

Livin和Caspase3在胆管癌中的表达及其与胆管癌生物学行为的关系

李昱骥, 隋远达, 孔凡民

■背景资料

随着对Livin和Caspase3的发现及相关研究的进一步深入, 大家越来越重视二者在许多肿瘤的发生、发展、预后中的相关性, 愈来愈多的实验围绕着二者的表达与关系进行研究。

李昱骥, 隋远达, 孔凡民, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠外科病区 辽宁省沈阳市 110001

李昱骥, 2011年中国医科大学博士, 副教授, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由李昱骥、隋远达及孔凡民共同设计; 实验试剂由孔凡民提供; 研究过程与数据分析由李昱骥与隋远达完成; 论文由李昱骥完成。

通讯作者: 孔凡民, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街153号, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠外科病区. liyuji74@163.com

电话: 024-83282881

收稿日期: 2013-09-14 修回日期: 2013-10-17

接受日期: 2013-10-30 在线出版日期: 2013-11-28

Clinical significance of expression of Livin and Caspase3 in cholangiocarcinoma

Yu-Ji Li, Yuan-Da Sui, Fan-Min Kong

Yu-Ji Li, Yuan-Da Sui, Fan-Min Kong, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Fan-Min Kong, Professor, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, 153 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. liyuji74@163.com

Received: 2013-09-14 Revised: 2013-10-17

Accepted: 2013-10-30 Published online: 2013-11-28

Abstract

AIM: To detect the expression of Livin and Caspase3 in cholangiocarcinoma and to explore their association with the biological behavior of cholangiocarcinoma.

METHODS: Fifty-six surgical cholangiocarcinoma specimens and 29 tumor-adjacent biliary tissue specimens collected from 2002 to 2008 at the First Hospital of China Medical University were used in this study. The expression of Livin and Caspase3 in the above specimens was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rate of Livin expression in cholangiocarcinoma was significantly higher than that in tumor-adjacent biliary tissues

(58.93% vs 0%, $\chi^2 = 26.094$, $P < 0.05$), whereas the positive rate of Caspase3 in cholangiocarcinoma was significantly lower than that in tumor-adjacent biliary tissues (29% vs 88.98%, $\chi^2 = 14.01$, $P < 0.05$). The expression of Livin and Caspase3 was significantly correlated with tumor differentiation in cholangiocarcinoma (both $P < 0.05$). The expression of Livin was negatively related to that of Caspase3 in cholangiocarcinoma ($r = -0.295$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The positive expression rate of Livin protein is higher and that of Caspase3 is lower in cholangiocarcinoma than in tumor-adjacent biliary tissues. Livin expression was negatively related to Caspase3 expression, and Livin and Caspase3 protein expression in cholangiocarcinoma was significantly correlated with tumor differentiation.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Cholangiocarcinoma; Immunohistochemistry; Livin; Caspase3

Li YJ, Sui YD, Kong FM. Clinical significance of expression of Livin and Caspase3 in cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(33): 3752-3756
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3752.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i33.3752>

摘要

目的: 研究凋亡抑制蛋白Livin和半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3(Caspase3)在胆管癌中的表达, 探讨其表达情况与胆管癌生物学行为的关系。

方法: 收集中国医科大学附属第一医院普通外科于2002-01/2008-12期间手术切除胆管癌的标本56例。对照组为27例正常胆管组织。用免疫组织化学法检测Livin和Caspase3的表达情况, 对结果应用SPSS13.0统计软件进行分析。

结果: 在56例胆管癌中Livin和Caspase3阳性

■同行评议者

薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属医院第一医院

表达率分别为58.93%(33/56)和39.29%(22/56), 对照组27例表达为阴性和88.89%(24/27), 均有统计学意义($\chi^2 = 29.094$ 和 14.01 , $P < 0.05$); 依照胆管癌分化程度分组显示二者表达也有差异($P < 0.05$), 且二者在胆管癌中的表达呈负相关($r = -0.295$, $P < 0.05$).

结论: 在胆管癌组织中Livin蛋白表达高于癌旁组织, 而Caspase3表达低于癌旁组织; 二者的表达呈负相关且与肿瘤的分化程度有明显相关性.

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胆管癌; 免疫组织化学; Livin; Caspase3

核心提示: 在胆管癌组织中Livin蛋白表达高于癌旁组织, 而Caspase3表达低于癌旁组织, 二者的表达呈负相关且与肿瘤的分化程度有明显相关性.

李昱曩, 隋远达, 孔凡民. Livin和Caspase3在胆管癌中的表达及其与胆管癌生物学行为的关系. 世界华人消化杂志 2013; 21(33): 3752-3756 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3752.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i33.3752>

0 引言

胆管癌临床起病隐匿, 早期诊断困难, 预后较差. 现代分子生物学研究表明, 凋亡调节紊乱是恶性肿瘤形成的重要机制之一. Livin是2000年发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP), 与许多肿瘤的发生、发展、预后都有相关性^[1]. 半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(cystenyl-aspartate-specific protease, Caspase)被证明与凋亡有关, 其中作为下游区效应分子的Caspase3是整个凋亡级联反应的一个关键点^[2]. Livin和Caspase3在胆管癌中的表达关系相关报道较少报道, 本实验收集56例手术切除胆管癌标本, 应用免疫组织化学法检测二者在其中的表达情况, 分析二者与胆管癌发生发展的关系, 探讨胆管癌的发病机制和转移.

1 材料和方法

1.1 材料 胆管癌来源于中国医科大学附属第一医院普通外科于2002-01/2008-12间手术切除的56例标本(征得家属意见留存标本), 均经病理证实为腺癌. 其中男性34例, 女性22例; 高分化腺癌29例, 中分化腺癌13例, 低分化腺癌14例; 伴有淋巴结转移者31例, 无淋巴结转移者25例; 根据国际抗癌联盟(Union for International Cancer

Control, UICC)颁布的TNM分期标准: I期12例, II期9例, III期27例, IV期8例. 全部患者无术前放、化疗记载. 对照组取自27例根治性切除手术的癌旁组织, 经病理证实未见癌细胞. 兔抗人Livin多克隆抗体、兔抗人Caspase3多克隆抗体、SABC试剂盒、DAB显色剂均由武汉博士德公司提供. 其他: 二甲苯、无水乙醇、苏木素、双氧水、中性树胶、枸橼酸缓冲液、PBS缓冲液等. FinZSe325切片机; 烤片机; 电热恒温干燥箱; 冰箱; 微量移液器和离心机; OLYMPUS光学显微镜.

1.2 方法 应用免疫组织化学实验(immunohistochemistry, IHC)检测胆管癌及癌旁组织标本中Livin和Caspase3蛋白的表达情况. 用随试剂赠送的阳性片作为阳性对照, 以PBS替代一抗作为阴性对照.

阳性判断标准以胞核或胞浆出现黄色或棕黄色颗粒为阳性, 在400倍光镜下, 随机选取3个视野, 每个视野观察100个细胞, 染色结果分为5级: 阳性细胞数 $< 1\%$ 为0级, $1\% - 24\%$ 为1级, $25\% - 49\%$ 为2级, $50\% - 74\%$ 为3级, $75\% - 100\%$ 为4级; 设定0、1、2级为低表达, 3、4级为高表达.

统计学处理 统计学分析使用SPSS13.0统计软件, 采用 χ^2 检验及Spearman等级相关检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Livin在胆管癌及癌旁胆管组织中的表达 Livin在56例胆管癌中阳性表达率为58.93%(33/56), 在27例癌旁胆管组织中表达皆为阴性, 有统计学差异(表1). 分别按照患者性别、胆管癌分化程度、淋巴结转移和TNM分期等不同临床病理参数来分类进行Livin阳性表达率的检测, 结果显示在胆管癌分化程度组中, 高、中、低分化组Livin的阳性表达率依次为37.93%(11/29)、76.92%(10/13)、85.71%(12/14), 有统计学差异, 而其余各分类未见统计学差异(表2).

2.2 Caspase3在胆管癌及癌旁胆管组织中的表达 Caspase3在56例胆管癌中阳性表达率为39.29%(22/56), 在27例癌旁胆管组织中阳性表达率为88.89%(24/27), 有统计学差异(表3). 分别按照患者性别、胆管癌分化程度、淋巴结转移和TNM分期等不同临床病理参数来分类进行Caspase3阳性表达率的检测, 结果显示在胆管癌分化程度组中, 高、中、低分化组Caspase3的阳性表达率依次为58.62%(17/29)、

■ 研发前沿
尽管近年来对于Livin和Caspase3的研究文章较多, 但较少二者在胆管癌中相关表达的报道, 本实验填补了这方面的空白, 为探讨二者的相互机制提供了新的方向.

■ 相关报道

本文通过对不同胆管组织的染色,检测Livin和Caspase3的表达,通过对各自机制及相关性的探讨来对二者的表达与关系进行分析,为胆管癌的诊断提供了新的思路。

表 1 Livin在胆管癌及癌旁胆管组织中的表达

组织来源	Livin的表达		合计	阳性率(%)	χ^2 值	P值
	+	-				
胆管癌组织	33	23	56	58.93	26.094	0.000
癌旁胆管组织	0	27	27	0		

表 2 Livin在胆管癌组织中的表达与临床病理参数之间的关系

临床病理参数	n	Livin表达		阳性率(%)	χ^2 值	P值
		+	-			
性别					1.259	0.262
男	34	18	16	52.94		
女	22	15	7	68.18		
分化程度					10.793	0.004
高	29	11	18	37.93		
中	13	10	3	76.92		
低	14	12	2	85.71		
淋巴结转移					0.157	0.692
有	31	19	12	61.29		
无	25	14	11	56.00		
TNM分期					0.585	0.445
I、II	21	11	10	52.38		
III、IV	35	22	13	62.86		

30.77%(4/13)、7.14%(1/14),有统计学差异,而其余各分类未见统计学差异(表4)。

2.3 Livin及Caspase3在胆管癌组织中表达水平的相关性 将胆管癌中Livin及Caspase3表达阳性情况进行Spearman等级相关检验.发现在胆管癌组织中Livin与Caspase3的表达呈负相关关系($r = -0.295, P < 0.05$)(表5)。

3 讨论

胆管癌是起源于胆道上皮细胞的恶性肿瘤,占所有消化系肿瘤的3%,在常见的胆道肿瘤中排第2位.胆管癌临床起病隐匿,症状出现较晚,早期诊断困难,仅10%患者得到手术治疗.胆管癌患者术后5年生存率约5%,未切除胆管癌患者生存期<1年^[3].为改善胆管癌的预后,人们把更多的目光投向分子生物学方面的研究,其中肿瘤细胞的凋亡是当前研究的热点之一。

细胞凋亡是由基因编码调控的细胞主动性自杀过程,又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD).现已证明,许多疾病尤其是肿瘤的发生、发展与细胞凋亡失衡有关.细胞凋亡功能受到抑制,则恶性肿瘤无限增殖,细胞凋亡受

抑制是肿瘤发病机制之一,参与肿瘤的发生、发展^[4].IAP是一类重要的抗细胞因子,在目前已知的8个IAP家族成员中,Livin是研究较少的一个,对其抑制细胞凋亡的机制也尚未完全清楚.Yagihashi等^[5]研究发现,在胃癌、结肠癌、胰腺癌及肝细胞性肝癌中均检测到Livin mRNA的过度表达.国内报道^[6]也发现,Livin表达与肿瘤临床分期及患者年龄相关。

本实验结果显示,胆管癌组织中Livin蛋白阳性表达率为58.93%,而胆管癌旁组织中未见阳性表达,两者比较有显著差异($P < 0.05$).Livin在胆管癌组织中有较高阳性表达提示其可能通过抑制胆管癌细胞凋亡而对胆管癌的发生、发展起抑制作用,故有望成为胆管癌诊断的肿瘤标志物.Livin蛋白阳性表达率与胆管癌患者的性别、TNM分期和淋巴结有无转移无关($P > 0.05$),而与患者的组织学分化程度有关($P < 0.05$).提示Livin阳性表达有利于胆管癌恶性程度的判断,为预后估计提供帮助。

Caspase3属于半胱氨酸蛋白酶家族成员,1994年由Ferandez-Alnemri等从人的cDNA文库中克隆得到,1996年正式命名.多数Caspase都与细胞凋亡有关,Caspase3位于Caspase下游区,通常以无活性的酶原形式产生,可以被多种因素活化.活化的Caspase3执行效应子功能,在细胞凋亡中起着不可替代的作用,是细胞凋亡过程中最关键的终末剪切酶.他通过剪切多聚(ADP-核糖)聚合酶[poly (ADP-ribose) polymerase, PARP],裂解核小体间的DNA引起细胞凋亡.Caspase3介导的凋亡在人体多种细胞中普遍存在,与直肠癌、胃癌、肝癌、胆囊癌等多种肿瘤都有关系^[7]。

本实验结果显示胆管癌细胞中Caspase3蛋白的表达率为39.29%,明显低于癌旁胆管组织中的表达率,二者比较有显著差异($P < 0.05$),表明Caspase3的失表达与胆管癌的发生相关,提示其在胆管癌细胞的恶性转化及发生、发展中起重要作用.Caspase3蛋白表达在胆管癌高、中、低分化组织中依次下调,3组之间比较有显著差

表 3 Caspase3在胆管癌及癌旁组织中的表达

组织来源	Caspase3的表达		合计	阳性率(%)	χ^2 值	P值
	+	-				
胆管癌组织	22	34	56	39.29	17.924	0.000
癌旁正常组织	24	3	27	88.89		

Caspase3: 半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3.

表 4 Caspase3在胆管癌组织中的表达与临床病理参数之间的关系

临床病理参数	n	Caspase3表达			χ^2 值	P值
		+	-	阳性率(%)		
性别					0.127	0.721
男	34	14	20	41.48		
女	22	8	14	36.36		
分化程度					10.808	0.004
高	29	17	12	58.62		
中	13	4	9	30.77		
低	14	1	13	7.14		
淋巴结转移					0.201	0.654
有	31	13	18	41.94		
无	25	9	16	36.00		
TNM分期					0.020	0.889
I、II	21	8	13	39.00		
III、IV	35	14	21	40.00		

Caspase3: 半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3.

表 5 Livin和Caspase3在胆管癌组织中表达的相关性

Livin	Caspase3		合计	r值	P值
	+	-			
+	9	24	33	-0.295	0.028
-	13	10	23		
合计	22	34	56		

Caspase3: 半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3.

异($P < 0.05$), 说明其与胆管癌的分化程度有关. 由于Caspase3是正常分化细胞所具有的成分, 而肿瘤在转化过程中容易失去某些正常细胞所具有的表型. 因此, 我们认为Caspase3在分化差的癌组织中表达下调是肿瘤异常分化所致, 参与了胆管癌的发生、发展.

目前已经证实, 在胃癌中Livin对Caspase3表达起抑制作用^[8-13], 本实验也在胆管癌中得到一致论断, 认为二者呈现负相关. 一般认为Livin主要是通过其杆状病毒IAP重复结构域(baculovi-

rus iap repeat domain, BIR)区与Caspase结合并直接抑制, 尤其是抑制Caspase3的活性, 达到阻断凋亡受体及线粒体相关的凋亡途径, 而实现对细胞凋亡的抑制作用^[14-16]. 随着对Livin和Caspase3关系研究的进一步深入, Livin在恶性肿瘤诊断方面的作用会越来越受到重视.

4 参考文献

- 1 Ma L, Huang Y, Song Z, Feng S, Tian X, Du W, Qiu X, Heese K, Wu M. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Differ* 2006; 13: 2079-2088 [PMID: 16729033 DOI: 10.1038/sj.cdd.4401959]
- 2 Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro MT, Kadkhodayan S, Fairbrother WJ, Dixit VM. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *J Biol Chem* 2002; 277: 12275-12279 [PMID: 11801603 DOI: 10.1074/jbc.M112045200]
- 3 李勤裕, 吴卫泽, 韩天权, 张圣道. 胆管癌分子靶向治疗. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1171-1177
- 4 Kukhta VK, Marozkina NV, Sokolchik IG, Bogaturova EV. Molecular mechanisms of apoptosis. *Ukr Biokhim Zh* 2003; 75: 5-9 [PMID: 15143512]

■ 创新盘点

本实验通过详实的数据与资料, 分析了Livin和Caspase3在胆管癌和非胆管癌组织中表达的异同, 总结规律, 为疾病的诊断提供新的方向.

■同行评价

Livin是2000年发现的凋亡抑制蛋白,与许多肿瘤的发生、发展、预后都有相关性。Livin和Caspase3在胆管癌中的表达关系相关报道较少报道,本实验具有一定的借鉴作用。

- 5 Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1206-1208 [PMID: 12816927 DOI: 10.1373/49.7.1206]
- 6 陈建华, 范钦和, 蔡勇. 乳腺癌中Livin基因及蛋白表达与细胞凋亡、增殖关系. *临床与实验病理学杂志* 2007; 23: 549-552
- 7 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 356-360 [PMID: 11819597]
- 8 王锴, 郁云龙, 刘阳阳, 李恩泽, 哈敏文, 朱志图. 蟾蜍毒素对人胃癌细胞凋亡的诱导机制. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 116-120
- 9 侯毅鞠, 李艳, 袁忠海, 郭素红. 凋亡抑制蛋白Livin在胃癌及癌旁组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1196-1200
- 10 韩高雄, 蔡明, 王国斌, 陶凯雄, 蔡昌学. Livin和Survivin基因联合靶向siRNA重组表达载体的构建和鉴定. *华中科技大学学报(医学版)* 2009; 38: 673-676
- 11 王琳琳, 郑洪, 唐薇薇, 厉国慧, 安文波. Livin基因沉默对人恶性黑色素瘤A375细胞周期和凋亡的影响. *肿瘤* 2009; 29: 345-349
- 12 陈鹏, 王春松, 孔令斌, 杨景玉. siRNA沉默Livin基因对胃癌细胞生长、凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1346-1349
- 13 杜媛, 冯一中, 李峰. Livin在胰腺癌组织芯片中的表达及其临床意义. *苏州大学学报(医学版)* 2008; 28: 244-246
- 14 杨春鹿, 黄青远, 赵君, 陈东义, 张林. Livin蛋白在食管癌中的表达及与p53蛋白相关性研究. *现代肿瘤医学* 2007; 15: 632-634
- 15 程平, 秦蓉, 张红, 吴继锋, 王道斌. 凋亡抑制因子Survivin和Livin在胃癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 850-855
- 16 唐鹏, 黄华. 凋亡抑制蛋白家族在食管癌分子靶向治疗中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1843-1847

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿,保证稿件尽快公平、公正的处理,《世界华人消化杂志》编辑部研究决定,从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费.审稿周期及发表周期不变.(《世界华人消化杂志》编辑部)