

• 临床研究 •

乳腺癌组织中 survivin 和增殖细胞核抗原的表达及其临床意义

伦增军 黄勇 王静 侯俊岭 李朝战 扈文涛 鲍广建

【摘要】 目的 探讨乳腺癌组织中 survivin 和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达及其临床价值。**方法** 回顾性分析枣庄市立医院 2001 年 1 月至 2006 年 12 月手术治疗的 156 例乳腺癌患者的临床病理学资料(患者术前均未行化疗或放射治疗)。采用免疫组织化学 SP 法检测癌组织石蜡切片中 survivin 及 PCNA 的表达。定性资料间的比较,依据不同分析目的分别采用线性趋势检验、Kappa 检验或 χ^2 检验;应用多因素 Logistic 回归分析与 survivin 及 PCNA 阳性表达有关的因素。**结果** 乳腺癌中 survivin 及 PCNA 阳性表达与肿瘤病理分型、肿瘤大小无关($P>0.050$),但其与组织学分级、临床分期、淋巴结转移数目相关($P<0.050$)。Survivin 及 PCNA 阳性表达随着癌组织分化程度降低,淋巴结转移数目增加,临床分期增高而增强。多因素 Logistic 回归分析显示组织学分级是影响 survivin 及 PCNA 阳性表达的最主要因素($P<0.050$)。乳腺癌中 survivin 和 PCNA 的表达密切相关(Kappa 值为 0.256, $P<0.001$)。Survivin 和 PCNA 双阳性患者复发转移率高于双阴性患者($\chi^2=6.510$, $P=0.011$)。**结论** 联合检测 survivin 及 PCNA 可作为判断乳腺癌生物学行为和预后的重要指标。

【关键词】 乳腺肿瘤;免疫组织化学;Survivin;增殖细胞核抗原;预后

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expression of survivin and proliferating cell nuclear antigen in breast cancer tissues and their clinical significance LUN Zeng-jun, HUANG Yong, WANG Jing, HOU Jun-ling, LI Chao-zhan, HU Wen-tao, BAO Guang-jian. Department 2 of General Surgery, Zaozhuang Municipal Hospital, Zaozhuang 277102, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of survivin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in breast cancer tissue and their clinical significance. **Methods** The clinical pathology data of 156 patients with breast cancer managed with a routine surgical treatment, who had no chemotherapy or radiation therapy before operation, in Zaozhuang Municipal Hospital from January 2001 to December 2006 were retrospectively analyzed. Immunohistochemical SP method was used to determine the expressions of survivin and PCNA in the cancer tissues. Comparison between qualitative data was performed using linear trend test, Kappa test or Chi-square test according to different analytical purposes respectively. Logistic regression analysis was applied for the analysis of positive expression-related factors of survivin and PCNA. **Results** The positive expressions of survivin and PCNA protein in breast cancer tissues were not related with pathology feature and tumor size ($P>0.050$), but were associated with tumor histological grade, clinic stage and the number of

lymph node metastasis ($P < 0.050$). The expressions of survivin and PCNA-positive cancer tissues were increased with the decrease of cancer tissue differentiation, and the increase in the number of lymph node metastasis and TNM staging. Logistic regression analysis showed that the histological grade of breast cancer was the main factor impacting the survivin and PCNA expression ($P < 0.050$). Survivin was positively related with PCNA (Kappa value, 0.256; $P < 0.001$). Survivin and PCNA dual-positive patients had higher rates of recurrence and metastasis than survivin and PCNA dual-negative patients ($\chi^2 = 6.510$, $P = 0.011$). **Conclusion** Detection of the expressions of survivin and PCNA can estimate the biological behavior and predict the prognosis for breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Immunohistochemistry; Survivin; PCNA; Prognosis

乳腺癌是女性最常见的一种恶性肿瘤之一,近年来其发病率呈直线上升趋势,在欧美及中国部分大城市已占恶性肿瘤至首位。乳腺癌的病因尚不清楚,目前乳腺癌的治疗仍以手术治疗为主^[1]。影响乳腺癌预后的因素很多,以往许多学者都认为乳腺肿瘤的大小和腋窝淋巴结是否受累是影响预后的重要指标,此外肿瘤的组织学分类、癌细胞的分化程度、年龄、绝经状态及激素受体等对预后均有一定的影响,但是组织形态学相同的乳腺癌,其预后往往不同,说明乳腺癌的生物学特征不尽相同^[2]。近年来国内外应用各种新技术、新方法,从细胞、组织、分子水平上检测乳腺癌细胞的生物学特征。survivin 及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)在肿瘤组织中的过度表达可见于多种恶性肿瘤,是乳腺癌中常用的基因标志物之一。笔者应用免疫组织化学 SP 法检测 156 例乳腺癌组织中 survivin 及 PCNA 的表达,探讨其与病理分型、临床分期、淋巴结转移、肿瘤大小、组织学分级及其相互之间的关系,并分析其与乳腺癌生物学行为和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2001 年 1 月至 2006 年 12 月枣庄市立医院普外科手术病例 156 例,有完整的临床病理学资料,术前均未行化疗或放射治疗。患者均为女性,年龄 34~78 岁,平均年龄 56.7 岁。标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,厚 4 μm 连续切片。按免疫组织化学 SP 法常规操作。根据 WHO 组织学分级标准进行病理诊断和分级,其中浸润性导管癌占 112 例,浸润性小叶癌占 22 例,单纯癌占 12 例,其他 10 例(髓样癌占 4 例、导管内癌占 3 例、腺癌占 2 例、乳头状癌各为 1 例)。癌组织采用 Motting-Han 分级法进行组织学分级^[3]: (1)根据细胞异型低、中、高分 1 度、2 度、3 度; (2)根据腺体形成 $>75\%$ 、 $<75\%$ 及 $<10\%$ 分 1 度、2 度、3 度; (3)根据核分裂相平均 <1 、 $1\sim 2$ 及 >2 个/高倍视野(计数 10 个高倍视野计算平均值)分 1 度、2 度、3 度。3 项计分总和 8~9 度者为 III 级,6~7 度为 II 级,3~5 度为 I 级。按 TNM 临床

分期标准对术后病例进行临床分期,其中Ⅰ期 29 例,Ⅱ期 104 例,Ⅲ期 23 例。全部病例均行乳腺癌改良根治术。156 例乳腺癌中 146 例获术后随访,随访率 93.6%,随访时间为 6~40 个月。术后 2 年死亡者 2 例,分别为临床Ⅱ和Ⅲ期病例。

1.2 试剂与方法

采用免疫组织化学 SP 方法检测 survivin 及 PCNA 的表达。方法简述如下:石蜡切片经常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,柠檬酸缓冲液高温高压修复抗原,滴加过氧化酶阻断液室温放置 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,滴加非免疫性动物血清室温放置 10 min,滴加一抗即抗 survivin 抗体(蒸馏水 1:100 稀释)或抗 PCNA,4℃冰箱孵育过夜,PBS 冲洗后,滴加生物素偶联的二抗,室温放置 10 min PBS 冲洗,再滴加链霉素亲和素-过氧化物酶溶液,室温放置 10 min, PBS 冲洗后,滴加 DAB 显色,冲洗,苏木素复染,封片,行显微镜观察。用已知的 survivin 及 PCNA 染色阳性的乳腺癌组织作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。光镜下观察结果,每片随机观察 5 个高倍视野,统计阳性细胞所占的百分数,按阳性细胞所占比例分级。

1.3 结果判断

乳腺癌组织中 survivin 的判断参照文献^[4]的标准:Survivin 阳性蛋白为定位于细胞质或细胞膜上,呈棕黄色颗粒,无着色细胞或着色细胞数 $\leq 10\%$ 记为阴性;着色细胞数 $>10\%$ 记为阳性。细胞增殖活性 PCNA 阳性率的判断参照文献^[5]的标准:阳性 PCNA 为定位于细胞核,呈棕黄色颗粒,无着色细胞或着色细胞数 $\leq 10\%$ 记为阴性;着色细胞数 $>10\%$ 记为阳性。

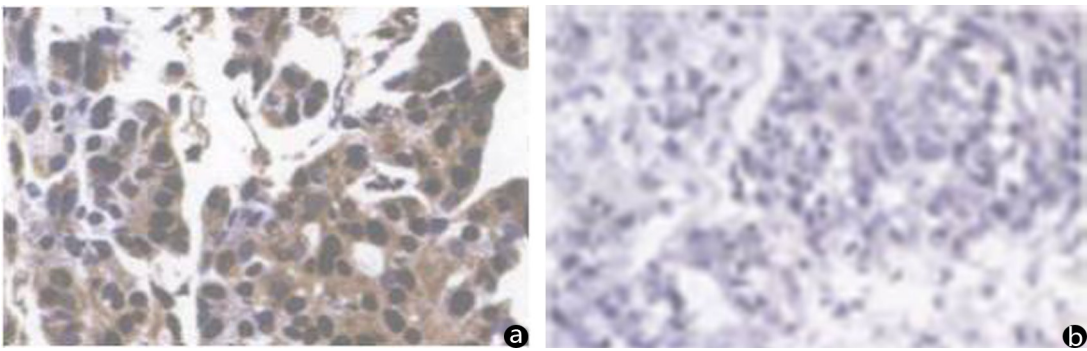
1.4 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件系统分别进行统计分析;定性资料间的比较,依据不同分析目的分别采用线性趋势检验、Kappa 检验或 χ^2 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义;定性资料间的两两比较采用 χ^2 分割法,检验水准为 0.012。逐个分析与 survivin 及 PCNA 阳性表达有关的临床及病理因素,筛选出显著性因素(检验水准 $P<0.05$),行多因素 Logistic 回归分析。

2 结果

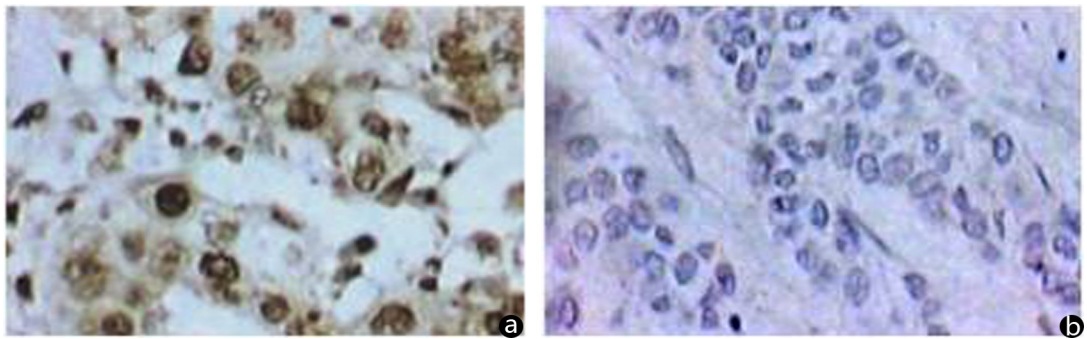
2.1 Survivin 及 PCNA 表达强度与各临床病理因素的关系

乳腺癌组织中 survivin 及 PCNA 的表达分别见图 1,2。156 例乳腺癌组织标本中 survivin 阳性表达率为 71.8%(112/156)及 PCNA 阳性表达率为 50.0%(78/156)。Survivin 及 PCNA 阳性表达强度与肿瘤病理分型、肿瘤大小无关($P>0.050$),与组织学分级、临床分期、淋巴结转移数目相关,差异有统计学意义($P<0.050$,表 1)。Survivin 及 PCNA 阳性表达随着癌组织分化程度降低,淋巴结转移数目增加,临床分期增高而增强。



a:乳腺癌组织中 survivin 阳性表达; b:乳腺癌组织中 survivin 阴性表达

图 1 乳腺癌组织中 survivin 的表达(S-P 染色 ×400)



a:乳腺癌组织中增殖细胞核抗原阳性表达; b:乳腺癌组织中增殖细胞核抗原阴性表达

图 1 乳腺癌组织中增殖细胞核抗原的表达(S-P 染色 ×400)

表 1 survivin 及 PCNA 表达与临床病理因素的关系

病理因素	survivin					增殖细胞核抗原				
	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P 值	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
肿瘤大小				0.374	0.541				0.408	0.523
<2 cm	20	12	62.5			15	17	46.9		
2~5 cm	72	23	75.8			47	48	49.5		
>5 cm	20	9	69.0			16	13	55.2		
病理分型				1.719	0.190				0.291	0.590
浸润性导管癌	84	28	75.0			54	58	48.2		
浸润性小叶癌	14	8	63.6			12	10	54.5		
单纯癌	8	4	66.7			7	5	58.3		
其他	6	4	60.0			5	5	50.0		
组织学分级				19.045	0.000				6.791	0.009
I	11	19	36.7			12	18	40.0		
II	79	22	78.2			52	49	51.5		
III	22	3	88.0			19	6	76.0		
临床分期				14.357	0.000			6.218	0.013	
I	12	17	41.4			11	18	37.9		
II	80	24	76.9			50	54	48.1		
III	20	3	87.0			17	6	73.9		
淋巴转移				24.156	0.000				9.211	0.002
(+)	72	9	88.9			50	31	61.7		
(-)	40	35	53.3			28	47	37.3		

2.2 Survivin 及 PCNA 表达的多因素 Logistic 回归分析

将经过筛选的影响 survivin 及 PCNA 阳性表达的因素(组织学分级、临床分期、淋巴结转移数目)代入 Logistic 模型进行多因素相关回归分析,结果显示组织学分级、临床分期、淋巴结转移数目与 survivin 及 PCNA 阳性表达的程度关系密切。组织学分级是影响 survivin 及 PCNA 阳性表达的最主要因素(表 2,3)。

表 2 乳腺癌 survivin 表达的多因素 Logistic 回归分析结果

因素	回归系数	标准误	χ^2 值	P 值	OR 值	OR 值 95%CI
组织学分级	2.101	0.509	18.312	0.000	8.156	3.124~21.404
淋巴结转移数	0.915	0.254	4.416	0.001	2.534	1.573~4.218
临床分期	1.219	0.277	5.728	0.000	2.620	1.642~4.982

表 3 乳腺癌 PCNA 表达的多因素 Logistic 回归分析结果

因素	回归系数	标准误	χ^2 值	P 值	OR 值	OR 值 95%CI
组织学分级	1.920	0.439	14.324	0.000	7.536	2.984~20.113
淋巴结转移数	0.908	0.246	4.352	0.001	2.213	1.343~4.013
临床分期	1.167	0.264	5.547	0.000	2.323	1.453~4.124

2.3 Survivin 和 PCNA 表达的比较

Kappa 检验结果显示两种方法的符合度好(Kappa 值为 0.256, $P < 0.001$), 乳腺癌中 survivin 和 PCNA 的表达密切相关(表 4)。

表 4 survivin 和 PCNA 的表达的关系(例)

survivin 表达	PCNA 表达		合计
	阳性	阴性	
阳性	66	46	112
阴性	12	32	44
合计	78	78	156

$P < 0.001$, Kappa 值为 0.256

2.4 患者的复发、转移情况

156 例乳腺癌中 146 例获术后随访,随访率 93.6%。146 例乳腺癌患者有 35 例出现复发转移,其中 10 例复发(胸壁复发 4 例,锁骨上淋巴结复发 6 例),3 例复发及转移(胸壁复发及肝转移 2 例,锁骨上淋巴结复发及肺转移 1 例),22 例转移(肺转移 9 例,骨转移 7 例,肝转移 5 例,脑转移 1 例)。Survivin 和 PCNA 表达与患者复发、转移的关系见表 5。Survivin 和 PCNA 双阳性患者复发、转移率高于双阴性患者($\chi^2 = 6.510$, $P = 0.011$)。

表 5 Survivin 和 PCNA 表达与患者复发、转移的关系

分组	例数	复发转移(例)		χ^2 值	P 值
		有	无		
Survivin(+)PCNA(+) ^a	66	22	44	11.655	0.009
Survivin(+)PCNA(-)	40	6	34		
Survivin(-)PCNA(+)	8	4	4		
Survivin(-)PCNA(-)	32	3	29		
合计	146	35	111		

a: $P < 0.012$, 与 Survivin(-)PCNA(-)组比较

3 讨论

临床研究表明,细胞凋亡是在特定的生理或病理条件下细胞接受某些信号的触发后,引发的细胞程序化死亡。细胞凋亡是机体的重要生理过程。在这个过程中,有许多因素参与细胞凋亡的调节。细胞凋亡的异常抑制与恶性肿瘤的发生、进展以及耐药性的产生密切相关^[6-7]。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)是一族结构、功能相似的凋亡抑制因子,在凋亡的负性调控中有重要作用^[8]。Survivin 是近年来克隆出的 IAP 家族新成员,在正常情况下仅表达于胚胎组织,在成熟分化的成人组织中表达消失,但可再表达于多种恶性转化细胞株和恶性肿瘤组织^[9]。近年的研究表明,survivin 不但具有抑制细胞凋亡的作用,而且可能参与了细胞有丝分裂的调节,干扰 survivin 与有丝分裂纺锤体微管的特异性结合,可致 survivin 抗凋亡活性的丧失^[10]。Survivin 直接抑制效应分子 caspase-3 和 caspase-7 的活性来阻止细胞的凋亡,并通过抑制细胞凋亡,与细胞增殖、分裂和细胞周期控制密切相关。其表达可作为某些癌的预后和复发的标志,与癌的发生、转移有一定的关系^[11]。本研究结果显示,乳腺癌组织中 Survivin 阳性表达率为 71.8%,随着癌组织分化程度降低、淋巴结转移数目增加、临床分期增高而增强。Survivin 蛋白在乳腺癌发生的早期即起作用并持续于乳腺癌的浸润、转移过程中,其表达可作为乳腺癌组织分化及预后的参考指标。

PCNA 是真核细胞 DNA 合成所必须的一种酸性核蛋白,相对分子质量为 36 000。近年研究证明^[12],它是 DNA 聚合酶的辅助蛋白之一,参与 DNA 合成并在细胞周期中起重要调控作用。PCNA 在 DNA 合成的 G₁ 期开始增加,至 S 期达到高峰,G₂/M 期又迅速降低,PCNA 合成和表达与细胞增殖状态相关。采用免疫组织化学技术测定肿瘤组织中 PCNA 的表达是临床上广泛应用、具有较高特异性的评价肿瘤增殖细胞活性的指标^[13]。文献报道,在乳腺癌组织中 PCNA 的阳性表达率与临床分期、腋淋巴结转移有密切的关系^[14]。本研究结果显示,乳腺癌组织中 PCNA 阳性表达率为 50%,随着癌组织分化程度降低、淋巴结转移数目增加、临床分期增高而增强。本研究结果 PCNA 阳性表达率较其他研究结果低,可能与肿瘤的组织类型、淋巴转移情

况、临床分期不同等有关。文献报道,在腋窝淋巴结转移阴性患者中 PCNA 高表达者的预后较低表达者差,腋窝淋巴结转移阳性患者中 PCNA 高表达者 5 年生存率和总生存率均明显低于 PCNA 低表达者^[15]。乳腺癌组织中 PCNA 的过度表达增加了癌细胞转移的危险性,可作为预测乳腺癌细胞的侵袭性、转移潜能和设计治疗计划的重要指标^[16]。本研究提示 survivin 和 PCNA 的表达密切关联。这可能与 survivin 蛋白在乳腺癌发生、发展不同阶段的表达呈进行性上升趋势有关。Survivin 不仅参与凋亡的调控,还促进了细胞增殖,影响了 PCNA 的表达,具体机制还有待进一步研究。多因素 Logistic 回归分析提示组织学分级是影响 survivin 及 PCNA 阳性表达的最主要因素。组织学分级低者, survivin 及 PCNA 阳性表达强,复发转移率高。Survivin 及 PCNA 均高表达者,组织学分级低,预后不佳,应加强术后的巩固性治疗和随访,以提高患者生存率。联合检测 survivin 及 PCNA 蛋白在乳腺癌组织中的表达,有助于临床医师对乳腺癌进展和预后的判断。

目前手术治疗仍是乳腺癌的主要治疗手段之一,术式有多种,总的趋势不外保守和扩大两方面,至今仍争论不休。乳房局部切除术和全乳切除术是保守手术的代表术式,术后需辅助放化疗,对严格选择的局限性早期癌,可收到较好的效果。但如何选择合适的早期癌患者还难得出结论。本研究结果提示经切除组织活检证实的乳腺癌患者,若 survivin 和 PCNA 表达均呈阳性,表明肿瘤的组织学分级低,预后不佳,宜行根治手术,加强术后的巩固性治疗和随访。对于拟行保乳手术的患者,建议穿刺肿块行 survivin 和 PCNA 联合检测,若为阳性表达则不宜行保乳手术。

总之, survivin 和 PCNA 的表达相互影响,分析其与乳腺癌生物学行为和预后的关系,可为预测乳腺癌患者的预后,选择合适的化疗方案及辅助治疗,提高治愈率提供有效的指标。

参考文献

- [1] 武正炎. 乳房疾病//吴在德. 外科学. 北京:人民卫生出版社, 2001. 350—362.
- [2] Temmim L, Luqmani Y A, Jarallah M, *et al.* Evaluation of prognostic factors in male breast cancer. *Breast*, 2001, 10:166—175
- [3] 刘艳红, 赵强, 曹娟. C-erbB-2、P-gp 及激素受体在乳腺癌中的表达及意义. *中华中西医杂志*, 2006, 7: [2006-7-19]. <http://www.39kf.com/cooperate/qk/journal/0602/2006-07-19-220146.shtml>
- [4] 邹继彬, 黄广恩, 陈鸿莲. 食管癌 survivin 和 PCNA 的表达及其临床意义. *中国医师杂志*, 2005, 7: 898—900.
- [5] 李成贻, 曹明智, 孔滨, 等. 41 例青年乳腺癌 ER、PR、CerbB-2、PCNA 表达及其临床特征. *现代中西医结合杂志*, 2007, 16: 309—310.
- [6] Chen X P, He S Q, Wang H P, *et al.* Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors and antitumor effects of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 2433—2440.
- [7] Fu Y G, Qu Y J, Wu K C, *et al.* Apoptosis-inducing effect of recombinant caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 1935—1939.
- [8] Gupta S. A role of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in increased lymphocyte apoptosis in aged humans. *Mech*

Ageing Dev, 2004, 125:99-101.

- [9] 林连捷, 郑长青. Survivin 与肿瘤. 世界华人消化杂志, 2003, 11:2027-2029.
- [10] Li F, Ambrosini G, Chu E Y, *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998, 396:580-584.
- [11] Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, *et al.* Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2003, 6:217-224.
- [12] 刘焕彩, 管英俊, 陈峰, 等. PCNA 与 caspase-3 在胃癌组织中的表达及意义. 潍坊医学院学报, 2008, 30:223-225.
- [13] Berns E M, Foekens J A, Vastaveren I L, *et al.* Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene*, 1995, 159:11-18.
- [14] 牛韵, 郎荣刚, 傅荣林, 等. 乳腺浸润性小叶癌中的 PCNA 和 P53 蛋白表达及临床意义. 中国肿瘤临床, 1999, 26:889-892.
- [15] 孙海燕. 增殖细胞核抗原的特性及其应用. 实用癌症杂志, 2002, 17:105-106.
- [16] 缪云翔, 吴浩荣. PCNA 和 C-erbB-2 及 nm-23-H1 在乳腺癌组织中的表达及临床意义. 中华实验外科杂志, 2006, 23:322-324.

(收稿日期:2008-05-05)

(本文编辑:张毅)

伦增军, 黄勇, 王静, 等. 乳腺癌组织中 survivin 和增殖细胞核抗原的表达及其临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2009, 3(3):301-308.