

Livin、Caspase-9 在十二指肠腺癌中的表达及临床意义

倪文凯, 于东风, 刘 弋

摘要 采用免疫组化法检测 60 例十二指肠腺癌组织及 30 例癌旁正常组织中凋亡抑制蛋白 Livin 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9) 的表达。结果显示十二指肠腺癌标本 Livin 和 Caspase-9 的阳性表达率分别为 71.7%、25.0%, 与癌旁正常组织阳性表达率(26.7%、76.7%) 差异有统计学意义($P < 0.01$)。Livin 的表达随着十二指肠腺癌病变化进展、程度的发展, 阳性表达率增高, Caspase-9 的表达随着十二指肠腺癌病理变程度的发展, 阳性表达率降低, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $r = -0.320$)。十二指肠腺癌组织标本中 Livin 和 Caspase-9 的表达呈负相关性。Livin 和 Caspase-9 在十二指肠腺癌的发生、发展中起着重要的作用, 可能会成为十二指肠腺癌的分子标志物或十二指肠腺癌治疗的新分子靶点。

关键词 十二指肠腺癌; Livin; Caspase-9; 免疫组化法

中图分类号 R 735.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)03-0410-03

凋亡是正常机体细胞保持稳定的重要措施之一, 是调节机体组织平衡的重要机制, 是一个受到严密监控的过程。基因的异常改变会导致细胞凋亡受到抑制, 最终导致肿瘤的发生和发展^[1]。凋亡抑制蛋白 Livin 是凋亡抑制蛋白家族(IAPs) 中的新成员, 特异的高表达于某些实体肿瘤组织和肿瘤细胞系中^[2]。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9) 是一种促凋亡因子, 是半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶族中的一员, 是执行细胞凋亡的主要酶类之一^[3]。为了研究两者对十二指肠腺癌发生发展的影响, 该研究通过免疫组化法检测十二指肠腺癌中两者的表达情况, 旨在探讨二者在十二指肠腺癌发生发展过程中的相互作用, 从而为十二指肠腺癌的诊断与临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集我院 2006 年 1 月~2012 年 12 月经手术切除并经病理验证的有完整临床资料的十二指肠腺癌患者的存档组织蜡块 60 例作为实

验组, 其中男 32 例, 女 28 例, 年龄 36~84 岁, 平均 45.4 岁。所有患者术前均未接受化疗及放疗。同时选取同组病例癌旁正常组织标本 30 例作为对照组。

1.2 主要试剂 兔抗人 Livin 多克隆抗体及兔抗人 Caspase-9 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 通用型二步法检测试剂盒(PV-6000)、PBS 缓冲液、枸橼酸缓冲液、DAB 显色液等均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法 采用免疫组化 PV-6000 两步法。每次染色均设立阳性及阴性对照组, (以 PBS 液代替一抗作为阴性对照)。结果判断: Livin 以细胞质和(或)细胞核出现黄色或棕黄色颗粒为阳性。Caspase-9 以细胞质出现黄色或棕黄色颗粒为阳性。选择合适部位选取 5 个高倍视野, 每个高倍镜视野计数 100 个细胞, 高倍镜下计数阳性细胞比例, 以 $>20\%$ 为阳性表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 各组之间比较相关性检验和 χ^2 检验, 并计算 Pearson 列联系数 r 。

2 结果

2.1 Livin 及 Caspase-9 在十二指肠腺癌及癌旁组织中的表达情况 Livin 及 Caspase-9 在十二指肠腺癌及癌旁组织均有阳性表达, 其中 Livin 在实验组中的阳性率明显高于对照组($P < 0.01$), Caspase-9 在实验组中的阳性率明显低于对照组($P < 0.01$)。见表 1、图 1。

2.2 Livin、Caspase-9 在十二指肠腺癌中的表达与临床病理参数的关系 Livin 的表达与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤发生部位比较差异无统计学意义, 与肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴结转移比较差异有统计学意义($P < 0.05$), Caspase-9 的表达与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤发生部位及浸润深度比较差异无统计学意义, 与淋巴结转移、肿瘤的分化程度比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 Livin 与 Caspase-9 在十二指肠腺癌中表达相关性分析 43 例 Livin 蛋白阳性表达的十二指肠腺癌组织中 7 例 Caspase-9 表达阳性, 17 例 Livin 蛋白阴性的十二指肠腺癌中有 8 例 Caspase-9 表达阳性。

2013-09-09 接收

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普通外科二病区, 合肥 230022

作者简介: 倪文凯, 男, 硕士研究生;

于东风, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: anyiyudf@163.com

表1 Livin在十二指肠腺癌及癌旁组织中的表达情况 [n(%)]

组别	n	Livin 表达		χ^2 值	P 值	Caspase-9 表达		χ^2 值	P 值
		-	+			-	+		
实验	60	17(28.3)	43(71.7)	16.493	<0.01	45(75.0)	15(25.0)	21.885	<0.01
对照	30	22(73.3)	8(26.7)			7(23.3)	23(76.7)		

Livin 与 Caspase-9 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $r = -0.320$), 见表3。两者的表达呈负相关性。

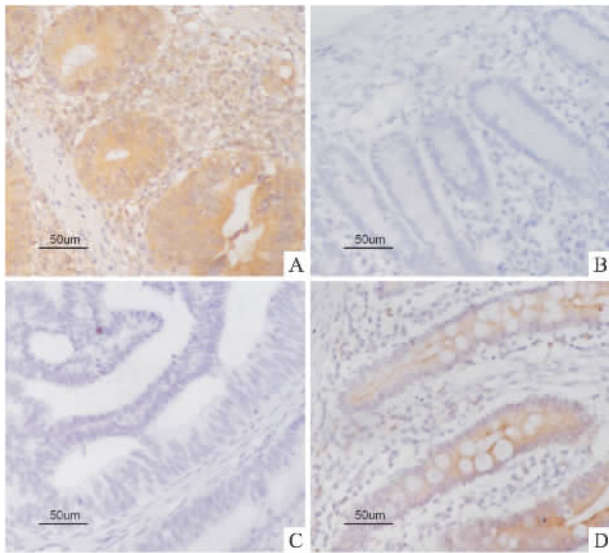


图1 十二指肠腺癌及癌旁正常组织中
Livin 及 Caspase-9 的表达 SP × 400

A: Livin 在腺癌组织中的阳性表达; B: Livin 在腺癌组织中的阴性表达; C: Caspase-9 在腺癌组织中的阴性表达; D: Caspase-9 在腺癌组织中的阳性表达

表2 Livin、Caspase-9 的表达与临床病理参数之间的关系 [n(%)]

项目	n	Livin		χ^2 值	P 值	Caspase-9		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			阳性	阴性		
性别									
男	32	23	9	0.001	0.969	9	23	0.375	0.550
女	28	20	8			6	22		
年龄(岁)									
≤50	40	28	12	0.164	0.685	12	28	0.900	0.343
>50	20	15	5			3	17		
肿瘤直径(cm)									
≤5	32	22	10	0.287	0.592	10	22	1.429	0.232
>5	28	21	7			5	23		
分化程度									
高、中分化	32	18	14	6.482	0.011	12	20	4.375	0.036
低分化	28	25	3			3	25		
浸润深度									
黏膜及肌层	17	8	9	7.074	0.008	3	14	0.246	0.620
浆膜及浆外层	43	35	8			12	31		
淋巴结转移									
阳性	31	28	3	9.175	0.002	3	28	6.429	0.011
阴性	29	15	14			12	17		
肿瘤原发部位									
降部	42	29	13	0.141	0.708	10	32	0.106	0.745
球水平部	18	14	4			5	13		

表3 十二指肠腺癌中 Livin 与 Caspase-9 表达之间的关系 [n(%)]

项目	n	Caspase-9(+)	Caspase-9(-)	χ^2 值	P 值	r 值
Livin(+)	43	7(16.3)	36(83.7)	6.156	<0.05	-0.320
Livin(-)	17	8(47.1)	9(52.9)			

3 讨论

细胞凋亡是机体重要的生理过程,对维持内环境的稳定有着关键的作用。细胞凋亡功能的异常最终导致肿瘤的发生和发展。Livin 基因位于人染色体 20q13.3,全长 4 600 bp,包含 6 个内含子和 7 个外显子。其编码的 Livin 蛋白含有 IAP 家族成员中特有的 BIR 结构和 RING 指结构。其中 RING 结构调控着 Livin 蛋白在细胞内的合理分布,BIR 结构是 Livin 蛋白发挥抗凋亡作用的重要结合部位,通过与 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 以及凋亡前体蛋白 SMAC 等酶的结合,达到阻断凋亡受体以及以线粒体为基础的凋亡途径而起到抑制细胞凋亡的作用^[4]。Yagihashi et al^[5]通过酶联免疫吸附实验检测癌症患者血清中抗 Livin 抗体,发现肺癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胆管癌和结直肠癌患者血清中抗 Livin 抗体高表达。Xi et al^[6]用免疫组化法发现在结直肠癌患者中 Livin 呈高表达,其表达水平与患者总体生存率呈负相关。本实验结果表明 Livin 在对照组中低表达,实验组中高表达,并与肿瘤浸润深度、淋巴结转移呈正相关,与肿瘤的分化程度呈负相关,提示 Livin 表达的升高可能与十二指肠腺癌的发生和发展有关系,同时 Livin 的表达可能影响十二指肠癌的生物行为,使其发生转移等恶性转化行为,有可能成为癌症预后及治疗情况的判断指标之一。

Caspase-9 是内源性凋亡途径中的关键蛋白酶,当细胞接收到凋亡信号后,线粒体释放 Cyt C 及凋亡活化因子(Apaf-1)。两者结合以后形成凋亡小体,共同激活 Caspase-9,活化后的 Caspase-9 进一步激活下游的效应 Caspase,从而参与调节过程^[7]。本研究显示 Caspase-9 在实验组的阳性表达明显低于对照组,并且与肿瘤有无淋巴结转移呈负相关,与肿瘤的分化程度呈正相关。提示 Caspase-9 的异常表达参与了十二指肠腺癌的发生和发展。

Kasof et al^[8] 通过实验证明: Livin 能够直接抑制 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 的水解作用, Livin 蛋白的 BIR 结构能够与 Caspase 结合从而抑制其功能。同时 Livin 还能直接在凋亡的起始点干扰 Pro-caspase-9 或者直接干扰 Caspase-9 的活性^[9]。研究表明 Livin 与 Caspase-9 的表达呈负相关性。Livin 蛋白和 Caspase-9 的具体作用机制以及两者之间的关系还有待进一步的研究证实。二者的联合检测可视为判断患者预后以及治疗效果的重要标志和预测因子。

参考文献

- [1] Rohayem J, Diestelkoeller P, Weigle B, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein surviving in cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1815-7.
- [2] Grzybowski-Izydorczyk O, Smolewski P. The role of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in hematological malignancies [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2008, 62(14): 55-63.
- [3] Strappazzon F, Torch S, Chatellard-Causse C, et al. Alix is involved in caspase 9 activation during calcium-induced apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(1): 64-9.
- [4] Sun J G, Liao R X, Zhang S X, et al. Role of inhibitor of apoptosis protein Livin in radiation resistance in nonsmall cell lung cancer [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(5): 585-92.
- [5] Yagihashi A. Anti-survivin and anti-livin antibodies [J]. *Nihon Rinsho*, 2010, 68(Suppl 6): 708-10.
- [6] Xi R C, Biao W S, Gang Z Z. Significant elevation of survivin and livin expression in human colorectal cancer: inverse correlation between expression and overall survival [J]. *Onkologie*, 2011, 34(8-9): 428-32.
- [7] Bratton S B, Salvesen G S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(pt 19): 3209-14.
- [8] Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. *Biol Chem*, 2001, 276(5): 3238-46.
- [9] Vucic D, Stennicke H R, Pisabarro M T, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(21): 1359-66.

The expression and clinical significance of Livin and Caspase-9 in duodenal adenocarcinoma

Ni Wenkai, Yu Dongfeng, Liu Yi

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract The expressions of Livin and Caspase-9 were detected by immunohistochemical technique in 60 duodenal adenocarcinoma tissues and 30 adjacent normal tissue. The positive expression rate of Livin in duodenal adenocarcinoma tissues was significantly higher than that of adjacent normal tissue, and the expression of Caspase-9 was lower than that of adjacent normal tissue ($P < 0.01$). The expression of Livin was negatively correlated with the expression of Caspase-9 ($P < 0.01$). The expression of Livin and Caspase-9 was closely correlated with the progress of pathological changes, degree of development, lymph nodes metastasis, and clinical stages, but not with sex, age and tumor size ($P > 0.05$). Livin and Caspase-9 were associated with occurrence and development of duodenal adenocarcinoma, and the expression of the above two were negatively correlated. Livin and Caspase-9 may be considered as reliable markers for clinical diagnosis, therapy efficacy and the prognosis of duodenal adenocarcinoma.

Key words duodenal adenocarcinoma; Livin; Caspase-9; immunohistochemical



更正: 经该文全体作者同意和编辑部核查, 本刊 2014 年第 49 卷第 1 期刊登的时兆燕等文章《还原型谷胱甘肽联合腺苷蛋氨酸治疗化疗药物性肝损害的临床疗效》中责任作者应为汪伟民、邓松华, 现将责任作者简介更正为“汪伟民, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangwm7@tom.com; 邓松华, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: desoh@126.com”。