

文章编号:1005-6947(2008)11-1137-03

· 简要论著 ·

# 乳腺癌中 survivin 的表达与血管生成的关系

仲雷, 张建国, 郭宝良, 杨学伟, 陈晰, 罗国庆, 李智刚

(哈尔滨医科大学附属第二医院 乳腺外科, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**目的 探讨 survivin 表达与乳腺癌血管生成的关系。方法 应用免疫组化法(IHC)检测 survivin 在 40 例乳腺癌组织、10 例癌旁正常腺体组织中的表达情况;以 FVIII-RA 作为血管内皮标记物,计数乳腺癌组织微血管密度(MVD)的表达情况。结果 survivin 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 62.5% (25/40),而 10 例癌旁腺体组织中无表达,两者差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。40 例乳腺癌组织中的 MVD 为  $(43.73 \pm 10.07)$  个/HP,其中 25 例 survivin 阳性组中 MVD 的表达为  $(63.33 \pm 10.36)$  个/HP,显著高于 15 例阴性组的  $(20.12 \pm 8.47)$  个/HP ( $P < 0.05$ )。结论 survivin 的高表达可能参与乳腺癌中微血管的新生,故可作为评价乳腺癌生物学行为的指标之一。

[中国普通外科杂志,2008,17(11):1137-1139]

**关键词:** 乳腺肿瘤/病理学; 蛋白, survivin; 微血管密度; 血管生成

**中图分类号:** R 737.9

**文献标识码:** B

我国乳腺癌的发病率在女性各肿瘤中已跃居首位<sup>[1]</sup>。转移是乳腺癌患者死亡的主要原因之一。微血管密度(microvessel density, MVD)增加可以促进转移的发生,这在许多研究中已得到证实。本研究以抗 FVIII-RA 抗体对人乳腺癌组织中的微血管进行定量分析,同时采用免疫组织化学方法检测凋亡抑制蛋白 survivin 的表达情况,探讨乳腺癌肿瘤血管生成与 survivin 表达的关系,为进一步深入研究乳腺癌转移的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

选择本院乳腺外科 2005 年 10 月—2007 年 1 月手术切除并经病理证实的 I ~ II 女性乳腺浸润性导管癌组织 40 例。所有患者术前未经任何辅助治疗。另收集 10 例癌旁乳腺组织标本作为对照组(距癌缘 > 5 cm)。以上标本均行多聚甲醛固定,石蜡包埋。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30672420);黑龙江省科技厅攻关项目(GB05C402-01);黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二医院青年基金资助(编号:QN2008-12)。

**收稿日期:**2008-06-30; **修订日期:**2008-10-23。

**作者简介:**仲雷,男,哈尔滨医科大学附属第二医院医师,主要从事乳腺疾病的基础与临床方面的研究。

**通讯作者:**仲雷 E-mail:zhongleiyd@hotmail.com

### 1.2 实验方法

**1.2.1 免疫组化检测** 石蜡包埋的组织块,4  $\mu\text{m}$  切片,用兔抗人 FVIII-RA 作为一抗,按 PV9000 二步法免疫组化试剂盒说明书标记血管内皮细胞,抗体工作浓度为 1:200。survivin 染色步骤也按试剂盒说明书操作。将已知的阳性标本作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精对比染色。survivin 免疫组化结果以细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。随机观察 10 个高倍视野,平均每高倍视野的阳性肿瘤细胞数  $\geq 10\%$  即判断为阳性。

**1.2.2 MVD 检测** 用 FVIII-RA 免疫染色标本切片,标记其中的微血管,以血管内皮细胞胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准。MVD 计算:参照 Weidner<sup>[2]</sup>的校正技术,先在光镜低倍视野(40 倍)下观察,选取着色细胞密集的“热点”,在高倍视野(200 倍)下观察、鉴别着色的脉管,并计数。以 5 个 200 倍视野内微血管数的平均值作为该切片的微血管密度(MVD)。

### 1.3 统计学处理

数据采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。应用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

免疫组化染色结果显示,乳腺癌组织中的微血管在肿瘤的内部可观察到,呈管腔状或条索状(图1)。40例乳腺癌MVD为 $(43.73 \pm 10.07)$ 个/HP。survivin的阳性信号定位于乳腺癌细胞胞质内,棕黄色颗粒状弥散分布(图2)。40例乳腺

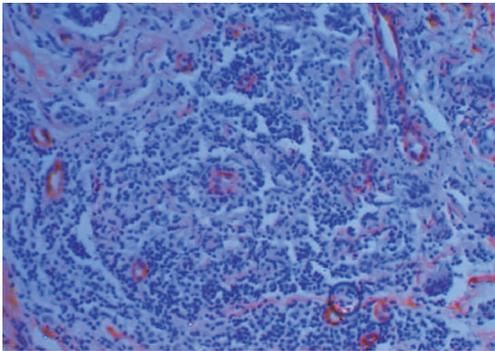


图1 乳腺癌癌巢中的微血管(FVIII-RA染色  $\times 200$ )

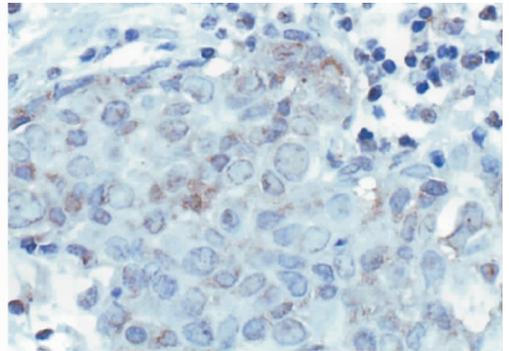


图2 survivin呈棕黄色颗粒状在乳腺癌细胞质内表达( $\times 400$ )

表1 survivin与MVD在乳腺癌中表达的关系

survivin	例数	MVD( $\bar{x} \pm s$ )	P值
阳性	25	$63.33 \pm 10.36$	<0.05
阴性	15	$20.12 \pm 8.47$	

注:MVD单位为个/200倍视野

## 3 讨论

乳腺癌作为一种全身性疾病,早期即可发生转移<sup>[3]</sup>。因此,对分子机制的研究已成为目前乳腺癌研究领域的热点。研究表明,实体肿瘤的生长是血管依赖性的。肿瘤生长至 $2 \sim 3 \text{ mm}^3$ ,细胞数在107个左右时,则必须依赖于肿瘤新生血管的形成。由于肿瘤内新生血管相对地增加了肿瘤细胞的黏附表面,而新生的微血管发育不成熟,管壁仅为一层常有裂隙的内皮细胞,缺乏基底膜,使它们比正常成熟血管更容易被肿瘤细胞穿透;同时由于内皮细胞分泌的纤维蛋白溶解酶的作用,使肿瘤更容易进入微血管。基于此,肿瘤内的新生血管不仅为肿瘤的生长提供必需的营养成分,还为肿瘤细胞进入循环系统导致远处转移提供通道<sup>[4-5]</sup>。这可能是乳腺癌一开始既已成为全身性疾病的根源。MVD是目前公认地反映肿瘤血管生成情况的“金标准”。本研究采用针对血管内皮细胞的F-VIII相关抗原作为血管标

癌组织中 survivin 的阳性表达率为 62.5% (25/40),而在 10 例癌旁乳腺组织中无表达,两者差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果还发现,在 25 例 survivin 阳性表达的乳腺癌组织中 MVD 为 $(63.33 \pm 10.36)$ 个/HP,而 15 例 survivin 阴性表达的乳腺癌组织中 MVD 为 $(20.12 \pm 8.47)$ 个/HP,两者差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表1)。

记物计数 MVD,背景清晰,对比度好,便于计数;并采用 Weidner 等的标准进行血管计数,发现乳腺癌组织中的 MVD 为 $(43.73 \pm 10.07)$ 个/HP,此结果与 Nieto 等<sup>[6]</sup>的研究结果相符;乳腺癌中新生血管在增加。

survivin 是 1997 年被发现的一个新基因<sup>[7]</sup>。survivin 通过抑制 caspases-3 和 caspases-7 前体的激活或直接抑制 caspases-3 和 caspases-7 的活性来阻止细胞凋亡,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子<sup>[8]</sup>。survivin 广泛表达于各种人胚胎组织中,在终末分化的成人组织不表达(子宫内膜、胎盘和胸腺有微量表达),而在人类的大多数肿瘤组织又出现明显的表达<sup>[9]</sup>。其表达具有严格的细胞周期依赖性,主要表达于细胞周期的  $G_2/M$  期,可对抗  $G_2/M$  期的凋亡。研究结果显示,40 例乳腺癌组织中 survivin 的阳性表达率为 62.5%,与内国其他研究者结论相近<sup>[10-11]</sup>,而对对照组乳腺组织中未见表达,两者差别有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示 survivin 可能通过抑制乳腺癌细胞的凋亡而促进细胞的恶性转化,参与乳腺癌的发生发展过程,是一个有潜在价值的肿瘤标记物。

肿瘤细胞在生长过程中能分泌多种血管活性物质,直接或间接地作用于血管内皮细胞;后者受刺激而分裂、移行、重塑,形成原始血管和开放的血管网。血管的形成确切地说取决于血管内

皮细胞的生存和凋亡平衡的结果。survivin 具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用,是一个细胞增殖旺盛的指标。本研究发现,25 例 survivin 表达阳性组中 MVD 为  $(63.33 \pm 10.36)$  个/HP,显著高于 15 例 survivin 表达阴性组的  $(20.12 \pm 8.47)$  个/HP。提示 survivin 与 MVD 关系密切 ( $P < 0.05$ )。乳腺癌中 survivin 的高表达使 MVD 增加的可能作用机制是:在肿瘤血管生成过程中内皮细胞表达的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导和促进 survivin 的高表达,而高表达的 survivin 抑制了各种指向 caspases 的凋亡机制,从而保护内皮细胞避免了凋亡<sup>[12]</sup>。另有研究报道,survivin 其他促进血管生成可能机制是介导了碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, BFGF)和血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)的作用,从而促血管的生成和稳定血管结构<sup>[13-14]</sup>。总之,survivin 在血管形成的中间环节发挥了具有重要作用。

综上所述,癌细胞脱离原发灶,播散至血循环,是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程,与肿瘤细胞自身生物学特性、机体免疫状况、局部微循环等多因素有关。因此,虽然本研究结果表明 survivin 与乳腺癌新生血管的形成关系密切,但乳腺癌转移的分子机制和过程尚需更进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 张嘉庆,王殊,乔新民. 乳腺癌的现状与远景[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(3):161-163.

[2] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer and Treatment, 1995, 36(2): 169-180.

[3] Zhu L, Lam CK, Chow LW. Sentinel lymph node biopsy or detection of micrometastasis in bone marrow: which might be an alternative to axillary lymph node dissection in breast

cancer patients[J]. Asian J Surg, 2004, 27(4):279-283.

[4] Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(7):881-890.

[5] Ahlgren J, Risberg B, Villman K, et al. Angiogenesis in invasive breast carcinoma-a prospective study of tumor heterogeneity[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(14):64-69.

[6] Nieto Y, Woods J, Nawaz F, et al. Prognostic analysis of tumour angiogenesis, determined by microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy[J]. Br J Cancer, 2007, 97(3):391-397.

[7] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC, et al. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8):917-921.

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

[9] Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein in cancer patients[J]. Cancer Res, 2000, 60(7):1815-1817.

[10] 毛杰,海健,舒衡平,等. 乳腺癌组织中 survivin, P53 蛋白的表达与预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(4):265-268.

[11] 吴万敏,王小娟,孟化. survivin 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(11):868-869.

[12] O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2):393-398.

[13] Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al. Angiotensin-1 inhibits endothelial cell[J]. J Biol Chem, 2000, 275(13):9102-9105.

[14] Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting[J]. Am J Pathol, 2001, 158(5):1757-1765.