

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.036

Livin 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义

王永亮 王 丹 郭 慧 刘长青 于海丰 甄春英 刘宝刚[△]

(哈尔滨医科大学附属第三临床医院 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:研究 livin 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与非小细胞肺癌的生物学特性及临床预后的关系。**方法:**通过免疫组化的方法检测和比较 88 例非小细胞肺癌组织和 20 例癌旁正常肺组织中 livin 蛋白的表达,并分析其与非小细胞肺癌的临床病理特征和预后的相关性。**结果:**非小细胞肺癌组织及癌旁正常肺组织中 livin 蛋白的阳性表达率分别为 54.55%和 5%,差异有显著统计学差异($P<0.05$)。非小细胞肺癌组织中 livin 蛋白的表达水平与淋巴结转移、TNM 分期显著相关($P<0.05$),但与患者的性别、年龄、分化程度及病理学类型无关($P>0.05$)。Livin 高表达的非小细胞肺癌患者生存时间显著短于 livin 低表达的患者($P<0.05$)。**结论:**Livin 蛋白在非小细胞肺癌的发生及发展中起重要作用并与患者的预后相关,可能作为非小细胞肺癌新的防治靶点。

关键词:凋亡抑制蛋白;Livin;非小细胞肺癌;表达;临床意义

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-748-04

Expression of Livin in Non-small Cell Lung Cancer and its Clinical Significance

LWANG Yong-liang, WANG Dan, GUO Hui, LIU Chang-qing, YU Hai-feng, ZHEN Chun-ying, LIU Bao-gang[△]

(The Third Affiliated Hospital of Haerbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of livin in non-small cell lung cancer and its clinical significance. **Methods:** The livin protein expression in 88 cases of NSCLC tissue samples and 20 cases of normal lung tissue samples were detected through immunohistochemistry. **Results:** The positive expression rate of livin protein in NSCLC tissues and normal tissues were respectively 54.55 % and 5 %. Which was significantly higher in NSCLC tissues ($P<0.05$). The protein expression of livin was significantly related with the lymph node metastasis, TNM stage, but it was unrelated with sex, age and differentiation degree and pathological type of NSCLC. The survival time in livin high expression group was significantly shorter than that in the livin low expression group. **Conclusion:** Livin protein had important role in the occurrence and development of NSCLC and was related with its prognosis, which would become a new therapeutic targets of NSCLC.

Key words: Inhibitor of apoptosis protein (IAP); Livin; Non-small cell lung cancer(NSCLC); Expression; Clinical significance

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-748-04

前言

目前,肺癌在世界范围内居癌症死亡原因的首位,其发病率高,预后差。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的 85 %,5 年生存率仅 15 %左右^[1,2]。因此,寻找能够预测肺癌发生和发展的分子靶点,以降低肺癌的发病率及死亡率具有十分重要的临床意义。随着分子生物学研究的深入,人们发现许多凋亡相关基因参与了肺癌的发生和发展。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)是近年来备受瞩目的一类蛋白家族^[3],livin 是 IAP 家族的新成员,具有抗细胞凋亡作用,在许多恶性肿瘤中均呈高度表达,在抑制细胞凋亡和促进肿瘤发生、发展中起着重要作用^[4-6]。本研究通过免疫组化的方法检测 NSCLC 组织及癌旁正常肺组织中 livin 蛋白的表达,旨

在探讨其与非小细胞肺癌的生物学特性及临床预后的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

88 例肺癌标本和 20 例癌旁正常组织均来自哈尔滨医科大学附属第三医院 2007 年 12 月至 2008 年 7 月手术切除标本,患者术前未经治疗,88 例肺癌患者中男 54 例、女 34 例;年龄 ≥ 60 岁者 28 例, <60 岁者 60 例;高分化者 18 例,中分化者 18 例,中低分化者 20 例,低分化者 32 例;有淋巴结转移者 37 例,无淋巴结转移者 51 例;按照国际肺癌研究中心(IASLC)第 7 版肺癌分期为标准^[7],I 期 29 例,II 期 20 例,III 期 39 例。取距肿瘤组织边缘的癌旁正常肺组织标本 20 例做对照,所有病例术后均得已随访。

1.2 试剂及方法

Livin 多克隆抗体工作浓度 1 : 200 (北京博奥森生物有限公司);DAB 显色试剂盒:北京中杉金桥公司。所有标本在 10 % 甲醛液内固定,常规石蜡包埋。连续切片 5 张,片厚 4 μm ,免疫组化 SABC 法,具体操作步骤按照说明书执行。

1.3 结果判定标准

作者简介:王永亮(1983-),男,硕士研究生,从事肺癌方向的研究,E-mail: d.l.q1986@163.com

[△]通讯作者:刘宝刚,主任医师,博士后,

电话:0451-86298691, E-mail: liubaogang1962@sina.com

(收稿日期:2013-05-08 接受日期:2013-05-31)

在显微镜下观察,根据染色的阳性强度及面积共同判断结果。判断标准采用半定量积分法判定:每例均随机观察5个高倍视野($X \times 400$),确定每个视野的阳性细胞率,算出平均数,阳性细胞所占比例 $\leq 5\%$ 为0分, $6\% \sim 25\%$ 为1分, $26\% \sim 50\%$ 为2分, $51\% \sim 75\%$ 为3分, $>75\%$ 为4分;阳性细胞表达的着色深度:基本不着色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。将两项积分相乘: $0 \sim 2$ 分为阴性(-), $3 \sim 4$ 分为弱阳性(+), $5 \sim 8$ 分为中度阳性(++), $9 \sim 12$ 分为强阳性(+++), $+$ ~ $+++$ 为阳性表达。本研究将 <9 分归为弱阳性(+),便于统计。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS18.0 统计软件处理,Livin 在非小细胞

肺癌组织中的阳性表达率的比较及其与非小细胞肺癌临床病理特征的相关性采用卡方检验,生存率的比较采用 Kaplan~Meier 法,Livin 不同染色程度的生存时间差异应用 Long~rank 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin 在非小细胞肺癌组织和癌旁正常肺组织中的表达

如图1所示,Livin 蛋白的免疫组织化学阳性信号主要定位于细胞浆,呈棕黄(褐)色细颗粒状。在 NSCLC 组织中,livin 蛋白的阳性表达率为 54.55% ,显著高于正常癌旁肺组织(5% , $P < 0.01$),见表1。

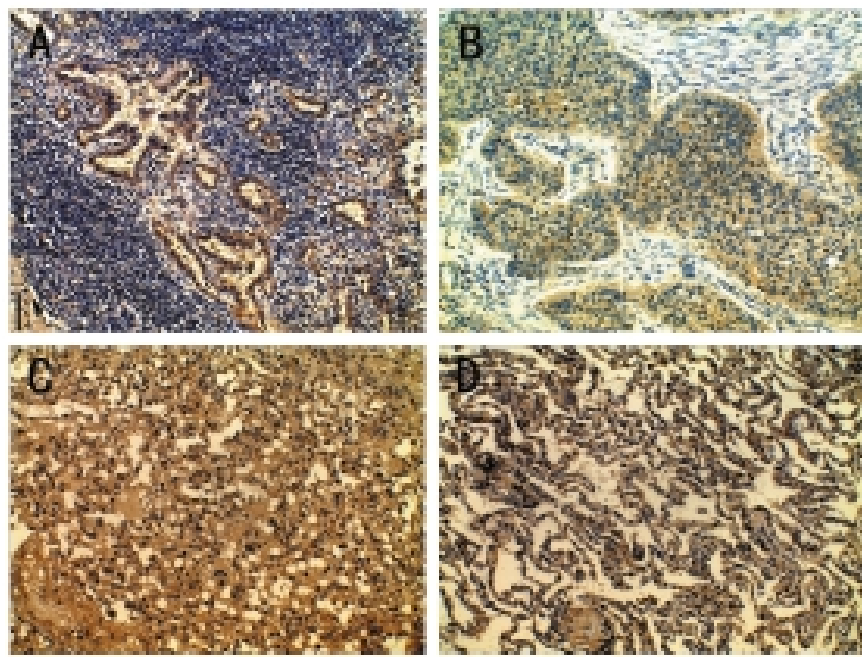


图1 Livin 在肺癌组织及癌旁正常肺组织中的表达

Fig.1 The expression of Livin in lung cancer and adjacent normal lung tissues

1-A 肺癌组织高表达($400\times$) 1-B 肺癌组织低表达($400\times$)

1-C 癌旁组织高表达($400\times$) 1-D 癌旁组织低表达($400\times$)

1-A high expression in the lung cancer tissue 1-B lower expression in the lung cancer tissue

1-C high expression in adjacent hepatic tissues 1-D lower expression in adjacent hepatic tissues

2.2 非小细胞肺癌 Livin 的表达与非小细胞肺癌生物学临床特征的关系

如表2所示,Livin 的表达与非小细胞肺癌的分期及淋巴结转移情况显著相关($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄和分化程度及病理类型均无关($P > 0.05$)。

2.3 Livin 的表达程度与非小细胞肺癌患者生存率和生存时间的关系

应用 Kaplan-Meier 法计算分析患者的生存时间与 Livin 表达程度的关系,结果显示 Livin 强表达与弱表达的患者两组生存率具有显著性差异($P < 0.001$)(见图2)。Livin 阴性表达患者的中位生存时间为 3.33 年,阳性表达患者的中位生存时间为 2.38 年,两组生存时间具有显著性差异($P = 0.001$),见表3。

3 讨论

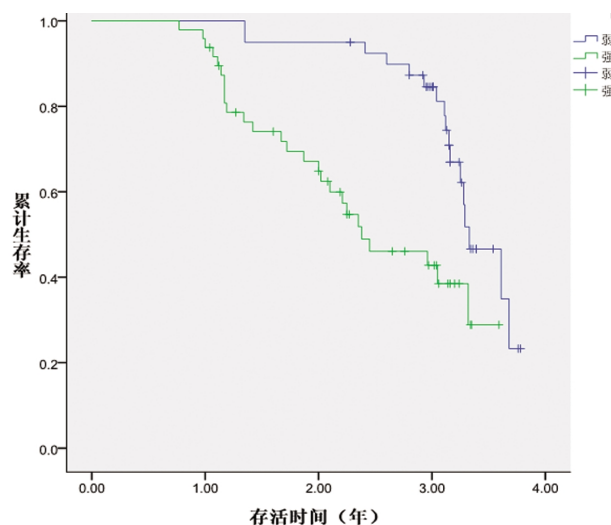


图2 生存率曲线图

Fig.2 Kaplan-Meier survival analysis for Livin

表 1 Livin 在肺癌组织和癌旁正常肺组织中的表达

Table1 The expression of Livin in human lung cancer and adjacent normal lung tissue

Group	Case	Livin colouring level		The positive expression rate (%)	χ^2	P value
		Positive expression	Negative expression			
Adjacent normal lung tissue	20	1	19	5	16.14	<0.001
Lung cancer tissue	88	48	40	54.55		

表 2 Livin 的表达与非小细胞肺癌临床特征的关系

Table 2 Correlation of the expression of livin with the clinical characteristics of non small cell lung cancer

Characteristics	Livin colouring level			Positive expression rate (%)	χ^2	P value
	Case	Positive expression	Negative expression			
Gender						
Male	54	33	21	61.11	2.43	0.12
Female	34	18	19	52.94		
Age						
< 60	60	34	26	50.00	0.34	0.56
≥ 60	28	14	14	56.67		
Staging						
Staging I	29	8	21	27.59	13.42	0.001
Staging II	20	12	8	60.00		
Staging III	39	28	11	71.79		
Pathology						
Adeno carcinoma	52	5	27	48.08	2.15	0.14
Squamous carcinoma	36	23	13	63.89		
Lymph nodes metastasis						
Nought	51	23	28	45.10	4.37	0.04
Generous	37	25	12	67.57		
Cell differentiation level #						
Poorly differentiated	32	20	12	62.50	4.17	0.24
Moderate poorly differentiated	20	13	7	65.00		
Moderately differentiated	18	7	11	38.89		
Well differentiated	18	8	10	44.44		

表 3 Livin 蛋白的表达与生存时间的关系

Table 3 The relationship between the livin protein expression and survival time

Livin	Median survival time(year)	χ^2	P value
Poor expression	3.33	11.35	0.001
High-expression	2.38		

细胞凋亡是指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡。在维持内部环境稳定多种生物进程,发展及有机体分化起着重要作用。细胞凋亡过程的紊乱可能促进肿瘤的发生和发展。Livin 是细胞凋亡蛋白抑制剂(IAPs)家族成员,通过绑定和抑制上游和下游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制细胞

凋亡^⑧。Livin 基因位于人染色体 20q13,长 4.6kb,由 6 个内含子和 7 个外显子构成,形成 280 个氨基酸的蛋白。Livin 蛋白主要存在于细胞核中,胞浆中的 livin 以丝状形式存在,含一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列 BIR(baculovirns IAP repeats)分子和一个羧基端环指结构域(RING),RING 结构域不参与抑制细

胞凋亡作用,但对 livin 在细胞内的合理分布具有重要的作用, BIR 结构域对于抗细胞凋亡的活性是必要的结构。Livin 绑定能介导细胞凋亡和抑制活性的半胱氨酸蛋白酶 -3/7/9 (caspases-3/7/9)^[9], BIR 结构域在抗凋亡过程中都与 caspases 相互作用^[10]。Livin 在正常组织中是低表达或不表达的,但在黑色素瘤,白血病,前列腺癌,结肠癌,脑胶质瘤等大部分恶性肿瘤中是高表达的^[11-13],由于在肿瘤组织中的特殊表达,近期 livin 蛋白已经成为肿瘤遗传诊断和治疗的研究热点。

本研究显示 livin 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达显著高于癌旁正常肺组织,与 Hariu^[6]的结果一致,表明 livin 在 NSCLC 的发生中起重要作用。此外,在 NSCLC 的患者中,有淋巴结转移组 livin 蛋白表达率 (67.57%) 比无淋巴结转移组 (45.10%) 显著升高,III 期 NSCLC 患者的 livin 蛋白表达率 (71.79%) 显著高于 I 期 (27.59%)、II 期 (60.00%),提示 livin 与 NSCLC 的进展有关。就 NSCLC 的生存时间而言,单因素生存分析显示临床分期及淋巴结转移与 livin 的表达对于 NSCLC 的生存时间有显著影响。且 Kaplan-Meier 法分析结果显示 livin 蛋白强表达组患者的生存率显著低于 livin 蛋白弱表达组,提示其强阳性表达与 NSCLC 的预后不良有关, livin 也许能成为评价 NSCLC 预后的标记物,这与 Gazzaniga^[17]报道的 livin 是早期浅表膀胱癌预后差的信号相似。其他一些文献也报道, livin 在多种恶性肿瘤中表达与患者预后明显相关^[18,19]。

总之, livin 有可能成为预测非小细胞肺癌患者预后的一个有价值的肿瘤分子标志物。通过此靶点的治疗^[20],我们有可能抑制 IAP 的表达,减少 livin 蛋白的表达,促进肿瘤细胞的凋亡,对于 NSCLC 的治疗提供一个新策略。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96
- [2] Silvestri GA, Alberg AJ, Ravenel J. The changing epidemiology of lung cancer with a focus on screening[J]. BMJ, 2009, 339: 451-454
- [3] 刘俊华, 吴纪祥, 刘益飞, 等. Livin 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(2): 247-249
Liu Jun-hua, Wu Ji-xiang, Liu Yi-fei, et al. Livin in non-small cell lung cancer the expression and clinical significance [J]. Journal of Modern Oncology 2010, 18(2): 247-249
- [4] Lin JH, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279: 820-831
- [5] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. Curt Biol, 2000, 10: 1359-1366
- [6] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 3238-3246
- [7] Okada Ban M, Thiery J P, Jouanneau J. Fibroblast Growth Factor-2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(3): 263-267
- [8] Liu Bin, Han Mei, Wen Jin-Kun, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment. Cancer Letters, 2007, 250: 168-176
- [9] Lee H J, Lee H J, Lee E O, et al. Mitochondria-cytochrome C-Caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis[J]. Cancer Lett, 2008, 270(2): 342-353
- [10] Nachmias B, Lazar I, Elmalech M, et al. Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and pro-apoptotic activity of Livin. Apoptosis, 2007, 12(9): 9-15
- [11] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J]. FEBS Lett, 2001, 495: 56-60
- [12] Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, et al. Detection of anti-Livin antibody in gastrointestinal cancer patients[J]. Clin Chem, 2003, 49: 1206-1208
- [13] Schmolinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, et al. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 3398-3403
- [14] 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
- [15] 赵立斌, 赵永红, 贺红梅, 等. Survivin 和 Livin 蛋白在脑胶质瘤中的表达及意义[J]. 河北医药, 2010, 32(11): 1367-1369
Zhao Li-bin, Zhao Yong-hong, He Hong-mei, et al. Survivin and Livin protein in brain glioma the expression and significance [J]. Hebei medical Journal, 2010, 32(11): 1367-1369
- [16] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 1000-1009
- [17] 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[J]. Ann Oncol, 2003, 14: 85-90
- [18] Nedelcu T, Kubista B, Koller A, et al. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134: 237-244
- [19] Choi J, Hwang YK, Sung KW, et al. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favourable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2007, 109: 471-477
- [20] Oh BY, Lee RA, Kim KH, et al. siRNA targeting Livin decreases tumor in a xenograft model for colon cancer[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(20): 2563-2571