

凋亡抑制蛋白 Livin 在非小细胞肺癌中的表达及与 p53、bcl-2 的相关性

崔肃 张鑫 许顺 陈东义

【摘要】 目的 探讨凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员 Livin 在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及 p53、bcl-2 之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学法(SP法)检测 45 例 NSCLC 患者的肺癌组织,35 例癌旁组织和 15 例肺良性瘤样病变的肺组织中 Livin 及 p53、bcl-2 的表达,使用 χ^2 检验比较各组间差别;使用 Spearman 相关性分析 Livin 与 p53、bcl-2 之间的相关性。**结果** Livin 在 45 例 NSCLC 组织中 62.22% 表达阳性,而 35 例癌旁正常肺组织和 15 例肺良性瘤样病变组织低表达(分别为 2.86%、6.67%, $P < 0.01$)。Livin 蛋白的表达与肺癌患者的病理类型、肿瘤分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期均无明显相关关系(分别为 $P = 0.844$, $P = 0.156$, $P = 0.565$, $P = 0.537$)。p53、bcl-2 蛋白表达均与 Livin 蛋白表达呈正相关(p53: $r = 0.375$, $P = 0.011$; bcl-2: $r = 0.565$, $P < 0.001$)。**结论** Livin 在 NSCLC 组织中特异性的高表达提示其可能参与了 NSCLC 的发生,使其将来可能成为 NSCLC 诊断及治疗的新靶点。Livin 与 p53 及 bcl-2 在 NSCLC 的发生中有可能发挥了协同作用。

【关键词】 癌,非小细胞肺; 凋亡抑制蛋白质类; 基因,p53; 基因,bcl-2; Livin

The expression of Livin in non-small cell lung cancer and the correlation with p53 and bcl-2 CUI Su, ZHANG Xin, XU Shun, CHEN Dong-yi. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: CUI Su, Email: cuisu@126.com

【Abstract】 Objective To examine and analyze the expression of Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein (IAP) family member, in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the correlation with p53 and bcl-2. **Methods** The expression levels of Livin and p53, bcl-2 in 45 NSCLC, 35 paracancerous, 15 benign tumor were detected by immunohistochemical staining (SP). **Results** Livin was expressed in 28 of 45 NSCLC (62.22%). Livin was expressed low levels in paracancerous or benign tumors (2.86%, $P < 0.01$ and 6.67%, $P < 0.01$). Livin expression had no significant relationship with clinically pathological characteristics of lung cancer patients. p53 and bcl-2 expression had a positive correlation with the expression of Livin (p53: $r = 0.375$, $P = 0.011$; bcl-2: $r = 0.565$, $P < 0.001$). **Conclusions** Livin may play a role in the carcinogenesis of NSCLC, which may serve as a novel target for NSCLC diagnosis and treatment. The overexpressions of Livin and p53, bcl-2 may play synergetic roles in process of carcinogenesis of NSCLC.

【Key words】 Carcinoma, non-small-cell lung; Inhibitor of apoptosis proteins; Genes, p53; Genes, bcl-2; Livin

恶性肿瘤的发生与体内细胞增殖和细胞凋亡的失衡密切相关。其中不仅包括肿瘤细胞的异常增殖,并且包括肿瘤细胞通过各种途径逃逸细胞凋亡。Livin, 又称 ML-IAP/KIAP, 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子之一,也是最新发现 IAP 家族的成员之一。其在浅表性膀胱癌、胃肠道肿瘤等多种恶性肿瘤组织中的高表达提示 Livin 在肿瘤的发生中发挥重要的作

用^[1-4]。目前关于 Livin 蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达研究已有大量的报道,但是其与 p53、bcl-2 蛋白的相关性研究鲜有报道。本文旨在采用免疫组织化学方法对 45 例 NSCLC 组织,35 例癌旁正常肺组织及 15 例肺良性肿瘤中 Livin 蛋白表达及 p53、bcl-2 的表达进行检验。

资料与方法

一、一般资料

45 例 NSCLC 患者的肺癌组织,35 例癌旁组织和 15 例肺良性瘤样病变的肺组织均取自于 2007 ~ 2008

年,中国医科大学附属第一医院手术病检标本。NSCLC患者均为原发性肺癌,术前未接受过化疗或放疗治疗,术后均经病理学确诊,其中男31例,女14例,年龄22~75岁,平均48.5岁。45例NSCLC患者中腺癌21例,鳞癌19例,大细胞癌5例。15例肺良性瘤样病变中炎性假瘤12例,肺错构瘤2例,肺平滑肌瘤1例。

二、主要仪器和试剂

石蜡标本切片机(Bringt 5040,英国),光学显微镜(Olympus-BH2型,日本),显微照相系统(Olympus A×70,日本)。SP试剂盒(福州迈新公司产品)。

三、免疫组织化学

将标本石蜡块制成4 μm厚连续石蜡切片。切片采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法染色,选用已知阳性胃癌切片作为阳性对照,用PBS代替一抗作为阴性对照,按产品说明书进行染色。

结果判定:每张切片随机选取10个高倍视野,分别计数100个细胞。胞核或胞质染为淡黄色至棕黄色者为阳性细胞,将阳性细胞按其数量及显色强度分为3级:弱阳性(+):阳性细胞数<10%;显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色;强阳性(+++):阳性细胞数>60%,多数细胞呈黄至棕黄色;中度阳性(++):阳性细胞数及显色强度介于弱阳性和强阳性之间。凡显色强度与背景无明显差别者为阴性。

四、统计学分析

应用SPSS 16.0软件进行统计学分析,两样本率的比较用 χ^2 检验;相关性采用Spearman相关性分析。

结 果

免疫组织化学法(SP法)检测NSCLC组织、癌旁和肺良性瘤样病变肺组织Livin蛋白及NSCLC组织中p53、bcl-2蛋白的表达情况:在45例NSCLC组织中Livin蛋白62.22%表达阳性,而癌旁正常肺组织和肺良性瘤样病变组织低表达(2.86%和6.67%, $P < 0.01$)。见表1。Livin的表达与肺癌患者的病例分型、肿瘤分化程度、淋巴结转移及TNM分期均无明显相关关系(表2)。p53蛋白64.44%表达阳性,在29例p53蛋白阳性表达者中,Livin蛋白表达阳性率为75.86%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$);bcl-2蛋白68.89%

表达阳性,在31例bcl-2蛋白表达阳性者中,Livin蛋白表达阳性率为80.65%,两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。p53蛋白及bcl-2蛋白表达与Livin蛋白表达呈正相关(表3)。Livin蛋白及bcl-2蛋白阳性表达于癌细胞胞质中,而p53蛋白阳性表达于癌细胞细胞核中(图1~6)。

讨 论

Livin是IAP家族中新近发现的一种凋亡蛋白,在2001年由Kasof等首次报道。人类的Livin基因定位于染色体20q13.3,全长为1297 nt,分别编码298和280个氨基酸的蛋白质,它含有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列(BIR)分子和一个羧基端环指结构域(RING)。关于Livin蛋白表达的定位,Kasof等^[5]用含Livin基因的质粒转染的Hela细胞并用相应抗体检测其表达产物,发现主要在细胞核及胞浆内呈纤维丝样染色,与survivin的亚细胞定位相似,并由此推论Livin可能与survivin一样,可通过细胞的微管系统及纺锤体影响细胞周期而抑制细胞凋亡,并亦有可能受到细胞周期蛋白的调节。与此相反,Vucic等^[6]用ML-IAP抗体检测过表达ML-IAP的乳腺癌MCF7细胞系,发现Livin及其RING结构主要定位于细胞质中,而非在有丝分裂的纺锤体上;与survivin不同,纺锤体的形成亦不受Livin过度表达的影响。目前对Livin抗凋亡的作用机制了解的并不是很多。初步研究表明,Livin需通过一系列的凋亡刺激物的作用来表现凋亡的抑制,其抑制凋亡的信号通路包括:(1)外在途径即死亡因子介导的细胞凋亡途径:Kasof等^[5]证明Livin可通过阻止TNF- α (tumor necrosis factor)或Fas(CD95)抗体诱导凋亡。在Fas/caspase-8诱导的死亡受体途径中,Livin不直接结合caspase-8,而是直接抑制核心蛋白酶caspase-3,从而抑制整条途径发挥抗凋亡作用。(2)Livin抗凋亡内在途径即细胞色素C依赖途径:Livin被凋亡蛋白诱导因子(apoptosis protease activating factor-1),细胞色素C(cyt-c)和dATP等诱导后,从线粒体内膜释放到细胞质中发挥凋亡作用。它们抑制凋亡也是通过干扰半胱天冬蛋白酶(caspase)来实现的。有研究表明Smac/Diablo蛋白(second mitochondria-derived of caspase, SMAC,第二个线粒体衍生的胱天蛋白酶激活剂/direct

表1 Livin蛋白在NSCLC组织、癌旁和肺良性组织中的表达

组织	例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P值
NSCLC组织	45	28	17	62.22	37.228	0.000
癌旁肺组织	35	1	34	2.86		
肺良性瘤样病变组织	15	1	14	6.67		

表2 Livin 蛋白在 NSCLC 组织中的表达及其与临床病理特征的关系

项目	例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
年龄					0.180	0.672
<60 岁	23	15	8	65.22		
>60 岁	22	13	9	59.09		
性别					0.567	0.451
男	27	18	9	66.67		
女	18	10	8	55.56		
吸烟					0.377	0.539
有	29	19	10	65.52		
无	16	9	7	56.25		
病理类型					0.338	0.844
鳞癌	19	11	8	57.89		
腺癌	21	14	7	66.67		
大细胞癌	5	3	2	3/5		
分化程度					2.008	0.156
低、未分化	32	22	10	68.75		
中、高分化	13	6	7	46.15		
淋巴结转移					0.331	0.565
阴性	35	21	14	60.00		
阳性	10	7	3	70.00		
病理分期					0.382	0.537
I ~ II 期	32	19	13	59.37		
III ~ IV 期	13	9	4	69.23		

表3 Livin 蛋白与 p53、bcl-2 蛋白表达的关系

项目	例数	Livin 蛋白		r 值	P 值
		阳性例数	阴性例数		
p53 蛋白表达					
阴性	16	6	10	0.379	0.011
阳性	29	22	7		
bcl-2 蛋白表达					
阴性	14	3	11	0.565	<0.001
阳性	31	25	6		

IAP binding protein with low pI, DIABLO, 低 pI 的 IAP 直接结合蛋白)能与 Livin 中的 BIR 结构域结合,抑制其活性,促进细胞凋亡^[7-8]。细胞在接收到足够的凋亡刺激信号后,caspase-3、caspase-7、caspase-9 的酶水解作用被激活而执行凋亡。Kasof 等^[5]证明 Livin 能够直接抑制 caspase-3、caspase-7、caspase-9 的酶水解作用,Livin 的 BIR 结构域能够和 caspase 结合而抑制它的功能。Livin 还能够在凋亡起始点直接干扰 Procaspase-9 或直接干扰 caspase-9 的活性^[9]。可见 Livin 在细胞凋亡中

起重要作用。

我们的研究结果显示,Livin 在 NSCLC 的阳性表达率明显高于癌旁正常组织中的表达,表明 Livin 的异常表达与 NSCLC 关系密切,参与了 NSCLC 的发生。我们的研究结果还发现,Livin 的表达与癌组织病理类型、分化程度和淋巴结转移无明显相关性,提示 Livin 可能不参与 NSCLC 的进展,需要后续进一步研究确定是否可以作为预测 NSCLC 患者预后的参考指标之一。

肿瘤的发生是一个多因素、多步骤的发展过程,是多基因共同作用的结果。p53 基因属于抑癌基因,在监视基因组的完整性和修复 DNA 损伤方面起着重要作用。p53 蛋白有野生型(wild-type, wt-p53) p53 蛋白和突变型 p53 蛋白(mutation-type, mt-P53)两种,其中野生型为抑癌基因而突变型为促癌基因。wt-p53 在细胞中含量很少,平均 5000 分子/细胞,且易水解,半衰期短,仅 20 ~ 30 min,用一般的免疫组化方法不能检测到;mt-p53 由于空间构型改变,导致稳定性增加,并且与一些癌基因产物形成稳定复合物,使其半衰期大大延长,可达 20 ~ 40 h,其在细胞中堆积可用免疫组化方法检测到^[10]。大量实验表证明^[11-13],在超过 50% 的人

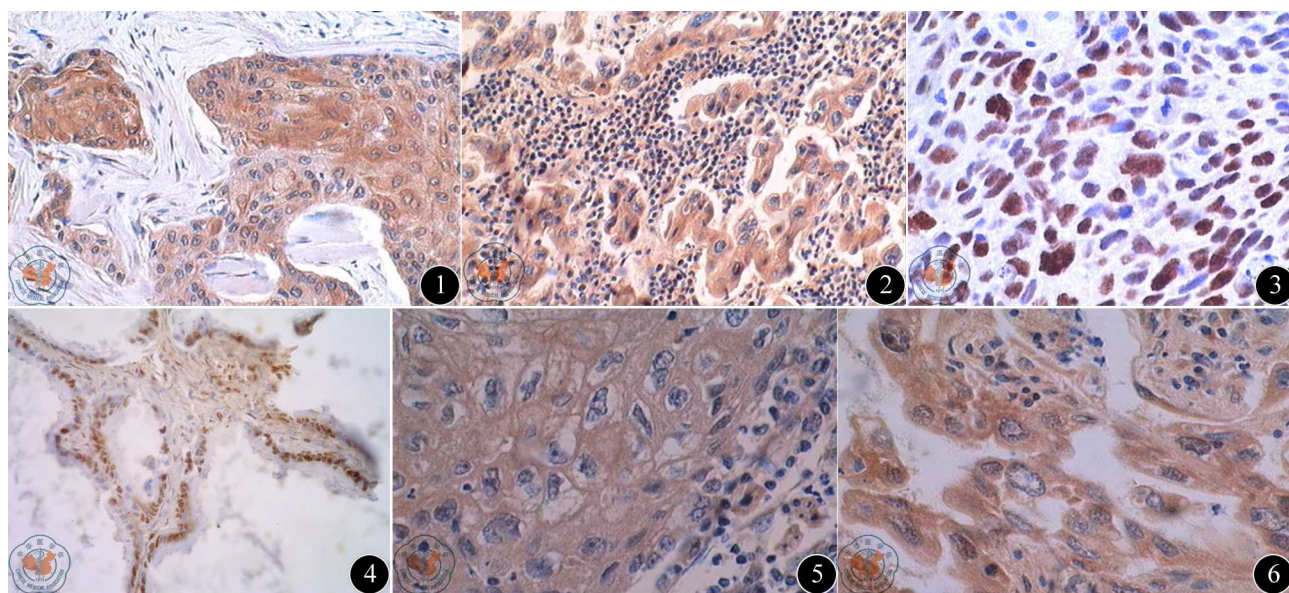


图1 Livin蛋白在肺鳞癌胞质中的表达(SP×400) 图2 Livin蛋白在肺腺癌胞质中的表达(SP×400) 图3 p53蛋白在肺鳞癌细胞核中的表达(SP×400) 图4 p53蛋白在肺腺癌细胞核中的表达(SP×400) 图5 bcl-2蛋白在肺鳞癌胞质中的表达(SP×400) 图6 bcl-2蛋白在肺腺癌胞质中的表达(SP×400)

类肿瘤中发现有 p53 基因的突变,尤其在肺癌中的发生频率更为多见,而在正常肺组织中均未发现突变型 p53 基因的表达。bcl-2 基因是 B 细胞淋巴瘤/白血病(B-cell lymphoma/leukemia-2)基因的缩写,它抑制许多凋亡信号引起的细胞凋亡,延长细胞的异常生存时间^[14],促进有转化作用的基因突变的积累,并协助细胞逃避免疫系统的监视作用,从而参与肿瘤的发生、发展。本研究结果显示,p53 蛋白在 NSCLC 组织中的阳性表达为 64.45% (29/45),在 29 例 p53 蛋白表达阳性者中 Livin 蛋白表达阳性率为 75.86% (22/29),阴性率为 24.14% (7/29),两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。bcl-2 蛋白 68.89% 表达阳性,在 31 例 bcl-2 蛋白表达阳性者中,Livin 蛋白表达阳性率为 80.65%,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$),提示肺癌组织中 Livin 蛋白表达与 p53、bcl-2 蛋白异常表达密切相关。凋亡抑制基因 bcl-2 作用于 caspase 级联反应的上游^[15],突变型 p53 基因具有下调 bcl-2 的作用,同时失去了活化凋亡促进基因 BAX 的作用,而 Livin 主要在其下游直接抑制 caspase23。本研究结果显示 Livin 基因及 p53 基因(特别是 mt-p53)、bcl-2 在 NSCLC 的发生发展中起协同作用。

目前对 Livin 的研究还有许多问题尚未阐明,但随着人们对于其进一步认识,由于其参与 NSCLC 的发生,因此,Livin 有望成为 NSCLC 诊断和基因治疗的新靶点,为 NSCLC 的诊断和治疗开辟一条新途径。

参 考 文 献

[1] Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, et al. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. Clin

Chim Acta, 2005, 362:125-130.

- [2] Wagener N, Cmkovic-Mertens I, Vetter C, et al. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in renal cell carcinoma and nontumorous adult kidney. Br J Cancer, 2007, 97:1271-1276.
- [3] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of Livin, Survivin and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. Ann Oncol, 2003, 14:85-90.
- [4] Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, et al. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. Clin Chem, 2003, 49:1206-1208.
- [5] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. J Biol Chem, 2001, 276:3238-3246.
- [6] Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, et al. Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor; implications for Smac-dependent antiapoptotic activity of ML-IAP. Biochem J, 2005, 385:11-20.
- [7] Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, et al. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). J Biol Chem, 2002, 277:12275-12279.
- [8] Augello C, Caruso L, Maggioni M, et al. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. BMC Cancer, 2009, 9:125.
- [9] Dario C, Altieri DC, Carlo M. Survivin Apoptosis: An interloper between cell death and cell proliferation in cancer. Laborator Investigation, 1999, 79:1322-1331.
- [10] Barkic M, Cromarkovi S, Grabusic K, et al. The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl242 deficient mice and promotes their survival. Mol Cell Biol, 2009, 29:2489.
- [11] Helton ES, Chen X. p53 modulation of the DNA damage response. J Cell Biochem, 2007, 100:883-896.
- [12] Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. Nat Rev Cancer, 2007, 7:165-168.
- [13] Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. Cell Death Differ, 2006, 13:951-961.
- [14] Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science, 1997, 275:1132-1136.

- [15] Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 2004, 303: 1010-1014.

(收稿日期: 2012-07-19)

(本文编辑: 张岚)

崔肃, 张鑫, 许顺, 等. 凋亡抑制蛋白 Livin 在非小细胞肺癌中的表达及与 p53、bcl-2 的相关性[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(23): 7620-7624.



中华医学会