

# Survivin 及 VEGF 在脉络膜黑色素瘤的表达及其与血管形成的关系

赵晓娟 李 彬 李辽青 高 飞 孙宪丽

## Relationship of survivin and VEGF with angiogenesis in choroidal melanoma

Zhao Xiaojuan, Li Bin, Li Liaoqing, Gao Fei, Sun Xianli. Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Affiliated Capital University of Medical Science, Beijing 100730, China

**Abstract Objective** Survivin is a vascular sheltered gene and it is associated with tumor neovascularization. Present study aimed to investigate the correlation of survivin and vascular endothelial growth factor (VEGF) with microvessel density (MVD) in choroidal melanoma and explore the mechanism of survivin as a anti-tumorigenesis factor. **Methods** Fifty-eight specimens of choroidal melanoma tissue were collected, and 8 specimens of normal choroid tissue were obtained from normal eyes of donors in eye bank of Beijing Tongren Hospital. The expression of survivin and VEGF in collected specimens was detected by using immunohistochemistry. New blood vessel in choroidal melanoma tissue was marked with CD105 using immunohistochemistry. **Results** The expression of survivin and VEGF in choroidal melanoma was 69% and 74%, respectively. No expression of survivin and VEGF was detected in normal choroid tissue. No significant differences were found between survivin or VEGF and age, tumor size, maximum tumor diameter, sclera infiltration of tumor ( $P > 0.05$ ). Expression rates of survivin and VEGF were significantly enhanced in the specimen with invasion of scleral emissaria in comparison with specimen without invasion of scleral emissaria ( $P < 0.05$ ). MVD was considerably increased in positive expressed specimen of survivin or VEGF compared with absent expression ( $P < 0.05$ ). The expression of survivin was closely correlated to expression of VEGF ( $r = 0.522, P < 0.01$ ). **Conclusion** Survivin and VEGF have intimate relation in angiogenesis. Survivin provide a new target therapy for choroidal melanoma.

**Key words** choroidal tumor; melanoma; survivin; vascular endothelial growth factor; immunohistochemistry

**摘要 目的** 研究脉络膜黑色素瘤(CM)组织中 survivin、血管内皮生长因子(VEGF)与微血管密度(MVD)的相关性,探讨 survivin 的作用机制。 **方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 survivin、VEGF 在 58 例 CM 组织和 8 例正常脉络膜组织中的表达,利用 CD105 标记 CM 组织的新生血管。 **结果** 58 例 CM 组织中 survivin 蛋白表达阳性率为 69%,VEGF 阳性率为 74%,二者在正常脉络膜组织中均不表达。Survivin 和 VEGF 与患者在不同年龄、肿瘤大小、最大基底径、肿瘤生长方式、巩膜壁浸润与否间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但与 CM 的巩膜导管侵犯与否间的比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );survivin、VEGF 在 CM 组织中的表达与否与 MVD 的比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );survivin 和 VEGF 在 CM 组织中的表达密切相关( $r = 0.522, P < 0.01$ )。 **结论** Survivin 和 VEGF 在血管生成过程中密切相关,survivin 蛋白可作为 CM 靶向治疗的靶点。

**关键词** 脉络膜肿瘤; 黑色素瘤; survivin; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学

**分类号** R 773.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0770-04

Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis

protein, IAP)家族的成员,具有极强的抗凋亡作用,还有保护肿瘤血管和调节细胞周期等多种生物学活性<sup>[1]</sup>。Survivin 在肿瘤血管生成中的作用,目前国内研究较少。本实验拟用免疫组织化学法研究脉络膜黑色素瘤(choroidal melanoma, CM)组织中 survivin、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,

本课题为北京市卫生局科技创新与推广项目基金资助(2003—2005年)

作者单位:100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所(赵晓娟,硕士研究生,现在北京航天总医院眼科 100076)

通讯作者:李彬(E-mail:libin43\_99@yahoo.com)

VEGF)与微血管密度(microvessel density, MVD)的关系,探讨 survivin 的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料来源** 选取 2002 年 8 月—2004 年 8 月北京同仁医院眼科病理室存档的 CM 石蜡标本 58 例,其中男 32 例,女 26 例;年龄 11~70 岁,平均 43 岁。其中梭形细胞型 25 例,混合细胞型 27 例,上皮细胞型 6 例;侵犯巩膜导管 20 例,未侵犯巩膜导管 38 例。正常葡萄膜组织标本 8 例取自正常供体眼球。

**1.1.2 主要试剂** 鼠抗人 CD105 单克隆抗体(英国 Novocastra 公司);鼠抗人 survivin 单克隆抗体、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 苏木精-伊红染色及免疫组织化学检测** 所有组织标本均经 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,每个蜡块 4 μm 厚连续切片 10 张,取其中 1 张行苏木精-伊红染色进行诊断分类。所有病例均经 2 名以上病理专家进行诊断并予以分类。剩余 9 张切片进行免疫组织化学 SP 法染色,按试剂盒说明方法操作。枸橼酸微波加热修复抗原,分别加入鼠抗人 CD105 单克隆抗体(1:50)、鼠抗人 survivin 单克隆抗体(1:200)、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(1:200),DAB 显色,苏木素复染。用已知的阳性切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作为空白对照。

**1.2.2 结果判断** 肿瘤细胞胞浆呈黄色、棕黄色染色为 survivin 和 VEGF 表达阳性,强度根据阳性物质着色深浅及阳性细胞的百分比分为 4 级<sup>[1]</sup>,对每张切片阳性细胞的阳性强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别记为 0、1、2、3 分;任意选取 5 个高倍视野(×400),计数 500 个肿瘤细胞,按照阳性细胞所占百分比记分:阳性细胞小于 5% 为 0 分,5%~<25% 为 1 分,25%~<50% 为 2 分,50%~<75% 为 3 分,≥75% 为 4 分,然后根据 2 项记分之和判断结果。两者之和 ≥2 分可判为阳性,阳性又以分值不同:2~3 分记作(+),4~5 分记作(++),6~7 分记作(+++)。按 Weidner 等<sup>[2]</sup>报道的微血管计数方法计数微血管量。凡孤立的或多个紧密排列的棕黄色或棕褐色的内皮细胞团,只要与邻近肿瘤细胞及周围结缔组织分界清楚,无论是否有血管腔,即可计数为 1 个微血管数。400 倍镜下观察,选取 5 个血管丰富的视野,即棕黄色密度最高区域,于 200 倍镜下计数被 CD105 染成棕黄色的

血管数目,取平均值作为该病例的 MVD 值。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计学分析。Survivin、VEGF 的表达与各病理因素间的比较采用  $\chi^2$  检验,survivin 与 VEGF 的关系采用 Spearman 秩相关分析,survivin、VEGF 表达与 MVD 的比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CM 与正常脉络膜组织 survivin、VEGF 的表达

Survivin、VEGF 的阳性染色主要位于细胞质或胞浆中,为大小不等的棕黄色颗粒,阳性细胞呈弥漫性分布(图 1-6)。CM 组织 survivin 蛋白阳性表达率为 69% (40/58);VEGF 蛋白阳性表达率为 74% (43/58)。正常脉络膜组织中未见 survivin、VEGF 蛋白的阳性表达。

### 2.2 Survivin、VEGF 的表达与 CM 组织病理学特征的关系

Survivin、VEGF 在不同年龄的患者,不同大小、不同最大基底径、不同生长方式及是否有巩膜壁浸润等肿瘤组织中的表达差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。梭形细胞型、混合细胞型、上皮样细胞型 survivin、VEGF 的阳性表达率有增高趋势,但差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。Survivin、VEGF 在有巩膜导管侵犯组阳性表达率均高于无巩膜导管侵犯者( $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 Survivin 和 VEGF 的表达与 CM 组织病理学特征的关系  
Table 1 The relationship of survivin/VEGF expression and histopathological feature

Group	N	Survivin		VEGF		
		Positive(n/%)	P	Positive(n/%)	P	
Age	< 30	7	3/42.9	>0.05	4/57.1	>0.05
	30-50	35	27/77.1		30/85.7	
	> 50	16	10/62.5		9/56.3	
Growth pattern	Nodular	34	23/67.6	>0.05	25/73.5	>0.05
	Mushroom	22	15/68.2		16/72.7	
	Diffuse	2	2/100.0		2/100.0	
Type of tumor	Spindle-cell	25	14/56.0	>0.05	16/64.0	>0.05
	Mixed-cell	27	21/77.8		22/81.5	
	Epithelioid-cell	6	5/83.3		5/83.3	
Tumor volume	Little	1	0/0.0	>0.05	1/100.0	>0.05
	Medium	5	2/40.0		3/60.0	
	Large	52	38/73.1		39/75.0	
Largest tumor dimension	≤ 10 mm	18	13/72.2	>0.05	14/77.8	>0.05
	10-15 mm	19	14/73.7		15/78.9	
	≥ 15 mm	21	13/61.9		14/66.7	
Sclera canal	Noninvasion	38	22/57.9	<0.05	25/65.8	<0.05
	Invasion	20	18/90.0		18/90.0	
Sclera	Noninvasion	47	32/68.1	>0.05	33/70.2	>0.05
	Invasion	11	8/72.7		10/90.1	
Total	58	40/69.0		43/74.0		

( $\chi^2$  test)

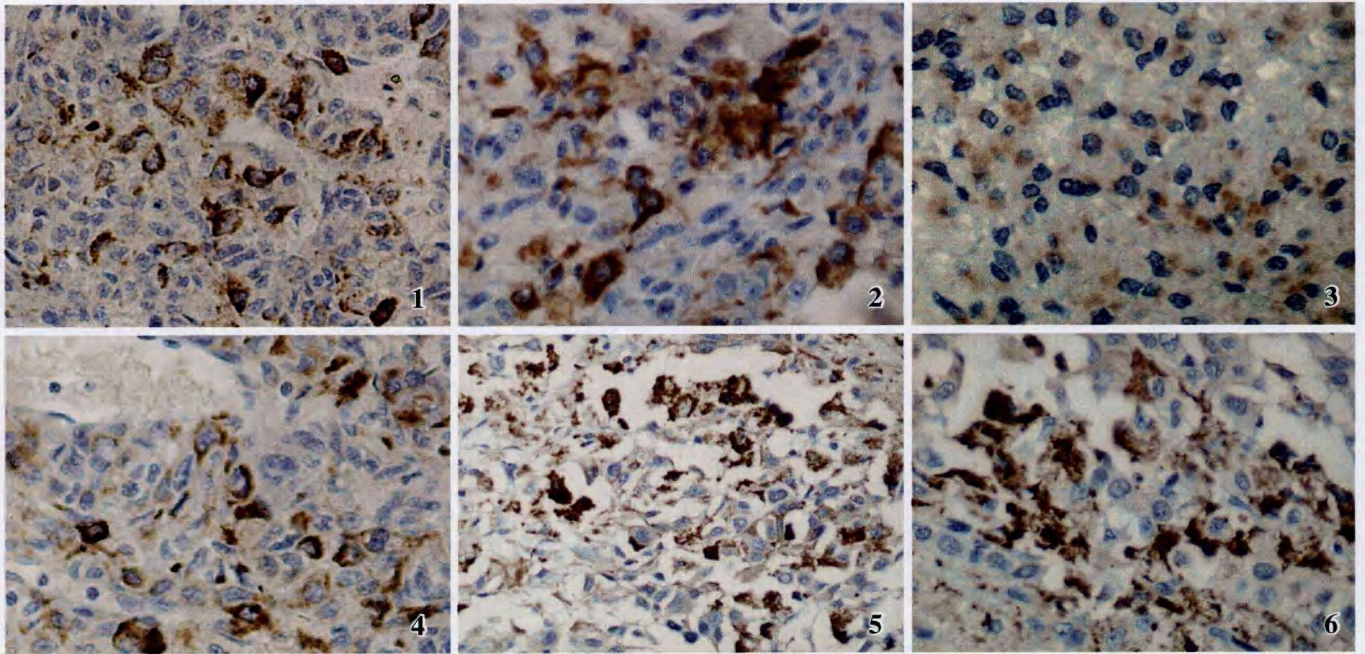


图1 VEGF在梭形细胞型CM中表达,胞浆呈棕黄色(SP × 400) 图2 VEGF在混合细胞型CM中表达,胞浆呈棕黄色(SP × 400) 图3 VEGF在上皮样细胞型CM中表达,胞浆呈棕黄色(SP × 400) 图4 Survivin在梭形细胞型CM中表达,胞浆呈棕黄色(SP × 400) 图5 Survivin在混合细胞型CM中表达,胞浆呈棕黄色(SP × 400) 图6 Survivin在上皮样细胞型CM中表达,胞浆呈棕黄色(SP × 400)

Fig.1 VEGF is positively expressed in spindle-cell type of choroidal melanoma, showing the brown-yellow staining in cytoplasm (SP × 400) Fig.2 VEGF is positively expressed in cytoplasm of mixed-cell type of choroidal melanoma (SP × 400) Fig.3 VEGF is positively expressed in cytoplasm in epithelioid-cell type of choroidal melanoma (SP × 400) Fig.4 Survivin is positively expressed in cytoplasm in spindle-cell type of choroidal melanoma of (SP × 400) Fig.5 Survivin is positively expressed in cytoplasm in mixed-cell type of choroidal melanoma (SP × 400) Fig.6 Survivin is positively expressed in cytoplasm in epithelioid-cell type of choroidal melanoma (SP × 400).

2.3 CM组织中 survivin 与 VEGF 蛋白表达的关系

Survivin 和 VEGF 蛋白在 CM 组织中表达的阳性等级数见表 2, 经 Spearman 秩相关分析, 呈正相关 ( $r = 0.522, P < 0.01$ )。

表2 Survivin 与 VEGF 在 CM 中表达的关系(n)

Table 2 Relationship of survivin and VEGF expression in CM (n)

Survivin	VEGF				Total
	-	+	++	+++	
-	10	4	3	1	18
+	4	9	2	1	16
++	1	6	7	7	21
+++	0	1	1	1	3
Total	15	20	13	10	58

2.4 CM组织中 survivin、VEGF 蛋白表达与 MVD 表达的关系

Survivin 和 VEGF 阳性表达肿瘤组织的 MVD 高于阴性肿瘤组织的 MVD ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

2.5 Survivin 与 VEGF 双阳性表达与巩膜导管侵犯情况的关系

Survivin 与 VEGF 双阳性表达在侵犯巩膜导管组阳性率为 80% (16/20), 未侵犯巩膜导管组为 50% (19/38), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 4)。

表3 CM中 survivin 及 VEGF 与 MVD 表达的关系( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Relationship of survivin or VEGF and microvessel density in CM ( $\bar{x} \pm s$ )

		MVD	t	P
Survivin	Positive	45.53 ± 6.33	2.26	< 0.05
	Negative	41.11 ± 5.42		
VEGF	Positive	45.63 ± 6.16	2.35	< 0.05
	Negative	39.93 ± 4.99		

(Student's t test)

表4 CM中 survivin、VEGF 双阳性与巩膜导管受侵犯的关系(n)  
Table 4 The relations of invasion sclera canal with double positive expression of survivin and VEGF in CM (n)

Group	N	Positive expression number
Noninvasion sclera canal	38	19
Invasion sclera canal	20	16
$\chi^2$		4.93
P		< 0.05

( $\chi^2$  test)

### 3 讨论

凋亡抑制蛋白 survivin 是 IAP 家族中独特结构的新成员, Ambrosini 等<sup>[3]</sup>用效用细胞蛋白酶受体-1 cDNA 在人类基因组文库中筛选出的基因, 它只含有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列 (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat, BIR) 结构, 羧基末段缺乏锌指结构, 代以交联螺旋结构。

本研究发现, survivin 在 CM 中的表达率为 69%, 而在正常脉络膜组织中未见表达。梭形细胞型、混合细胞型、上皮样细胞型中 survivin 的阳性表达率分别为 56%、77.8%、83.3%, 提示随着细胞恶性程度的增加, 其 survivin 的阳性表达率有所增加。但经  $\chi^2$  检验差异有统计学意义, 尚不能说明组织病理学类型和 survivin 的表达两者之间具有相关性, 其结果可能受样本量以及患者来源等影响。本研究发现, 巩膜导管侵犯组 survivin 的表达阳性率显著高于无巩膜导管侵犯组, 因而 survivin 可能在 CM 的形成过程中起重要作用, 且对肿瘤的转移有促进作用。

本研究还发现, survivin 和 VEGF 的表达呈正相关, 提示促血管生成因子对 CM 的发生发展, 特别是在促进血管形成方面, 可能有 survivin 的参与。此外, 两者同时表达时 CM 发生巩膜导管侵犯较高, 说明 survivin 和 VEGF 之间关系密切, 在肿瘤转移中有重要作用。

由于新生血管生成在肿瘤浸润、转移中的关键作用, 所以客观准确地反映血管新生程度尤为重要。von Willebrand 因子、CD31 和 CD34 是所有血管内皮细胞的标记物, 而 CD105 的抗体优先结合于激活的内皮细胞和正在参与血管形成的内皮细胞, 这些细胞均高表达 CD105<sup>[4]</sup>。Kumar 等<sup>[5]</sup>采用 CD105 抗体观察了 106 例乳腺癌组织中 MVD 与患者预后的相关性, 多因素分析显示用 CD105 测定 MVD 值是一个独立的预后指标, 能定量区别肿瘤新生血管和已存在血管。王凤华等<sup>[6]</sup>用 FVIII-Rag 和 PAS 标记肿瘤 MVD, 发现随着 CM 恶性程度的升高、局部浸润的发生, 肿瘤微血管的形成亦相应增加。本研究采用 CD105 计数微血管数, 结果显示, survivin 和 VEGF 阳性表达组的 MVD 显著高于阴性表达组, 提示其在 CM 血管生成中占有重要地位。

Blanc-Brude 等<sup>[7]</sup>研究发现, 在血管受损时, survivin 表达升高。O' Connor 等<sup>[8]</sup>应用 VEGF 和 bFGF 诱导静止期内皮细胞分裂, 检测 survivin 表达水平, 结果血管内皮细胞内 survivin 含量升高了 16 倍, 6~10 h 达峰值。Mesri 等<sup>[9]</sup>用 survivin 反义寡核苷酸作用于血管内皮细胞后, VEGF 和 bFGF 的促血管形成作

用被抑制, 导致内皮细胞凋亡和毛细血管迅速退化。这些结果提示 survivin 可能是血管形成中生长因子诱导的保护性基因, 维持血管内皮细胞的正常增生。

Tran 等<sup>[10]</sup>在对肿瘤耐药机制的研究中发现, VEGF 在对抗体内化疗药物诱导的内皮细胞凋亡过程中充当强有力的拮抗剂。VEGF 诱导的 survivin 表达可能既充当了内皮细胞免受化学疗法诱导的凋亡效应影响的盾牌, 又保证了微血管动力效应的完整性, 这可能是内皮细胞耐药的先决条件。

综上所述, survivin 不仅可以抑制肿瘤细胞的凋亡, 而且可以抑制肿瘤血管内皮细胞的凋亡。促血管因子 VEGF 在肿瘤细胞中高表达, 不仅直接促进血管的形成, 还可诱导 survivin 表达, 产生抗凋亡作用, 引起血管过度增生。两者共同作用, 促进血管形成。由于 survivin 特异地表达于肿瘤细胞, 故可考虑抑制 survivin 的表达来治疗肿瘤。靶向 survivin 的治疗既可以阻止肿瘤的发生发展, 又可抑制肿瘤的血管生成并增加肿瘤对化疗药物的敏感性, 可以使抗肿瘤过程中对正常组织的损害减小到最低。但同时靶向 survivin 和 VEGF 是否更具治疗优势尚待进一步研究。

### 参考文献

- 1 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1808 - 1812
- 2 Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis a new significant and independent prognostic factor in early stage breast carcinoma [J]. *Nat Cancer Inst*, 1992, 84(12): 1875 - 1887
- 3 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917 - 921
- 4 Wang JM, Kumar S, van Agthoven A, et al. Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human cascular endothelial cells [J]. *Int J Cancer*, 1995, 62(6): 791 - 796
- 5 Kumar S, Ghellal A, Li C, et al. Breast carcinoma; vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 856 - 861
- 6 王凤华, 李彬, 李辽青, 等. 脉络膜黑色素瘤微血管密度与其临床组织病理学预后指标关系的探讨 [J]. *眼科研究*, 2004, 22(1): 17 - 20
- 7 Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H, et al. Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular indury [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9): 987 - 994
- 8 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
- 9 Mesri M, Morales-Puiz M, Ackermann EJ, et al. Suppress of vascular endothelial growth factor mediated endothelial cell protection by survivin targeting [J]. 2001, 158(5): 1757 - 1765
- 10 Tran J, Master Z, Yu JL, et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4349 - 4354

(收稿: 2008-07-07 修回: 2009-05-25)

(本文编辑: 尹卫靖)