

· 基础研究 ·

凋亡抑制因子 Livin 蛋白在喉癌组织中的表达及与预后的关系

赵厚育¹, 任 婕¹, 卓贤露¹, 邹 剑², 朱明凤¹, 刘世喜²

(1. 贵阳医学院附属医院耳鼻咽喉科, 贵州 贵阳 550004; 2. 四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 成都 610041)

摘要: **目的** 观察喉鳞癌组织中凋亡抑制因子 Livin 蛋白的表达, 探讨其在喉癌发生、发展中的作用及与其预后的关系。**方法** 采用免疫组化 SP 法检测 117 例喉鳞癌组织和 20 例正常舌腭弓黏膜组织中 Livin 蛋白的表达, 结合临床及随访资料, 分析其与各临床病理因素及预后的关系。**结果** ①喉癌组织中 Livin 蛋白阳性表达率为 61.5% (72/117), 在正常对照组中 Livin 蛋白呈阴性表达, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$); ② Livin 蛋白在喉鳞癌组织中阳性表达率与病程、临床分期及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 与年龄、临床分型和组织分化程度无关 ($P > 0.05$); ③ Cox 回归模型多因素分析结果显示临床分期晚、有淋巴结转移和 Livin 蛋白阳性表达是肿瘤复发的独立危险因素。**结论** Livin 蛋白可能在喉鳞癌的发生、发展中起一定作用, 其阳性表达可能在一定程度上提示喉癌的预后。

关键词: 喉鳞状细胞癌; Livin 蛋白; 免疫组化

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)04-0253-05

Expression of Livin in laryngeal squamous cell carcinoma and its relationship with prognosis

ZHAO Hou-yu, REN Jie, ZHUO Xian-lu, et al.

(Department of Otolaryngology, the Hospital Affiliated to Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Livin in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and its associations with carcinogenesis, progression and prognosis. **Methods** Immunohistochemistry was performed to detect the expression of Livin in 117 cases of LSCC and 20 controls of normal mucous membrane of palatoglossal pillar. Comparisons of the results with the clinical and follow-up data were conducted. **Results** ① Livin expression was detected in 61.5% (72/117) cases of LSCC and negative in all normal mucous membrane of palatoglossal pillars. A significant difference was observed between the two groups ($P < 0.05$). ② The positive rate of Livin expression was markedly associated with the course of disease, clinical stage and lymph node metastasis status respectively ($P < 0.05$). However, no associations of Livin expression with age, position and histological grades were observed ($P > 0.05$). ③ Multivariate cox proportional hazards model analysis demonstrated that clinical stage, lymph node metastasis and expression of Livin in LSCC were independent predictive factors in laryngeal cancer recurrence. **Conclusion** The elevated expression of Livin in LSCC might play an important role in the carcinogenesis of LSCC and its progression. Elevated expression of Livin in LSCC may predict the prognosis.

Key words: Laryngeal neoplasm; Carcinoma, squamous cell; Livin protein; Immunohistochemistry

喉癌是耳鼻咽喉头颈外科常见肿瘤,近年来发病率有逐渐增多趋势,由于发病部位为呼吸及发音的重要器官,所以对患者的危害性极

基金项目:贵州省科技厅资助项目,项目编号:E2009-40。
作者简介:赵厚育,男,副主任医师。
通讯作者:刘世喜,Email:Liusx999@163.com.

大。其病因和发病机制与其他恶性肿瘤相似,迄今尚未完全阐明。目前普遍认为恶性肿瘤的发生是一个长期的、多阶段的、多基因改变累积的过程,细胞凋亡的减少在肿瘤发生和发展中起重要作用。Livin 是新发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,特异性表达于人的胚胎组织及大多数人类实体瘤细胞和组织,在正常成人组织中低或无表达,提示该基因可能在肿瘤的发生和发展中起着重要作用^[1]。关于 Livin 蛋白在喉癌中的表达及机制的研究,目前国内外报道较少。本文采用免疫组化 SP 法检测喉鳞癌组织和正常黏膜组织中的 Livin 蛋白的表达,并结合临床资料及随访,探讨其与喉鳞癌发生、发展和预后的关系。

1 材料及方法

1.1 临床资料

收集 2004 年 1 月~2005 年 12 月因喉鳞状细胞癌在四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科住院手术的 129 例患者的临床资料并进行随访,其中 11 例失访,1 例因心肌梗死亡。剩余 117 例患者成为本组实验的研究对象。其中男 112 例,女 5 例;年龄 30~77 岁,中位数年龄 60.2 岁;平均病程 6.2 个月。按照 2002 年国际抗癌联盟(UICC)修订标准进行临床分类, T1N0M0 17 例, T1N1M0 2 例, T2N0M0 32 例, T2N1M0 1 例, T3N0M0 24 例, T3N1M0 7 例, T3N2M0 5 例, T4N0M0 2 例, T4N1M0 21 例, T4N2M0 5 例, T4N3M0 1 例; I 期 17 例, II 期 32 例, III 期 34 例, IV 期 34 例;声门上型 20 例,声门型 94 例,声门下型 3 例;高分化 44 例,中分化 50 例,低分化 23 例;有淋巴结转移 42 例,无淋巴结转移 75 例。所有患者术前均未进行放疗或化疗。平均随访时间 41.4 个月,复发 29 例,平均复发时间 9.7 个月。

选取 2007 年因慢性扁桃体炎在耳鼻咽喉科住院行扁桃体摘除患者的舌腭弓黏膜 20 例作对照(均为成人)。所有标本均及时固定、包埋、4 μm 连续切片备用。所有患者的石蜡标本由四川大学华西医院病理科提供。

1.2 主要试剂

鼠抗人 Livin 单克隆抗体系美国 Chemicon

公司产品, SP 试剂盒系北京中山生物技术公司产品。

1.3 实验方法

实验步骤严格按试剂盒说明进行,切片脱蜡后经 3% 双氧水封闭内源性过氧化物酶 10 min,经微波炉修复抗原,羊血清封闭后滴加浓度为 1:100 鼠抗人 Livin 单克隆抗体(一抗), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,滴加生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,滴加辣根酶标记链霉亲和素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,封片备检。所有标本均严格控制实验条件并作常规 HE 染色,于免疫组化 SP 法检测,将已知的乳腺癌切片作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液代替一抗,作为阴性对照。

1.4 结果判定标准

Livin 蛋白以在肿瘤细胞胞浆中出现淡黄至棕黄色颗粒者为阳性细胞,每例标本以 400 倍光镜下随意读取 500 个细胞,根据细胞的染色强度和染色细胞所占比例两者积分之和来判定。染色强度积分为:不染色 = 0 分,轻度染色 = 1 分,中度染色 = 2 分,强染色 = 3 分;染色细胞所占比例积分为:无细胞染色 = 0 分, <25% 细胞染色 = 1 分, $\geq 25\% \sim 50\%$ 细胞染色 = 2 分, >50% 细胞染色 = 3 分。若两者积分之和 ≥ 2 分可判为阳性^[2]。由两位不知患者临床病理资料的病理医师进行判定。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包进行统计学分析。两个独立样本均数比较采用 *t* 检验,多个样本之间的两两比较采用单因素方差分析;两组间百分率比较采用 χ^2 检验;预后因素分析采用 Kaplan-Meier 单因素生存分析、log-rank 检验,多因素分析采用 Cox 回归分析。 $P < 0.05$ 定为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin 蛋白在喉癌组织和正常黏膜组织中的表达

Livin 蛋白在喉鳞癌中阳性染色主要出现在肿瘤细胞胞浆中,为棕黄色颗粒,少部分伴有细胞核阳性染色。喉癌组中 Livin 蛋白阳性表达率为 61.5% (72/117) (图 1),而在正常对照组中 Livin 蛋白均呈阴性表达(0/20) (图 2)。

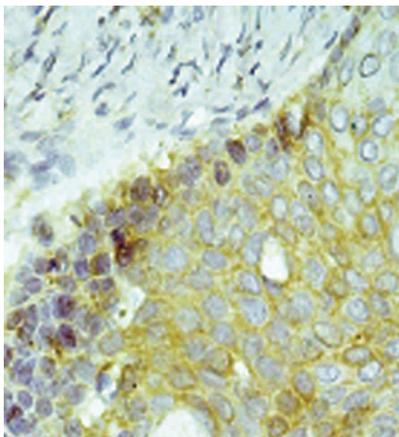


图 1

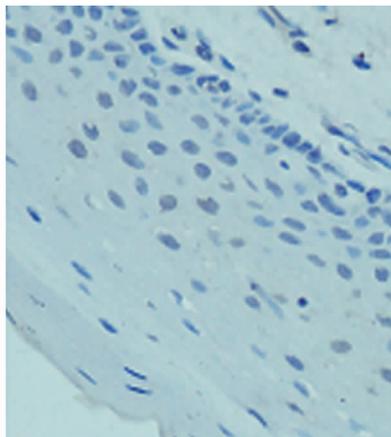


图 2

图 1 喉癌组中 Livin 蛋白阳性表达(SP 染色, ×400)

图 2 正常对照组中 Livin 蛋白阴性表达(SP 染色, ×400)

2.2 喉癌组织中 Livin 蛋白的表达与各临床病理因素间的关系

从 Livin 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达阳性率来看, Livin 蛋白阳性表达率随病程的增加而增加 ($P < 0.05$), TNM 分级中 T3、T4 的喉鳞癌组织中的阳性表达率较 T1、T2 显著升高 ($P < 0.05$), 有淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$), 复发组显著高于无复发组 ($P < 0.05$), 而 Livin 蛋白的阳性表达率在不同的年龄、临床分型和组织分化程度间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体结果见表 1。

2.3 喉癌组织中 Livin 蛋白的表达与复发的关系

2.3.1 单因素分析

采用 Kaplan-Meier 生存分析和 log-rank 检验, 对可能影响喉癌复发如年龄、病程、临床分型、TNM 分级、淋巴结有无转移、肿瘤分化程度及 Livin 蛋白阳性表达 7 个危险因素进行单因素分析, 结果显示, 病程长 ($P = 0.013$)、临床分期晚 ($P = 0.02$)、有淋

巴结转移 ($P = 0.026$) 及肿瘤中 Livin 蛋白的阳性表达 ($P = 0.002$) 的患者无复发生存率显著降低。Livin 蛋白阳性组的 3 年无复发生存率为 65.3%, 而 Livin 蛋白阴性组的 3 年无复发生存率为 91.1% (图 3)。由此说明: 除病程长、分期晚及淋巴结转移是喉癌复发的可能因素外, Livin 蛋白阳性表达也可能是喉癌复发的因素之一。

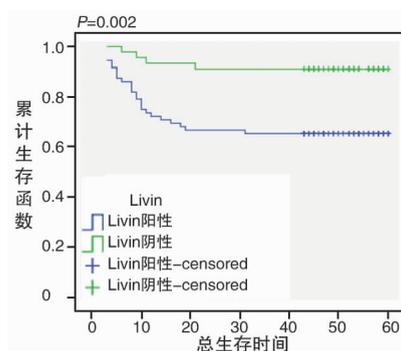


图 3 Livin 蛋白阳性表达与阴性表达患者的无复发生存率曲线图

表 1 喉癌组织中 Livin 蛋白的表达与临床病理特征的关系(例)

临床病理因素	例数	Livin 蛋白的表达		χ^2	P
		阳性	阴性		
年龄					
≤60 岁	58	35	23	0.069	>0.05
>60 岁	59	37	22		

续上表

临床病理因素	例数	Livin 蛋白的表达		χ^2	P
		阳性	阴性		
病程					
≤6 月	58	24	34	19.749	<0.05
>6 月	59	48	11		
临床分型					
声门型	94	58	36	0.005	>0.05
声门上、下型	23	14	9		
TNM 分级					
T1、T2	52	20	32	22.846	<0.05
T3、T4	65	53	12		
淋巴结转移					
有	42	39	3	25.127	<0.05
无	75	33	42		
分化程度					
高分化	44	26	18	0.247	>0.05
中分化	50	31	19		
低分化	23	15	8		
复发情况					
有	29	24	5	6.192	<0.05
无	88	48	40		

2.3.2 多因素分析 对可能影响喉癌复发如年龄、病程、临床分型、临床分期、淋巴结有无转移、肿瘤分化程度及 Livin 蛋白阳性表达 7 个危险因素进行 Cox 回归模型多因素分析,结果

显示,仅有 TNM 分级、淋巴结转移和 Livin 蛋白阳性表达是肿瘤复发的独立危险因素,而年龄、病程、临床分型和肿瘤分化程度不是肿瘤复发的独立危险因素,具体结果见表 2。

表 2 喉癌复发的多因素分析

临床变量	偏回归系数(β)	标准误(SE)	P	OR	95% 可信区间	
					下限	上限
TNM 分级	0.901	0.296	0.002	2.462	1.379	4.397
淋巴结转移	-0.166	0.075	0.026	0.847	0.732	0.981
Livin 蛋白表达	1.175	0.584	0.044	3.237	1.030	10.175

3 讨论

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,近年来喉癌的发病率有明显的增加趋势,对患者的危害性大,找到有效的防治方法具有重要的现实意义,但其确切的病因至今仍不十分明了,细胞凋亡过程紊乱可能是其重要原因之一。

Livin 蛋白是 IAP 家族的一个新成员,不同的组织中发现了 Livin 基因的表达^[3-5]。Livin 蛋白的组织分布具有明显的细胞选择性和肿瘤特异性,即在胚胎和发育的胎儿组织中表达,在终末分化的成人组织中不表达(胸腺、生殖腺除外),在黑色素瘤、肺癌、结肠癌、膀胱癌、淋巴瘤、乳腺癌、前列腺癌、脑胶质瘤及头颈部肉瘤等大多数肿瘤组织中表达^[6-9]。查阅国内

外文献,目前关于 Livin 蛋白在喉癌中的表达情况报道较少。唐乔等^[10] 研究报道 Livin 蛋白在喉癌组织中的阳性表达率为 82.76%,而在正常喉黏膜组织中未检出阳性结果。张建中等^[11] 研究发现 Livin 蛋白在喉癌中的阳性表达率为 67.21%,在喉不典型增生组织中为 25%,而在正常喉黏膜中表达阴性。本实验结果与文献报道一致,Livin 蛋白在正常黏膜组织中未检测到,在喉鳞状细胞癌组织中有 61.5% 阳性表达,提示 Livin 基因可能在肿瘤的发生和发展中起着重要作用。

喉癌的发生可以视为肿瘤细胞增殖活跃以及凋亡抑制打破了细胞增殖与凋亡之间的动态平衡,从而导致肿瘤细胞无限增殖。Livin 蛋白的过度表达则进一步扩大肿瘤细胞增殖与凋亡之间的差距,结果导致肿瘤细胞获得生长优势,促进了肿瘤的发生、发展、浸润和转移。肖虹等^[12] 研究显示凋亡抑制因子 Livin 蛋白在喉鳞癌组织和血液中高表达且与喉癌淋巴结转移、TNM 分级密切相关。笔者同时研究发现,Livin 蛋白阳性表达与病程、TNM 分级和淋巴结有无转移相关,Livin 蛋白阳性表达率随病程的增加而增加,随 TNM 分级的递增而递增,有淋巴结转移组中高于无淋巴结转移组,但与喉鳞状细胞癌患者的年龄、性别、临床分型和肿瘤分化程度不相关。

喉癌术后的复发转移是导致手术失败和患者死亡的主要原因,是影响患者术后生存率至关重要的因素,因此确定术后复发转移的高危因素具有重要意义。笔者通过 Kaplan-Meier 单因素生存分析显示,患者病程、临床分期、淋巴结有无转移及喉癌组织中 Livin 蛋白的阳性表达与术后复发明显相关,而与患者的年龄、性别、临床分型和肿瘤分化程度不相关。然而喉癌复发的影响因素是多方面因素同时作用的结果,如果仅对其中的某一因素单独进行分析,有较大的局限性。Cox 比例风险模型作为一种多因素分析方法,能定量筛选和综合分析各种因素的作用,克服混杂因素的干扰,是判断复发因素的较好方法。笔者采用的多因素分析结果显示仅有临床分期晚、淋巴结转移和 Livin 蛋白阳性表达是喉癌复发的独立危险因素。

综上所述,Livin 蛋白的过度表达可能在喉癌发生、发展过程中起重要作用,其阳性表达提示预后较差。

参考文献:

- [1] Ihab Abd-Elrahman, Klilah Hershko, Tzahi Neuman, et al. Experimental therapeutics, molecular targets, and chemical biology: The Inhibitor of Apoptosis Protein Livin (ML-IAP) Plays a Dual Role in Tumorigenicity [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (6): 5475 - 5480.
- [2] 卓贤露,赵厚育,姜振东. 凋亡抑制因子 Livin 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及与碱性成纤维细胞生长因子的关系 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22 (3): 114 - 116.
- [3] 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.
- [4] Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3 (6): 401 - 410.
- [5] 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.
- [6] JG Sun, RX Liao, SX Zhang, et al. Role of inhibitor of apoptosis protein Livin in radiation resistance in nonsmall cell lung cancer [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26 (5): 585 - 592.
- [7] 杨辛治,袁贤瑞,史帅涛. Livin 在脑胶质瘤中的表达及意义 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2007, 13 (5): 321 - 324.
- [8] BY Oh, RA Lee, KH Kim. siRNA targeting Livin decreases tumor in a xenograft model for colon cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17 (20): 2563 - 2571.
- [9] B Yan. Research progress on Livin protein: an inhibitor of apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357 (1 - 2): 39 - 45.
- [10] 唐乔,黄金中,余力,等. Livin 和增殖细胞核抗原蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2006, 22 (12): 1356 - 1358.
- [11] 张建中,巴云鹏,吕明栓. 凋亡抑制蛋白 Livin 在喉癌中的表达和意义 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2008, 15 (10): 552 - 554.
- [12] 肖虹,姬长友,陈继川. 凋亡抑制因子 Livin 在喉鳞癌中的表达及临床意义 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28 (11): 1226 - 1228.

(修回日期:2012-05-16)