

# 非小细胞肺癌血管内皮生长因子- C 和 Survivin 蛋白的表达及其对患者预后的影响

张惠忠<sup>1</sup>, 魏益平<sup>1</sup>, 华平<sup>1</sup>, 李海刚<sup>2</sup>, 刘金耿<sup>1</sup>, 吴澄<sup>1</sup>, 曹永科<sup>1</sup>  
(中山大学附属第二医院 1.心胸外科, 2. 病理科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】研究血管内皮生长因子- C(VEGF- C)和 survivin 蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及其与肺癌生物学行为的关系。【方法】应用免疫组化方法检测 77 例 NSCLC 组织中 VEGF- C 和 survivin 蛋白的表达,分析其与肿瘤大小、肿瘤淋巴管密度(LVD)、组织类型、分化程度、淋巴结转移、临床复发情况和患者术后生存时间的关系。【结果】77 例 NSCLC 组织中,有 45 例 VEGF- C 蛋白表达呈阳性(58.4%);有 41 例 survivin 蛋白表达呈阳性(53.2%)。VEGF- C 蛋白的阳性表达组肿瘤大小和 LVD 均高于阴性组( $P < 0.05$ ), VEGF- C 蛋白的表达与患者术后生存时间呈负相关 ( $P < 0.05$ )。Survivin 蛋白的阳性表达组的 LVD 高于阴性组 ( $P < 0.05$ ), survivin 蛋白的表达与 NSCLC 淋巴结转移( $r = 0.324, P < 0.05$ )和临床复发呈正相关( $r = 0.233, P < 0.05$ ), 与患者术后生存时间呈负相关( $P < 0.05$ )。VEGF- C 和 survivin 蛋白在 NSCLC 组织中的表达之间呈正相关性( $r = 0.266, P < 0.05$ )。【结论】VEGF- C 和 survivin 蛋白的表达与非小细胞肺癌的生物学行为具有相关性,它们的高表达提示非小细胞肺癌患者预后不良。

关键词: 肺肿瘤; 免疫组织化学; VEGF- C; survivin; 预后

中图分类号: R655; R730.3

主献标识码: A

文章编号:1672- 3554(2006)06- 0681- 05

## Expression of Vascular Endothelial Growth Factor- C and Survivin Protein in Non- small Cell Lung Carcinoma and Its Effect on the Patients Prognosis

ZHANG Hui- zhong, WEI Yi- ping, HUA Ping, LI Hai- gang, LIU Jin- geng, WU Cheng, CAO Yong- ke  
(1. Department of Heart and Chest Surgery; 2. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the expression of vascular endothelial growth factor- C (VEGF- C) and survivin proteins, and its relationship with biological behaviors of non- small cell lung carcinoma (NSCLC). 【Methods】Immunohistochemical staining was used to detect the expression of VEGF- C and survivin proteins in 77 cases of NSCLC. The relationship was analyzed between the expression of VEGF- C, survivin and tumor size, lymphatic vessel density (LVD), histological type, differentiation, lymphoid nodular metastasis, clinical recurrence and survival time of the patients. 【Results】Out of 77 cases of NSCLC, 45 cases (58.4%) showed positive expression of VEGF- C protein and 41 cases (53.2%) showed positive expression of survivin protein, respectively. Both tumor size and LVD were larger in the positive expression group of VEGF- C than the negative one ( $P < 0.05$ ). The expression of VEGF- C protein was associated negatively with the survival time ( $P < 0.05$ ). The LVD was larger in positive expression group of survivin than negative one ( $P < 0.05$ ). The expression of survivin was associated with lymphoid nodular metastasis ( $r = 0.324, P < 0.05$ ) and clinical recurrence positively ( $r = 0.233, P < 0.05$ ) and was associated the survival time negatively ( $P < 0.05$ ). The expression of VEGF- C was associated with the expression survivin proteins positively ( $r = 0.266, P < 0.05$ ). 【Conclusion】The expressions of VEGF- C and survivin proteins are closely associated with the biological behaviors of NSCLC, those high expressions suggest poor prognosis.

Key words: lung neoplasms; immunohistochemistry; vascular endothelial growth factor C; survivin; prognosis

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):681- 685]

收稿日期: 2006-08-22

基金项目: 广州市科委科技攻关引导资助项目(02Z3- E0016)

作者简介: 张惠忠(1963- ),男,广东阳江人,医学硕士,副教授,主要从事肺、食管肿瘤的研究. E- mail:zhzhgd@163.com

肺癌是我国常见的癌肿之一,癌细胞的侵袭转移是影响肺癌患者预后的重要因素。为此,如何从基因上抑制癌细胞的浸润转移一直是近年来分子生物学方面的研究热点。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是肿瘤转移的相关基因<sup>[1]</sup>,它可以诱导肿瘤内部新生淋巴管形成和肿瘤组织周围淋巴管扩张,其表达强度与淋巴结转移和患者的预后有密切关系<sup>[2]</sup>;Survivin 是抑制细胞凋亡基因家族中的重要成员,它具有调节细胞周期的作用,并与肿瘤的临床分期和淋巴结转移有密切关系<sup>[3]</sup>。本文应用免疫组织化学染色,检测 77 例非小细胞肺癌(non small cell lung carcinoma, NSCLC)组织中 VEGF-C 和 survivin 蛋白的表达情况,研究这两种蛋白的表达与肿瘤大小、淋巴管密度(lymphatic vessel density, LVD)、组织类型、分化程度、临床分期、肿瘤复发、淋巴结转移和术后生存时间的关系,为进一步探讨应用 VEGF-C 和 survivin 抑制剂改善 NSCLC 患者的预后提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

我院胸外科 1997-1999 年手术切除并经病理证实的 NSCLC 77 例,男性 61 例,女性 16 例。年龄 27~77 岁,中位年龄 61 岁。患者术前均未进行放、化疗,随访 5 年以上,生存期 2~72 个月(中位生存时间 17.5 个月);所有标本均用体积分数 10%的甲醛固定,石蜡包埋切片,厚 4  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 免疫组化检测

VEGF-C 和 SABC 试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。用微波炉进行抗原修复(解冻档,10 min)。一抗(稀释度均为 1:50,稀释剂为 PBS)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,其余步骤参考链霉素亲和素-生物素辣根过氧化物酶(SABC)试剂盒介绍的方法进行操作。双花扁豆凝集素(DAB)显色。

Survivin(多克隆抗体)为 Santa Cruz 公司产品。将 survivin 染色的切片分别先行微波和高温高压抗原修复,一抗的稀释度为 1:50,试剂盒为即用型。染色按 SP 法进行。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性的喉鳞癌组织切片作阳性对照。

淋巴管的标记采用抗内皮生长因子相关抗原抗体(FITC-VEGF)和 3,3'-二氨基联苯胺型胶原双重标记法进行。多克隆抗体 F

、鼠抗人单克隆抗体 型胶原(CIV94)和 SP 双染试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。FITC-VEGF 和 3,3'-二氨基联苯胺型胶原分别用 DAB 和 BCIP/NBT 染色,即内皮细胞染成黄棕色,基底膜染成暗紫色,仅染成棕色而无暗紫色的脉管为淋巴管。

### 1.3 结果判断

VEGF-C 和 survivin 蛋白均表达于细胞浆(呈棕色)。VEGF-C 和 survivin 蛋白的判断:在高倍镜下取 4 个不同视野各计数 200 个癌细胞,阳性细胞数>10%为阳性,阳性细胞数  $\leq$  10%为阴性<sup>[4]</sup>。LVD 的计算方法:用低倍镜( $\times 40$ )观察切片,选择淋巴管最多的区域(hot spot),以 200 倍显微镜计算 3 个视野的淋巴管总数作为每个病例的 LVD,棕染的细胞为淋巴管内皮细胞,未染色的为管壁的基底膜。

### 1.4 统计分析

数据用 SPSS11.5 计算,均数的比较采用 t 检验,率的比较用  $\chi^2$  检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线法和 Log Rank 检验,用 Pearson 法计算相关系数。检验水准,设  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

77 例 NSCLC 组织中,有 45 例 VEGF-C 蛋白和 41 例 survivin 蛋白呈阳性表达,阳性表达率分别为 58.4%和 53.2%(图 1,2)。棕染的细胞为淋巴管内皮细胞,未染色的为管壁的基底膜(图 3)。

### 2.1 NSCLC 组织中 VEGF-C 蛋白的表达与临床病理指标的关系

VEGF-C 蛋白表达阳性组和阴性组的肿瘤直径和 LVD 的差异经 t 检验,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1);高、中、低分化组 VEGF-C 蛋白的阳性表达率分别为 31.3%(5/16),51.9%(14/27),76.5%(26/34),差异有统计学意义( $\chi^2=2.9094$ , $P < 0.05$ ,表 2)。VEGF-C 蛋白表达阳性组和阴性组的术后中位生存时间分别为 11 月和 29.5 月,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 4)。VEGF-C 蛋白的表达与组织学类型、淋巴结转移和肿瘤复发均无关( $P > 0.05$ ,表 2)。

### 2.2 NSCLC 组织中 survivin 蛋白的表达与临床病理指标的关系

Survivin 蛋白阳性组和阴性组 LVD 比较,差异有统计学意义( $t=-3.469$ , $P < 0.05$ ,表 1);Survivin

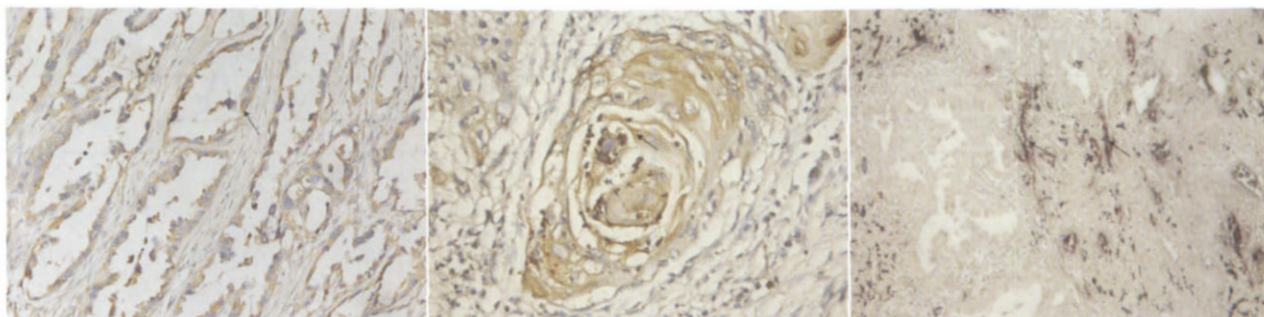


图 1 肺癌 VEGF- C 蛋白免疫组化染色癌细胞浆呈阳性表达

图 2 肺癌 Survivin 蛋白免疫组化染色癌细胞浆呈阳性表达

图 3 肺癌淋巴管内皮细胞染色

Fig.1 Expression of VEGF- C protein detected by immunohistochemical staining in carcinoma of lung (yellow brown, SP, x200)

Fig.2 Expression of Survivin protein detected by immunohistochemical staining in carcinoma of lung (yellow brown, SP, x200)

Fig.3 Lymphatic vessel endothelial cell staining in carcinoma of lung(yellow brown, SP, x200)

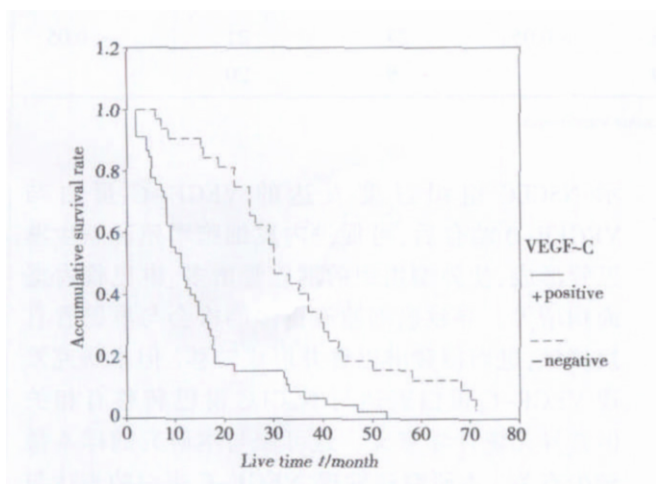


图 4 NSCLC 癌组织中 VEGF- C 蛋白的表达与患者术后生存期的关系

Fig.4 Relationship between expression of VEGF- C protein and the patients survival time after operation

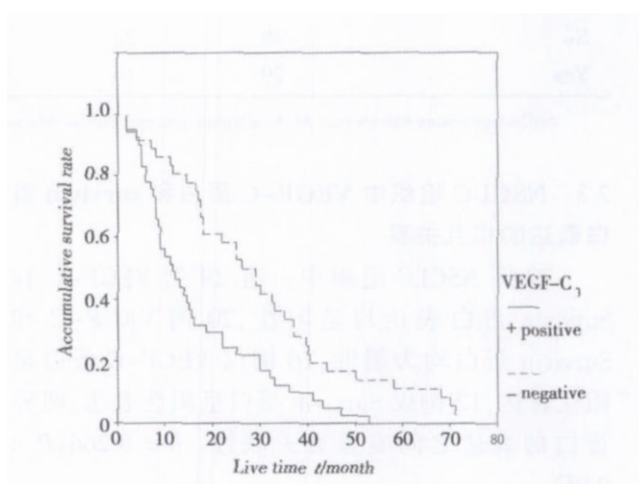


图 5 NSCLC 癌组织中 survivin 蛋白的表达与患者术后生存期的关系

Fig.5 Relationship between expression of survivin protein and the patients survival time after operation

蛋白的表达与 NSCLC 淋巴结转移和临床复发呈正相关, 相关系数分别为 0.324 和 0.233 二者差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 2)。Survivin 蛋白表达阳性组和阴性组的术后中位生存时间分别为 8.5

月和 25.5 月, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 5)。Survivin 蛋白的表达与肿瘤大小、组织学类型、分化程度均无关 ( $P > 0.05$ , 表 1,2)。

表 1 VEGF- C 和 survivin 蛋白在肺癌组织中的表达及与肿瘤大小和 LVD 的关系

Table 1 Relation of expression of VEGF- C and survivin protein with clinical pathological remarks ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	VEGF- C		P	Survivin		P
	-	+		-	+	
Tumor size(cm)	4.5 ± 2.2	6.8 ± 3.3	< 0.01	5.8 ± 3.2	5.8 ± 3.0	> 0.05
LVD	7.8 ± 1.4	10.1 ± 2.5	< 0.01	8.2 ± 1.9	10.0 ± 2.5	< 0.05

LVD: lymphatic vessel density

表 2 VEGF- C 和 survivin 蛋白在肺癌组织中的表达及与肿瘤大小和 LVD 的关系

Table.2 Relation of expression of VEGF- C and survivin protein with clinical pathological remarks

( $\bar{x} \pm s$ )

Group	VEGF- C			P	Survivin		P
	n	-	+		-	+	
Histological type							
SqCa	27	10	17		14	13	
ACA	47	21	26	> 0.05	22	25	> 0.05
AdCa	3	1	2		0	3	
Differentiation							
Well	16	11	5		10	6	
Mediate	27	13	14	< 0.05	10	17	> 0.05
Low	34	8	26		16	18	
Lymphoid node Metastasis							
No	38	19	19	> 0.05	24	14	< 0.05
Yes	39	13	26		12	27	
Recurrence							
No	48	22	26	> 0.05	27	21	< 0.05
Yes	29	10	19		9	20	

SqCa: squamous carcinoma; ACA: adenocarcinoma; AdCa: adenosquamous carcinoma

### 2.3 NSCLC 组织中 VEGF- C 蛋白和 survivin 蛋白表达的相互关系

77 例 NSCLC 组织中, 有 29 例 VEGF- C 和 Survivin 蛋白表达均呈阳性, 20 例 VEGF- C 和 Survivin 蛋白均为阴性, 16 例仅 VEGF- C 蛋白呈阳性表达, 12 例仅 Survivin 蛋白呈阳性表达, 两种蛋白的表达之间有显著关联性 ( $r = 0.266, P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

### 3.1 VEGF- C 蛋白对肺癌患者临床预后的影响

癌组织内存在淋巴管, 而且其分布贯穿整个肿瘤组织。VEGF- C 蛋白是淋巴管内皮细胞增殖和趋化的特异性诱导因子, 经旁分泌的方式分泌后, 与受体 VEGFR- 2 和 VEGFR- 3 结合, 使受体产生自身磷酸化, 通过细胞浆内的信息传递, 增加有丝分裂活动, 导致内皮细胞增殖和新生淋巴管形成。Miyata 等<sup>[9]</sup>发现 VEGF- C 蛋白的表达与淋巴管生成数量呈正比, 与淋巴结转移呈显著正相关。

本研究表明, VEGF- C 蛋白的表达与肿瘤组织的大小、LVD 呈正相关, 与肿瘤细胞分化程度和患者术后生存时间呈负相关, 即 VEGF- C 蛋白的阳性表达率越高, 肿瘤越大、LVD 越高、患者预后越差。该结果与国内其它肿瘤研究结果相似<sup>[9]</sup>。提

示 NSCLC 组织过度表达的 VEGF- C 蛋白与 VEGFR- 3 结合后, 可促进内皮细胞增殖和新生淋巴管形成, 使肿瘤组织的淋巴管增多, 淋巴管占据面积增大, 导致癌细胞有更多的机会与淋巴管直接接触, 进而侵袭淋巴管并形成转移。但本研究发现 VEGF- C 蛋白表达与 NSCLC 淋巴转移有相关但差异无统计学意义, 这可能与本研究的样本量较少有关。本研究还发现, VEGF- C 蛋白的表达与组织分化程度呈负相关, 即随着肿瘤组织分化程度的增高, VEGF- C 蛋白的表达明显降低, 提示分化越差的肿瘤, 表达 VEGF- C 蛋白的能力越强, 越容易诱导淋巴管内皮细胞增殖, 促进新生淋巴管形成和癌细胞的淋巴道转移。上述结果为我们进一步应用 VEGF- C 蛋白的抑制剂, 阻止癌细胞通过淋巴系统转移, 延长患者的生存时间提供了理论依据。

### 3.2 Survivin 蛋白对肺癌患者临床预后的影响

Survivin 蛋白是抑制细胞凋亡蛋白家族中的重要成员, 是迄今为止发现的最强凋亡抑制因子<sup>[9]</sup>。它在多种肿瘤组织中均有表达, 但在正常组织中很少检测到。Blanc- Brude 等<sup>[7]</sup>发现 survivin 蛋白通过级联式激活并溶解蛋白质, 主要抑制 Caspase- 3 和 Caspase- 7 的活性, 阻断细胞的凋亡, 从而使细胞获得永生性。

本研究发现 survivin 蛋白的表达与 NSCLC 的

LVD、淋巴结转移、肿瘤复发和患者的预后有密切关系,即 survivin 蛋白的表达越高,其对癌细胞凋亡抑制的能力越强,癌细胞的生存能力也相应增强,由此导致肿瘤复发和淋巴结转移,使患者的术后生存期缩短。因此, survivin 蛋白的高表达提示肺癌患者的预后不良<sup>[8]</sup>。Guan 等<sup>[9]</sup>研究发现肿瘤组织中 survivin 蛋白过度表达通常提示预后较差且对放、化疗的敏感性较低;用 RNA 干扰 survivin 蛋白的表达可诱导胰腺癌细胞凋亡,抑制肿瘤生长,并提高肿瘤对放、化疗的敏感性。这提示我们 survivin 蛋白将是治疗 NSCLC 的一个新靶点。

### 3.3 VEGF-C 与 survivin 蛋白的关系

VEGF-C 和 survivin 蛋白均为肿瘤发生和转移的相关基因。肿瘤及其转移靶器官的微环境均有产生 VEGF-C 和 survivin 蛋白的能力,它们对转移癌细胞的停泊、生长、淋巴管和血管生成都起到重要作用。本研究结果显示,在肺癌组织中 VEGF-C 和 survivin 蛋白的表达之间存在正相关性,但二者之间相互作用的分子机制仍有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] SKOBE M, HAWIGHORST T, JACKSON D G, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF - C promotes breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7 (2):192- 198.
- [2] GOMBOS Z, XU X, CHU C S, et al. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early- stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(23): 8364- 8371.
- [3] ZAFFARONI N, PENNATI M, DATDONE M G, et al. Survivin as a target for new anticancer interventions [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360- 372.
- [4] SU J L, SHIH J Y, YEN M L, et al. Cyclooxygenase- 2 induces EP1 - and HER - 2/Neu - dependent vascular endothelial growth factor - C up - regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(2):554- 564.
- [5] MIYATA Y, KANDA S, OHBA K, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors- A, - C, and - D [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(3): 800- 806.
- [6] 唐海阔, 黄洪章, 潘朝斌, 等. 舌鳞癌 VEGF-C 表达及癌周淋巴管增殖与颈淋巴结转移的关系[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 24(4): 375- 377.
- [7] BLANC - BRUDE O P, MESRI M, WALL N R, et al. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor - associated angiogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2683- 2692.
- [8] MIZUKI IKEHARA, FUMIHIRO OSHITA, YOICHI KAMEDA, et al. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung [J]. Oncology Reports, 2002, 9(4): 835- 838.
- [9] GUAN H T, XUE X H, DAI Z J, et al. Down - regulation of survivin expression by small interfering RNA induces pancreatic cancer cell apoptosis and enhances its radiosensitivity[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(18): 2901- 2907.

(编辑 张敏瑞)