

论著·基础研究

子宫内膜异位症患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 的表达与细胞凋亡的相关性*

尚 丽¹, 杜二球^{1△}, 李咏梅¹, 纪道华², 李 斌³

(1. 湖北省十堰市人民医院/湖北医药学院附属人民医院产科, 湖北十堰 442000; 2. 湖北省十堰市郧阳区胡家营镇卫生院, 湖北十堰 442539; 3. 湖北医药学院, 湖北十堰 442000)

摘 要:目的 探讨子宫内膜异位症(EMS)患者子宫上皮存活素(Survivin)和增殖指数(Ki)67 的表达与细胞凋亡的相关性。**方法** 选择 2013 年 9 月至 2017 年 2 月在湖北省十堰市人民医院收治的进行妇科手术且术后病理检查证实的 EMS 患者 60 例作为观察组, 同期选择 60 例子子宫肌瘤行手术治疗(排除 EMS)得到正常子宫内膜的患者作为对照组, 采用免疫组织化学方法检测两组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 表达情况, 判定凋亡细胞数量与凋亡指数。**结果** 观察组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率[分别为 83.3%(50/60)和 96.7%(58/60)]均显著高于对照组[分别为 56.7%(34/60)和 40.0%(24/60)], 差异均有统计学意义($P<0.05$)。观察组患者增生期与分泌期的凋亡指数[分别为(11.42±2.91)%和(40.29±1.49)%]均显著低于对照组[分别为(31.45±2.41)%和(112.34±3.10)%], 差异均有统计学意义($P<0.05$)。观察组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率与增生期、分泌期凋亡指数均呈显著负相关性($r=-0.354, -0.452, -0.482, -0.413; P=0.018, 0.005, 0.003, 0.009$); Survivin 阳性率与 Ki67 阳性率呈显著正相关性($r=0.672, P=0.000$)。**结论** EMS 患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 的表达呈上调的趋势, 且增生期与分泌期的细胞凋亡指数明显降低, Survivin 和 Ki67 表达上调是导致细胞凋亡指数下降的机制之一。

关键词:子宫内膜异位症; Ki-67 抗原; 细胞凋亡; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.007

中图法分类号:R711.71;R446.61

文章编号:1673-4130(2019)01-0025-04

文献标识码:A

Correlation between the expression of Survivin and Ki67 in uterus epithelium and apoptosis in patients with endometriosis*

SHANG li¹, DU Erqiu^{1△}, LI Yongmei¹, JI Daohua², LI Bin³

(1. Renmin Hospital, Hubei University of Medical, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Hujiaying Township Hospital, Yuyang District, Shiyan, Hubei 442539, China; 3. Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the expression of Survivin and Ki67 in uterus epithelium and apoptosis in patients with endometriosis (EMS). **Methods** From September 2013 to February 2017, 60 EMS patients for gynecological surgery and postoperative pathology confirmed in our hospital were selected as the observation group, and the other 60 patients of uterine fibroids (excluded EMS) were selected for surgical treatment were selected as the control group, used the immunohistochemical method to detect uterus epithelium Survivin and Ki67 expression, and were to determine the number of apoptotic cells and apoptotic index. **Results** The positive rates of Survivin and Ki67 in the uterus epithelium were 83.3% and 96.7% in the observation group, so that were 56.7% and 40.0% in the control group respectively, and the observation group were higher than in the control group ($P<0.05$). The apoptotic index in the proliferative phase and secretory phase in the observation group were (11.42±2.91)% and (40.29±1.49)%, respectively, the control group were (31.45±2.41)% and (112.34±3.10)%, respectively, and the observation group were lower than that of the control group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the positive rates of Survivin and Ki67 in the uterus epithelium in observation group were showed obvious negative correlation to the proliferative phase and secretory phase apoptosis index ($P<0.05$); the positive rate of Survivin was showed positive

* 基金项目:湖北省教育厅科研项目(B20122416)。

作者简介:尚丽,女,主治医师,主要从事妇科肿瘤及各种分娩系统诊治方面的研究。△ 通信作者, E-mail: duerqiu88@163.com。

本文引用格式:尚丽,杜二球,李咏梅,等. 子宫内膜异位症患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 的表达与细胞凋亡的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(1): 25-28.

correlation to the Ki67 positive rate($r=0.672, P=0.000$). **Conclusion** EMS patients with uterine epithelial Survivin and Ki67 are showed increased expression, and the proliferative phase and the secretory phase of the cell apoptosis index are significantly decreased, the expression of Ki67 and Survivin may be the mechanisms that lead to cell apoptosis index decreased.

Key words: endometriosis; Ki67 antigen; apoptosis; immunohistochemistry

子宫内膜异位症(EMS)是一种具有侵袭、种植和复发等生物学行为的妇科常见病,育龄妇女发病率达 14.0%,可引起痛经、不孕等,严重影响患者身心健康^[1-2]。EMS 发病机制尚未明确,目前,在 EMS 中关于增殖指数(Ki)67 和存活素(Survivin)的研究已有相关文献报道^[3]。Survivin 和 Ki67 可调控肿瘤相关的众多信号级联反应,并调节与肿瘤转移、生长及浸润相关的信号通路,并在促进肿瘤血管生成中也具有重要作用^[4-5]。正常子宫内膜的增生和脱落具有周期性,是通过细胞的增殖和凋亡完成的,在分泌晚期及月经期细胞发生凋亡。在宫腔外,异位内膜细胞也能被种植及存活,与其凋亡特性发生变化有关^[6-8]。Survivin 是细胞凋亡抑制蛋白(IAP)家族新成员,也是当前作用最强的 IAP^[9-10]。本研究探讨了 EMS 患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 的表达与细胞凋亡的相关性,希望为早期预防 EMS 提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 9 月至 2017 年 2 月在十堰市人民医院收治的进行妇科手术且术后病理检查证实的 EMS 患者 60 例作为观察组,均符合 EMS 的诊断标准,年龄 36~78 岁,平均(54.22±4.19)岁;平均体质质量指数(22.76±5.22)kg/m²;I 期 19 例,II 期 21 例,III 期 14 例,IV 期 6 例。同期选择 60 例子宫肌瘤行手术治疗(排除 EMS)得到正常子宫内膜的患者作为对照组,年龄 31~79 岁,平均(54.31±3.82)岁;平均体质质量指数(22.11±4.82)kg/m²。两组患者年龄、体质质量指数等资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。两组患者术前 3 个月内均未接受激素治疗,均无内科合并疾病,均在同 1 个月经周期手术。本研究得到了两组患者的知情同意与十堰市人民医院伦理委员会的批准。

1.2 Survivin 和 Ki67 的免疫组织化学检测 将两组患者子宫上皮组织使用 4%甲醛固定标本,进行石蜡包埋,以厚度 4 μm 进行切片。对 S-P 法免疫组织实施化学染色,根据试剂盒说明书操作,采用二氨基联苯胺显色,以苏木素复染,采用磷酸盐缓冲液作为阴性对照。Ki67 和 Survivin 阳性产物位于细胞核,颜色为棕黄色,细颗粒状。利用显微镜观察 5 个高倍镜视野,记录阳性染色细胞百分比,按染色范围即强度计分:<5%计 0 分,5%~<20%计 1 分,20%~<50%计 2 分,≥50%计 3 分;无色计 0 分,淡黄计 1 分,棕黄计 2 分,棕褐计 3 分;累积 0~1 分为阴性,≥2 分为阳性。

1.3 凋亡细胞判定 在显微镜下,分泌期及增生期的细胞核存在的棕褐色或棕黄色颗粒就是凋亡细胞,选取 5 个高倍视野,统计其中的子宫内膜细胞、凋亡细胞及间质细胞,凋亡指数=凋亡细胞数/(子宫内膜细胞数+间质细胞数)×100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料以率(%)表示,组间比较采用 t 检验、 χ^2 检验;采用直线相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率比较 观察组患者子宫上皮的 Survivin 和 Ki67 阳性率均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率比较[n(%)]

组织	<i>n</i>	Survivin 阳性	Ki67 阳性
观察组	60	50(83.3)	58(96.7)
对照组	60	34(56.7)	24(40.0)
χ^2		4.092	8.902
<i>P</i>		0.013	0.000

2.2 两组患者增生期和分泌期凋亡指数比较 观察组患者增生期和分泌期凋亡指数均显著低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者增生期和分泌期凋亡指数比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组织	<i>n</i>	增生期	分泌期
观察组	60	11.42±2.91	40.29±1.49
对照组	60	31.45±2.41	112.34±3.10
<i>t</i>		8.734	7.883
<i>P</i>		0.000	0.000

表 3 观察组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率与细胞凋亡的相关性($n=60$)

指标	增生期凋亡指数	分泌期凋亡指数
Survivin 阳性率		
<i>r</i>	-0.354	-0.452
<i>P</i>	0.018	0.005
Ki67 阳性率		
<i>r</i>	-0.482	-0.413
<i>P</i>	0.003	0.009

2.3 观察组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率与细胞凋亡的相关性 观察组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率与增生期、分泌期凋亡指数均呈显著负相关 (r 分别为 -0.354 、 -0.452 、 -0.482 、 -0.413 ; P 分别为 0.018 、 0.005 、 0.003 、 0.009)。见表 3。Survivin 阳性率与 Ki67 阳性率呈显著正相关 ($r=0.672$, $P=0.000$)。

3 讨 论

EMS 是临床常见疾病,指的是存在于子宫内外的活性子宫内膜组织,也是育龄妇女经常发生的一种良性病变,发病率为 14.0% 。EMS 能引起慢性盆腔痛、不孕等,对患者的生活质量产生严重影响^[11]。EMS 具有组织侵袭、复发、局部播散、远处转移等恶性行为,但其具体的发病机制尚不太明确。

Survivin 是迄今为止克隆出的最小的 IAP,为一个由 142 个氨基酸组成的胞浆蛋白。Survivin 半衰期仅 30 min,过于依赖细胞周期,通常是在细胞周期 G_2/M 期中表达^[12]。有研究表明,Survivin 在正常和增生期子宫内膜均有表达,且增生的子宫内膜表达明显升高,同时,在正常月经周期中,随着内膜从增生到分泌,Survivin 表达量也不断增加^[13-14]。有研究表明,在 EMS 子宫内膜组织中,Survivin 存在着过度表达,使异位内膜细胞可躲避外界多种刺激引起的细胞凋亡,从而诱发 EMS 的发生、发展^[15]。

Ki67 作为增殖细胞的标记物,其应用范围极为广阔,在 G_0 期与 G_1 早期无表达,于 G_1 中、晚期表达,在 S 、 G_2 期表达逐渐增加,到 M 期达峰值。Ki67 在静止的细胞中很少表达,只表达于增生细胞^[16]。有研究表明,在 EMS 阶段,异位内膜上皮细胞出现明显异型性,缺乏间质侵犯,核浆比例增大,病灶可见乳头状结构;Ki67 表达不但阳性率提升到 100% ,且表达强度也显著增强^[17]。

本研究结果显示,观察组患者子宫上皮 Ki67 和 Survivin 阳性率均显著高于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。从机制方面分析,在 EMS 患者中,子宫上皮组织氧浓度降低使活性氮细胞水平也随之降低,进而使 Fas 基因激活,促使 Survivin 进入细胞,与细胞中 CDK4 结合,激活 CDK2/CyclinE 及 Rb 磷酸化,使 G_1/S 期进程缩短,对 DNA 复性具有促进作用;与正常内膜组织比较,在位于异位内膜组织中异常增生细胞具有更强的生长能力,破坏了正常细胞的凋亡与增殖之间的平衡,对 Survivin 基因加以诱导,使其在子宫异位内膜中呈高表达。异位内膜细胞中的 C-myc 基因与 bcl-2 的高表达,使异位内膜细胞继续存活、种植,诱导子宫异位内膜组织中 Survivin 的表达,促进细胞增殖^[18]。因 Ki67 只在增殖细胞中的细胞核表达,所以,也常被当做判定癌症患者预后的

重要指标,Ki67 的表达强度与细胞增殖活性明显相关,也与 EMS 的恶性进展有关^[19]。

凋亡是由基因调控的主动而有序的细胞死亡,是由体内、外因素触发细胞内原定的死亡程序。正常子宫内膜的增生与脱落呈周期性,是通过细胞的增殖和凋亡完成的,在分泌晚期及月经期细胞发生凋亡^[20]。正常子宫内膜的细胞凋亡指数也具有周期性,经期与分泌晚期的凋亡指数比分泌早期及增殖期高得多,有利于内膜修复和功能恢复。有研究表明,凋亡通过对细胞增生及死亡的平衡进行调控,从而在子宫内膜生理功能方面发挥重要作用,且导致 EMS 发生的一个重要因素可能是内膜组织对细胞发生的凋亡不敏感。且 EMS 患者子宫上皮还存在着众多巨噬细胞,在促进异位内膜组织增生方面具有重要意义^[21]。

本研究结果显示,观察组患者增生期与分泌期凋亡指数均显著低于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。表明在子宫内膜中,细胞凋亡是影响周期性结构及生理功能的重要因素,因 EMS 患者子宫内膜对细胞凋亡的敏感性明显下降,故导致凋亡指数降低。

本研究 Pearson 直线相关分析结果显示,观察组患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 阳性率与增生期、分泌期凋亡指数均呈显著负相关 (r 分别为 -0.354 、 -0.452 、 -0.482 、 -0.413 ; P 分别为 0.018 、 0.005 、 0.003 、 0.009)。Survivin 阳性率与 Ki67 阳性率呈显著正相关 ($r=0.672$, $P=0.000$)。对细胞凋亡进行抑制的过程中,Ki67 和 Survivin 阻断线粒体细胞色素 C 的释放,直接抑制含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 7 (Caspase-7),从而抑制细胞凋亡,利用有丝分裂对转化细胞异常增殖具有促进作用^[22]。作为凋亡抑制因子,Survivin 蛋白在 EMS 患者子宫上皮高表达抑制细胞凋亡可能是其逆流入腹腔的子宫内膜能种植与存活的机制之一^[8]。

4 结 论

EMS 患者子宫上皮 Survivin 和 Ki67 的表达呈上调的趋势,且增生期与分泌期细胞凋亡指数明显降低,Survivin 和 Ki67 表达上调是导致细胞凋亡指数下降的机制之一。

参考文献

- [1] WANG Y, MANG M, WANG Y, et al. Tubal origin of ovarian endometriosis and clear cell and endometrioid carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(3): 869-879.
- [2] SANCHEZ A M, QUATTRONE F, PANNESSE M, et al. The cannabinoid receptor CB1 contributes to the development of ectopic lesions in a mouse model of endometriosis[J]. Hum Reprod, 2017, 32(1): 175-184.
- [3] ZHANG Z, CHENG X, GUI T, et al. Wenshen xiaozheng

tang induces apoptosis and inhibits migration of ectopic endometriotic stromal cells[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194(3):386-394.

[4] 李书艳,冯卫群. Survivin、PCNA 在子宫内膜异位症组织中的表达及其意义[J]. 河北医科大学学报, 2013, 34(1): 18-20.

[5] WANG Y, JIANG L L, WU J F, et al. Protective effect of honokiol against endometriosis in rats via attenuating Survivin and Bcl-2: a mechanistic study [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016, 62(1):1-5.

[6] ACIMOVIC M, VIDAKOVIC S, MILIC N, et al. Survivin and VEGF as novel biomarkers in diagnosis of endometriosis[J]. J Med Biochem, 2016, 35(1):63-68.

[7] 张晓玲,邱琳,于晓红,等. 卵巢子宫内膜异位症患者异位和在位内膜中 Survivin 的表达及意义[J]. 中国生育健康杂志, 2012, 23(1):24-27.

[8] TAGUCHI A, KOGA K, KAWANA K, et al. Resveratrol enhances apoptosis in endometriotic stromal cells[J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 75(4):486-492.

[9] UEGAKI T, TANIGUCHI F, NAKAMURA K, et al. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) may be effective therapeutic targets for treating endometriosis [J]. Hum Reprod, 2015, 30(1):149-158.

[10] 肖雪莲,韦枝红. 子宫内膜异位症相关性卵巢癌组织中 P53 和 survivin 蛋白表达水平分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(3):268-269.

[11] HU C, WANG Z, PANG Z, et al. Guizhi fuling capsule, an ancient Chinese formula, attenuates endometriosis in rats via induction of apoptosis [J]. Climacteric, 2014, 17(4): 410-416.

[12] 彭冬先,何援利,丘立文. 靶向 shRNA 抑制 survivin 基因对子宫内膜异位症裸鼠模型异位内膜 caspase-3 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(2):210-212.

[13] WANG Y, CHEN H, FU Y, et al. MiR-195 inhibits proliferation and growth and induces apoptosis of endometrial stromal cells by targeting FKN [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12):2824-2834.

[14] LI M Q, SHAO J, MENG Y H, et al. NME1 suppression promotes growth, adhesion and implantation of endometrial stromal cells via Akt and MAPK/Erk1/2 signal pathways in the endometriotic milieu [J]. Hum Reprod, 2013, 28(10):2822-2831.

[15] 林善群,高淑平,卢运萍,等. p53 和 survivin 蛋白水平在子宫内膜异位症相关性卵巢癌组织中的表达意义研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(14):1373-1376.

[16] MEI J, LI M Q, DING D, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) enhances survival and invasiveness of endometrial stromal cells via the activation of JNK signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(3):431-444.

[17] SU Y, JIANG Y, SUN S, et al. Effects of HER2 genetic polymorphisms on its protein expression in breast cancer [J]. Cancer Epidemiol, 2015, 39(6):1123-1127.

[18] CUI Y, NIU M, ZHANG X, et al. High expression of valosin-containing protein predicts poor prognosis in patients with breast carcinoma [J]. Tumour Biol, 2015, 36(12): 9919-9927.

[19] 彭冬先,何援利. 慢病毒介导靶向 survivin 基因的 shRNA 抑制子宫内膜在裸鼠腹腔种植生长[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(2):281-283.

[20] 蒋苹,许红,王中弥,等. PTEN、Survivin 蛋白在子宫内膜异位症相关的卵巢癌组织中表达的相关性及临床意义 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(15):3-6.

[21] LIU H Z, HAN X X, LIU J, et al. Effect of taoren Quyu decoction on human endometrial cells and its anti-endometriosis activity in rats [J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(7):696-700.

[22] LU Z, WANG J, ZHENG T, et al. FTY720 inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma by inactivating STAT3 signaling [J]. BMC Cancer, 2014, 14(6):783.

(收稿日期:2018-07-30 修回日期:2018-10-06)

(上接第 24 页)

clinical samples; methods, effectiveness and cost considerations[J]. Ger Med Sci, 2009, 7:Doc06.

[15] SUN Z, CHEN Z, HOU X, et al. Locked nucleic acid pentamers as universal PCR primers for genomic DNA amplification[J]. PLoS One, 2008, 3(11):e3701.

[16] BOTKIN D J, GALLI L, SANKARAPANI V, et al. Development of a multiplex PCR assay for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli, enterohemorrhagic E. coli, and enteropathogenic E. coli strains [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2(1):8.

[17] DUTTA S, GUIN S, GHOSH S, et al. Trends in the prevalence of diarrheagenic escherichia coli among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India [J]. PLoS One, 2013, 8(2):e56068.

[18] HAEGGMAN S, LÖFDAHL S, PAAUW A, et al. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in Klebsiella pneumoniae [J]. Anti Agent Chem, 2004, 48(7):2400-2408.

[19] 沈恺妮,蔡倩倩,焦洋,等. 抽取血培养的最佳时机[J]. 协和医学杂志, 2015, 6(1):61-65.

(收稿日期:2018-07-28 修回日期:2018-10-04)