

survivin、VEGF 及 Ki67 在结直肠癌中的表达及其临床意义

张晓雨¹, 周建农², 张彤²

Expression and Clinical Significance of survivin、VEGF and Ki67 in Colorectal Carcinoma

ZHANG Xiao-yu¹, ZHOU Jian-nong², ZHANG Tong²

1. Xuzhou Medical College Affiliated Hua'an Hospital, Huaian 223002, China; 2. Jiang Su Institute of Cancer Research

Abstract :Objective To investigate the relationship between the expression of survivin、VEGF、Ki67 and the clinicopathologic parameters in colorectal carcinoma(CRC), and evaluate their significances in predicting the prognosis. **Methods** Immunohistochemical method by two-step Power Vision was used to detect survivin、VEGF、Ki67 expression in 40 patients with CRC. The relationship between the expression of survivin、VEGF、Ki67 and the clinicopathologic parameters, prognosis was retrospectively analyzed. **Results** The positive rates of survivin、VEGF、Ki67 in CRC were all higher than those in matched normal tissues($P < 0.01$). Their expressions were related to Duke's stages and the metastasis of lymph nodes. The expression rates of the three markers in CRC with the metastasis of lymph nodes were higher than those without metastasis($P < 0.05$), and higher in Duke's C、D stages than in Duke's A、B stages($P < 0.05$). survival rate of 3 years and 5 years were lower in those patients with the positive expression of these markers than in those with the negative expression($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of survivin、VEGF、Ki67 were associated with the development and metastasis of CRC. The patients with expressions of survivin、VEGF、Ki67 have lower survival rates of 3 years and 5 years. We may evaluate the prognosis of CRC through the test of survivin、VEGF and Ki67.

Key words: survivin; VEGF; Ki67; Colorectal Carcinoma(CRC); Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨结直肠癌组织中存活素(survivin)、血管内皮生长因子(VEGF)、细胞核增殖相关抗原 Ki67 的表达与各临床病理因素的关系,评价 survivin、VEGF 及 Ki67 在结直肠癌预后判断中的价值。方法 采用免疫组织化学 PowerVision 两步法检测 40 例结直肠癌组织中 survivin、VEGF 及 Ki67 的表达情况,回顾性分析 survivin、VEGF 及 Ki67 与各临床病理因素及预后之间的关系。结果 survivin、VEGF 及 Ki67 在结直肠癌组织中的表达阳性率均明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$),与 Duke's 分期及淋巴结转移有明显相关($P < 0.05$),Duke's C 期、D 期结直肠癌组织明显高于 Duke's A 期、B 期,有淋巴结转移组 survivin、VEGF 及 Ki67 阳性率明显高于无淋巴结转移组。survivin、VEGF 及 Ki67 阳性表达患者 3、5 年生存率明显低于表达阴性者($P < 0.05$)。结论 在结直肠癌发生、发展过程中伴随着 survivin、VEGF 及 Ki67 的表达,检测结直肠癌组织 survivin、VEGF 及 Ki67 可能对判断结直肠癌的淋巴结转移及病情进展有一定的价值。survivin、VEGF 及 Ki67 阳性的患者 3 年、5 年生存率明显降低,对三者进行检测,可以对结直肠癌患者的预后评估有一定的辅助意义。

关键词: survivin; VEGF; Ki67; 结直肠癌; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)01-0035-04

0 引言

恶性肿瘤的形成及发展与肿瘤的凋亡抑制、血管形成及肿瘤细胞的克隆性增殖有关。survivin 是凋亡抑制因子 IAPs 家族(Inhibitors of apoptosis)的新成

员,被认为在 bcl-2 的下游阻断了半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-7 凋亡调节通路^[1],在正常组织中不表达,而选择性的表达于恶性肿瘤组织。在诱导肿瘤血管形成的因子中,血管内皮生长因子(VEGF)被认为是最重要的血管形成因子^[2]。能反映肿瘤细胞增殖活性的指标很多,目前以 Ki67 最具有代表性^[3]。

本实验主要是研究这三个指标在结直肠癌组织中的表达及与各临床病理因素以及 3、5 年生存率之

收稿日期:2005-12-27;修回日期:2006-02-17

作者单位:1. 223002 江苏淮安,徐州医学院附属淮安医院;2. 江苏省肿瘤防治研究所

作者简介:张晓雨(1977-),男,硕士,医师,主要从事肿瘤外科临床的研究工作

间的关系,为今后临床预后的判断提供实验依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集江苏省肿瘤医院外科 1999 ~ 2000 年间结直肠癌手术切除标本 40 例,男 25 例,女 15 例,年龄 24 ~ 79 岁,平均年龄 56 岁,其中结肠癌 20 例,直肠癌 20 例。所有标本经 4 % 中性甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色,光镜观察。病理类型:管状腺癌 23 例,乳头状腺癌 12 例,粘液腺癌 5 例。Duke's 分期: A 期 2 例, B 期 17 例, C 期 12 例, D 期 9 例。术前均无放疗、化疗史。术后经 1 ~ 60 个月随访,因病情恶化而死亡 25 例,死亡率 65.0 %。

1.2 试剂与方法

survivin 鼠抗人单克隆抗体(工作浓度 1 : 50)、VEGF 兔抗人多克隆抗体(工作浓度 1 : 50)、Ki67 兔抗人多克隆抗体(工作浓度 1 : 50),通用型免疫组化染色试剂盒 PV 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。采用免疫组织化学 PowerVision 两步法,参照试剂盒说明书进行,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知阳性表达的胃癌标本作为阳性对照。

1.3 阳性判定标准

以棕黄色颗粒定位于胞浆包括游离缘的肿瘤细胞为 survivin、VEGF 阳性细胞,以棕黄色颗粒定位于细胞核的肿瘤细胞为 Ki67 阳性细胞。随机选择 10 个有代表性视野,计算阳性细胞占镜下细胞的百分比。阳性染色细胞 > 10 % 为阳性表达。

1.4 统计学分析

survivin、VEGF、Ki67 表达状态与结直肠癌临床病理特征之间的关系、单因素生存率比较采用 Pearson 卡方检验。所有统计学处理均采用 SPSS10.0 统计软件包进行。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

survivin、VEGF 阳性染色定位于胞浆中包括游

离缘。40 例中有 24 例 survivin 表达阳性,阳性率为 60 %,有 29 例 VEGF 表达阳性,阳性率为 72.5 %,10 例癌旁正常组织均无 survivin、VEGF 的表达。Ki67 阳性染色定位于细胞核,40 例中有 32 例 Ki67 表达阳性,阳性率为 80 %,10 例癌旁正常组织中有 2 例 Ki67 表达阳性。survivin、VEGF、Ki67 阳性表达范围 10 % ~ 80 %,见图 1 ~ 3。

2.2 survivin、VEGF 及 Ki67 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系 三者的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的部位、大小、病理类型无明显关系 ($P > 0.05$),与 Duke's 分期及有无淋巴结转移明显相关 ($P < 0.05$),见表 1。

2.3 预后因素分析

40 例结直肠癌患者随访结果:3 年存活 24 例,3 年存活率 60 %,5 年存活 14 例,5 年存活率 35 %。survivin、VEGF 及 Ki67 的表达状态与 3、5 年生存率显著相关 (P 均 < 0.05),见表 2。

3 讨论

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其发生和发展机制尚未完全阐明。目前研究发现,肿瘤的凋亡抑制、血管形成及肿瘤细胞的克隆性增殖在结直肠癌的发生和发展中可能有重要的地位。

survivin 是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员。survivin 可能主要通过两条途径来抑制细胞凋亡:其一是通过直接抑制凋亡终末效应器 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程;其二是 survivin 与周期蛋白激酶 Cdk4^[4]、p34cdc2^[5] 相互作用阻断凋亡信号传导通路。国外研究表明,survivin 具有凋亡抑制、血管保护、调节细胞周期等多种生物学活性,与结直肠癌的恶性程度及预后密切相关^[6]。本组实验结果显示:40 例结直肠癌组织中有 24 例(60 %) survivin 阳性表达,10 例癌旁正常组织均无 survivin 的表达,与 Kawasaki 等^[6]对 171 例大肠癌和癌旁正常组织的研究结果基本一致。这种在正常



图 1 survivin 在结直肠癌中的表达(PV ×400) 图 2 VEGF 在结直肠癌中的表达(PV ×400)

图 3 Ki67 在结直肠癌中的表达(PV ×400)

表 1 survivin、VEGF、Ki67 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系

Factor	n	survivin			VEGF			Ki67			
		n	Expression rate(%)	P	n	Expression rate(%)	P	n	Expression rate(%)	P	
Gender	Male	25	14	56	0.74	20	80	0.273	20	80	1
	Female	15	10	66.7		9	60	12	80		
Age(year)	50	11	7	63.3	1	10	90.9	0.233	11	100	0.08
	>50	29	17	58.6		19	65.5	21	72.4		
Tumor locus	Colon	20	10	50	0.333	17	85	0.155	17	85	0.695
	Rectum	20	14	70		12	60	15	75		
Tumor size(cm)	<5	30	18	60	1	23	76.7	0.418	26	86.7	0.089
	5	10	6	60		6	60	6	60		
Histological type	Tubular	23	13	56.5	0.416	16	69.6	0.603	17	79.3	0.184
	Papillate	12	7	58.3		9	75	10	83.3		
	Mucoid	5	4	80		4	80	5	100		
Duke's ,stage	A + B	19	6	31.6	0.001	10	52.6	0.012	12	63.2	0.017
	C + D	21	18	85.7		19	90.5	20	95.2		
Lymphnode metastasis	Negative	21	8	38.1	0.004	12	57.1	0.034	14	66.7	0.046
	Positive	19	16	84.2		17	89.5		18	94.7	

表 2 survivin、VEGF、Ki67 的表达与 3、5 年生存率之间的关系

Factor	n	3-year survival rate(%)		P	5-year survival rate(%)		P
		n	rate(%)		n	rate(%)	
Survivin	Positive	24	45.8	4.892	20.8	5.161	0.023
	Negative	16	81.3		56.3		
VEGF	Positive	29	44.8	9.862	24.1	5.332	0.021
	Negative	11	100		63.6		
Ki67	Positive	32	50	6.5	25	6.857	0.009
	Negative	8	100		75		

组织中不表达,而在肿瘤组织中表达特点提示 survivin 基因在结直肠癌发生阶段被激活,表达出大量 survivin 蛋白,可作为结直肠癌发生阶段的分子标志物。本组研究资料显示 survivin 在结直肠癌中的表达与结直肠癌的 Duke's 分期及淋巴结转移呈正相关 ($P < 0.05$),尤其与 Duke's 分期显著相关 ($P < 0.001$),说明 survivin 阳性表达在结直肠癌发展、转移过程中起着重要作用。分析 survivin 与患者 3、5 年生存率的关系发现: survivin 阳性组与阴性组之间生存率存在显著差异 ($P < 0.05$),survivin 阳性组患者术后 3、5 年生存率显著低与阴性组。提示 survivin 阳性表达可能是预后不良的指针。

血管内皮生长因子(VEGF)是 1989 年 Ferrara 等从牛正常垂体滤泡星形细胞中分离纯化出来的一种特异性蛋白质。其主要作用在于参与血管内皮细胞增殖、血管形成及肿瘤的浸润、转移^[8]。本组研究结果显示,结直肠癌 VEGF 表达与 Duke's 分期及淋巴结转移相关,与其他各项临床指标无相关性,与 Han 等^[8]报道一致,提示 VEGF 可作为判定病情进展的标志之一。VEGF 阳性的结直肠癌患者 3、5 年

生存率显著低于阴性者 ($P < 0.05$),说明随着侵袭力和转移程度的增加,患者生存时间明显缩短。

Ki67 是应用最广泛的增殖细胞标志之一,参与肿瘤的发生、发展^[9]。本研究分析 Ki67 与结直肠癌的关系发现,在结直肠癌中 Ki67 的阳性表达率明显高于癌旁正常组织 ($P < 0.05$),与结直肠癌的临床分期及淋巴结转移呈正相关,与患者术后生存时间呈负相关 ($P < 0.05$)。说明从正常粘膜到大肠癌,其细胞增殖活性增强,大肠癌细胞增殖活性越高,浸润转移的可能性越大,Ki67 可作为判断预后的参考指标。

综上所述,结直肠癌中 survivin、VEGF 及 Ki67 基因表达上调,其表达与结直肠癌的发生、发展密切相关,对三者进行检测,可以对结直肠癌患者的预后评估有一定的辅助意义。

参考文献:

[1] Yang J, Liu FX, Yan XC. Research advances on inhibitor of apoptosis, survivin[J]. Ai Zheng, 2003, 22(7):771-774.
 [2] Nakayama Y, Sako T, Shibao K, et al. Prognostic value of plasma vascular endothelial growth factor in patients with colo-

- rectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(4):2437-2442.
- [3] Ben-Izhak O, Bar-Chana M, Sussman L, et al. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma[J]. *Histopathology*, 2002, 41(6):519-525.
- [4] Suzuki A, Hayashida M, Ito T, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 (INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation [J]. *Oncogene*, 2000, 19(29):3225-3234.
- [5] O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(24):13103-13107.
- [6] Kawasaki H, Toyoda M, Shiohara H, et al. Expression of Survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis [J]. *Cancer*, 2001, 91(11):2026-2032.
- [7] Guba M, Seeliger H, Kleespies A, et al. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2004, 19(6):510-517.
- [8] Han J, Xia C, Gao J, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in colorectal cancer and its clinical significance [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2002, 82(7):481-483.
- [9] Iolota V, Batistatou A, Tsamandas AC, et al. Immunohistochemical expression of TGF-beta1, p21WAF1, p53, Ki67, and angiogenesis in gastric carcinomas: a clinicopathologic study[J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2002, 32(2-3):83-89.

[编辑:贺文]

(上接第 34 页)

表达 VEGFR-3 阳性组的肿瘤淋巴管计数比阴性组高 ($P < 1.20 \times 10^{-13}$); Logistic 回归分析也发现胃癌细胞 VEGFR-3 阳性表达与肿瘤淋巴管计数高度相关, 进一步分析进展期胃癌细胞 VEGFR-3 阳性表达与肿瘤淋巴管计数相关程度更高。以上实验结果分析初步揭示了胃癌细胞中 VEGF-C、VEGFR-3 和肿瘤淋巴管计数三者之间的关系。

已发现肿瘤内分泌的 VEGF-C 与淋巴内皮细胞表达的 VEGFR-3 结合能刺激肿瘤淋巴管生成^[4,7,8]; 本实验发现胃癌细胞内的 VEGFR-3 与 VEGF-C 结合也能刺激肿瘤淋巴管生成, 这又多了一条刺激淋巴管生成的通路。此发现可能更好的解释肿瘤内淋巴管最初生成的机制。由此可知胃癌组织内淋巴管生成也可通过胃癌细胞内的 VEGFR-3 与 VEGF-C 结合刺激肿瘤内淋巴管生成。所以, 胃癌组织中的肿瘤淋巴管形成可能有两途径: (1) 胃癌细胞分泌的 VEGF-C、D 与淋巴管内皮细胞表达的 VEGFR-3 结合, 刺激和诱导肿瘤淋巴管形成。这在以前有报道。(2) 胃癌细胞分泌的 VEGF-C 与胃癌细胞分泌的 VEGFR-3 结合也可刺激和诱导肿瘤淋巴管形成。

参考文献:

- [1] Fielder W, Graeven U, Ergun S, et al. Expression of FL T4 and its ligand VEGF-C in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 1997, 11:921-927.
- [2] Matsumoto T, Claesson Welsh L. VEGF receptor signal transduction [J]. *Sci STKE*, 2001 (112): RE21.
- [3] Niki T, Iba S, Yamada T. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 in blood and lymphatic vessels of lung adenocarcinoma [J]. *J Pathol*, 2001, 193(4):450-457.
- [4] 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.
- [5] Stacker S A, Caesar C, Baldwin M E, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics [J]. *Nat Med*, 2001, 7(2):186-191.
- [6] Mandriota S J, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis [J]. *EMBO J*, 2001, 20(4):672-682.
- [7] Mani Mirjami MT, Ruohola Johanna K, Karpanen T, et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-T tumors [J]. *Int J Cancer*, 2003, 98(6):946-951.
- [8] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5):1786-1790.

[编辑:贺文]