

· 论 著 ·

## Smac 与 Survivin 在胃溃疡组织中的表达

杨 丽, 钟玉全

(内江市第一人民医院消化内科, 四川内江 641000)

**摘要:**目的 研究促凋亡因子(Smac)与生存素(Survivin)在胃溃疡组织中的表达情况。方法 选择内江市第一人民医院收治的胃溃疡患者 80 例,其中无癌前病变胃溃疡 40 例(N 组),癌前病变胃溃疡 40 例(Y 组),使用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法对两组患者标本中的 Smac mRNA 和 Survivin mRNA 进行检测,免疫组化(SP)法对标本中的 Smac 与 Survivin 表达进行检测。胃溃疡患者经三联用药治疗,采用脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL 技术)检测治疗前后细胞凋亡指数。结果 Smac 在 N 组中的阳性(++)与强阳性(+++)的表达占比 82.5%,显著高于 Y 组,占比为 47.5%;Survivin 在 N 组中(++)与(+++)的表达占比 15.0%,显著低于 Y 组,占比为 35.0%;Smac mRNA 在 N 组中的相对表达量显著高于 Y 组,而 Survivin mRNA 在 N 组中的表达则显著低于 Y 组;N 组经三联用药治疗后的细胞凋亡指数相比治疗前显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 临床可将 Smac 的降低与 Survivin 的升高作为判定胃溃疡患者组织发生癌前病变的辅助诊断指标,无癌前病变胃溃疡患者经三联用药治疗,能有效控制患者的细胞凋亡指数,提高患者的生存率。

**关键词:**促凋亡因子; 凋亡抑制蛋白; 胃溃疡; 癌前病变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2406-03

## Analysis on the expression of Smac and Survivin in precancerous lesions of gastric ulcer

YANG Li, ZHONG Yuquan

(Department of Digestive Internal Medicine, the First People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641000, China)

**Abstract:**Objective To investigate the expression of pro-apoptotic factor (Smac) and Survivin in gastric ulcer tissue. **Methods** Selected the 80 cases of gastric ulcer patients as the research object in the first people's hospital of neijiang, in which no precancerous lesions of 40 cases of gastric ulcer (N group), 40 cases of precancerous lesions of gastric ulcer (Y group), two groups of patients were Smac mRNA and Survivin mRNA were detected by using PCR method, immunohistochemical SP method of Smac and Survivin in specimens of table detect. Gastric ulcer patients were treated by triple therapy, and the apoptosis index was detected by TUNEL. **Results** Smac in N group(++) and (+++) in the expression accounted for 82.5% was higher than that in Y group accounted for 47.5%, Survivin in group N(++) and (+++) in the expression accounted for 15.0% was significantly lower than Y group accounted for 35.0%; And Smac mRNA in the N group relative expression the amount was significantly higher than that of Y group, while the expression of Survivin mRNA in the N group were significantly lower than Y group; N group the apoptosis index of the triple therapy after treatment than before treatment significantly decreased, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The clinical application of Smac and Survivin can be used as an auxiliary diagnostic index for the diagnosis of precancerous lesions in patients with gastric ulcer. Patients with gastric ulcer without precancerous lesion treated by triple therapy which can effectively control the apoptosis index of patients, improve the survival rate of patients.

**Key words:** pro-apoptotic factor; inhibitor of apoptosis protein; gastric ulcer; precancerous lesion

胃溃疡是消化内科常见的一种疾病,在溃疡的形成和愈合过程中,会有多种细胞因子参与其中,对组织细胞的增殖与凋亡造成影响。目前的研究发现<sup>[1]</sup>,胃癌患者的发病与耐药和肿瘤细胞的凋亡也有明显的关系,但尚不清楚相关机制。细胞凋亡受阻在肿瘤的发生和发展中具有重要的作用<sup>[2]</sup>。细胞凋亡受基因的高度调控,是细胞走向死亡的主动过程,尤其是在多细胞有机体的生长发育过程中,组织同源性的维持作用十分重要<sup>[3]</sup>。由线粒体衍生的蛋白酶激活剂为促凋亡因子(Smac)。生存素(Survivin)是一种凋亡抑制蛋白,不仅能抑制细胞的凋亡,同时能调节细胞的分裂功能,是一种具有双功能的蛋白质<sup>[4]</sup>。有研究指出,Smac 与 Survivin 与胃溃疡的发生、发展、愈合、良恶性病变和细胞癌变有重要的关系<sup>[5]</sup>,本次研究目的在于探究 Smac 与 Survivin 在胃溃疡患者中的表达情况,为今后的临床诊断提供辅助依据。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院收治的胃溃疡患者 80 例为研究对

象,其中无癌前病变胃溃疡 40 例为 N 组,癌前病变胃溃疡 40 例为 Y 组。胃癌癌前病变的判定标准:具有临床症状,符合慢性萎缩性胃炎诊断标准并在两周内经内镜及病理确诊具有中度以上胃黏膜上皮异型增生和(或)不完全型上皮化生者。所有患者均经首次胃镜检查检查和病理检查证实为胃溃疡且处于溃疡活动期,幽门螺杆菌检查提示为阳性,在纳入研究的前 4 周内并未使用过任何抗菌药物、质子泵抑制剂、铋制剂、激素类药物<sup>[6]</sup>。排除严重心肝肾功能损伤患者、溃疡性胃癌患者。N 组男 29 例,女 11 例;年龄 32~70 岁,平均(53.6±12.6)岁。Y 组男 30 例,女 10 例;年龄 28~73 岁,平均(55.2±11.3)岁。两组患者在性别、年龄比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。本次研究已通过内江市第一人民医院伦理委员会批准,并告知患者及家属签署知情同意书。

## 1.2 方法

1.2.1 治疗方法 两组患者给予抗幽门螺杆菌三联疗法治疗:扬子江药业集团有限公司生产的奥美拉唑肠溶胶囊(国药

准字 H20084388)40 mg, 每日 1 次, 西安康拜尔制药有限公司生产的阿莫西林胶囊(国药准字 H61022524)1.0 g, 每日 2 次, 浙江普洛康裕制药有限公司生产的克拉霉素胶囊(国药准字 H19980090)0.5 g, 每日 2 次, 持续用药 2 周; 之后 2 周停用阿莫西林与克拉霉素, 仅口服奥美拉唑 40 mg, 每日 1 次, 持续用药 4 周; 奥美拉唑餐前服用, 阿莫西林与克拉霉素餐后服用。停用 1 个月后再对患者行胃镜复查了解溃疡的愈合情况。

**1.2.2 检测方法** Smac mRNA 和 Survivin mRNA 的相对表达量采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR), 使用上海吉玛制药技术有限公司提供的 RNA 快速提取试剂盒对总 RNA 进行提取, 并采用琼脂凝胶电泳法对 RNA 的完整性进行检测, 计算相对表达量。Genbank 验证: (1) Smac 正义链: 5'-GGA CCA CCG CAT CTC TAC AT-3'; 反义链: 5'-GCA CTT TCT TCG CAG TTT CC-3'; (2) 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)正义链: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; 反义链: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG-3'; (3) Survivin 正义链: 5'-GGA CCA CCG CAT CTC TAC AT-3'; 反义链: 5'-GCA CTT TCT TCG CAG TTT CC-3'。RT-PCR 反应体系: 按 QIAGEN onestep RT PCR Kit 说明操作。Smac 和 Survivin 反应参数分别为: 95 °C 4.5 min, 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min 共 30 个循环, 72 延伸 10 min; 95 °C 4.5 min, 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

本次使用的兔抗人 Smac 抗体、Survivin 抗体、免疫组化(SP)试剂盒均为上海安研商贸有限公司生产提供。Smac 与 Survivin 表达采用 SP 法, 采用脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)技术检测凋亡指数。首先选择局部病变的溃疡组织作为标本, 并以 10% 的甲醛固定 24 h, 石蜡包埋处理, 将切片处理为 5 μm 的厚度, 置入甲苯中脱蜡, 使用分浓度乙醇进行多次水化和 PBS 洗涤。SP 法最后使用苏木精-伊红进行染色、脱水与封片; 而 TUNEL 技术最后使用 TUNEL 反应混合液荧光标记、脱水与封片。AB-PAS 染色液对切片进行脱蜡、稀盐酸冲洗、吸干、脱水、透明、封片处理。阴性对照则采用磷酸缓冲液进行处理, 阳性对照则采用阳性切片。

**1.3 SP 结果判定标准** Smac 与 Survivin 的判定方法如下: 在高倍镜下选择 10 个视野, 分别观察细胞核、细胞质, 若出现浅黄色至棕褐色均视为阳性表达, 其中阳性细胞占比在 10% 及以下得 0 分, 阳性细胞占比 11%~25% 得 1 分, 阳性细胞占比 26%~50% 得 2 分, 阳性细胞占比 51%~75% 得 3 分, 阳性细胞占比在 76% 及以上得 4 分。着色强度判断标准: 不着色得 0 分, 浅黄色得 1 分, 黄色得 2 分, 棕黄色得 3 分。将阳性细胞占比得分与着色强度得分相乘, 得 0 分为阴性(-), 得 1~4 分为弱阳性(+), 得 5~8 分为阳性(++), 得 9~12 分为强阳性(+++)[7]。

**1.4 统计学处理** 本次研究数据采用 SPSS19.0 统计学软件对数据进行分析处理, 其中计数资料以 n(%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; 计量资料采取方差检验及正态分布检验, 以  $\bar{x} \pm s$  表示; 其中计量资料的组间比较采用 *t* 检验。P<0.05 表示差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 不同溃疡组织中 Smac 的表达强度比较** Smac 在 N 组中(-)与(+)的表达占比 17.5%, 而 Y 组占比高达 52.5%; N 组中(++ )与(+++)的表达占比 82.5%, 而 Y 组占比为 47.5%, 说明不同胃溃疡组织中的 Smac 表达强度明显不同, 见表 1。

**表 1 不同溃疡组织中 Smac 的表达强度比较[n(%)]**

组别	n	-	+	++	+++
N 组	40	3(7.5)	4(10.0)	12(30.0)	21(52.5)
Y 组	40	8(20.0)	13(32.5)	13(32.5)	6(15.0)
$\chi^2$		5.95	15.59	0.20	32.01
P		0.01	<0.05	0.65	<0.05

**2.2 不同溃疡组织中 Survivin 的表达强度比较** Survivin 在 N 组中(-)与(+)的表达占比 85.0%, 而 Y 组占比高达 65.0%; N 组中(++ )与(+++)的表达占比 15.0%, 而 Y 组占比为 35.0%, 说明不同胃溃疡组织中的 Survivin 表达强度明显不同, 见表 2。

**表 2 不同溃疡组织中 Survivin 的表达强度比较[n(%)]**

组别	n	-	+	++	+++
N 组	40	23(57.5)	11(27.5)	4(10.0)	2(5.0)
Y 组	40	13(32.5)	13(32.5)	8(20.0)	6(15.0)
$\chi^2$		12.53	0.58	3.90	5.52
P		<0.05	0.44	0.04	0.02

**2.3 不同溃疡组织中 Smac 与 Survivin mRNA 相对表达量** Smac mRNA 在 N 组中的相对表达量显著高于 Y 组, 而 Survivin mRNA 在 N 组中的表达则显著低于 Y 组; 说明不同胃溃疡组织中的 Smac 与 Survivin mRNA 相对表达量不同(P<0.05); N 组经三联药物治疗后的细胞凋亡指数[(5.16±1.22)%], 相比治疗前[(18.23±3.62)%]显著降低, 差异有统计学意义(P<0.05)。见表 3。

**表 3 不同溃疡组织中 Smac 与 Survivin mRNA 相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	Smac mRNA	Survivin mRNA
N 组	40	1.19±0.15	1.73±0.74
Y 组	40	0.73±0.25	3.21±1.05
<i>t</i>		9.97	7.28
P		<0.05	<0.05

**3 讨 论**

细胞凋亡是人体组织中一项正常的生理代谢活动, 能保证人体组织的生长与细胞处于一个动态平衡, 一旦出现细胞凋亡则该动态平衡受到破坏, 导致多种疾病的发生[8]。机体内的促凋亡因子下降或抗凋亡因子上升时, 细胞的凋亡大幅度下降甚至不凋亡, 可能导致肿瘤发生, 所以有学者指出肿瘤的发生与凋亡因子和促凋亡因子的失衡有关系[9]。胃黏膜细胞的增殖与凋亡预示着胃黏膜局部出现溃疡。在对未发生癌前病变的患者进行三联治疗后, 再次对患者的细胞凋亡指数进行检测发现, 患者的细胞凋亡指数相比治疗前显著降低, 差异有统计学意义(P<0.05)。Smac 是一种新发现的促凋亡因子, 目前大量的研究已经证实 Smac 具有治疗肿瘤的作用。有关研究证实 Smac 能诱导蛋白的凋亡, 胞内定位一旦发生改变, 则 Smac 发挥作用, 有效提高细胞质内的 Smac 蛋白含量能为治疗肿瘤提供广泛的前景[10]。正常情况下, Smac 主要存在于细胞的线粒体中, 且在健康心、肝、脾、肾、肠、前列腺、胸腺中高表达。但细胞受到各类刺激发生凋亡后, Smac 则会从线粒体释放到胞

质内,与凋亡抑制蛋白(IAPs)结合,令胱门蛋白酶丧失活性后抑制细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。本研究发现,Smac 在未发生癌前病变的胃溃疡患者中,(-)与(+)表达(17.5%)明显低于发生癌前病变的胃溃疡患者(52.5%),Smac mRNA 在 Y 组中的相对表达量显著低于 N 组,这提示已经发生癌前病变的胃溃疡患者,其病变组织中的 Smac(++)和(+++)表达显著低于未癌前病变组患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与上述研究结论一致。

Survivin 属于 IAPs 中的一种,相关研究指出<sup>[12]</sup>,Survivin 在细胞周期的调控中对细胞的凋亡具有抑制作用,同时参与了肿瘤发生、发展与预后过程。另外,Survivin 在血管的形成中还具有一定作用<sup>[13]</sup>。Survivin 蛋白存在于人类常见的肿瘤中,由于其只能在肿瘤细胞中表达,所以健康的人体组织中几乎无法检出 Survivin 蛋白,这也让应用 Survivin 基因治疗和 Survivin 蛋白特异性抗体免疫治疗更具有靶向性、安全性与特异性,所以 Survivin 蛋白已经成为临床备受关注的抗肿瘤治疗新靶点<sup>[14]</sup>。本研究发现,Survivin 在未发生癌前病变的胃溃疡患者中(++)与(+++)表达仅为 15.0%,显著低于有癌前病变的胃溃疡患者(35.0%);另外,Survivin mRNA 在 Y 组中的表达则显著高于 N 组,与上述研究结论一致。Survivin 在人类多种肿瘤组织中表达,邢春瑶等<sup>[15]</sup>在对 42 例宫颈鳞癌患者的病变组织中检测出 Survivin 的表达率为 100.0%。在一项非小细胞肺癌的研究中发现,患者体内的 Survivin 表达率达 85.0%<sup>[16]</sup>,而其他相似的研究也指出<sup>[17]</sup>,Survivin 在乳腺癌中的阳性率约为 70.0%,膀胱癌中阳性率为 87.0%,黑色素瘤中阳性率为 93.0%,但在上述肿瘤组织周围的正常组织与细胞间质中并未发现 Survivin 的表达,这都说明 Survivin 在肿瘤组织中广泛表达,与肿瘤的发生、发展有密切联系。

综上所述,临床可将 Smac 的降低与 Survivin 的升高作为判定胃溃疡患者组织发生癌前病变的一种辅助诊断,结合患者的实际病情拟定治疗方案,能有效控制患者的细胞凋亡指数,提高患者的生存率。

参考文献

[1] 陈雷,尚培中. Xiap、Smac 与消化系肿瘤的研究进展[J]. 中国现代普通外科进展,2016,19(4):300-303.  
 [2] 杨颖,刘国敏,闫国华. 促凋亡因子与凋亡抑制蛋白在胃溃疡组织中的表达[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(7):759-761.  
 [3] 胡金甫,汪辉,李科珍. Survivin、Bcl-2、HPV16/18 在宫颈鳞癌中的表达及相关性研究[J]. 中国妇幼保健,2014,29

(5):781-784.  
 [4] 朱文嘉,李诗敏,王纾宜. Survivin 和增殖细胞核抗原(PCNA)在鼻腔鼻窦恶性黑色素瘤(SNM)中的表达及其临床意义[J]. 复旦学报:医学版,2014,41(5):596-601.  
 [5] 王志红,鲍德明,石振旺,等. 溃疡型胃癌和癌前病变中 PTEN、Survivin 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2015,24(10):1153-1156.  
 [6] 李艳东,雷海梅,周永莉,等. 胃腺癌中 survivin 和 EGFR 的作用及其相互关系[J]. 山西医科大学学报,2014,45(9):839-842.  
 [7] 赵东菊,石太新,王艳蕊,等. 儿童急性白血病促凋亡蛋白 Smac、HtrA2 表达的意义[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(3):207-210.  
 [8] 张小玲,田志逢,王萍,等. KLF5 和 Survivin 蛋白异常表达与胃癌预后的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(2):142-145.  
 [9] 许天祥,胡江,刘彦恒. Survivin 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 内蒙古医学杂志,2014,46(10):1153-1156.  
 [10] 郭霞霞,王郁杰,王瑞勤,等. 胃癌病变过程中 Kruppel 样因子 8 及生存蛋白的表达与幽门螺杆菌感染关系[J]. 中华医院感染学杂志,2015,29(7):1462-1464.  
 [11] 田忠成,邵飞飞,党雪菲,等. Survivin 在甲状腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学,2014,18(3):390-393.  
 [12] 韩国达,白希永,陆志良,等. 凋亡抑制蛋白 Survivin 在胃癌中的表达及与预后的关系[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(8):29-33.  
 [13] 殷舞,莫祥兰,韦海明,等. Survivin、Apaf-1 和 caspase-9 在胃癌腹膜转移中的表达及意义[J]. 广东医学,2014,35(2):221-223.  
 [14] 李冬斌,许香梅,张伟,等. 胃癌组织 Survivin、RHAMM 表达及意义[J]. 山东医药,2016,56(28):53-54.  
 [15] 邢春瑶,冷维春,周家文. Bcl-2 和 Survivin 在宫颈癌中的研究进展[J]. 中国实验诊断学,2014,18(1):167-169.  
 [16] 叶闻远,欧阳学农,余宗阳. 非小细胞肺癌 XIAP 和 Smac 的表达与临床病理特征及预后的关系[J]. 中国肿瘤临床,2014,9(7):444-448.  
 [17] 曲贝贝,左金华. 凋亡抑制基因 Survivin 的研究进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2014,9(15):2842-2846.

(收稿日期:2017-05-06 修回日期:2017-07-05)

(上接第 2405 页)

参考文献

[1] 柯培锋,刘冬冬,徐建华,等. 全自动生化分析仪携带污染的发现及其解决方案[J]. 广东医学,2014,35(11):1728-1730.  
 [2] 李叶静. 观察生化试剂对循环酶法测定血清总胆汁酸的干扰因素分析以及改进措施[J]. 检验医学与临床,2016,13(16):2330-2332.  
 [3] Szabo Z, Klein A, Jakab C. Hematologic and plasma biochemistry reference intervals of healthy adult barn owls (Tyto alba)[J]. Avian Dis, 2014, 58(2):228-231.

[4] 顾光煜,张葵. 临床化学自动分析的携带污染与解除[J]. 临床检验杂志,2007,25(6):401-403.  
 [5] 李俊立,杨叶子,王昌富,等. BECAMAN DXC800 生化分析仪携带污染的纠正措施[J]. 临床输血与检验,2012,14(4):311-313.  
 [6] 赵利,陈红娟. 试剂交叉污染对生化分析仪测定总胆汁酸的影响[J]. 包头医学院学报,2016,32(5):155-156.  
 [7] 李海聪,方欢英,陈智瑾,等. 脂类物质对血清总胆汁酸检测的干扰和携带污染分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(11):1407-1409.

(收稿日期:2017-05-05 修回日期:2017-07-04)