

乳腺癌中 Survivin 和 VEGF 的表达

王书昌¹ 杨学伟² 张玉玲^{2△} 张昊¹

(1 哈尔滨市第二医院 黑龙江 哈尔滨 150056; 2 哈尔滨医科大学附属二院 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的: 研究抗凋亡蛋白 Survivin, 血管内皮生长因子 VEGF 在乳腺癌中的表达情况, 探讨二者的表达与乳腺癌侵袭的关系以及二者之间的联系。从而为临床诊断和治疗乳腺癌提供参考价值。**方法:** 应用免疫组织化学方法检测 Survivin 和 VEGF 在 41 例乳腺癌标本中和 10 例正常乳腺组织对照组中的表达情况。**结果:** 与对照组相比, 乳腺癌中 Survivin 的阳性表达 (68.29%) 与 VEGF 的表达 (63.41%) 明显升高, 且他们的表达与肿瘤的淋巴结转移和 c-erBb-2 有相关性。而与患者的年龄、临床分期、ER、PR 和肿瘤大小无明显相关性。Survivin 表达与 VEGF 表达呈明显正相关 ($P < 0.01$)。**结论:** Survivin(生存素)与 VEGF(血管内皮生长因子)的表达在乳腺癌的发生、发展中起重要作用。Survivin 的高表达促进了 VEGF 的促内皮细胞功能。

关键词: 乳腺癌; Survivin; VEGF; 免疫组化

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)21-4159-04

Survivin and VEGF Expressions in Breast Cancer and their Relations

WANG Shu-chang¹, YANG Xue-wei², ZHANG Yu-ling^{2△}, ZHANG Hao¹

(1 The second Hospital of Harbin, Heilongjiang, 150056;

2 Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University Heilongjiang, Harbin 150086)

ABSTRACT Objective: To study the expression of Survivin and VEGF in breast carcinoma tissue, and their relation to the invasiveness and metastasis in breast cancer. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of Survivin and VEGF in 41 breast cancer and 10 normal breast tissue. **Results:** The positive expressions of Survivin and VEGF in breast cancer was 68.29% and 63.41% respectively, both higher than that in normal breast tissue ($p < 0.05$). And the expression of Survivin and VEGF was positive related to the lymph node metastasis and c-erBb-2, but with no significant correlation with age, clinical stage, ER, PR and tumor size. The expression of Survivin was positively related to the expression of VEGF. **Conclusion:** The expression of Survivin and VEGF may play an important role in the occurrence and development of breast carcinomas. The high expression of Survivin promoted the function of VEGF which boost the growth of the endothelial cell.

Key words: Breast carcinoma; Survivin; VEGF; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4159-04

前言

乳腺癌是一种女性多发的恶性肿瘤。我国近年来有明显上升趋势。因此, 研究乳腺癌的诊治有很重要的意义。通过用免疫组化方法研究抗凋亡蛋白 Survivin, 血管内皮生长因子 VEGF 在乳腺癌中的表达情况, 探讨二者的表达与乳腺癌侵袭的关系以及二者之间的联系。从而为临床诊断和治疗乳腺癌提供参考价值。

1 材料与与方法

1.1 实验材料

1.1.1 标本来源 所有标本均取自 2005 年 1 月—2005 年 10 月在我院普外二科行手术治疗的乳腺疾病患者, 均为女性。其中乳腺癌 41 例, 10 例为乳腺良性疾病患者, 取其正常腺体作为对照组。全部病例术前均未接受化疗, 放疗。乳腺癌患者年龄在

28-66 岁之间, 平均 48.6 岁。TNM 分期 I 期组 17 例, II 期组 24 例。年龄 45 岁以上组 17 例, 45 岁以下组 24 例。有淋巴结转移组 23 例, 无淋巴结转移组 18 例。乳腺癌病例均经术中快速冰冻病检和常规病理检查确诊。

1.1.2 主要试剂 本实验采用链霉素-生物素(S-P)免疫组化技术, survivin 和 VEGF 的单克隆抗体及免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术公司。用 PBS 替代第一抗体做阴性对照。

1.2 标本处理

术中肿块切除后, 切取约 (1-2) cm² × (0.3-0.5) cm 肿瘤及肿瘤周围 1.0cm 的癌旁腺体组织。良性病变取病变组织旁肉眼所见得正常乳腺组织为对照。切取的组织经生理盐水冲洗后, 即行多聚甲醛固定, 石蜡包埋。其余标本送病理科行冰冻病检和常规病理检测。

1.3 实验方法

1.3.1 标本的固定与包埋 手术切取的新鲜组织, 经生理盐水冲洗后即被放入 10% 的多聚甲醛固定液中, 固定 48 小时, 随后进行系列浓缩, 酒精脱水。经二甲苯透明, 石蜡包埋。

1.3.2 切片 每一标本做 3 张连续切片, 切片厚度 4μm, 第一张做 HE 染色, 第二张做 Survivin 为第一抗体的免疫组化染色,

作者简介: 王书昌, 男, 硕士, 主要研究方向: 乳腺疾病

E-mail: wshc761018@163.com

△通讯作者: 张玉玲 zhangyuling0000@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2011-03-05 接受日期: 2011-03-30)

第三张做以 VEGF 为一抗的免疫组化染色。将切片置于 37℃ 恒温干燥箱中,烘片 24 小时,备用。

1.4 判定标准

对全部石蜡切片进行 HE 染色,在显微镜下观察切片质量,排除带有大量出血、坏死区域的组织。选择出质量较好的切片进行免疫组化试验。对每一病例均行常规病理检查,从而确定标本的良、恶性。癌旁腺体的确定,注意控制取材的部位距离肿瘤肉眼边缘 1.0 厘米。免疫组化染色,显微镜下观察,免疫组化结果呈棕黄色颗粒。VEGF, Survivin 均表达于肿瘤细胞胞浆, survivin 和 VEGF 结果判定标准采用半定量的方法,光镜下进行分析,在排除非特异性染色的前提下,以黄色、棕黄色、棕褐色为阳性,计分方法:A 按切片中细胞染色的深浅评分,0 分:无着色;1 分:细胞染色呈浅黄色;2 分:细胞染色呈棕黄色;3 分:细胞染色呈棕褐色。B 按切片中的阳性细胞比例评分,每

例随机观察 5 个视野,每个视野 100 个细胞,计数 500 个细胞中染色阳性的细胞数,0 分:显色细胞数≤ 5%;1 分:显色细胞数占 5%-25%;2 分:显色细胞数占 25%—50%;3 分:显色细胞数占 50%—75%;4 分:75%以上的细胞显色。每例标本染色积分=A× B,若乘积≤ 1 为阴性,>1 为阳性。结果的判定有两位不知患者临床病理资料的病理医师进行。

1.5 统计学分析

各样本资料差异的统计学处理采用 X² 检验方法,P<0. 05 表示有统计学意义。

2 结果

Survivin 和 VEGF 的阳性染色主要见于肿瘤细胞的胞浆棕黄色着的(图 1—4)。乳腺癌中 Survivin、VEGF 的表达(表 1)。

表 1 Survivin and VEGF 在乳腺癌中的表达
Table 1 The expression of survivin and VEGF in breast cancer

指标 Target	分组 Group	例数 Case	Survivin		P	VEGFP		P
			阳性数 Positive No.	阳性率 Positive ratio		阳性数 Positive No.	阳性率 Positive ratio	
腋淋巴转移 Lymphatic metastasis	+	23	19	82.61%	<0.05	18	78.26%	<0.05
	-	18	9	50.00%		8	44.44%	
C-erBb-2	+	20	14	70.00%	<0.05	16	80.00%	<0.05
	-	21	14	66.67%		10	47.61%	
年龄 Age	≤ 45	24	17	70.83%	>0.05	15	62.50%	>0.05
	>45	17	11	64.71%		11	64.71%	
临床分期 Clinical stage	I	17	10	58.82%	>0.05	9	52.94%	>0.05
	II	24	18	75.00%		17	70.83%	
肿瘤大小 Tumor size	≤ 2.0cm	16	9	56.25%	>0.05	11	68.75%	>0.05
	>2.0cm	25	19	76.00%		15	60.00%	
ER	+	22	16	72.73%	>0.05	14	63.64%	>0.05
	-	19	12	63.16%		12	63.16%	
PR	+	20	13	65.00%	>0.05	14	70.00%	>0.05
	-	21	15	71.42%		12	57.14%	

Survivin、VEGF 的阳性表达与乳腺癌病人的淋巴转移、PR 未见明显关系。C-erBb-2 有明显关系,与病人年龄、肿瘤大小、临床分期、ER、乳腺癌组织中 Survivin、VEGF 表达阳性率明显高于乳腺

表 2 乳腺癌、癌旁组织和正常腺体中 Survivin、VEGF 的表达

Table 2 The expression of survivin and VEGF in breast cancer, surrounding tissues and normal tissues

Group	Case (n)	Survivin	VEGF
乳腺癌 Breast	41	28(68.29%)*	26 (63.41%) *
癌旁组织 (1.0cm) Tissue	41	25(60.98%)**	23 (57.14%) **
正常腺体	10	0 (0.00%)	1 (10.00%)

注:与乳腺良性疾病比较,* P < 0. 001,**P<0.025

Note: Compare with innocence lacteal gland disease * P < 0. 001,**P< 0.025

良性疾病组织,两者差异有显著性意义($P < 0.005$) (表 2)。

在 41 例乳腺癌标本中, Survivin 阳性为 28 例 (68.29%, $P < 0.001$)。 VEGF 阳性为 28 例 (63.41%, $P < 0.001$)。 41 例癌旁 1.0cm 组织中, Survivin 阳性为 25 例 (60.98%, $P < 0.025$), VEGF 阳性为 23 例 (57.14%, $P < 0.025$)。均明显高于正常乳腺腺体的

表达。

乳腺癌标本中 Survivin 的表达与 VEGF 表达的关系 (表 3)。可见乳腺癌中 Survivin 的表达与 VEGF 表达呈明显的正相关 ($P < 0.01$)。

表 3 Survivin 与 VEGF 在乳腺癌组织中的共同表达情况
Table 3 The co-expression of survivin and VEGF in breast cancer

Survivin	VEGF		合计
	+	-	
+	18	10	28
-	8	5	13

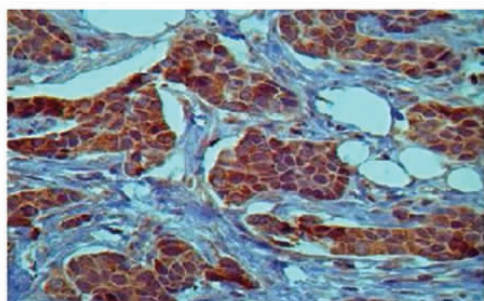


图 1 癌组织 Survivin 阳性表达× 400 倍

Fig.1 The expression of surviving in the breast carcinoma tissue(× 400)

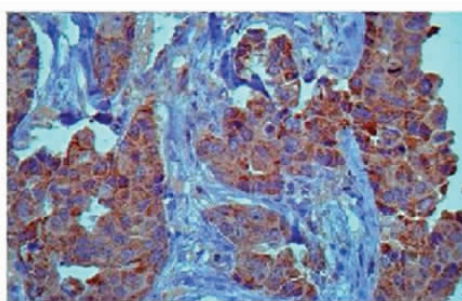


图 2 乳腺癌 VEGF 表达阳性× 400

Fig.2 The expression of VEGF in the breast carcinoma tissue(× 400)

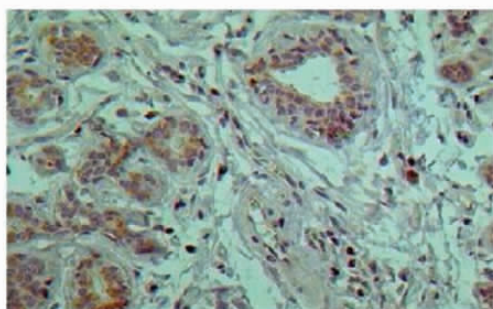


图 3 癌旁 (1.0cm) survivin 的表达× 400

Fig.3 The expression of survivin in periphery region of breast cancer(× 400)

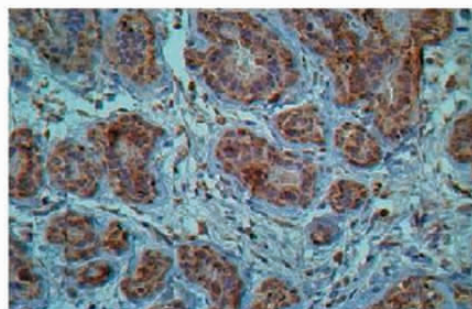


图 4 癌旁 (1.0cm) VEGF 的表达× 400

Fig.4 The expression of VEGF in periphery region of breast cancer(× 400)

可见乳腺癌中 Survivin 的表达与 VEGF 表达呈明显的正相关 ($P < 0.01$)。

3 讨论

Survivin 是迄今为止克隆出的最小 IAP^[1]。研究表明, Survivin 几乎在所有被检测过的肿瘤组织中,如胃癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌等,都有不同程度的表达,且 Survivin 的表达与多种肿瘤的生物特性(或)疾病分期有关^[2]。Tanaka 等^[3]的一组资料显示, Survivin 在乳腺癌组织中的阳性率为 70.7%,而在癌旁正常乳腺组织中无表达。本研究采用免疫组化 SP 法检测了 41 例乳腺癌组织中 Survivin 的表达,结果发现 41

例乳腺癌标本 Survivin 阳性(73.17%),而在 10 正常腺体中 Survivin 阳性率为 0%,这与文献报道的基本一致。在伴有淋巴结转移的乳腺癌中, Survivin 的阳性率还有升高的趋势,差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

目前对 Survivin 的表达与临床病理特征之间的关系尚有许多争议。Kren 等^[4]认为在非小细胞肺癌中 Survivin 蛋白的表达与肿瘤期别有关, Kajiwar 等^[5]认为在星形细胞瘤中 Survivin 蛋白的表达与肿瘤分级有关。陆澄等^[6]认为 Survivin 的表达与乳腺癌淋巴结转移有关。本研究发现,在乳腺癌组织中,分析显示 Survivin 的表达与患者临床分期、肿瘤大小、ER、PR 等均无相关性,这一结果与 Kennedy 等^[7]的研究结论相近。这一研究结

果提示, Survivin 的表达可能是独立于乳腺癌临床病理特征外的一个新的生物学指标。

VEGF(血管内皮生长因子)是一种重要的血管生成因子^[9], VEGF 在绝大多数肿瘤细胞中表达, 正常组织在生理状态下也有微量 VEGF 表达, 具有增加血管通透性促使血管内皮细胞生长并直接促使血管再生的作用^[10,11]。实体肿瘤生长和转移依赖于肿瘤血管的形成^[12], TOI 等^[13] 研究发现乳腺癌细胞中富含 VEGF 者, 术后复发比含 VEGF 较少者出现早。本实验中, 乳腺浸润性导管癌及乳腺良性病中 VEGF 的表达结果显示, 乳癌组 VEGF 表达水平明显高于良性病组, 提示乳癌组织生血管活性强度高于良性病组织, 乳癌组织中可能存在更多量的血管内皮生长因子, 对临床鉴别组织学难以确定良恶性的病例有一定意义。血管的生成是肿瘤生长, 转移的中心环节^[14]。VEGF121 促使血管生成作用最强, 且在乳腺癌组织中高表达^[15]。

Lichtenbeld 等^[16] 发现乳腺组织生血管活性强度和 VEGF 含量呈正相关关系。本实验中, 乳腺浸润性导管癌及乳腺良性病中 VEGF 的表达结果显示, 乳癌组 VEGF 表达水平明显高于良性病组, 提示乳癌组织中血管活性强度高于良性病组织, 乳癌组织中可能存在更多量的血管内皮生长因子, 对临床鉴别组织学难以确定良恶性的病例有一定意义。实验中 VEGF 在乳腺导管癌的表达上差异性与其存在不同的异构体的分布有关。

本实验结果表明 Survivin 和 VEGF 在乳腺癌中表达具有一致性。近年来研究证实内皮细胞中表达的 VEGF 可诱导和促进 Survivin 的高表达, 而 Survivin 的表达上调是内皮细胞在血管生成过程中维持生存活力的必要条件^[17]。VEGF 在肿瘤血管生成过程中发挥的内皮细胞抗凋亡作用依赖于其诱导的 Survivin 表达上调, 高表达的 Survivin 抑制了各种指向 Caspase 的凋亡机制, 从而保护内皮细胞逃避凋亡。相反, Survivin 表达缺乏可导致内皮细胞及新生血管退化, 可见 VEGF 促进了 Survivin 表达, 同时, 高表达 survivin 又维持和保护了 VEGF 的促内皮细胞功能, 从而促进了肿瘤血管生成和浸润转移。最近有人报道, 诱导 Survivin 的表达可使肿瘤血管内皮细胞免受化疗药物所致的凋亡^[18]。在乳腺癌中, Survivin 和 VEGF 基因表达上调与肺癌临床病理特征相关, 并且二者关系密切。因此, 二者的联合检测将为乳腺癌的诊断和靶向治疗提供新的途径。

总之, Survivin(生存素)、VEGF(血管内皮生长因子)在乳腺导管癌组织的表达与其生物学行为如浸润、病理分级、淋巴转移有密切关系, 可以作为判断肿瘤的预后及治疗后缓解情况的指标, 更重要的是由于其表达的高阳性率使其成为乳腺癌基因治疗的靶向, 开辟生物治疗乳腺癌的新途径。

参考文献(References)

[1] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4):1117-1123

[2] Koch CA, Vortmeyer AO, Diallo R, et al. Survivin: a novel neuroendocrine marker for pheochromocytoma [J]. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146(3):381-388

[3] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of surviving and its

relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1):127-34

- [4] Kren L, Brazdil J, Hermanova M, et al. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas :a clinicopathologic study of 102 cases [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2004, 12(1) : 44-49
- [5] Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, et al. Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis [J]. *Cancer*, 2003, 97(4):1077-1083
- [6] 陆澄, 谢晖, 周茜. Survivin 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. *西部医学*, 2009; 21(11):1870-1874
- Lu Cheng; Xie Hui; Zhou Qian. Expression and significance of survivin in breast carcinoma [J]. *Medical Journal of West China*, 2009; 21(11):1870-1874
- [7] Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer [J]. *Cancer*, 2003, 88(7): 1077-1083
- [8] Hellmut GA. A giogenic tumor therapy: Will it work? [J]. *Tip s2*, 1998, 19: 216-222
- [9] Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, et al. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer [J]. *Pathol*. 2000, 190(4):430-436
- [10] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlations with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1995: 3964-3968
- [11] Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, et al. Vascular endothelial growth factor VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors [J]. *Pathol*, 1998, 153(1):103-108
- [12] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J]. *Med*, 1998 285:1182-1186
- [13] Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer [J]. *Cancer Res*. 1994; 85(10):1045-1049
- [14] Folkman J, Watson K, Ingber D, et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia [J]. *Nature*. 1989; 339(6219):58-61
- [15] Khorana AA, Ryan CK, Cox C, et al. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis [J]. *Cancer*. 2003, 97(4):960-968
- [16] Lichtenbeld HC, Barendsz-Janson AF, van Essen H, et al. Angiogenic potential of malignant and non-malignant human breast tissues in an in vivo angiogenesis model [J]. *Cancer*, 1998, 77(3):455-459
- [17] Tran J, Rak J, Sheehan C, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264(3): 781-788
- [18] Tran J, Master Z, Yu JL, et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF [Proc]. *Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(7):4349-4354