

网络出版时间: 2019-12-2 13:43 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.024.html

# Survivin 和 EphA2 蛋白在脑膜瘤组织中的表达及预后关系

苏 辉 程宏伟 洪文明

**摘要** 目的 探讨凋亡抑制蛋白存活素(Survivin)和血管生成拟态(VM)蛋白上皮细胞激酶(EphA2)在脑膜瘤组织中的表达,以及两者联合检测对脑膜瘤预后判断的意义。方法 留取62例脑膜瘤患者术后肿瘤病理标本,免疫组织化学SP法检测Survivin、EphA2在脑膜瘤的脑膜组织中的表达,同时收集患者临床资料,分析两者表达与患者预后关系;按照脑膜瘤分级,Western blot法检测EphA2、Survivin蛋白表达。结果 随着脑膜瘤病理分级(I级、II级、III级)升高,EphA2、Survivin蛋白在脑膜瘤中表达阳性率逐渐提高,且与脑膜瘤复发相关( $P < 0.01$ );Western blot法研究证实EphA2、Survivin蛋白的表达与脑膜瘤病理分级相关( $P < 0.05$ )。结论 凋亡抑制蛋白Survivin和VM形成相关蛋白EphA2参与脑膜瘤的进展和预后。

**关键词** 脑膜瘤;血管生成拟态;凋亡抑制蛋白;上皮细胞激酶;存活素

中图分类号 R 977.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1955-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.024

在原发性脑部肿瘤中,约1/5~1/4为脑膜瘤,有部分脑膜瘤表现为恶性肿瘤特点,具有复发性、侵袭性和远处转移<sup>[1]</sup>。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)存活素(Survivin)可阻断执行凋亡的蛋白裂解酶Caspases-3等,导致肿瘤细胞增殖和发展<sup>[2]</sup>,Survivin的表达与脑膜瘤的级别和复发是否相关,能否作为预测肿瘤复发和临床预后的指标目前仍存在争议<sup>[3]</sup>。上皮细胞激酶(epithelial cell kinase, EphA2)是血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)相关的信号通路重要蛋白,有研究证实抑制消化系统肿瘤<sup>[4]</sup>、黑色素瘤<sup>[5]</sup>细胞中Survivin、EphA2蛋白的表达可抑制VM形成。Survivin蛋白表达与脑膜瘤<sup>[6]</sup>、EphA2蛋白表达与脑膜瘤<sup>[7]</sup>的关系已有文献报道,但有关联合检测凋亡抑制蛋

白Survivin和VM形成中EphA2蛋白在脑膜瘤中的表达及意义文献报道较少。本研究检测最近4年里62例不同级别脑膜瘤患者中Survivin、EphA2蛋白的表达特点,分析其脑膜瘤预后中的价值。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 62例患者为2014年2月~2018年7月均因进行性加重的头痛等症状入住安徽医科大学第一附属医院神经外科,且结合脑部磁共振诊断为脑膜瘤,手术后均经病理学证实。按照WHO脑膜瘤病理分级,其中34例为I级,17例为II级,11例为III级;患者性别:27例为男性,35例为女性;患者年龄40~77( $52.9 \pm 13.2$ )岁。患者均为首发病例,无其他较为严重的合并症。患者对研究均知情同意,并签署协议书。

**1.2 主要试剂** 一抗:羊抗人Survivin多克隆抗体、羊抗人EphA2多克隆抗体购于美国Santa Cruz生物技术公司;免疫组织化学SP和DAB显色试剂盒购于北京中杉金桥有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

**1.3 免疫组化染色及结果判断** 采取免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(streptavidin-peroxidase method, SP法)检测Survivin、EphA2蛋白表达,步骤如下。手术切除脑膜瘤组织,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,厚4 $\mu$ m切片,二甲苯脱蜡,微波抗原修复,3% $H_2O_2$ 消除内源性过氧化物酶,羊血清封闭抗原。滴加羊抗人多克隆一抗(Survivin, 1:200稀释;EphA2, 1:300稀释),4 $^{\circ}C$ 孵育过夜。次日滴加兔抗羊二抗50 $\mu$ l;DAB显色,苏木素复染,中性树胶封固后镜检。Survivin、EphA2免疫组化结果由2名病理科医生独立判定,细胞质呈棕黄色或棕褐色判定为阳性细胞。按照文献<sup>[8]</sup>方法:①阳性染色程度计分,阴性“-”:染色较浅,0分;弱阳性“+”:呈浅黄色,1分;阳性“++”:呈黄色,2分;强阳性“+++”:呈棕褐色,3分。② $\times 200$ 倍显微镜下随机记录500个细胞,计算阳性染色细胞占总细胞的百分比,0~10% 0分;11%~25% 1分;26%~50% 2分;51%~75% 3分;>75% 4分。将Sur-

2019-06-10 接收

基金项目:安徽省科技攻关计划项目(编号:12010402113)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院神经外科,合肥 230022

作者简介:苏 辉 男,硕士研究生,主治医师;

程宏伟 男,博士,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail:chw001@163.com

vivin、EphA2 蛋白的两组数值相加以表示浓度分布评分(intensity distribution score, IDS), IDS 为 0 时, 为阴性, 将患者以 IDS 积分分为两组, 低表达组: 0 ~ 3 分; 高表达组: 4 ~ 7 分。

**1.4 Western blot 检测脑膜瘤组织中 Survivin、EphA2 蛋白表达** 随机取手术切除脑膜瘤组织, 每组 5 例, 超低温冰箱冻存。行蛋白免疫印迹检查时, 加入蛋白裂解液, 将脑膜瘤组织研磨呈粉状, 超声细胞破碎仪反复破碎, 离心, BCA 法测定样品蛋白浓度。行 SDS-PAGE 电泳, 上样量为 20 μg 总蛋白, 加入羊抗人多克隆抗体 (Survivin, 1 : 2 000 稀释; EphA2, 1 : 2 500 稀释) 4 ℃ 孵育过夜, 次日, 二抗孵育, ECL 化学发光显影, 曝光, 灰度分析采用 Image J 软件, 以 GAPDH 为内参, 目标蛋白相对表达水平采用 Survivin、EphA2 蛋白和 GAPDH 比值表示。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件包, 脑膜瘤染色阳性组间差异比较采用  $\chi^2$  检验, 非参数秩和检验; Survivin、EphA2 相对表达量采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异比较采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有

显著性。

## 2 结果

**2.1 Survivin、EphA2 蛋白表达与脑膜瘤一般情况比较** 应用浓度分布评分 (IDS) 比较两种蛋白表达与脑膜瘤一般资料情况, 低表达组 (0 ~ 3 分) 与高表达组 (4 ~ 7 分) 与患者性别、年龄、饮酒、吸烟、肿瘤部位等差异无显著性 (表 1)。

**2.2 Survivin 和 EphA2 蛋白在不同病理分期脑膜瘤组织中的表达** 脑膜瘤临床中主要分为 I 级、II 级和 III 级, Survivin、EphA2 蛋白在不同级别脑膜瘤组织中的表达免疫组织化学染色结果见图 1、2。随着病理分级水平的升高, 非参数秩和检验相关分析显示, Survivin 和 EphA2 蛋白在脑膜瘤组织中升高, 两组呈正相关 ( $F = 3.627, P < 0.05$ ), 见表 2。

**2.3 脑膜瘤患者预后与 Survivin 与 EphA2 蛋白表达的关系** 术后 62 例脑膜瘤患者均获得随访, 时间为 6 ~ 36 (12.8 ± 4.6) 个月, 统计不良预后 (复发 + 死亡) 患者病例数; 本组不良预后 9 例 (7 例复发, 2

表 1 比较 Survivin 和 EphA2 表达 IDS 值与脑膜瘤患者一般情况 (n)

指标	Survivin IDS		$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	EphA2 IDS		$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
	0 ~ 3 分 (n = 38)	4 ~ 7 分 (n = 24)			0 ~ 3 分 (n = 41)	4 ~ 7 分 (n = 21)		
性别								
男	16	11	0.083	0.798	17	10	0.214	0.644
女	22	13			24	11		
年龄 (岁)								
< 50	14	10	0.144	0.704	16	8	0.005	0.943
≥ 50	24	14			25	13		
饮酒								
无	26	15	0.230	0.631	28	13	0.253	0.615
有	12	9			13	8		
吸烟								
无	23	14	0.029	0.864	27	10	1.919	0.166
有	15	10			14	11		
肿瘤部位								
凸面	20	13	0.014	0.906	22	11	0.009	0.924
其他	18	11			19	10		

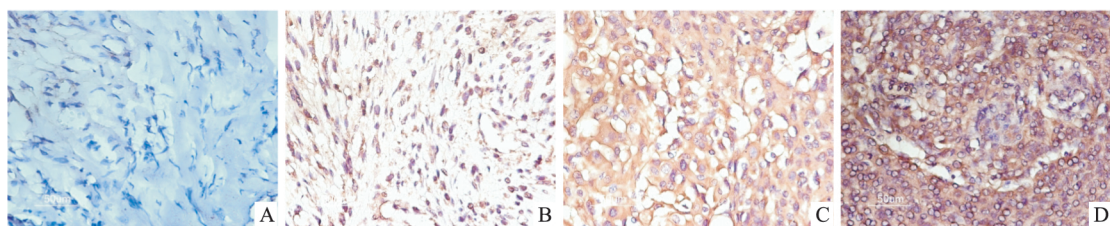


图 1 脑膜瘤组织中 Survivin 蛋白表达 ×400

A: 脑膜瘤旁正常脑组织 (-) 表达; B: I 级脑膜瘤组织中 (+) 表达; C: II 级脑膜瘤组织中 (++) 表达; D: III 级脑膜瘤组织中 (+++) 表达

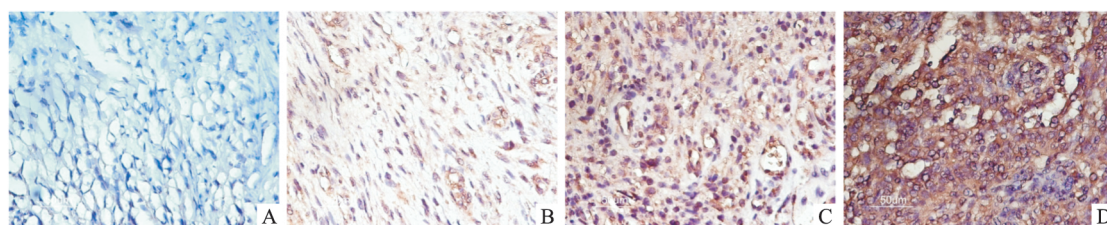


图2 脑膜瘤组织中 EphA2 蛋白表达 ×400

A:脑膜瘤旁正常脑组织(-)表达;B:I级脑膜瘤组织中(+)表达;C:II级脑膜瘤组织中(++)表达;D:III级脑膜瘤组织中(+++)表达

表2 Survivin 与 EphA2 蛋白在不同分期脑膜瘤组织中表达

病理分级 (n)	Survivin 表达				阳性率 (%)	EphA2 表达				阳性率 (%)
	-	+	++	+++		-	+	++	+++	
I级 (34)	13	10	9	2	61.76	15	14	3	2	55.88
II级 (17)	2	5	6	4	88.24	3	3	8	3	82.35
III级 (11)	0	2	5	4	100.00	1	1	5	4	90.91

例死亡),与未复发病例的 Survivin IDS 值(2.09 ± 1.05)、EphA2 IDS 值(2.52 ± 1.21)比较,复发患者的 Survivin IDS 值(5.62 ± 1.83)、EphA2 IDS 值(5.35 ± 1.72),两组之间比较差异有统计学意义( $F = 8.361、7.264, P < 0.01$ ),见图3。提示 Survivin IDS 值与 EphA2 IDS 值升高,脑膜瘤患者可能预后不良。

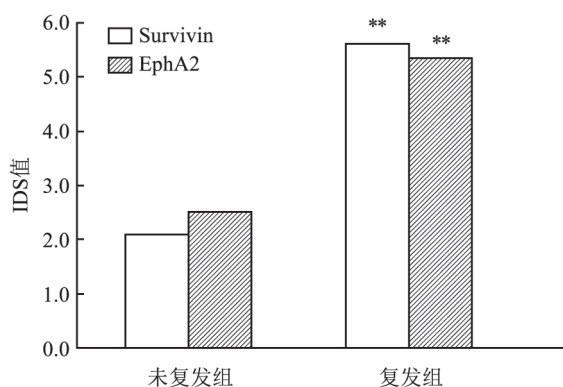


图3 脑膜瘤患者复发情况与 Survivin 与 EphA2 蛋白表达 IDS 值的关系  
与未复发组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.4 蛋白免疫印迹法检测 Survivin 和 EphA2 蛋白在不同分期脑膜瘤中的表达** 随机选择 5 例不同病理分级脑膜瘤组织,Western blot 结果表明,I 级脑膜瘤组织中 Survivin 和 EphA2 蛋白的表达较弱,随着病理分期升高,Survivin 和 EphA2 蛋白的表达增强,见图4A。由图像分析可知,与 I 级脑膜瘤组织比较,高分期的 II 级和 III 级脑膜瘤组织中 Survivin / GAPDH 和 EphA2 / GAPDH 比值明显升高,见图4B。

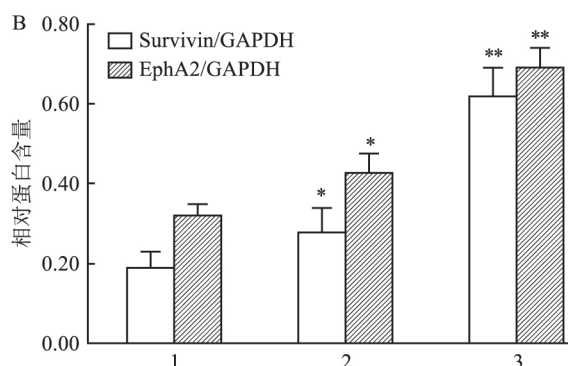
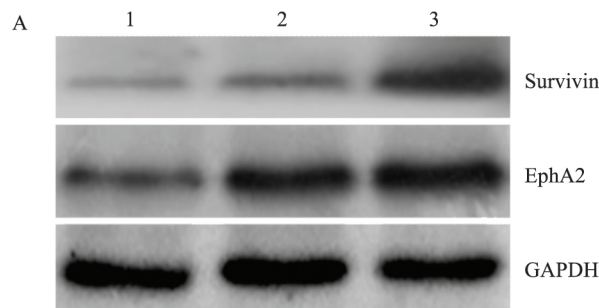


图4 蛋白免疫印迹检测 Survivin 和 EphA2 蛋白  
在不同分期脑膜瘤组织中的表达

A:Western blot 结果;B:蛋白半定量统计图;1:I级脑膜瘤组织;2:II级脑膜瘤组织;3:III级脑膜瘤组织;与 I 级脑膜瘤比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

脑膜瘤早期,肿瘤往往生长缓慢,患者病情隐匿,若有典型的头疼、癫痫等症状时,病情已为晚期。虽然脑膜瘤恶性程度不高,但其具有侵袭性、异常增殖、术后患者易复发的特征,且脑膜瘤组织中富含血管,常呈结节状嵌入大脑半球中<sup>[9]</sup>。Caspases-3 系具有激活半胱氨酸和裂解底物位点的蛋白裂解酶,可导致细胞凋亡,Survivin 属于凋亡抑制蛋白家族,功能多样,参与细胞凋亡、分裂和老化,Survivin 可阻断 Caspases-3 蛋白裂解酶,抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[10]</sup>。研究<sup>[11]</sup>表明,高表达 Survivin 提示肿瘤患者预后不良或药物抵抗,而抑制肿瘤细胞中 Survivin 表达可

抑制肿瘤增殖,诱导肿瘤凋亡。由此提示 Survivin 在脑膜瘤细胞增殖和信号转导通路中发挥功能。

近年来的研究<sup>[12]</sup>表明,肿瘤细胞的生长中常出现 VM,中胚层的血管间叶组织代替内胚层起源的上皮细胞,形成肿瘤细胞上皮-间质转化。肿瘤细胞的血管生成拟态是指肿瘤细胞围成条管道样结构,可以模拟血管作用,但没有血管内皮细胞形成,在这些无内皮细胞管道样结构中,血液可以在其中流动,从而供给肿瘤组织营养,故抗新生血管的分子靶向治疗成为近年来抗肿瘤药物研发的一个重要课题。实体瘤脑膜瘤的生长过程需要丰富的血供,血管为其生长和侵袭提供充足的营养和氧,对脑膜瘤血管新生机制的研究有望成为有效的减少脑膜瘤复发和分子靶向治疗的依据。研究<sup>[13]</sup>表明,上皮细胞激酶(EphA2)是 VM 相关的信号通路蛋白,作为受体蛋白酪氨酸激酶,EphA2 在血管生成方面起重要的调节作用,抑制 EphA2 的表达,在临床治疗胰腺癌中已取得一定的疗效。本研究应用免疫组织化学和蛋白免疫印迹法均证实 EphA2 在高级别的脑膜瘤中表达更为明显,与脑膜瘤的复发呈正相关。

该研究由于病例数,尤其是 II 级和 III 级脑膜瘤较少,在分析中可能会存在偏倚;同时,随访时间不够,有待进一步收集病例和延长随访时间。总之,调控细胞增殖和凋亡的关键蛋白 Survivin 以及 VM 相关蛋白 EphA2 在恶性程度较高的 III 级脑膜瘤中高表达,两者联合检测可作为肿瘤治疗的理想靶点。同时,该研究发现 Survivin 和 EphA2 蛋白的表达水平与脑膜瘤患者的预后有关,故两者的深入研究为精准治疗脑膜瘤的提供新的可能,值得进一步研究。

参考文献

[1] Gilard V, Goia A, Ferracci F X, et al. Spinal meningioma and factors predictive of post-operative deterioration[J]. J Neurooncol, 2018, 140(1):49-54.

[2] Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, et al. Ki-67 and sur-

vivin as predictive factors for rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy[J]. Anticancer Res, 2018, 38(3):1735-9.

[3] Cavo M, Fato M, Peñuela L, et al. Microenvironment complexity and matrix stiffness regulate breast cancer cell activity in a 3D *in vitro* model[J]. Sci Rep, 2016, 6:35367.

[4] 汪晓庆,曹威,宋先兵,等. HIF-1 $\alpha$  基因转染人胃腺癌 SGC7901 细胞对裸鼠移植瘤的影响及机制[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(8):1128-32.

[5] Gao S, Fan C, Huang H, et al. Effects of HCG on human epithelial ovarian cancer vasculogenic mimicry formation *in vivo* [J]. Oncol Lett, 2016, 12(1):459-66.

[6] 焦建同,黄进,程超,等. Survivin 在脑膜瘤的表达特点及其预测预后的价值[J]. 临床神经外科杂志, 2018, 15(4):241-5.

[7] 胡朝峰,程宏伟,单明,等. 血管生成拟态蛋白在脑膜瘤组织的表达意义[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(12):1890-2.

[8] Hijiya N, Shibata T, Daa T, et al. Overexpression of cannabinoid receptor 1 in esophageal squamous cell carcinoma is correlated with metastasis to lymph nodes and distant organs, and poor prognosis [J]. Pathol Int, 2017, 67(2):83-90.

[9] Kavya N, Rao S, Sathyanarayana M L, et al. Survivin expression in canine spontaneous cutaneous and subcutaneous tumors and its prognostic importance [J]. Vet World, 2017, 10(10):1286-91.

[10] Tang T K, Chiu S C, Lin C W, et al. Induction of survivin inhibition, G/M cell cycle arrest and autophagic on cell death in human malignant glioblastoma cells [J]. Chin J Physiol, 2015, 58(2):95-103.

[11] Chen D, Dai F, Chen Z, et al. Dimethoxy curcumin induces apoptosis by suppressing survivin and inhibits invasion by enhancing E-cadherin in colon cancer cells [J]. Med Sci Monit, 2016, 22:3215-22.

[12] Scully S, Francescone R, Faibish M, et al. Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas [J]. J Neurosci, 2012, 32(37):12950-60.

[13] Wang H, Lin H, Pan J, et al. Vasculogenic mimicry in prostate cancer: the roles of EphA2 and PI3K [J]. J Cancer, 2016, 7(9):1114-24.

### Expression and prognosis value of Survivin and EphA2 proteins in meningiomas

Su Hui, Cheng Hongwei, Hong Wenming

(Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the expression of protein Survivin and vasculogenic mimicry (VM) in meningioma tissues, and the significance and prognosis of Survivin and EphA2 proteins in meningioma. **Methods** 62 patients with meningioma underwent postoperative tumor pathology, the expression of Survivin and EphA2 in meningi-

oma tissues was detected by immunohistochemistry SP method, and collect the clinical data, analyzed the relationship between the expression of Survivin and EphA2 and the prognosis of the patients. The expressions of EphA2 and Survivin proteins were detected by Western blot according to meningioma classification. **Results** With the increase of grade I, II and III of meningioma, the positive rate of EphA2 and Survivin expression in meningioma gradually increased, and it was correlated with the recurrence of meningioma ( $P < 0.01$ ). Western blot confirmed that the expressions of EphA2 and Survivin proteins were correlated with the pathological grading of meningioma. **Conclusion**

The apoptotic inhibitory protein Survivin and VM-related protein EphA2 are involved in the progression and prognosis of meningioma.

**Key words** meningioma; angiogenic mimicry; apoptotic inhibitory protein; EphA2; Survivin

(上接第 1954 页)

(4): e0192436.

- [6] Yong X, Tang B, Xiao Y F, et al. *Helicobacter pylori* upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer[J]. *Cancer Lett* 2016, 374(2): 292–303.
- [7] Xi H Q, Zhang K C, Li J Y, et al. RNAi-mediated inhibition of Lgr5 leads to decreased angiogenesis in gastric cancer[J]. *Oncotarget* 2017, 8(19): 31581–91.
- [8] Huang T, Qiu X, Xiao J, et al. The prognostic role of Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. *Clin Res Hepatol Gas* 2016, 40(2): 246–53.
- [9] Kalantari E, Asadi Lari M H, Roudi R, et al. Lgr5High/DCLK1High phenotype is more common in early stage and intestinal subtypes of gastric carcinomas[J]. *Cancer Biomark Markers* 2017, 20(4): 563–73.
- [10] Saberi S, Piryaei A, Mirabzadeh E, et al. Immunohistochemical analysis of LGR5 and TROY expression in gastric carcinogenesis demonstrates an inverse trend[J]. *Iran Biomed J*, 2019, 23(2): 107–20.
- [11] Choi Y, Park J, Ko Y S, et al. FOXO1 reduces tumorsphere formation capacity and has crosstalk with LGR5 signaling in gastric cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(3): 1349–55.
- [12] Qin H, Cai A, Xi H, et al. ZNF3 induces apoptosis of gastric cancer cells by antagonizing Wnt and Hedgehog signaling[J]. *Panminerva Med* 2015, 57(4): 167–75.
- [13] Gong X, Azhdarinia A, Ghosh S C, et al. LGR5-targeted antibody-drug conjugate eradicates gastrointestinal tumors and prevents recurrence[J]. *Mol Cancer Ther* 2016, 15(7): 1580–90.
- [14] Zeng J H, Pan H F, Liu Y Z, et al. Effects of Weipixiao (胃痞消) on Wnt pathway-associated proteins in gastric mucosal epithelial cells from rats with gastric precancerous lesions[J]. *Chin J of Integr Med* 2016, 22(4): 267–75.

## Expression of LGR5 promoter methylation in gastric cancer

Chen Xiaoyu<sup>1</sup>, Zhu Yaodong<sup>2</sup>, Yu Xin<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of General Surgery, <sup>2</sup>Dept of Chinese Integrative Medicine Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract** **Objective** To investigate the relationship between methylation of leucine-rich repetitive G protein-coupled receptor 5 (LGR5) and gastric carcinogenesis and related clinicopathological parameters. **Methods** The methylation levels of LGR5 promoter in 26 groups of gastric cancer specimens were calculated by multiplex PCR and Methyl Target technique, and the clinical and pathological parameters were analyzed. **Results** The methylation level of LGR5 was significantly decreased in gastric cancer tissues, and correlated with pathological stage, depth of invasion, tumor size, lymphatic metastasis and recurrence within one year. **Conclusion** The methylation level of LGR5 in gastric cancer tissues is helpful for the diagnosis of gastric cancer and the preliminary judgement of pathological parameters. It provides a reference for predicting short-term recurrence and a new target for treatment.

**Key words** gastric cancer; LGR5; promoter; methylation