

· 临床研究 ·

VEGF、PCNA 及 Survivin 与膀胱癌病理分级、临床分期的关系*

况南珍¹, 傅颖媛^{1△}, 黄红卫², 王福财¹, 曾小平¹

(1. 南昌大学基础医学院免疫学教研室, 江西南昌 330006;

2. 南昌大学第二附属医院泌尿外科, 江西南昌 330006)

摘要:目的 探讨膀胱癌肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)、增殖细胞核抗原(PCNA)及 Survivin 的表达及其临床意义。方法 采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法检测 50 例膀胱移行细胞癌组织及 10 例正常膀胱组织中 VEGF、PCNA 及 Survivin 蛋白的表达。结果 膀胱癌患者肿瘤组织中 VEGF、PCNA 及 Survivin 的阳性表达率分别为 56.1% (23/41)、56.5% (26/46) 和 60.0% (27/45), 明显高于正常膀胱组织 ($P < 0.01$); 并随着膀胱癌病理分级和临床分期的增加而升高 ($P < 0.01$)。结论 VEGF、PCNA 及 Survivin 的阳性表达与膀胱癌的发生、发展密切相关。

关键词:血管内皮生长因子类; 增殖细胞核抗原; 免疫组织化学; Survivin; 膀胱肿瘤

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)07-0651-03

Relationship of VEGF, PCNA, Survivin and pathological grading, clinical stage of bladder cancer*

Kuang Nanzhen¹, Fu Yingyuan^{1△}, Huang Hongwei², Wang Fucui¹, Zeng Xiaoping¹

(1. Department of Immunology, Faculty of Basic Medical Science, Nanchang University, Jiangxi,

Nanchang 330006, China; 2. Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated

Hospital to Nanchang University, Jiangxi, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To explore the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF), proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and Survivin in bladder tumor tissue and their clinical significance. **Methods** Immunohistochemistry streptavidin-peroxidase(SP) method was employed to detect the expression of VEGF, PCNA and Survivin in tissue of 50 cases of bladder transitional cell carcinoma and 10 cases of normal bladder. **Results** Positive expression rates of VEGF, PCNA and Survivin in bladder tumor tissue were 56.1% (23/41), 56.5% (26/46) and 60.0% (27/45), respectively, which were significantly higher than those in normal bladder tissue ($P < 0.01$) and increased with increasing pathological grading and clinical stage of bladder tumor ($P < 0.01$). **Conclusion** Positive expression of VEGF, PCNA and Survivin have close relationship with the bladder tumorigenesis and development.

Key words: vascular endothelial growth factors; proliferating cell nuclear antigen; immunohistochemistry; Survivin; bladder neoplasms

膀胱癌是最常见的泌尿系统肿瘤,其临床症状主要表现为反复出现无痛性血尿,尿路刺激症状,晚期可出现排尿困难及肿瘤转移症状。研究发现,血管生成在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在膀胱癌组织中的表达与组织学分级、临床分期及淋巴结转移密切相关,目前,VEGF-C 成为膀胱癌的早期诊断、预后因子和治疗靶点研究的热点;肿瘤细胞具有旺盛的增殖活性,增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)可作为评价细胞增殖状态的指标;survivin 是至今发现的作用最强的凋亡抑制基因,它在肿瘤组织中的表达与肿瘤的发生、发展及预后有一定相关性^[1]。本研究采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法检测 VEGF、PCNA 和 Survivin 蛋白在膀胱癌患者肿瘤组织中的表达水平,比较各指标之间关系及其与膀胱癌发生、发展的相关性,为膀胱癌患者的早期诊断、治疗策略及预后评估提供参考。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂与仪器 VEGF 兔抗人单克隆抗体、PCNA 鼠

抗人单克隆抗体及兔抗人 Survivin 多克隆抗体为美国 Sigma 公司产品; SP-9001 试剂盒(兔-SP 试剂盒)、SP-9000 试剂盒(小鼠-SP 试剂盒)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。主要仪器包括: Leica EG 1150H 石蜡包埋机(德国)、Leica ASP-300S 生物组织脱水机(德国)、Leica RM2135 切片机(德国)、YT-7FB 型生物组织摊烤片机(湖北亚光医用电子技术有限公司)。

1.2 标本来源 收集南昌大学医学院第二附属医院 2006 年 1 月至 2008 年 1 月手术切除的膀胱癌肿瘤组织 50 例,经病理确诊均为移行上皮癌,其中,高分化(I、II 级)35 例,低分化(III 级)15 例;根据国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)的肿瘤淋巴结转移(tumor node metastasis, TNM)分期,浅表性(Tis~T₁ 期)35 例,浸润性(T₂~T₄ 期)15 例;经尿道行肿瘤电切术 33 例,经膀胱行部分切除术 17 例。另取前列腺增生患者的正常膀胱黏膜及膀胱癌旁组织 10 例作为对照。

1.3 免疫组织化学检测 常规石蜡包埋、切片(厚 4~5 μm),常规脱蜡至水;柠檬酸盐缓冲液高压抗原修复 2 min,磷酸盐缓

表 1 VEGF、PCNA 及 Survivin 的阳性表达与组织类别、病理分级及临床分期的关系

类别	VEGF				PCNA				Survivin			
	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
组织												
正常膀胱组织	10	0	10	0.0	10	0	10	0.0	10	0	10	0.0
膀胱癌组织	41	23*	18	56.1	46	26*	20	56.5	45	27*	18	60.0
膀胱癌组织病理分级												
I 级	11	5	6	45.5	17	7	10	41.2	16	7	9	43.7
II 级	15	9	6	60.0	14	8	6	57.1	14	8	6	57.1
III 级	15	9	6	60.0	15	11	4	73.3	15	12	3	80.0
膀胱癌临床分期												
浅表性(Tis~T ₁ 期)	24	15	9	62.5	31	13	18	41.9	30	13	17	43.3
浸润性(T ₂ ~T ₄ 期)	13	9	4	69.2 [#]	15	13	2	86.7 [#]	15	13	2	86.7 [#]

*: $P < 0.01$, 与正常膀胱组织比较; #: $P < 0.01$, 与浅表性膀胱癌组织比较。

冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤; 3% H₂O₂ 去离子水 37 °C 温箱孵育 15 min, PBS 洗涤; 山羊血清封闭, 37 °C 温箱孵育 15 min, 倾去血清(勿洗); 滴加第一抗体(VEGF、PCNA 或 Survivin), 37 °C 孵育 2.5 h, 阴性对照用 PBS 代替第一抗体; 滴加生物素化的第二抗体, 37 °C 温箱孵育 45 min, PBS 洗涤; 滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素, 温箱孵育 15 min, PBS 洗涤; 二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 显色, 苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 脱水, 透明, 中性树胶封片及拍照。

1.4 结果判定^[2-4] VEGF 染色阳性为细胞质出现棕黄色颗粒, 阳性细胞百分比: $< 30\%$ 及无着色为阴性(-), $\geq 30\%$ 为阳性(+). PCNA 染色阳性为细胞核呈棕褐色, 阳性细胞百分比: $< 5\%$ 为阴性(-), $5\% \sim < 30\%$ 为弱阳性(+), $30\% \sim < 70\%$ 为阳性(++), $\geq 70\%$ 为强阳性(+++). Survivin 染色阳性主要为细胞质出现棕黄色颗粒, 阳性细胞百分比: $\geq 10\%$ 为阳性(+), $< 10\%$ 为阴性(-)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理。各组计量资料采用校正卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

10 例正常膀胱组织中 VEGF、PCNA 及 Survivin 均阴性染色, VEGF、PCNA 及 Survivin 在膀胱癌组织中的阳性表达率分别为 56.1% (23/41)、56.5% (26/46) 和 60.0% (27/45), 与正常膀胱组织比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1、封 3 图 1。膀胱癌组织中 VEGF、PCNA 及 Survivin 的阳性表达与组织病理分级、临床分期的关系见表 1, VEGF、PCNA 及 Survivin 的阳性表达率随组织病理分级的增加有升高趋势, 表浅性与浸润性膀胱癌组织中三者的阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤。随着免疫学与分子生物学基础理论和实验技术的发展, 寻找膀胱癌生物学标志对其早期诊断、治疗措施的选择及预后评估具有重要的临床意义。

VEGF 作为刺激肿瘤血管生成的主要因子之一, 可作用于血管内皮细胞, 刺激其增殖、迁徙和诱导血管生成。VEGF 通常高表达于多种恶性肿瘤组织^[5] 和体外培养的肿瘤细胞。赵

长林等^[2] 发现 VEGF 在大多数膀胱癌组织中高表达, 而且其表达水平与病理分期及组织分级呈正相关, 与 Bernardini 等^[6] 报道的膀胱癌患者血清 VEGF 水平一致。本实验结果显示 VEGF 在膀胱癌组织中的阳性表达率为 56.1%, 明显高于正常膀胱组织 ($P < 0.01$), 且随病理分级的增加有升高趋势, 表浅性与浸润性膀胱癌组织中 VEGF 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 VEGF 的表达水平随肿瘤病理分级和临床分期的增加而升高。

PCNA 是一种与细胞周期相关的蛋白^[7], 存在于细胞核内, 肿瘤细胞增殖活跃, 处于增殖状态, 尤其在 S 期, PCNA 表达明显增强, 使具有恶性潜能的细胞易向恶性转化^[8-9]。范志强等^[4] 结果表明 PCNA 在膀胱移行细胞癌中高表达。本实验结果显示 PCNA 在膀胱癌组织中的阳性表达率为 56.5%, 明显高于正常膀胱组织 ($P < 0.01$), 且随病理分级的增加有升高趋势, 表浅性与浸润性膀胱癌组织中 PCNA 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 PCNA 与肿瘤的恶性程度和临床分期有关。

Survivin 是 1997 年耶鲁大学 Ambrosini 等^[10] 发现的凋亡抑制蛋白(inhibition of apoptosis protein, IAP) 家族新成员, 是 IAP 家族成员中结构最简单的蛋白分子, 具有显著的抗细胞凋亡功能。Survivin 在成人的正常组织中检测呈阴性, 而当细胞发生转化或细胞恶变时阳性表达, 并与肿瘤的发生、发展及预后有密切的关系^[11]。人们发现通过下调 Survivin 的表达可明显改善肿瘤细胞的异常生物学行为^[12]。Lehner 等^[13] 用免疫组织化学检测 45 例膀胱癌患者, 其中, Survivin 阳性表达 26 例, 14 例膀胱原位癌患者中有 2 例为阳性, 而正常膀胱黏膜上皮细胞核中 Survivin 均无表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。徐建平^[14] 发现 Survivin 在子宫肌瘤组织中表达的阳性率高于其在正常子宫肌肉组织中的表达, 提示 Survivin 可能成为肿瘤的早期诊断指标。李奕璇等^[15] 发现 Survivin 启动子属肿瘤特异的强启动子, 可在恶性肿瘤细胞中启动 Survivin 蛋白的大量表达。本实验中也发现膀胱癌组织中, Survivin 的阳性表达率明显高于正常膀胱组织 ($P < 0.01$), 且随肿瘤病理分级和临床分期的增加而升高, 提示其表达是膀胱癌发生的重要因素之一。

综上所述, VEGF、PCNA 及 Survivin 表达的异常升高与

膀胱癌发生、发展及转移密切相关,可作为临床早期诊断、治疗措施选择及预后评估的辅助指标。

参考文献:

- [1] Ku JH, Kwak C, Lee HS, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *J Urol*, 2004, 171(2 Pt 1): 631-635.
- [2] 赵长林, 殷江霞, 刘贤奎, 等. 膀胱癌 Survivin 和 VEGF 的表达与血管生成关系的研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2007, 12(12): 902-905.
- [3] 刘禄成, 李香云, 范海涛, 等. VEGF/VEGFR 在膀胱癌中表达的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(7): 633-635.
- [4] 范志强, 姜佑三, 徐勇, 等. PCNA、MMP9 和 E-cd 在膀胱移行上皮癌中表达及意义[J]. *天津医药*, 2005, 33(7): 405-407.
- [5] 张景华, 张德才, 何津, 等. 乳腺癌中 VEGF 基因 mRNA 的表达及其与临床病理因素的关系[J]. *实用癌症杂志*, 2011, 26(2): 140-143.
- [6] Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer[J]. *J Urol*, 2001, 166(4): 1275-1279.
- [7] 周四维, 杨为民, 李家贵, 等. 现代膀胱肿瘤学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 582.
- [8] Mitselou A, Ioachim E, Kitsou E, et al. Immunohistochemical study of apoptosis-related Bcl-2 protein and its correlation with proliferation indices (Ki67, PCNA),

tumor suppressor genes (p53, pRb), the oncogene c-erbB-2, sex steroid hormone receptors and other clinicopathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium[J]. *In Vivo*, 2003, 17(5): 469-477.

- [9] 徐骏飞, 江颖, 倪启超, 等. 乳腺癌组织中 FOXO3a、 β -Catenin、PCNA 的表达及临床意义[J]. *山东医药*, 2011, 51(27): 16-18.
- [10] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.
- [11] 刘伟, 黄超, 邢伟. 大肠癌中 Survivin 和 nm23-H1 的表达及其联合检测的临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(19): 2074-2076.
- [12] 曾柯, 吴小候, 杜虎. survivin 靶向 siRNA 对膀胱癌细胞增殖和凋亡作用的体外研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(14): 1360-1362.
- [13] Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, et al. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002, 10(2): 134-138.
- [14] 徐建平, 黎清, 罗新, 等. 凋亡基因 Survivin 在子宫肌瘤组织中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2007, 28(12): 1980-1981.
- [15] 李奕璇, 陈全, 朱大冕. 肿瘤特异性 hTERT 启动子与 Survivin 启动子在肺癌 A549 细胞中的转录活性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(2): 168-173.

(收稿日期: 2011-10-29 修回日期: 2011-12-01)

(上接第 650 页)

事件,在促进食管上皮内瘤变的发生及向食管癌的转变过程中发挥重要作用。

本课题从 mRNA 及蛋白水平研究了 STAT3 在食管上皮内瘤变及食管癌组织中的表达,初步探讨了 STAT3 的异常活化在食管上皮内瘤变演变过程中的作用。但是,STAT3 及其下游相关基因在食管癌发生、发展过程中的作用还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene[J]. *Cell*, 1999, 98(3): 295-303.
- [2] Ma XT, Wang S, Ye YJ, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(11): 1569-1573.
- [3] 吴文新, 刘惠民, 张祥宏, 等. Stat3 通路相关基因在散发性大肠管状腺瘤癌变中的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(5): 388-390.
- [4] Proietti C, Salatino M, Rosembli C, et al. Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells[J]. *Mol Cell*

Biol, 2005, 25(12): 4826-4840.

- [5] 朱雄增. 胃肠道癌前病变和癌的 WHO 诊断新标准[J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(2): 168-169.
- [6] 王新华, 李珊珊, 郭燕萍, 等. 食管鳞癌组织中 STAT3 蛋白的表达及临床意义[J]. *山东医药*, 2005, 45(33): 13-14.
- [7] 贵永贤, 李小环, 赵立群, 等. 食管肿瘤癌变过程中 Stat3 和 Ki-67 基因表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2008, 48(26): 29-31.
- [8] 李素梅, 钟雪云, 林琛莅, 等. Stat3、CyclinD1 及 Bcl-2 在食管鳞癌组织芯片中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(4): 681-684.
- [9] 高远, 轩小燕, 张红燕, 等. STAT3 信号蛋白与食管鳞癌上皮间质转化的关系及其意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(5): 447-452.
- [10] 刘俊茹, 王原, 左连富, 等. COX-2、P-Stat3 及 p-Stat5 在食管癌组织中的表达及其意义[J]. *癌症*, 2007, 26(5): 458-462.
- [11] 王新华, 李珊珊, 阎爱华, 等. 食管鳞癌细胞系中 STAT3 的激活及 VEGF 和 Bcl-2 的表达[J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(6): 325-328.

(收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2011-11-03)