

· 基础研究 ·

喉癌组织中 Survivin 和 VEGF 的表达及其临床意义

白云飞¹, 覃洁², 彭诗东¹

(内蒙古医学院附属医院 1. 耳鼻咽喉科; 2. 呼吸内科, 内蒙古呼和浩特 010050)

摘要: 目的 研究喉癌组织中 Survivin 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达与喉癌的临床分期、病理分级及与淋巴结转移的关系, 并探讨其二者的相关性。方法 采用免疫组化 S-P 法对 72 例喉癌组织及 10 例喉正常黏膜组织中 Survivin 和 VEGF 的表达进行测定。结果 Survivin 和 VEGF 在喉癌组织中的阳性表达均高于喉正常黏膜组织 ($P < 0.05$); Survivin 和 VEGF 的表达与喉癌组织的临床分期、病理分级及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 但与患者的年龄无关 ($P > 0.05$); Survivin 和 VEGF 在喉癌组织的表达呈正相关 ($r_s = 0.577, P < 0.05$)。结论 喉癌组织中 Survivin 和 VEGF 的表达和喉癌的临床分期、病理分级及淋巴结转移密切相关。

关键词: 喉鳞状细胞癌; 生存素; 血管内皮生长因子; 免疫组化; 表达

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)01-0005-05

Expression of Survivin and VEGF in laryngeal carcinoma and clinical significance

BAI Yun-fei, TAN Jie, PENG Shi-dong

(Department of Otolaryngology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010050, China)

Abstract: **Objective** To study the relation between the expression of Survivin and VEGF with the clinical stages, pathological grades and lymphatic metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC), and to study the correlation between the expression. **Methods** Expression of Survivin and VEGF was measured with immunohistochemical method in 72 samples of LSCC and 10 of non-carcinoma laryngeal mucosa. **Results** The expression of Survivin and VEGF in LSCC samples was higher than that in normal laryngeal mucosa ($P < 0.05$). The expression was correlated with the clinical stages, pathological grades and lymphatic metastases in LSCC ($P < 0.05$), but not with the sex and age of the patients. The expression of Survivin was positively correlated with that of VEGF ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Survivin and VEGF is significantly correlated with the clinical stage, pathological grade and lymphatic metastasis in LSCC.

Key words: Laryngeal neoplasm, squamous cell; Survivin; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry; Express

喉癌是耳鼻咽喉科最常见的恶性肿瘤, 严重威胁人类的健康, 近年来喉癌呈逐年上升趋势。愈来愈多地研究表明恶性肿瘤的发生发展和转归与细胞凋亡及细胞增殖调节失控密切相关^[1]。Survivin 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在喉癌中表达的相关研究国内外少有文献报道, 本文应用

免疫组织化学方法对 72 例喉癌组织和 10 例喉正常黏膜组织进行 Survivin 和 VEGF 的检测, 旨在探讨 Survivin 和 VEGF 的表达与喉癌的临床分期、病理分级及有无淋巴结转移等的关系, 通过对 Survivin 和 VEGF 在喉癌组织中发生、发展作用的认识, 为临床诊断及治疗提供理论依据。

作者简介: 白云飞, 男, 主治医师。
通讯作者: 彭诗东, Email: pengshidong2008@126.com.

1 材料与方法

1.1 标本

收集内蒙古医学院第一附属医院和山西医科大学肿瘤医院2006年10月~2008年8月手术治疗并病理证实的72例喉鳞癌标本及10例喉正常黏膜组织(会厌囊肿、声带息肉)。72例喉癌组中男64例,女8例;年龄35~85岁,平均63.7岁。按照2002年国际抗癌协会(UICC)TNM分级及临床分期方案,其中I期3例($T_1 N_0 M_0$),II期13例($T_2 N_0 M_0$),III期28例($T_1 N_1 M_0$ 3例、 $T_2 N_1 M_0$ 3例、 $T_3 N_1 M_0$ 1例、 $T_3 N_0 M_0$ 2例),IV期28例($T_{1-4} N_2 M_0$ 2例、 $T_{1-4} N_3 M_0$ 1例、 $T_4 N_1 M_0$ 6例、 $T_4 N_0 M_0$ 19例);72例喉癌中声门上型21例、声门型43例、声门下型8例;术后病理证实有淋巴结转移16例,无淋巴结转移56例;其中高分化40例,中分化25例,低分化7例,所有病例术前均未行放疗及化疗。

1.2 主要试剂

VEGF、Survivin、S-P 9000试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 检测步骤

严格按步骤取材、固定、脱水、透明、包埋、切片、脱蜡及脱苯水化;滴加3%过氧化氢孵育5~10 min,消除内源性过氧化物酶;PBS冲洗;微波修复;滴加封闭液(封闭用正常山羊血清工作液),覆盖组织,室温孵育15 min,倾去,勿洗;滴加一抗工作液(兔抗人,单克隆抗体),切片置于湿盒内,4℃冰箱过夜;PBS液冲洗;滴加生物素标记的第二抗体工作液(IgG/Bio)(其中Survivin为兔抗人单克隆抗体,VEGF为兔抗人多克隆抗体),37℃孵育15 min;再用PBS液冲洗,除去PBS液,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37℃孵育15 min;PBS液冲洗后,除去PBS液,滴加新配制(按比例1:1:1)DAB显色液覆盖组织,室温避光显色3~5 min,显微镜下观察3~10 min;自来水充分冲洗;复染核、返蓝、二甲苯透明、封片。阴性对照以PBS代替第一抗体。

1.4 结果判定

显微镜下观察比较不同部位的染色强度,VEGF和Survivin染色阳性细胞以胞浆呈黄色至棕黄色为主,偶见胞核表达,均以组织结构清楚、背景清晰为标准。将染色强度打分:无色0分,淡黄色1分,黄色2分,棕黄色3分。每例随机选取不重复5个视野,计算每个视野中阳性细胞所占百分比并计分,将阳性细胞百分比打分为阴性0分,阳性细胞 $\leq 10\%$ 为1分,11%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。采用二次计分法^[2]:染色强度与百分比的乘积>3分为免疫反应阳性。

1.5 统计学方法

收集研究资料,以SPSS12.0统计软件进行数据处理,样本间率比较用 χ^2 检验及Fishers精确概率法,相关关系的分析采用Spearman等级相关分析法。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin和VEGF在不同组织中的表达

Survivin和VEGF表达阳性信号主要定位于细胞浆,偶见胞核表达,以细胞浆呈黄色颗粒为阳性细胞。Survivin在喉癌组织中及喉正常黏膜组织中阳性率分别为81.9%(59/72)和20%(2/10),两者差异具有统计学意义($\chi^2 = 17.685$, $P < 0.05$)(图1,2),VEGF在喉癌组织中及喉正常黏膜组织中阳性率分别为81.9%(59/72)和10%(1/10),两者差异具有统计学意义($\chi^2 = 23.151$, $P < 0.05$)(图3,4)。

2.2 Survivin和VEGF在喉癌组织中的表达与临床病理参数的关系

Survivin和VEGF在喉癌组织中的表达与年龄无关($P > 0.05$);Survivin的表达与病变的发生部位、临床分期、分化程度及有无淋巴结转移有关($P < 0.05$);VEGF的表达与病变的发生部位无关($P > 0.05$),与临床分期、分化程度及有无淋巴结转移有关($P < 0.05$)(表1)。

2.3 Survivin和VEGF表达的相关性

在喉癌组织中,Survivin和VEGF的表达有相关性($r_s = 0.577$, $P < 0.05$),两者呈正相关(表2)。

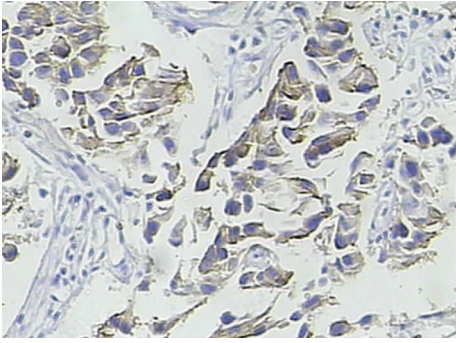


图 1 喉癌组织中 Survivin 的阳性表达 (S-P 法, × 200)



图 2 喉正常黏膜组织中 Survivin 的阴性表达 (S-P 法, × 200)

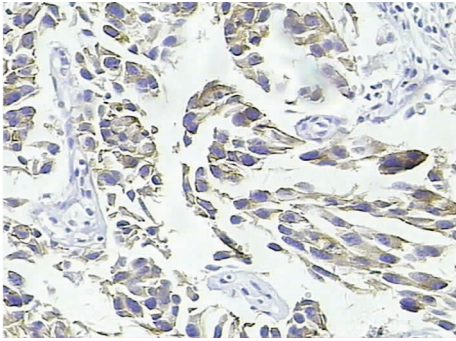


图 3 喉癌组织中 VEGF 的阳性表达 (S-P 法, × 200)



图 4 喉正常黏膜组织中 VEGF 的阴性表达 (S-P 法, × 200)

表 1 Survivin 和 VEGF 在喉癌组织中的表达及与临床病理参数的关系

临床病理参数	Survivin			χ^2	P	VEGF			χ^2	P
	阳性表达	阴性表达	阳性率			阳性表达	阴性表达	阳性率		
年龄										
≥60 岁	23	6	79.3	8.483	>0.05	23	6	79.3	7.873	>0.05
<60 岁	36	7	83.7			36	7	83.7		
部位										
声门上型	15	6	71.4	9.572 *	<0.05	16	5	76.2	11.487	>0.05
声门型	6	2	75			5	3	62.5		
声门下型	30	13	69.8			35	8	81.4		
临床分期										
I 期	0	3	0	25.060 *	<0.05	0	3	0	25.543 *	<0.05
II 期	7	6	53.8			7	6	53.8		
III 期	26	2	92.9			25	3	89.3		
IV 期	26	2	92.9			27	1	96.4		
分化程度										
高分化	29	11	72.5	22.082 *	<0.05	31	9	77.5	24.770 *	<0.05
中分化	23	2	92			21	4	84		
低分化	7	0	100			7	0	100		
淋巴结转移										
有	16	0	100	4.533 *	<0.05	16	0	100	4.533 *	<0.05
无	43	13	76.8			43	13	76.8		

注: * P < 0.05

表 2 Survivin 与 VEGF 在喉癌组织中的相关性

Survivin	VEGF		P
	阳性	阴性	
阳性	52	7	<0.05
阴性	7	6	

注: $r_s = 0.577$, $P < 0.05$; 二者呈正相关

3 讨论

3.1 Survivin 在喉癌中的表达及临床意义

随着对肿瘤发病机制的深入研究,人们逐渐认识到细胞凋亡受抑制会导致细胞增殖与凋亡之间的失衡,这可能是肿瘤发生发展的重要原因。Survivin 属于抑制凋亡家族(IAP)的新成员,因可延长细胞的生存故又名生存素。研究表明,Caspase 级联式激活并溶解蛋白质是凋亡发生的核心机制^[3],Survivin 可直接作用于Caspase,主要通过黏附于活化的Caspase-3和Caspase-7,参与细胞凋亡的执行,调节染色体的分离和胞质的分裂,从而阻断凋亡的过程。Survivin 基因除胎盘和胸腺组织外,正常成人组织中均无表达,其过表达能抑制各种刺激所诱导的凋亡。研究证实 Survivin mRNA 的改变与 Survivin 蛋白的改变基本一致^[4]。本组实验结果与 Kato 等^[5]在食管癌组织中 Survivin 表达的研究结果有所出入,但其他学者对 Survivin 的研究认为其表达与喉癌临床分期、分化程度和淋巴结转移相关^[6-11],与本实验研究结果相一致。

3.2 VEGF 在喉癌中的表达及临床意义

VEGF 是目前已知的作用最强的血管通透因子。其通过与其特异性的受体结合促进内皮细胞增殖,同时增加血管通透性使内皮细胞迁移,为新的血管生成打下基础。VEGF 在正常成人及动物组织中水平较低,但在胎儿及正在进行生理性血管生长的组织中水平较高。大多数肿瘤细胞本身、肿瘤浸润的巨噬细胞和肥大细胞均分泌高水平 VEGF^[12]。VEGF 可以为肿瘤细胞的生长和新生血管形成提供营养,从而为肿瘤的生长、浸润和转移奠定基础。VEGF 与肿瘤生长及转移的关系在小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤组织中都得到了证实^[13]。本试验研究结果与目前许多学者的结果相符^[14-17]。

3.3 检测喉癌组织中 Survivin 与 VEGF 共同表达的意义

关于 Survivin 与 VEGF 在喉癌组织中的表达的相关性少有研究及报道,本试验研究结果与王彦军等^[6]学者观点相一致,这说明在喉癌的发生发展过程中,很可能 Survivin 的凋亡抑制机制与 VEGF 的促血管形成机制有协同作用。

本试验研究结果提示,Survivin 和 VEGF 均可作为反映喉癌生物学行为的客观参考指标,与喉癌的临床分期、淋巴结转移和病理类型有关,并且二者在喉癌组织中的表达存在一定程度的相关性。故采用免疫组化方法联合检测二者的异常表达可能有助于对可疑癌进行早期诊断,对肿瘤恶性程度、患者的手术时机的选择及预后做出正确的评价,并制定合理的治疗方案,能否成为新的分子指标用于临床,作为反映肿瘤生物学行为的一种客观指标有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨抚华,胡以平. 医学细胞生物学[M]. 北京:科学出版社出版,2002:300-306.
- [2] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 癌症杂志,1996,5(4):229-231.
- [3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptosis protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and Caspase-7 [J]. Biochemistry, 2001, 40(4):1117-1123.
- [4] Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis [J]. Br J Cancer, 2005, 92(2):212-216.
- [5] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of surviving in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy [J]. Cancer, 2001, 95(5):92-95.
- [6] 王彦军,孔维佳,熊新高,等. Survivin 和 VEGF 蛋白在喉癌组织中的表达及其相关性研究 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(18):838-841.
- [7] 杨娜,孙克巍,辛丁,等. Survivin 基因和增殖细胞核抗原在喉鳞状细胞癌中的表达及相关性研究 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2006,12(5):326-329.
- [8] 陈杰,田勇泉,邢晓为,等. 喉鳞状细胞癌中 Survivin 基因的表达 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2006,12(3):171-174.
- [9] Rengan R, Pfister DG, Lee NY, et al. Long-term neck control rates after complete response to chemoradiation in patients with advanced head and neck cancer [J]. Am J Clin Oncol, 2008, 31(5):465-469.
- [10] Nishimura G, Tsukuda M, Mikami Y, et al. Efficacy of con-

- current chemoradiotherapy for T1 and T2 laryngeal squamous cell carcinoma regarding organ preservation [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(2): 661 - 666.
- [11] Marioni G, D' Alessandro E, Bertolin A, et al. Survivin multifaceted activity in head and neck carcinoma: current evidence and future therapeutic challenges [J]. *Acta Otolaryngol*, 2010, 130(1): 4 - 9.
- [12] Damert A, Machein M, Breier G, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(17): 3860 - 3864.
- [13] Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, et al. P53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2000, 89(1): 51 - 62.
- [14] Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in early laryngeal cancer: Relationship with radioresistance [J]. *Clin Otolaryngol*, 2001, 26(6): 498 - 504.
- [15] 王宗贵,等. 癌中血管内皮生长因子 C 与淋巴转移的关系[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(5): 82 - 84.
- [16] Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, et al. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer [J]. *Eur Arch Otorhino Laryngology*, 2005, 262(11): 890 - 898.
- [17] Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62(3): 179 - 213.
- (修回日期:2011-12-30)
-
- (上接第4页)
- [4] 管敏鑫,赵立东. 与氨基糖甙类抗生素耳毒性相关的线粒体 12S rRNA 突变的流行病学特征 [J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(2): 98 - 105.
- [5] 刘新,戴朴,黄德亮,等. 线粒体 DNA A1555G 突变大规模筛查线粒体 DNAA1555G 突变大规模筛查及其预防意义探讨 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(19): 1318 - 1322.
- [6] 张艳,卞颖华,许鹏飞,等. 应用耳聋基因芯片技术检测非综合征型耳聋基因突变 [J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(1): 22 - 26.
- [7] 王冰,徐洁,姚红兵,等. 重庆市非综合征型耳聋患儿 GJB2 基因突变分析 [J]. *重庆医学*, 2009, 38(9): 1028 - 1031.
- [8] Chen Neng, Tranebjærg Lisbeth, Rendtorff Nanna Dahl, et al. Mutation Analysis of SLC26A4 for pendred syndrome and non-syndromic hearing loss by high-resolution melting [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2011, 13(4): 416 - 426.
- [9] 李建瑞,陈瑛,李玲香,等. 变性高效液相色谱法筛查间隙连接蛋白 2 耳聋基因突变 [J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(3): 140 - 143.
- [10] 贾婧杰,袁永一,戴朴,等. 山东省滨州市特殊教育学校耳聋学生分子病因学分析 [J]. *中华耳科学杂志*, 2010, 8(4): 407 - 410.
- [11] 谢兰,程京. 生物芯片的临床应用现状和未来发展趋势 [J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(11): 1000 - 1010.
- [12] 江凌晓,凌月仙,蔡桂君,等. 遗传性耳聋基因芯片检测的临床应用研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(3): 170 - 172.
- [13] 席宏,张岑娜. 大前庭水管综合征 SLC26A4 基因突变分析 [J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(4): 394 - 396.
- [14] 赵恒静,纪育斌,李红辉,等. 柳州地区 161 例先天性聋患者易感基因突变检测分析 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2010, 18(1): 11 - 13.
- [15] 王强,邢光前,尤易文,等. 南通地区感音神经性聋患者 GJB2 基因分析 [J]. *江苏医药*, 2010, 36(12): 1365 - 1367.
- [16] 杨晓林. GJB2 基因突变与 NSHI 患者临床表型的相关性研究进展 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2010, 18(1): 90 - 93.
- [17] 唐江凤,朱春生. 突发性耳聋疗效与相关因素的分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2009, 15(4): 297 - 300.
- [18] 王国建,袁永一,李荣,等. 不同听力学表型人群中常见耳聋基因突变检出率的分析 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 25(10): 445 - 448.
- (修回日期:2011-12-25)