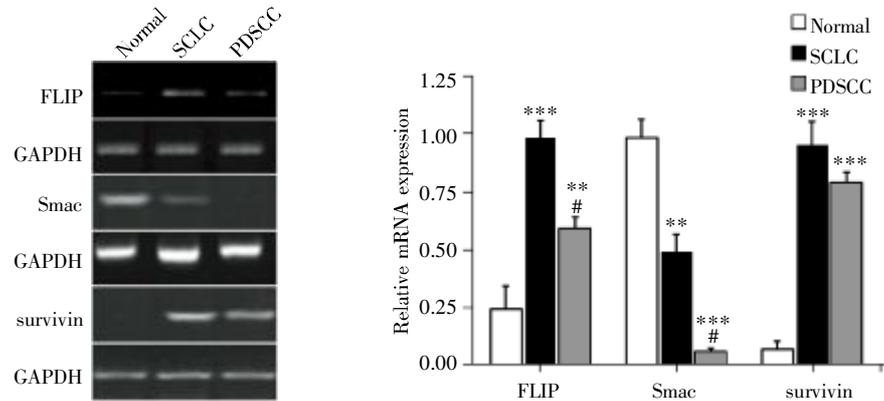
激活因子/低等电点的 IAP 直接结合蛋白, 基因定位于 12 号染色体, 成熟 Smac 定位于线粒体。Smac 在人正常组织中, 如心、肝、肾、脾以及胸腺均有高表



与正常组织比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与 SCLC 比较, # $P < 0.01$ 。

图2 Western blot 法检测 SCLC 与 PDSCC 中 FLIP、Smac 及 survivin 蛋白的表达

Figure 2 The expressions of FLIP, Smac and survivin in SCLC and PDSCC by using Western blot



与正常组织比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 SCLC 比较, # $P < 0.01$ 。

图3 SCLC 与 PDSCC 中 FLIP、Smac 及 survivin mRNA 表达分析

Figure 3 The expressions of FLIP, Smac and survivin mRNA in SCLC and PDSCC

达,是细胞正常存在蛋白。细胞受凋亡刺激后,线粒体释放 Smac 到胞质中,与 IAPs 结合后 Caspase 被激活,从而发挥促凋亡作用^[7]。细胞凋亡是一个逐级调控的过程,这种自毁性的过程通常由 Caspase-3 作为主要的执行者使 Caspases 系列级联放大而实现。增殖与凋亡平衡的打破是肿瘤发生的主要原因,Smac 表达减少破坏原有平衡,参与促进肿瘤的发生与发展^[7]。本研究检测到 Smac 蛋白和 mRNA 在 SCLC 和 PDSCC 中均显著下降,正常组高于癌组织,且无论 SCLC 还是 PDSCC,Smac 表达与临床分期及生存率均相关,IV 期患者其 Smac 阳性表达率均显著低于 II、III 期患者,生存期低于 1 年的患者癌组织中 Smac 的表达也显著低于生存期 1 年以上的患者,本研究结果提示,Smac 的表达在 SCLC 及 PDSCC 中均与临床分期及 1 年生存率显著相关,Smac 在肿瘤组织中的低表达提示不良预后。Smac

可能是 SCLC 和 PDSCC 的独立预后因素。通过检测肺癌患者术后 Smac 表达变化,对于预测患者术后生存率具有一定临床意义。有研究报道上调 Smac 的表达可以提高部分肿瘤化疗的敏感性^[11-12],提示 Smac 可作为潜在的肿瘤治疗的靶标。

FLIP 和 survivin 都是近年新发现凋亡抑制蛋白,抑制细胞凋亡和促进细胞增殖等作用。有作者报道 survivin 可以作为肿瘤治疗的靶标^[13]。本文的检测结果显示 FLIP 与 survivin 在正常组织中的表达显著均低于癌组织中的表达,FLIP 与 survivin 表达与肿瘤分期、是否淋巴结转移以及 1 年生存率等皆无显著相关性,与其他作者的报道一致^[6,8-10,14],但是,肿瘤的发生往往是多个基因表达失衡所致,因此,虽然本研究结果提示 FLIP、survivin 与肿瘤分期及生存率均无显著相关,但联合检测 FLIP、survivin 及 Smac 仍是必要的,因为 survivin 可与 Smac 作用

阻断 Smac 与 XIAP 结合,最终抑制 Caspase 激活。可见,FLIP、Smac、survivin 之间存在一定联系^[15]。对这三者联合检测,有助于对 SCLC 及 PDSCC 进行分类,对监测其预后具有一定价值。

本研究还显示 SCLC 组织中 Smac 的阳性表达显著高于 PDSCC,但由于 SCLC 与 PDSCC 属于不同类型的肿瘤,其临床意义尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gasparle LE, Mcnamara EJ, Gay EG, et al. Small-cell lung cancer: prognostic factors and changing treatment over 15 years[J]. *Clin Lung Cancer*, 2012, 13(2): 115-222
- [2] Park KS, Liang MC, Raiser DM, et al. Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(16): 2806-2815
- [3] Su L, Liu G, Hao X, et al. Death receptor 5 and cellular FLICE-inhibitory protein regulate pemetrexed-induced apoptosis in human lung cancer cells [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(16): 2471-2478
- [4] Xu P, Xu XL, Huang Q, et al. CIP2A with survivin protein expressions in human non-small-cell lung cancer correlates with prognosis [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1643-1647
- [5] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung carcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(2): 244-285
- [6] Rosato A, Menin C, Boldrin D, et al. Survivin expression impacts prognostically on NSCLC but not SCLC[J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(2): 180-186
- [7] Vogler M, Giagkousiklidis S, Genze F, et al. Inhibition of clonogenic tumor growth: a novel function of Smac contributing to its antitumor activity [J]. *Oncogene*, 2005, 24(48): 7190-7202
- [8] Akyurek N, Memis L, Ekinici O, et al. Survivin expression in pre-invasive lesions and non-small cell lung carcinoma [J]. *Virchows Arch*, 2006, 449(2): 164-170
- [9] 金玉姬, 王德欣, 陈晓黎, 等. 大鼠肝部分切除后肝再生组织中 Survivin 基因的表达变化[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(1): 59-62
- [10] Boiarskikh UA, Kondrakhin IV, Evshin IS, et al. Prediction of a non-small cell lung cancer sensitivity to cisplatin and paclitaxel based on the marker genes expression [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2011, 45(4): 652-661
- [11] Probst BL, Liu L, Ramesh V, et al. Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- α -dependent manner [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(10): 1645-1654
- [12] Greer RM, Peyton M, Larsen JE, et al. SMAC mimetic (JP1201) sensitizes non-small cell lung cancers to multiple chemotherapy agents in an IAP-dependent but TNF- α -independent manner [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(24): 7640-7648
- [13] Altieri DC. Targeting survivin in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2012, 11(24): 740-755
- [14] Wilson TR, Redmond KM, McLaughlin KM, et al. Procaspase 8 overexpression in non-small-cell lung cancer promotes apoptosis induced by FLIP silencing [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(10): 1352-1361
- [15] Wagner PL, Kitabayashi N, Chen YT. Combined small cell lung carcinomas: genotypic and immunophenotypic analysis of the separate morphologic components [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 131(12): 376-382

[收稿日期] 2013-01-26