

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.10.013

survivin 在甲状腺癌中的表达及与微血管生成的关系

马 静,李晓江,隋 军,杨 洁,王 涵,莫 侨,张 楠

Correlations between Expression of survivin and Microvessel Density in Thyroid Carcinoma

MA Jing, LI Xiao-jiang, SUI Jun, YANG Jie, WANG Han, MO Qiao, ZHANG Nan

Department of Head and Neck Surgery, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Yuannan Tumor Research Center, Kunming 650118, China

Corresponding Author: LI Xiao-jiang, E-mail: xiaojiangle@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To evaluate the relationship between survivin expression and angiogenesis as well as clinicopathological characteristics of differentiated thyroid carcinoma DTC through analysing the expression of survivin and microvessel density (MVD) of DTC. **Methods** Survivin and CD34 expressions were examined immunohistochemically in tissue samples from 56 DTC patients and 10 normal cases. Meantime, the relationship between expressions of survivin and CD34 and clinicopathological characteristics of patients were analyzed. **Results** Expression rate of survivin protein was 75% (42/56) in DTC, and survivin was negative in 10 normal thyroid tissues. Expression rate of survivin was significantly related to the advanced DTC, and cN+ DTC, and the DTC with extracapsular invasion. The MVD was significantly higher in DTC than that in normal thyroid tissue. **Conclusion** The Survivin expression and MVD were upregulated in DTC, indicating survivin was involved to angiogenesis and progress of DTC.

Key words: survivin; Thyroid neoplasm; Immunohistochemistry; Microvessel density

摘 要:目的 探讨 survivin 在分化型甲状腺癌发生发展中的作用及与微血管生成的关系。**方法** 采用免疫组织化学检测 56 例分化型甲状腺癌组织和 10 例正常甲状腺组织 survivin 和 CD34 的表达,并计数微血管密度(MVD),分析分化型甲状腺癌中 survivin 的表达与血管生成的关系。**结果** 甲状腺癌组织中 survivin 蛋白阳性率为 75% (42/56),正常甲状腺组织中无表达。survivin 蛋白在肿瘤组织中的表达与临床分期,颈淋巴结转移,原发灶的包膜侵犯均显著相关。在甲状腺癌组织中,随 survivin 表达增强,MVD 逐渐增高,呈正相关。**结论** survivin 蛋白在分化型甲状腺癌组织中表达上调,并与微血管生成关系密切,提示 survivin 与甲状腺癌的发生、发展有关。

关键词: survivin 基因;甲状腺癌;免疫组织化学;微血管密度

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)10-1149-03

0 引言

甲状腺癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一,约占全身恶性肿瘤的 0.2%(男性)~1%(女性),多发于中青年女性。甲状腺癌是多因素起源的癌基因和抑癌基因相互失衡导致的疾病。survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白,研究发现 survivin 基因在肿瘤组织中过表达是患者预后不良独立的预测指标,其表达水平与肿瘤复发和转移有明显关系。本实验通过

检测甲状腺癌中 survivin 的表达,并用 CD34 标记测定微血管密度(MVD)以观察甲状腺癌新生血管形成情况,探讨 survivin, MVD 与甲状腺癌各种临床病理因素之间的关系以及它们相互之间的联系,探索 survivin 在甲状腺癌血管生成中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源

56 例甲状腺癌组织标本取自 2004 年 1 月—2008 年 12 月云南省肿瘤医院(昆明医学院第三附属医院)病理科存档蜡块,其中男 15 例,女 41 例;年龄 22~65 岁,中位年龄 45 岁。根据 AJCC 标准(2002)确定临床分期:其中Ⅰ期 30 例,Ⅱ期 12 例,Ⅲ期 9 例,Ⅳ期 5 例;乳头状腺癌 42 例,滤泡状腺癌 14 例;有淋巴结转移 20 例,无淋巴结转移 36 例。

收稿日期:2009-05-25;修回日期:2010-07-13
基金项目:云南省教育厅科学基金资助项目(06Y133C)
作者单位:650118 昆明,昆明医学院第三附属医院(云南省肿瘤医院)头颈外科,云南省头颈肿瘤研究中心
通信作者:李晓江, E-mail: xiaojiangle@yahoo.com.cn
作者简介:马静(1978-),男,博士,主治医师,主要从事头颈肿瘤的基础和临床工作

术前未进行治疗,另取同一患者正常甲状腺组织 10 例作为对照组。

1.2 试剂与方法

抗 survivin 抗体、鼠抗人 CD34 单克隆抗体及免疫组织化学 SP 试剂均购自福州迈新生物工程有限公司。采用 SP 法进行免疫组织化学染色,实验步骤按试剂盒说明书进行。石蜡切片经常规脱蜡水化,用 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液行微波抗原修复,DAB 染色,苏木精对比染色、烤片和透明封片,显微镜下观察。磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

survivin 蛋白以细胞质或细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性反应。参照姚济芬^[1]等方法,按阳性细胞所占百分比参考着色强度确定分级如下:阳性细胞数<5%为 0 分;阳性细胞数 5%~25%为 1 分;阳性细胞数>25%~50%为 2 分;阳性细胞数>50%~75%为 3 分;阳性细胞数>75%为 4 分。再根据阳性细胞显色强度记分:无着色为 0 分;轻度染色为 1 分;中度染色为 2 分;重度染色为 3 分。两者得分之和判断阳性等级:0~1 分为阴性(-);2~3 分为弱阳性(+);4~5 分为中等阳性(++);6~7 分为强阳性(+++)。

CD34 以内皮细胞的细胞膜或细胞质部位呈棕黄色为阳性反应,参照 Weidner 等报道的方法:CD34 标记的微血管判定标准是以与背景明显有别的任何一个棕色染色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管,只要结构不相连续,分支结构也作为一个血管计数,表现为棕黄色的内皮细胞形成的条状、隙状结构及有管腔者。计数者在临床资料均不知晓的情况下,低倍镜(×100)选择肿瘤间质中 MVD 最多的区域(热点),再转到中高倍镜(×200)下计数 3 个视野的微血管数,取其平均值作为该例组织的 MVD,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.4 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件包进行统计分析,样本率比较采用 χ^2 检验,均数比较采用 t 检验,survivin 与 MVD 表达的相关性采用 Spearman 等级相关分析。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 survivin 蛋白在分化型甲状腺癌中的表达

survivin 蛋白主要以细胞质阳性染色为主,有些也定位于细胞核,表现为淡黄色至棕黄色颗粒,见图 1。56 例甲状腺癌组织中 survivin 的阳性表达率为 75%(42/56),而在对照组正常甲状腺腺体组织中 survivin 呈阴性表达,两者相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 survivin 在正常甲状腺、甲状腺癌组织中的表达
Table 1 The expression of survivin in normal thyroid tissue and thyroid carcinoma

Groups	n	survivin					Positive rate (%)
		-	+	++	+++	++++	
Normal thyroid	10	10	0	0	0	0	0.00
Thyroid carcinoma	56	14	13	19	10	0	75.00

2.2 甲状腺癌中 survivin 表达与临床特征的相关性

甲状腺癌中 survivin 蛋白的表达与患者年龄、性别、病理类型无明显相关性($P > 0.05$),而 survivin 蛋白在与Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移和包膜受侵犯表达的患者中明显增加($P < 0.05$),见表 2。

表 2 甲状腺癌组织中 survivin 蛋白的表达与临床病理特征的关系

Table 2 The relation between survivin protein expression and clinical pathogenic characteristic

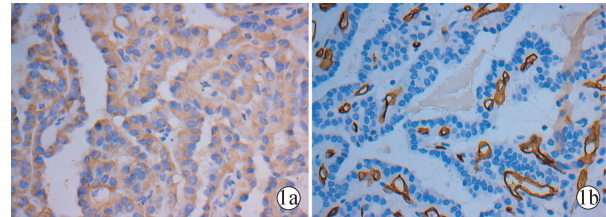
Clinical feature	<i>n</i>	survivin expression	Positive rate (%)	χ^2	<i>P</i>
Gender					
Male	25	18	72.00	1.285	>0.05
Female	31	24	77.41		
Age					
<45	15	11	73.33	1.457	>0.05
≥45	41	31	75.61		
Pathology					
Papillary carcinoma	42	32	76.19	2.186	>0.05
Follicle carcinoma	14	10	71.43		
Clinical stage					
I ~ II	42	29	69.05	5.986	<0.05
III ~ IV	14	13	92.86		
Lymphoid node					
Without	36	22	61.11	6.256	<0.05
With	20	20	100		
Invasion of tegument					
Without	33	19	57.58	6.842	<0.01
With	23	23	100		

2.3 甲状腺癌中 survivin 的表达与 MVD 的关系

CD34 主要着色血管内皮细胞,肿瘤新生血管腔大小不一,形态不规则,分布不均匀,间质微血管密集。阳性棕黄色颗粒定位于细胞质或细胞膜。survivin 表达强阳性组的 MVD 高于其他三组($P < 0.05$),肿瘤组织中随 survivin 表达的增强,MVD 有增多趋势,呈正相关,差异有统计学意义($r = 0.756, P < 0.01$),见表 3、图 1。

表 3 甲状腺癌中 survivin 的表达与 MVD 的关系
Table 3 The relation between survivin protein expression and MVD

survivin	n	MVD ($\bar{x} \pm s$)
-	14	23.65 $\pm$ 9.25
+	13	34.35 $\pm$ 11.06
++	19	40.94 $\pm$ 10.57
+++	10	49.91 $\pm$ 14.02



1a: the expression of survivin in thyroid carcinoma
1b: the expression of MVD in thyroid carcinoma

图 1 Survivin 和 CD34 标记的微血管密度在
甲状腺癌中的表达 (×400)

Figure 1 The expression of survivin and MVD in thyroid
carcinoma (×400)

3 讨论

survivin 是 1997 首先通过效应细胞蛋白酶受体的 cDNA 与人类基因库杂交而分离得到的蛋白,是凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis,IAP)家族中的重要成员,参与抗凋亡、有丝分裂等多种生物学功能的调节,具有不同于家族其他成员的独特性质和结构,被认为是迄今发现的最强的凋亡抑制因子。survivin 的表达具有细胞周期的特异性,选择性表达在细胞周期的 G₂/M 期,抗凋亡作用依赖于细胞周期的 G₂/M 期的检查点^[2]。survivin 基因在多种头颈肿瘤如鼻咽癌、口腔癌中均有较强的表达^[3-4]。本课题通过免疫组织化学染色检测发现:甲状腺癌组织中 survivin 蛋白阳性率为 75%,而非癌组织中均无表达;其在肿瘤组织中的表达与临床分期、颈淋巴结转移及原发灶的包膜侵犯显著相关;而与年龄、性别及病理分型无关 ($P>0.05$)。survivin 的表达与细胞的增殖分化有关,说明 survivin 的异常表达是肿瘤癌变发生发展过程中有效指标之一,可预示肿瘤的侵袭性和恶性程度。Antonaci A^[5]等通过免疫组织化学对 67 例巨大甲状腺乳头状癌患者(其中 37 例并发微小癌的患者)的癌组织和淋巴结转移灶细胞进行 survivin 蛋白检测,发现在同一患者巨大乳头状甲状腺癌组织和微小癌组织中的表达水平没有明显差异。在有侵袭转移的病人中癌组织和淋巴结转移灶其 survivin 蛋白的表达水平明显增高。作者认为 survivin 蛋白的高表达在甲状腺乳头状癌的发生中是一个早期事件,其在临床的应用价值还有待进一步研究。

肿瘤的浸润、转移和复发是造成病人死亡的主要原因之一,无论原发肿瘤、还是转移瘤的形成和生长,

均依赖于血管的形成。本研究结果表明,随着 survivin 表达的增强,MVD 有逐步增多趋势 ($P<0.01$),说明 survivin 能明显促进肿瘤新生血管生成,这与其他研究者对乳腺癌、肺癌、前列腺癌、子宫鳞癌^[6-10]等肿瘤组织 MVD 检测的结果一致,MVD 与甲状腺癌的发生明显相关,联合检测甲状腺癌组织中 survivin 表达与 MVD,可提高预测甲状腺癌侵袭转移的可靠性。survivin 与 MVD 呈正相关可以用 survivin 与其靶基因血管内皮生长因子(vascularendothelial growth factor,VEGF)的调控与被调控关系来解释。随着肿瘤的不断生长、体积增大而形成缺氧微环境以及许多癌基因及抑癌基因的改变,survivin 基因被激活并过度表达,启动 VEGF 基因转录和相应的蛋白表达产物增加,进而 VEGF 与存在于血管内皮细胞表面的 VEGF 受体结合,激活一系列信号转导通路,从而诱导血管生成增多,肿瘤得以继续生长扩大,侵袭周围组织并发生远处转移。鉴于 survivin 重要的生物学特性,survivin 可成为头颈肿瘤在基因治疗方面一个理想的治疗靶点^[11]。

参考文献:

[1] 姚济芬,季银芬,石一复,等. 微血管密度和血管套及血管内皮生长因子在子宫颈癌中的表达[J]. 浙江大学学报(医学版),2003,32(1):62-66.
[2] Altieri DC. Validating Survivin as a cancer therapeutic target[J]. Nat Rev Cancer, 2003(1):46-54.
[3] Li YH, Hu CF, Shao Q, et al. Elevated expressions of Survivin and VEGF protein are strong independent predictors of survival in advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. J Transl Med,2008,6:1.
[4] Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa[J]. J Dent Res,2003,82(11):923-928.
[5] Antonaci A, Consorti F,Mardente S,et al. Survivin and cyclin D1 are jointly expressed in t hyroid papillary carcinoma and microcarcinoma[J]. Oncol Rep, 2008,20(1):63-67.
[6] Oshida K, Nagashima T, Ueda T, et al. Pharmacokinetic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast using dynamic MR mammography[J]. Eur Radiol,2005, 15(7):1353-1360.
[7] Ushijima C, Tsukamoto S, Yamazaki K, et al. High vascularity in the peripheral region of non-small cell lung cancer tissue is associated with tumor progression[J]. Lung Cancer,2001, 34(2):233-241.
[8] Bono AV, Celato N, Cova V, et al. Microvessel density in prostate carcinoma[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis,2002,5 (2):123-127.
[9] Hirakawa T, Kamura T, Kaku T, et al. Prognostic significance of epithelial-stromal vascular cuffing and microvessel density in squamous cell carcinoma of the uterine cervix[J]. Gynecol Oncol,1999,74(3):369-374.
[10] 宋晖,辛晓燕,肖锋. Survivin 基因 RNAi 对子宫颈癌裸鼠移植瘤生长与凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2009,16(4):374-378.
[11] Wang J, Xu Z, Zhang M. Down regulation of Survivin expression and elevation of caspase-3 activity involved in pitava statin induced HepG 2 cell apoptosis[J]. Oncol Rep, 2007,18(2):383-387.