

Livin 和 caspase-3 在食管鳞癌组织中的表达及相关性分析

210009 南京 江苏省肿瘤医院放疗科 刘伟, 季明华, 朱军¹

【摘要】 目的 探讨食管鳞癌组织中 Livin 与 caspase-3 的表达情况, 以及两者与临床病理特征的关系。方法 采用免疫组织化学 SP 法检测 36 例食管鳞癌组织及 20 例癌旁正常食管组织中 Livin 和 caspase-3 蛋白的表达, 分析其与食管鳞癌临床病理特征的关系。结果 食管鳞癌组织中 Livin 的阳性表达率为 69.4%, 高于癌旁正常组织中的 10.0% ($P=0.000$); caspase-3 在食管鳞癌组织中的阳性表达率为 38.9%, 低于癌旁正常组织中的 80.0% ($P=0.003$)。两者表达与组织分化程度、浆膜浸润和淋巴结转移有关, 与性别、年龄无关。Livin 与 caspase-3 的表达在食管鳞癌组织中呈负相关($r=-0.337, P=0.045$)。结论 Livin 和 caspase-3 在食管鳞癌的发生、发展过程中起重要作用。

【关键词】 食管鳞癌; Livin; caspase-3

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2013)09-0779-03

Expression and relative analysis of Livin and caspase-3 in esophageal squamous cell carcinoma

LIU Wei, JI Minghua, ZHU Jun. Department of Radiotherapy Oncology, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China

Corresponding author: ZHU Jun, E-mail: zhujdr@126.com

【Abstract】 Objective To explore the expression of Livin and caspase-3 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and their relationship with clinical features. **Methods** The expressions of Livin and caspase-3 in 36 cases of ESCC and 20 cases of normal esophageal tissue (control group) were detected using SP method and their relationship with clinical pathological features was investigated. **Results** The positive rate of Livin in ESCC was 69.4%, higher than 10.0% in control group ($P=0.000$). The positive rate of caspase-3 in ESCC was 38.9%, lower than 80.0% in control group ($P=0.003$). The expression of Livin and caspase-3 was related with histological differentiation, serosal infiltration and lymph node metastasis, but not with sex and age. Negative association was found between the expressions of Livin and caspase-3 in ESCC tissue ($r=-0.337, P=0.045$). **Conclusion** Livin and caspase-3 play an important role in the occurrence and development of ESCC.

【Key Words】 Esophageal squamous cell carcinoma; Livin; Caspase-3

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 鳞癌是主要的病理类型, 发病率呈逐年增加的趋势, 发现时多为中晚期, 预后较差, 病死率较高, 至今发病机制尚不清楚。研究表明, 肿瘤发生与细胞凋亡异常密切相关, 多种凋亡相关基因异常表达参与食管癌的发生、发展^[1]。Livin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白家族 (IAPs) 中的新成员, 能特异性地表达于肿瘤组织和胚胎组织, 而在正常组织中较少表达或不表达^[2]。caspase-3 是凋亡蛋白 Caspase 家族中最重要的成员, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的关键蛋白酶^[3]。本研究采用免疫组化法检测食管鳞癌组织中 Livin、caspase-3 蛋白的表达情况, 旨在探讨二者

在食管鳞癌发生、发展过程中的关系, 以为食管鳞癌的诊断与临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集江苏省肿瘤医院 2012 年 3 月至 2012 年 10 月手术切除并经病理证实的 36 例食管鳞癌组织标本, 其中男性 24 例, 女性 12 例; 年龄 40~70 岁, 平均 55.5 岁; 组织分化程度: 高、中分化 16 例, 低分化 20 例; 浆膜层浸润 26 例, 无浆膜层浸润 10 例; 淋巴结转移 19 例, 无淋巴结转移 17 例; 所有患者术前均未行放、化疗。另选距癌旁 ≥ 5 cm 的正常食管组织标本 20 例作为正常对照。

1.2 主要试剂 兔抗人 Livin 多克隆抗体、兔抗人 caspase-3 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,免疫组化 SP 试剂盒和 DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 检测方法 采用免疫组化 SP 法检测 Livin 和 caspase-3 蛋白的表达。取石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,分别加入兔抗人 Livin 抗体(1:100)和兔抗人 caspase-3 抗体(1:100),4℃温箱过夜,第 2 天加入生物素抗兔 IgG(1:100),37℃ 30min DAB 显色,各步骤之间用 PBS 液冲洗 3 次,每次 5min,依次脱水封片。以正常兔 IgG 代替一抗作为阴性对照,以已知阳性切片作为阳性对照。各步骤均严格按试剂盒说明书进行操作。

1.4 结果判定 Livin 和 caspase-3 阳性表达为细胞质或细胞核内出现棕褐色或棕黄色颗粒。结果判定参照文献[4]:每例标本随机选取 10 个高倍镜视野,每个视野计数 100 个细胞;根据染色强度及阳性细胞比例进行综合评分:(1)染色强度评分:无色计为 0 分,浅黄计 1 分,黄色计 2 分,棕黄色计 3 分;(2)阳性细胞百分比评分:<5%计为 0 分,6%~25%计 1 分,26%~50%计 2 分,>50%计 3 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积 ≤ 1 分者设为阴性,≥ 2 分者为阳性。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 11.5 软件处理数据。两样本率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法,相关性分析采用 Spearman 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin、caspase-3 在食管鳞癌和癌旁正常组织中的表达 Livin 蛋白在食管癌、癌旁正常组织中的阳性表达率分别为 69.4% (25/36) 和 10.0% (2/20),差异有统计学意义($\chi^2 = 18.196, P = 0.000$)。caspase-3 蛋白在食管癌、癌旁正常组织中的阳性表达率分别为 38.9% (14/36) 和 80.0% (16/20),差异有统计学意义($\chi^2 = 8.737, P = 0.003$)。

2.2 Livin、caspase-3 的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系 食管鳞癌组织中 Livin、caspase-3 表达与组织分化程度、浆膜浸润及淋巴结转移有关($P < 0.05$),与性别、年龄无关($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 食管鳞癌组织中 Livin 和 caspase-3 蛋白表达的相关性 25 例 Livin 蛋白阳性表达者中,caspase-3 蛋白阳性表达者 7 例;14 例 caspase-3 蛋白阳性表

表 1 Livin、caspase-3 的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系[例(%)]

临床病理参数	n	Livin	P	caspase-3	P
年龄(岁)					
≤55	13	8(61.5)	0.475	6(46.1)	0.723
>55	23	17(73.9)		8(34.8)	
性别					
男	24	15(62.5)	0.268	10(41.6)	0.727
女	12	10(83.3)		4(33.3)	
分化程度					
高、中	16	8(50.0)	0.034	10(62.5)	0.016
低	20	17(85.0)		4(20.0)	
浆膜浸润					
无	10	4(40.0)	0.039	7(70.0)	0.026
有	26	21(80.8)		7(26.9)	
淋巴结转移					
无	17	8(47.1)	0.010	10(58.8)	0.039
有	19	17(89.5)		4(21.1)	

达者中,Livin 蛋白阳性表达者 7 例。Spearman 相关分析显示,Livin 蛋白表达与 caspase-3 蛋白表达呈负相关($r = -0.337, P = 0.045$)。见表 2。

表 2 食管鳞癌组织中 Livin 和 caspase-3 蛋白表达的相关性

Livin	n	caspase-3		r	P
		+	-		
+	25	7	18	-0.337	0.045
-	11	7	4		

3 讨论

细胞凋亡是一种基因控制的生理性死亡过程,细胞凋亡和细胞增殖的动态平衡是机体维持内环境稳定的必要条件。细胞凋亡的失调是肿瘤发生的重要机制之一,一直是国内外肿瘤领域的研究热点,在肿瘤的发生、发展中扮演着重要的角色^[5]。

Livin 基因是一个近年来发现的凋亡抑制基因,具有强大的凋亡抑制功能,其异常表达与多种人类肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[6]。近年来已在结直肠癌^[7]、膀胱癌^[8]、肺癌^[9]、口腔鳞癌^[10]和黑色素瘤^[11]等实体瘤组织和血清中检测出 Livin 过表达的研究报道,提出 Livin 对这些肿瘤的预后具有一定参考价值。本研究显示 Livin 在食管癌组织中的阳性表达率明显高于其在癌旁正常组织中的阳性

表达率($P = 0.000$),表明 Livin 的异常表达与食管癌关系密切。本研究进一步分析发现,Livin 表达与食管癌组织分化程度、浆膜浸润、淋巴结转移相关,即在组织分化差、有浆膜浸润和淋巴结转移者中的阳性表达率升高,提示 Livin 表达可以影响食管鳞癌的生物行为,表明 Livin 参与了食管鳞癌的发生、发展、侵袭及转移。因此,我们认为 Livin 可能是食管鳞癌预后不良的指征之一。

Caspase 是一组半胱氨酸蛋白酶,caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的成员,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的关键蛋白酶,大多数触发细胞凋亡的刺激因素最终通过 caspase-3 介导的信号传导途径实现细胞凋亡,是细胞凋亡的“执行者”^[12]。caspase-3 的活化意味着细胞凋亡进入不可逆转的阶段。本研究显示,caspase-3 在食管癌组织中的阳性表达率明显低于其在癌旁正常组织中的表达率($P = 0.003$),提示 caspase-3 的异常表达参与了食管癌的发生、发展。进一步分析发现,caspase-3 在组织分化差、有浆膜浸润和淋巴结转移者中阳性表达率降低,提示 caspase-3 表达减弱,细胞凋亡受到抑制,肿瘤细胞增殖活跃,表明 caspase-3 的低表达与食管鳞癌细胞的分化、浸润和转移有关。

Livin 蛋白 N 端含有一个凋亡抑制蛋白重复序列(BIR)结构,BIR 结构与 caspase-3 结合后,直接抑制 caspase-3 蛋白酶水解作用,从而抑制细胞凋亡的发生^[2]。本研究采用 Spearman 相关性分析显示,食管癌组织中 Livin 与 caspase-3 蛋白表达呈负相关。提示 Livin 可能直接作用于 caspase-3 并抑制其活性,阻断细胞的凋亡过程,从而促进了食管鳞癌发生、发展的生物学进程。

综上所述,Livin 和 caspase-3 与食管鳞癌关系密切,参与了食管鳞癌的发生、发展、侵袭及转移过程,两者的表达呈负相关。联合检测 Livin 和 caspase-3,可作为评估食管癌生物学行为和判断预后的重要标志,并可能为食管鳞癌诊断及靶向治疗

提供新思路 and 途径。

参考文献

- [1] Chen L, Ren GS, Li F, et al. Expression of livin and vascular endothelial growth factor in different clinical stages of human esophageal Carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(37): 5749 - 5754.
- [2] Wang L, Zhang Q, Liu B, et al. Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(12): 3661 - 3669.
- [3] Chen N, Gong J, Chen X, et al. Caspase and inhibitor of apoptosis proteins in cutaneous and mucosal melanoma: expression profile and clinicopathologic significance[J]. Hum Pathol, 2009, 40(7): 950 - 956.
- [4] Cheng T, Zhang JG, Cheng YH, et al. Relationship between PTEN and Livin expression and malignancy of renal cell carcinomas[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6): 2681 - 2685.
- [5] Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807(6): 735 - 745.
- [6] Yan B. Research progress on Livin protein; an inhibitor of apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357(1-2): 39 - 45.
- [7] Wang X, Xu J, Ju S, et al. Livin gene plays a role in drug resistance of colon cancer cells[J]. Clin Biochem, 2010, 43(7-8): 655 - 660.
- [8] Liu HB, Kong CZ, Zeng Y, et al. Livin may serve as a marker for prognosis of bladder cancer relapse and a target of bladder cancer treatment[J]. Urol Oncol, 2009, 27(3): 277 - 283.
- [9] 李鸿茹, 陈愉生, 陈刚, 等. Livin 在肺癌组织中的表达及与 caspase-3 的相关性初步探讨[J]. 中国肺癌杂志, 2007, 10(6): 486 - 490.
- [10] 蒋蕾, 李向新, 白玲, 等. Livin 在口腔鳞癌浸润前沿中的表达及临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(6): 1398 - 1400.
- [11] Lazar I, Perlman R, Lotem M, et al. The clinical effect of the inhibitor of apoptosis protein livin in melanoma[J]. Oncology, 2012, 82(4): 197 - 204.
- [12] D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(7): 1104 - 1114.

收稿日期: 2013-02-20; 修回日期: 2013-05-08