

文章编号:1005-6947(2008)07-0711-03

· 简要论著 ·

肝癌组织中 Livin 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系

崔东旭, 魏晰麟, 刘宝林, 孙韶龙, 刘臻, 张小薄

(中国医科大学附属盛京医院 肝胆胰肿瘤外科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要:目的 探讨 Livin 蛋白在肝癌组织中的表达及其意义。方法 采用免疫组化 SP 法检测 78 例肝癌及 33 例肝血管瘤旁正常肝组织中 Livin 蛋白的表达;光镜下计数阳性细胞数并根据不同临床特征进行统计学分析。结果 肝癌组织中 Livin 蛋白的表达明显高于正常肝组织($P < 0.001$);Livin 蛋白的表达与患者的性别、年龄以及是否患有乙肝、丙肝、TNM 临床分期均无明显关系,而与肝癌是否发生转移有明显关系;肝癌发生转移者 Livin 蛋白的表达率明显高于未转移者($P < 0.05$)。结论 Livin 蛋白的过度表达可能在肝癌的发生、发展中起重要作用,并与肝癌的转移密切相关。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7):711-713]

关键词: 癌, 肝细胞; Livin 蛋白; 细胞凋亡

中图分类号: R 735.7

文献标识码: B

Livin 是人类抑制凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,最初从人类胚肾 cDNA 文库中克隆获得,故曾称 KIAP(kidney inhibitor

of apoptosis protein)^[1]。由于该基因在黑色素瘤细胞高度表达,故又称 ML-IAP(melanoma inhibitor of apoptosis protein)^[2]。其特异性高表达于肿瘤组织如黑色素瘤、宫颈癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤以及肺癌等^[3-6],而受到广泛关注。然而目前 Livin 在肝癌组织中表达的相关研究尚少。本研究旨在进一步探讨肝癌组织中 Livin 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系。

收稿日期:2008-02-22; **修订日期:**2008-05-12。

作者简介:崔东旭,男,中国医科大学附属盛京医院肝胆胰肿瘤外科副教授,主要从事肝胆胰肿瘤外科及器官移植的临床及实验方面的研究。

通讯作者:崔东旭 E-mail:cuidongxu@hotmail.com

参考文献:

- [1] Zhu J, Wang S, Bie P. *et al.* Apoptosis and regeneration of sinusoidal endothelial cells after extended cold preservation and transplantation of rat liver [J]. *Transplantation*, 2007, 84(11):1483-1491.
- [2] Choi SI, Jeong CS, Cho SY. *et al.* Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(10):1328-1335.
- [3] Czaja MJ. Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(5):759-767.
- [4] 原春辉,刘永锋,赵宁,等.腺苷对移植胰腺再灌注损伤保护作用的实验研究[J].中国普通外科杂志,2005,(5):351-354.
- [5] 于昕,陈炜,罗蒙,等.腺苷 A2 型受体在肝窦内皮细胞

- 一氧化氮生成中的作用[J].外科理论与实践,2004,9(40):310-313.
- [6] Peralta C, Hotter G, Closa D, *et al.* The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors [J]. *Hepatology*, 1999, 29(1):126-132.
- [7] Rivo J, Zeira E, Galun E. *et al.* Attenuation of reperfusion lung injury and apoptosis by A2A adenosine receptor activation is associated with modulation of Bcl-2 and Bax expression and activation of extracellular signal-regulated kinases [J]. *Shock*, 2007, 27(3):266-273.
- [8] 宋少伟, Gulik TM van, 刘永锋, 等.大鼠肝脏缺血再灌注损伤后 5'核苷酸酶和乳酸脱氢酶活性变化的研究 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7(8):484-486.
- [9] Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A2 receptor and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cell against storage/reperfusion injury in rat liver [J]. *Hepatology*, 2000, 32(2):297-302.

1 材料与方法

1.1 标本来源及其一般资料

收集本院肝胆胰肿瘤外科 2005 年 1 月—2006 年 1 月手术切除且临床资料完整的 78 例肝癌标本(肝癌组),术前均未行放疗及化疗,术后病理证实组织类型均为肝细胞癌(HCC)。同期收集 33 例肝血管瘤旁肝组织标本作为正常对照组。两组病例的性别构成和年龄无统计学差异(表 1)。标本均用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片。肝癌组肝癌侵袭转移的判定标准为:肝门淋巴结转移,门静脉癌栓形成,癌周多个卫星结形成,癌组织浸润破坏肿瘤包膜;凡符合上述条件中的一项或一项以上者定为有转移倾向。

表 1 肝癌组与正常对照组间年龄与性别构成比较

| 年龄和性别 | 肝癌组 | 正常对照组 | χ^2 | <i>P</i> |
|-----------|-----|-------|---------------------|----------|
| 年龄 | | | | |
| <60 | 52 | 19 | 0.831 | 0.362 |
| ≥ 60 | 26 | 14 | | |
| 男 | 71 | 25 | 3.411 ¹⁾ | 0.065 |
| 女 | 7 | 8 | | |

注:1)为校正卡方值

1.2 试剂及实验方法

兔抗人 Livin 多克隆抗体为武汉博士德生物工程公司产品;山羊抗兔 SP 免疫组织化学(免疫组化)染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒均为北京中山生物技术有限公司产品。

采用免疫组化 SP 法检测 Livin 表达率。石蜡包埋组织切片常规脱蜡,水化后经 3% 过氧化氢处理,微波抗原修复;其余染色步骤按试剂说明书进行。同时用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照组,用预实验中已知的 Livin 表达阳性片作阳性对照。

1.3 结果判断

Livin 蛋白染色阳性信号呈棕黄色颗粒,表达定位于肝细胞的胞浆(图 1)。在放大 400 倍的显微镜下观察,每张病理切片随机选取 10 个视野,每个视野计数 200 个细胞,取其阳性细胞计数平均值作为该张片子的阳性细胞数并计算阳性细胞

所占比例。Livin:阳性细胞数 < 5% 者为阴性(-),5% ~ 25% 为低度表达(+),26% ~ 50% 为中度表达(++),> 50% 为高度表达(+++)^[7]。

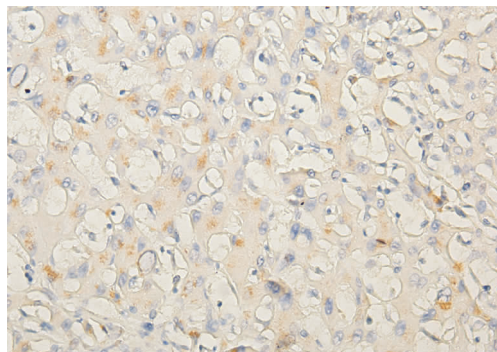


图 1 肝癌组织中 Livin 蛋白的表达(SP $\times 400$)

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件对数据资料进行分析,组间比较因数据为非正态分布而采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 判定为有统计学意义;采用卡方检验、校正卡方及 Fisher 精确概率法对不同临床特征进行分析。

2 结果

2.1 Livin 蛋白的表达

肝癌组 Livin 蛋白表达明显高于正常对照组($P < 0.001$)(表 2)。

2.2 Livin 蛋白表达与临床病理特征的关系

Livin 蛋白在肝癌组织中的表达与患者的性别、年龄、是否患有乙肝、丙肝以及 TNM 临床分期均无明显关系;上述指标组间差异无显著性($P > 0.05$)。Livin 与肿瘤是否转移存在明显关系,转移组中 Livin 蛋白的表达率明显高于非转移组($P < 0.05$)(表 3)。

表 2 两组 Livin 蛋白表达的计数比较

| 计数结果 | Livin (/200) | |
|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | 正常对照组(<i>n</i> = 33) | 肝癌组织(<i>n</i> = 80) |
| 中位数 | 0 | 34 |
| $P_{25} \sim P_{75}$ | 0 ~ 0 | 2 ~ 75 |
| <i>P</i> 值 | < 0.001 | |

注: P_{25} :第 25 百分位数, P_{75} :第 75 百分位数

表3 不同临床特征的 Livin 蛋白表达率

| 临床特征 | Livin(-) 例数(%) | Livin(+) 例数(%) | 合计 | χ^2 | P |
|-------|-------------------|-------------------|----|-----------------|-------|
| 年龄 | | | | | |
| <60 | 18(34.60) | 34(65.40) | 52 | 0.471 | 0.493 |
| >=60 | 7(26.90) | 19(73.10) | 26 | | |
| 性别 | | | | | |
| 男 | 21(29.60) | 50(70.40) | 71 | 1.138 | 0.286 |
| 女 | 4(57.10) | 3(42.90) | 7 | | |
| 乙肝 | | | | | |
| 无 | 2(100.00) | 0(0.00) | 2 | a ¹⁾ | 0.141 |
| 有 | 22(36.10) | 39(63.90) | 61 | | |
| 丙肝 | | | | | |
| 无 | 19(35.20) | 35(64.80) | 54 | 0.631 | 0.427 |
| 有 | 5(55.60) | 4(44.40) | 9 | | |
| 转移 | | | | | |
| 无 | 10(50.00) | 10(50.00) | 20 | 6.593 | 0.01 |
| 有 | 89(18.60) | 35(81.40) | 43 | | |
| TNM分期 | | | | | |
| I | 2(28.60) | 5(71.40) | 7 | 2.557 | 0.465 |
| II | 12(48.00) | 13(52.00) | 25 | | |
| III | 3(23.10) | 10(76.90) | 13 | | |
| IV | 7(38.90) | 11(61.10) | 18 | | |

1): a Fisher 精确概率法

3 讨论

如前所述, Livin 蛋白在多数恶性肿瘤组织中特异性高表达,而在正常成人的大多数终末组织中(胎盘组织除外)低表达或不表达^[3-6]。有实验表明 Livin 蛋白可通过直接抑制 caspase 或 caspase 前体 (procaspase)^[7-9] 及 MAPK JNK120^[10] 而发挥抑制细胞凋亡的作用。然而,一旦凋亡信号足够强而使 caspase-9 下游的 caspase-3, 6, 7 活化后, caspase-3 和 caspase-7 可以在 Livin 蛋白的 NH2 端 52 位的天冬氨酸处对 Livin 进行剪切, Livin 蛋白被剪切后的片断 p30 和 p28 则具有促进细胞凋亡的作用^[11]。表明只有完整的 Livin 蛋白才具有抑制细胞凋亡的作用。

本研究观察到, Livin 蛋白在肝癌组织中的表达明显高于正常肝组织,表明 Livin 蛋白可能与 HCC 的发生和发展密切相关。笔者认为 Livin 蛋

白很可能通过抑制细胞凋亡而参与 HCC 的发生及发展。

本研究同时发现 Livin 蛋白在肝癌组织中的表达与患者的性别、年龄、是否患有乙肝、丙肝以及 TNM 临床分期均无明显关系;而与肝癌是否转移则存在明显关系,转移组中 Livin 的表达率明显高于非转移组。关于 Livin 蛋白对肝癌转移的影响机制尚无法推测。

参考文献:

- [1] 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 (3): 820 - 831.
- [2] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, *et al.* ML - IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. *Curr Biol*, 2000, 10 (21): 1359 - 1366.
- [3] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. *Biol Chem*, 2001, 276 (5): 3238 - 3246.
- [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 (3): 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]. *Curr Biol*, 2000, 10 (21): 1359 - 1366.
- [6] 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 (1 - 2): 56 - 60. 1243 - 1252.
- [7] Liu X, Kim CN, Yang J, *et al.* Induction of apoptosis program in cell - free extracts, requirement for dATP and cytochrome C [J]. *Cell*, 1996, 86 (1): 147 - 157.
- [8] Luo X, Bndihardjo I, Zou H, *et al.* Bid, a Bel - 2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors [J]. *Cell*, 1998, 94 (4): 481 - 490.
- [9] Richter BW, Mir SS, Eiben LJ, *et al.* Molecular cloning of ILP - 2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21 (13): 4292 - 4301.
- [10] Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey OM, *et al.* IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22 (6): 1754 - 1766.
- [11] Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, *et al.* Caspase - mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug - resistant melanoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (19): 6340 - 6349.