

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.02.007
文章编号: 1005-8982 (2019) 02-0033-05

黑色素瘤中细胞凋亡抑制蛋白 Survivin 和 MEF2D 的表达及意义

王萍, 陆捷洁

(海南省皮肤病医院 皮肤科, 海南 海口 570206)

摘要: **目的** 探究凋亡抑制蛋白 Survivin 和 MEF2D 在黑色素瘤中的表达及其相关性。**方法** 临床收集 21 例黑色素瘤组织和 10 例皮内痣组织。使用免疫组织化学和 Western blotting 检测不同组织中的 Survivin 和 MEF2D 蛋白表达水平, 并探讨 Survivin 和 MEF2D 表达的相关性。**结果** Survivin 和 MEF2D 在黑色素瘤组织中阳性表达率高于皮内痣组织 ($P < 0.05$); Survivin、MEF2D 与病理分级有相关性 ($P < 0.05$); Western blotting 检测发现 Survivin 和 MEF2D 在黑色素瘤组织中的表达高于皮内痣组织 ($P < 0.05$); Survivin 与 MEF2D 蛋白呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** Survivin 和 MEF2D 在黑色素瘤组织中高表达, 且与病理分级有相关性, MEF2D 可能通过调节 Survivin 表达调控黑色素瘤凋亡, 是黑色素瘤发生、发展的重要机制。

关键词: 黑色素瘤; Survivin/ 蛋白; MEF2D/ 蛋白

中图分类号: R739.5

文献标识码: A

Expressions of apoptosis inhibitor proteins Survivin and MEF2D in melanoma and significance

Ping Wang, Jie-jie Lu

(Department of Dermatology, Hainan Skin Disease Hospital, Haikou, Hainan 570206, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of anti-apoptosis proteins Survivin and MEF2D in melanoma and their correlation. **Methods** The expressions of Survivin and MEF2D were detected in 21 cases of melanoma tissues and 10 cases of intradermal nevus tissues by immunohistochemistry and Western blot. Then the correlation between Survivin and MEF2D expressions was explored. **Results** The positive rates of Survivin and MEF2D in the melanoma tissues were significantly higher than those in the intradermal nevus tissues ($P < 0.05$). The expressions of Survivin and MEF2D were associated with pathological stage ($P < 0.05$). The expressions of Survivin and MEF2D in melanoma were higher those in the intradermal nevus tissues ($P < 0.05$). Survivin was positively correlated with the expression of MEF2D ($P < 0.05$). **Conclusions** Survivin and MEF2D are highly expressed in melanoma, and correlated with pathological stage. MEF2D might regulate the expression of Survivin to control the apoptosis of melanoma, and it plays a significant role in the development of melanoma.

Keywords: melanoma; Survivin; MEF2D

恶性黑色素瘤 (malignant melanoma, MM) 来源于黑色素细胞, 具有侵袭力强、转移性高和预后极差等特点^[1]。细胞凋亡异常在黑色素瘤发病过程起

重要作用, Survivin 是人类凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAPs) 家族的成员, 是目前肿瘤研究领域的热点之一^[2]。肌细胞增强因子 2D (myocyte

enhancer factor 2D, MEF2D) 在肝癌、骨肉瘤及肺癌等疾病中发挥重要抗凋亡作用^[3-5]。本研究采用免疫组织化学和 Western blotting 检测黑色素瘤患者和皮内痣患者组织中 Survivin 和 MEF2D 的表达水平及其相关性, 探讨 Survivin 和 MEF2D 在黑色素瘤发病中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收取海南省皮肤病医院皮肤科于 2013 年 6 月—2017 年 6 月收集的 21 例黑色素瘤和 10 例皮内痣组织, 均通过组织病理学确诊。标本使用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 使用石蜡包埋技术制作石蜡包块。黑色素瘤患者中男性 12 例, 女性 9 例; 年龄 20 ~ 86 岁, 平均 52.8 岁。根据病理 (Clark 标准) 分级: I 级 5 例, II 级 4 例, III 级 6 例, IV、V 级 6 例。皮内痣患者中男性 4 例, 女性 6 例; 年龄 15 ~ 56 岁, 平均 41.7 岁。

1.2 主要试剂

兔抗人 Survivin 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 兔抗人 MEF2D 单克隆抗体 (美国 CST 公司), 免疫组织化学 SP 染色试剂盒 DAB 显色剂 (北京中杉金桥生物有限公司)。

1.3 免疫组织化学染色

石蜡包块连续切 5 张, 厚 4 ~ 5 μm , 1 张进行 HE 染色复查诊断。采用 SP 法进行组织染色, 实验操作按照试剂盒说明书进行: 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 4 h, 二甲苯脱蜡、浓度梯度乙醇水化及蒸馏水洗涤, 高压修复抗原 5 min, 0.3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶 30 min, 滴加一抗 (浓度参考说明书) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 10 min/次, 滴加二抗常温孵育 1 h, DAB 显色, 苏木精复染后使用盐酸分化和氨水返蓝, 乙醇浓度梯度脱水, 二甲苯透明和中性树胶封片, 使用显微镜观察拍片。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 判定标准

随机选取高倍镜下 4 个视野, 按染色强度进行打分, 染色强度与背景着色相对比: 0 分为无色, 1 分为浅黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色。统计 300 个肿瘤细胞中 Survivin 或 MEF2D 阳性表达细胞数, 依据阳性细胞所占比例判断 Survivin 或 MEF2D 表达水平: 0 分为阴性, 1 分为 $\leq 10\%$, 2 分为 $>10\% \sim 50\%$, 3 分为 $>50\% \sim 75\%$, 4 分为 $>75\%$ 。染色强度与阳性细

胞百分比的乘积 ≥ 2 分为免疫染色阳性。

1.5 Western blotting 检测

黑色素瘤和皮内痣组织切成小块置入研磨器, 加入 400 μl 蛋白裂解液后研磨, 转移研磨液至 1.5 ml 离心管, 使用震荡器震荡 30 s, 置于冰上 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min 离心 15 min。留取 5 μl 蛋白上清液定量, 其余加入 6 \times Loading buffer (体积比 1 : 5), 沸水煮沸 5 min 变性。取 30 μg 蛋白上样, SDS-PAGE 胶进行电泳分离, 110 V 电压转膜 2 h。5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 将膜置于特定一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上孵育过夜。使用 TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 置于相应的二抗常温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 后用 ECL 显影液进行显影, 目的蛋白表达量通过与内参蛋白 β -actin 标准化后得到相对比值。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计学软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验, 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 Fisher 确切概率法, 相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

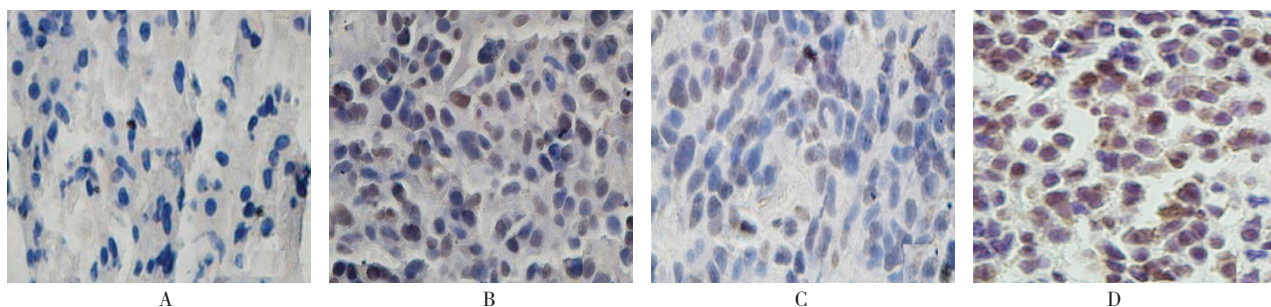
2.1 两组 Survivin、MEF2D 蛋白阳性率比较

免疫组织化学结果显示, Survivin 蛋白染色阳性呈棕黄色颗粒, 主要定位于细胞浆, 少数细胞核中亦可见染色。黑色素瘤组织中有 15 例阳性表达, 阳性率为 71.4% (15/21), 皮内痣中有 0 例阳性表达, 阳性率为 0.0% (0/10), 经 Fisher 确切概率法, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。见图 1A、B。

MEF2D 蛋白阳性棕黄色颗粒主要定位于细胞核, 少数胞浆中亦可见表达。黑色素瘤组织中阳性率为 76.2% (16/21), 皮内痣组织中阳性率为 20.0% (2/10)。经 Fisher 确切概率法, 差异有统计学意义 ($P=0.006$)。见图 1C、D。

2.2 Survivin、MEF2D 蛋白表达与临床特征的关系

Survivin 和 MEF2D 蛋白在黑色素瘤组织中呈高表达, 分析其与临床病理特征的关系发现, 随着病理分级增加, Survivin 和 MEF2D 蛋白阳性率逐渐升高 ($P < 0.05$)。I、II 级肿瘤组织免疫组织化学结果显示, Survivin 阳性率为 33.3% (3/9), III、V 级阳性率



A: Survivin 在皮内痣组织中表达; B: Survivin 在黑色素瘤组织中表达; C: MEF2D 在皮内痣组织中表达; D: MEF2D 在黑色素瘤组织中表达

图 1 Survivin 和 MEF2D 蛋白在皮内痣组织和黑色素瘤组织中的表达 (免疫组织化学 × 400)

为 83.3% (10/12), 经 Fisher 确切概率法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MEF2D 阳性表达率在 I、II 级肿瘤组织中为 44.4% (4/9), III、V 级肿瘤组织中为

91.7% (11/12), 经 Fisher 确切概率法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Survivin 和 MEF2D 蛋白表达与年龄、性别无关 ($P > 0.05$)。见附表。

附表 临床特征与 Survivin、MEF2D 蛋白表达的关系 例

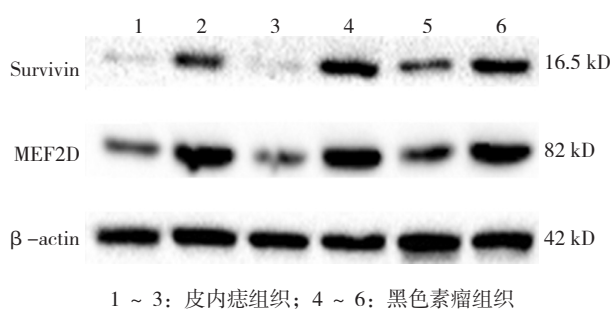
临床特征	n	Survivin 蛋白		P 值	MEF2D 蛋白		P 值
		阳性	阴性		阳性	阴性	
年龄							
<50 岁	11	9	2	0.361	7	4	0.670
≥ 50 岁	10	6	4		5	5	
性别							
男	12	10	2	0.331	9	3	1.000
女	9	5	4		6	3	
病理分级							
I、II 级	9	3	6	0.032	4	5	0.046
III、V 级	12	10	2		11	1	

2.3 黑色素瘤组织中 Survivin 和 MEF2D 蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示, 皮内痣组织未检测到 Survivin 蛋白表达或表达极弱, 而黑色素瘤组织中 Survivin 不同程度表达; 皮内痣组织 MEF2D 蛋白表达极弱, 而黑色素瘤组织中 MEF2D 蛋白呈不同程度高表达。

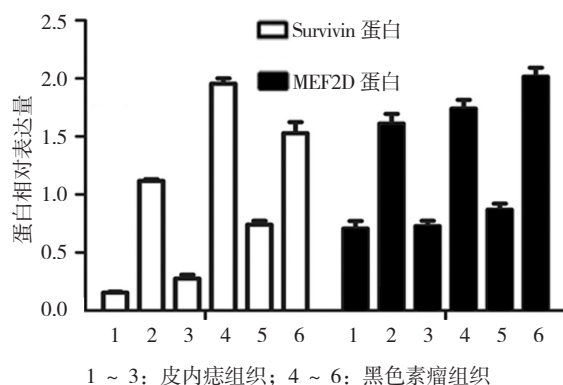
使用 Image-J 软件分析 Survivin 和 MEF2D 蛋白相对内参表达量灰度值。图 2 中 1 的 Survivin 相对表达量为 (0.155 ± 0.009), 2 为 (1.117 ± 0.016), 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 90.770, P = 0.000$); 3 的 Survivin 相对表达量为 (0.277 ± 0.032), 4 为 (1.955 ±

0.045), 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 52.630, P = 0.000$); 5 的 Survivin 相对表达量为 (0.741 ± 0.042), 6 为 (1.528 ± 0.096), 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 13.470, P = 0.000$)。1 的 MEF2D 相对表达量为 (0.707 ± 0.064), 2 为 (1.612 ± 0.083), 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 14.960, P = 0.000$); 3 的 MEF2D 相对表达量为 (0.728 ± 0.047), 4 为 (1.740 ± 0.076), 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 19.620, P = 0.000$); 5 的 MEF2D 相对表达量为 (0.869 ± 0.053), 6 为 (2.015 ± 0.077), 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 21.230, P = 0.000$)。见图 2、3。



1 ~ 3: 皮内痣组织; 4 ~ 6: 黑色素瘤组织

图 2 Survivin、MEF2D 蛋白在黑色素瘤和皮内痣组织的表达



1 ~ 3: 皮内痣组织; 4 ~ 6: 黑色素瘤组织

图 3 Survivin、MEF2D 蛋白在黑色素瘤和皮内痣组织中的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 黑色素瘤患者 Survivin 与 MEF2D 蛋白表达的相关性

21 例黑色素瘤患者中 Survivin 和 MEF2D 表达均阳性者 12 例, 均阴性者 4 例; Survivin 表达阳性, MEF2D 表达阴性者 3 例; Survivin 表达阴性, MEF2D 表达阳性者 2 例。Survivin 与 MEF2D 蛋白表达水平呈正相关 ($r=0.447, P=0.042$)。

3 讨论

近年来, 中国每年新增黑色素瘤患者 2 万余例, 发病率呈逐年上升趋势^[6]。晚期黑色素瘤患者由于手术疗效不佳, 且对放化疗不敏感, 导致其 5 年生存率偏低。既往研究发现, 放化疗主要是通过诱导黑色素瘤细胞凋亡起到杀伤作用, 治疗不敏感的原因是肿瘤细胞产生凋亡抵抗, 因此发现黑色素瘤细胞凋亡相关基因对其靶向治疗可能会起到关键作用。

Survivin 是凋亡抑制蛋白 IAPs 家族中抗凋亡能力最强的蛋白之一, 目前广泛高表达于各种肿瘤, 如肺癌、口腔癌和肝癌等^[7-9]。Survivin 在肿瘤中呈高表达且可以抑制肿瘤细胞的凋亡, 从而促进肿瘤的发生、增殖及对化疗的耐药性。Survivin 被认为是多种肿瘤的新型标志物, 用来协助肿瘤早期诊断、评估患者进

展及预后。CARPI 等^[10]发现, 通过寡脱氧核苷酸分子信标靶向 Survivin mRNA 达到抗肿瘤作用。本研究发现, Survivin 在黑色素瘤组织中阳性率为 71.4%, 而在皮内痣组织中未见表达。同时, 在 I、II 期黑色素瘤中 Survivin 阳性表达率为 33.3%, 而在 III、IV 期黑色素瘤中阳性表达率为 83.3%, 提示随着病理分期增加 Survivin 阳性率有所升高。此外, 通过 Western blotting 检测发现黑色素瘤组织中 Survivin 蛋白表达高于皮内痣组织。

MEF2 是转录因子 MADS-box 调节家族中的一员, MEF2 家族包括 MEF2A、MEF2B、MEF2C 和 MEF2D^[11]。既往研究发现, MEF2D 能增加肝细胞癌增殖能力, 在肝癌的发生、发展中具有重要意义^[12]。此外, MEF2D 在肺癌和神经元细胞中发挥抗凋亡作用^[5]。MEF2D 除了在实体肿瘤中发挥抗凋亡作用, 与白血病的发生也存在明显联系^[13]。本研究发现, MEF2D 在黑色素瘤组织中阳性率为 76.2%, 而在皮内痣组织中阳性率为 20.0%。同时, 在 I、II 期黑色素瘤中 MEF2D 阳性率为 44.4%, 而在 III、IV 期黑色素瘤中阳性率为 91.7%, 提示随着病理分级增加 MEF2D 阳性表达率升高。Western blotting 检测发现黑色素瘤组织中 MEF2D 蛋白表达高于皮内痣组织。本研究中发现, MEF2D 与 Survivin 蛋白表达呈正相关, 提示 MEF2D 与 Survivin 可能存在调控关系, 但具体调节过程及机制仍需进一步探究。

近年来, 分子靶向治疗在很多肿瘤中取得突破性进展。本研究证实, 黑色素瘤组织中 MEF2D、Survivin 异常高表达, 且与病理分级存在密切联系, 以两者作为靶点对黑色素瘤进行综合治疗将会取得更好的疗效, 为黑色素瘤治疗提供新思路。

参 考 文 献:

- [1] SCHADENDORF D, FISHER D E, GARBE C, et al. Melanoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1(12): DOI: 10.1038/nrdp.2015.3.
- [2] GARG H, SURI P, GUPTA J C, et al. Survivin: a unique target for tumor therapy[J]. Cancer Cell Int, 2016, 16(1): 49.
- [3] KONG J, LIU X, LI X, et al. Pokemon promotes the invasiveness of hepatocellular carcinoma by enhancing MEF2D transcription[J]. Hepatol Int, 2016, 10(3): 493-500.
- [4] YU H, SUN H, BAI Y, et al. MEF2D overexpression contributes to the progression of osteosarcoma[J]. Gene, 2015, 563(2): 130-135.
- [5] 石少敏, 王静, 赵建军, 等. siRNA 肌细胞特异性增强因子 2D 对人肺癌细胞株 A549 和 H460 增殖及凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(12): 2873-2875.

- [6] DESANTIS C E, LIN C C, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(4): 252-271.
- [7] HUANG Q, ZENG Y, LIN H, et al. Transfection with Livin and Survivin shRNA inhibits the growth and proliferation of nonsmall cell lung cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7086-7091.
- [8] LI S, YANG Y, DING Y, et al. Impacts of survivin and caspase-3 on apoptosis and angiogenesis in oral cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3774-3779.
- [9] TAGLIERI L, de IULIIS F, GIUFFRIDA A, et al. Resistance to the mTOR inhibitor everolimus is reversed by the downregulation of survivin in breast cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3832-3838.
- [10] CARPI S, FOGLI S, GIANNETTI A, et al. Theranostic properties of a survivin-directed molecular beacon in human melanoma cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): DOI: 10.1371/journal.pone.0114588.
- [11] PON J R, MARRA M A. MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2297-2312.
- [12] MA L, LIU J, LIU L, et al. Overexpression of the transcription factor MEF2D in hepatocellular carcinoma sustains malignant character by suppressing G2-M transition genes[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(5): 1452-1462.
- [13] GU Z, CHURCHMAN M, ROBERTS K, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(3): DOI: 10.1038/ncomms13331.

(李科 编辑)