

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 02. 008

食管鳞癌组织中 Livin 和 Smac 表达的意义

赵秋民^{1,2}

Expression and Clinical Significance of Livin and Smac in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma

ZHAO Qiu-min^{1,2}

1. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, China; 2. Editorial Board of Journal of Zhengzhou University(Medical Sciences)

Abstract: Objective To investigate the expression of Livin and Smac proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissue and their relationship to the progression of ESCC. **Methods** Expressions of Livin and Smac proteins were respectively detected by immunohistochemistry SP method in 62 cases of ESCC, in 31 cases of paracancerous atypical hyperplasia, and in 62 cases of normal esophageal mucosa. Then the relationships between Livin and Smac protein expressions and clinicopathologic features of ESCC patients were estimated. **Results** Of the 62 ESCC patients, the diagnosis of ESCC were confirmed by histopathological detection, 15 cases were grade I, 25 cases were grade II, 22 cases were grade III; 20 cases have lymph node metastasis; and 7 cases were followed with invasion of mucosa, submucosa, or shallow layer, 14 cases have invasion of deep muscle, 41 cases have invasion of fiber membrane. Livin protein were lower expressed in normal esophageal mucosa, but high expressed in paracancerous dysplasia and esophageal cancer tissues, and the difference among the 3 groups was statistically significant ($\chi^2 = 22.742, P < 0.05$). Smac protein were overexpressed in paracancerous dysplasia, but less expressed in normal esophageal mucosa and esophageal cancer tissues, and the difference among the 3 groups was statistically significant ($\chi^2 = 9.688, P < 0.05$). Livin and Smac protein expressions in ESCC tissues were not affected by the patients' gender and age, however it was significantly correlated with the histological grade, depth of invasion or lymph node metastases ($P < 0.05$). The expression of Livin and Smac proteins was negatively correlated with the progression of ESCC ($r = -0.426, P < 0.05$). **Conclusion** Abnormal expression of Livin and Smac occurred in ESCC, which suggested that Livin and Smac play important role in the development, invasion and metastasis of ESCC.

Key words: ESCC; Livin; Smac; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨食管鳞癌组织中凋亡抑制蛋白 Livin 和促凋亡基因 Smac 蛋白的表达及其与食管鳞癌临床生物学指标的关系。**方法** 应用免疫组化 SP 法对 62 例食管鳞癌组织、31 例癌旁不典型增生组织及 62 例正常食管黏膜组织进行 Livin 和 Smac 蛋白的检测,分析其阳性表达与食管鳞癌患者临床病理因素的关系。**结果** 62 例食管鳞癌组织中,组织学分级 I 级 15 例、II 级 25 例、III 级 22 例;有淋巴结转移 20 例;肿瘤浸润至黏膜层、黏膜下层或浅肌层 7 例、深肌层 14 例、纤维膜 41 例。Livin 蛋白在正常食管黏膜组织中低表达,在癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中高表达,阳性率分别为 38.7%(24/62)、61.3%(19/31)和 80.6%(50/62),差异有统计学意义($\chi^2 = 22.742, P < 0.05$);Smac 蛋白在癌旁不典型增生组织中高表达,在正常食管黏膜组织及食管鳞癌组织中低表达,阳性率分别为 67.7%(21/31)、48.4%(30/62)和 33.9%(21/62),差异也有统计学意义($\chi^2 = 9.688, P < 0.05$)。食管鳞癌患者癌组织中 Livin 和 Smac 蛋白的表达与性别、年龄无关;与组织学分级、浸润深度及有无淋巴结转移有关($P < 0.05$)。Livin 和 Smac 蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈负相关($r = -0.426, P < 0.05$)。**结论** Livin 和

Smac 在食管鳞癌组织中呈现异常表达,提示两者参与了食管鳞癌的发生发展和浸润转移。

关键词: 食管鳞癌; 凋亡抑制蛋白 Livin; 促凋亡基因 Smac; 免疫组织化学

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2009)02-0110-05

收稿日期:2008-01-23;修回日期:2008-06-18
基金项目:教育部“十五”、“211 工程”重点学科建设资助项目(教重办 200202)
作者单位:1. 450052 郑州大学第一附属医院病理科,河南省肿瘤病理重点实验室;2. 郑州大学学报医学版编辑部
作者简介:赵秋民(1972-),男,博士,编辑,主要从事肿瘤病理学研究

0 引言

Livin 是最近发现的凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAPs) 家族中的新成员, 特异性表达于人的胚胎组织及大多数人类实体瘤细胞, 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^[1-3]。第 2 个线粒体衍生的胱天蛋白酶激活剂, 即 Smac (second mitochondria-derived activator caspase) 是近年来发现的一种促凋亡基因, 参与细胞凋亡的下游反应, 高表达 Smac 可促进肿瘤细胞凋亡, 并增加肿瘤细胞对化疗的敏感性^[4]。有学者在食管癌组织中应用免疫组化方法检测了 Livin 蛋白的表达情况, 但样本量较少, 且未检测癌旁不典型增生组织中 Livin 蛋白的表达情况^[5]; 食管癌组织中 Smac 蛋白的表达情况国内外未见文献报道。为此, 作者采用免疫组织化学方法联合检测食管鳞状细胞癌组织、相应癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织中 Livin 蛋白和 Smac 的蛋白表达情况, 探讨了 Livin 蛋白和 Smac 蛋白在食管癌发生、发展中的作用及两者的相互关系。

1 资料与方法

1.1 资料

62 例食管癌标本来自 2006 年 2 月 26 日~3 月 16 日河南省安阳市肿瘤医院择期手术切除的食管癌患者, 患者术前均无化疗、放疗及免疫治疗史; 男 36 例, 女 26 例, 年龄 38~75 (60.6±7.5) 岁。标本均在离体 30 min 内迅速取材, 分别取自癌灶、癌旁 3 cm 内及手术残端食管组织, 经 40 g/L 多聚甲醛液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度 3~5 μm, 分别用于 HE、免疫组织化学染色。

1.2 方法

Livin、Smac mAb 均为 Santa Cruz 公司产品。SP 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。免疫组织化学染色采用 SP 法, 操作严格按说明书进行。石蜡切片常规脱蜡和水化后, 浸于 EDTA 液 (pH 9.5), 高压修复组织抗原 20 min。PBS 洗涤; 封闭内源性过氧化物酶; PBS 洗涤; 非免疫性动物血清孵育 10 min; Livin、Smac mAb 孵育 60 min (工作浓度 1:100); 生物素标记的第二抗体孵育 10 min; PBS 洗涤; 链霉素标记的亲本素-过氧化物酶孵育 10 min; PBS 洗涤; DAB 显色, 蒸馏水冲洗, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。以 PBS 液代替一抗作为阴性对照, 阳性对照为已知 Livin、Smac 蛋白表达阳性的乳癌、肺癌组织切片。

1.3 结果判断标准^[5-6]

食管鳞癌组织中 Livin 蛋白阳性细胞主要表达于胞质, 呈黄色或棕黄色颗粒样信号; Smac 蛋白阳性信号定位于胞质, 呈黄色或棕黄色颗粒。①根据阳性细胞在同类细胞中所占比例计分: 阳性细胞<10%计 0 分; 10%~25%计 1 分; 26%~50%计 2 分; >50%计 3 分。②按阳性细胞染色强度计分: 不着色为 0 分; 淡黄色为 1 分; 黄色为 2 分; 棕黄色为 3 分。2 项相加 0~1 分为阴性, 2~3 分为 +, 4~5 分为 ++, 6 分为 +++ (>4 分为过表达, 计为阳性)。

1.4 统计学方法

应用 SPSS10.0 统计学软件, 统计分析方法为 χ^2 检验和 Spearman 相关性分析。检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 62 例食管癌组织病理学检测的结果

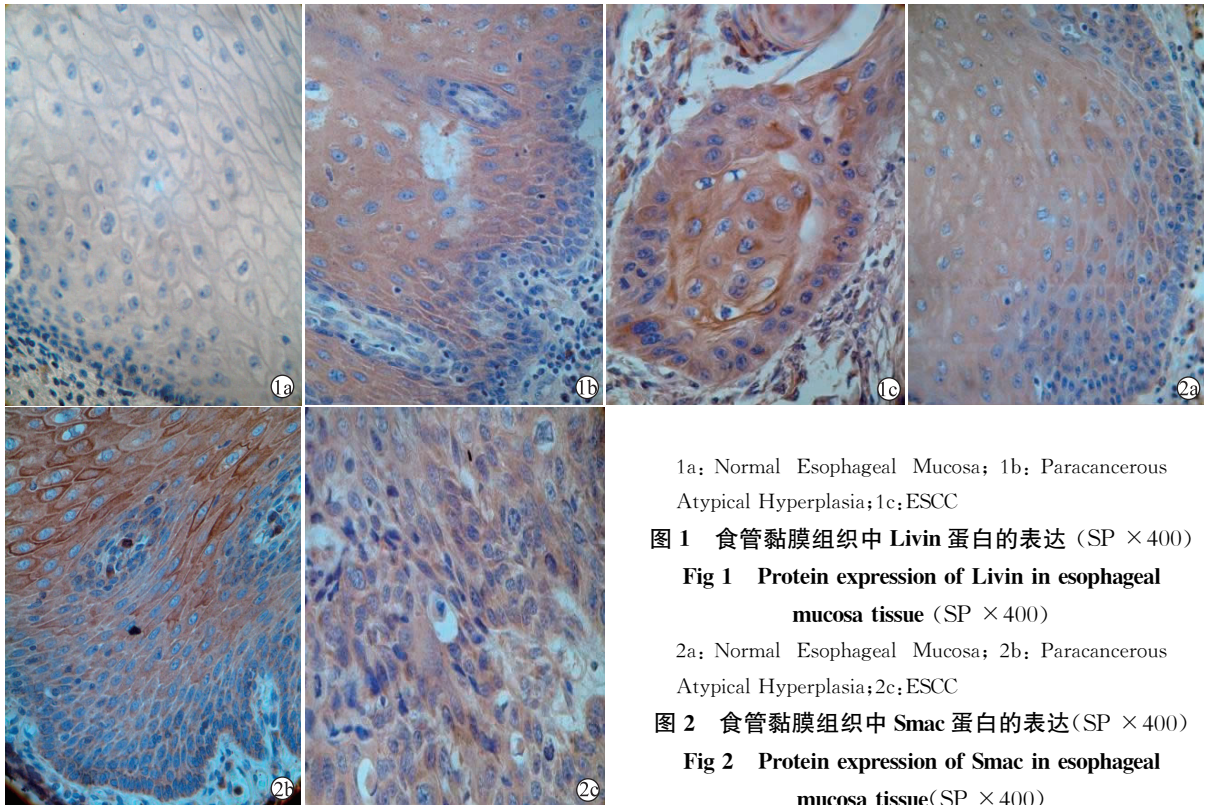
以 HE 切片病理组织学检测, 证实 62 例癌组织标本均为鳞癌, 组织学分级 I 级 15 例, II 级 25 例, III 级 22 例; 伴淋巴结转移者 20 例, 无淋巴结转移者 42 例; 肿瘤浸润深度: 浸润至黏膜层、黏膜下层或浅肌层 7 例; 深肌层 14 例, 纤维膜 41 例。62 例癌旁 3 cm 以内的标本中有 31 例呈中-重度不典型增生; 62 例手术残端食管组织均为正常鳞状上皮。

2.2 食管黏膜组织中 Livin 和 Smac 蛋白阳性表达的分布及定位

鳞癌组织中, Livin 阳性细胞分布在细胞增生活跃区, 如癌细胞珠的周边区域或呈中、低分化的癌细胞团内, 而且着色较深, 见图 1c。癌旁不典型增生组织中的染色和定位区域类似于癌组织, 见图 1b。正常食管黏膜组织中仅有少量 Livin 阳性表达, 见图 1a。从正常鳞状上皮→癌旁不典型增生→鳞癌组织, Livin 阳性信号呈细胞膜→细胞膜和(或)细胞浆→细胞浆和(或)细胞核表达。而 Smac 蛋白在鳞癌组织中低表达, 见图 2c; 癌旁不典型增生组织中 Smac 蛋白表达高于癌组织, 见图 2b, 且 Smac 蛋白阳性信号主要呈膜表达; 大部分正常食管黏膜组织中 Smac 蛋白高表达, 而部分正常食管黏膜组织中 Smac 蛋白的表达与鳞癌组织中的表达相近, 见图 2a。

2.3 Livin 和 Smac 蛋白表达与食管鳞癌临床生物学的关系

Livin 蛋白在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织和食管鳞癌组织中的阳性率分别为 38.7% (24/62)、61.3% (19/31) 和 80.6% (50/62); 癌旁不典型增生组织和食管鳞状细胞癌组织中 cyclinB1 阳性率高于正常黏膜组织 ($\chi^2 = 22.742, P < 0.05$)。



1a: Normal Esophageal Mucosa; 1b: Paracancerous Atypical Hyperplasia; 1c: ESCC

图 1 食管黏膜组织中 Livin 蛋白的表达 (SP × 400)

Fig 1 Protein expression of Livin in esophageal mucosa tissue (SP × 400)

2a: Normal Esophageal Mucosa; 2b: Paracancerous Atypical Hyperplasia; 2c: ESCC

图 2 食管黏膜组织中 Smac 蛋白的表达 (SP × 400)

Fig 2 Protein expression of Smac in esophageal mucosa tissue (SP × 400)

Smac 蛋白在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织和食管鳞癌组织中的阳性率分别为 48.4% (30/62)、67.7% (21/31) 和 33.9% (21/62); 癌旁不典型增生组织和食管鳞癌组织中 Smac 蛋白阳性率明显低于正常食管黏膜组织 ($\chi^2 = 9.688, P < 0.05$), 见表 1。不同性别、年龄间 Livin、Smac 蛋白的表达差异无统计学意义, 而不同组织学分级、浸润深度及有无淋巴结转移间 Livin、Smac 蛋白的表达差异有统计学意义, 见表 2。

表 1 食管黏膜组织中 Livin、Smac 蛋白的表达 (n)

Tab 1 Protein expression of Livin, Smac in esophageal mucosa tissue

Groups	n	Livin Protein					χ^2	Smac Protein					χ^2
		-	+	++	+++	++++		-	+	++	+++	++++	
Normal mucosa	62	38	5	10	9			32	9	14	7		
Precancerous atypical hyperplasia	31	12	5	6	8		22.742 ^a	10	6	8	7		9.688 ^a
ESCC	62	12	17	12	21			41	9	7	5		

^a $P < 0.05$

2.4 食管鳞癌组织中 Livin 蛋白和 Smac 蛋白表达之间的关系

食管鳞癌组织中 Livin 蛋白和 Smac 蛋白表达成负相关, 相关系数为 -0.426 ($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

细胞凋亡是一种由基因控制的细胞自主性进行

的程序性死亡, 是生物界中重要的生命现象之一, 对保持组织的健康和正常生长有十分重要意义。细胞凋亡通路和 p53、c-myc、bcl-2 家族、Smac、IAPs 及胞内信号转导等通路构成一个复杂的网络对凋亡进行精细的调控。

人类 IAP 家族现有 8 个成员, 即 NIAP、XIAP (ILP 1/MIHA)、cIAP 1 (HIAP 2/MIHB)、cIAP 2 (HIAP 1/MIHC)、survivin (TIAP)、Apollon (Bruce)、ILP2 (Ts IAP) 和 Livin (ML-IAP/KIAP)。Livin 是 IAP 家族中的新成员, 其基因位于染色体 20 q 13.3, 全长 46 kb, 有 α 及 β 两种异构体, 分别编码长度为 298 及 280 个氨基酸的蛋白质^[7]。近年来已有在结直肠癌^[8]、膀胱癌^[9]和肺癌^[10-11]等实体瘤组织和血清中检测出 Livin 和抗 Livin 抗体异常表达的研究报道, 并且认为 Livin 对评价某些肿瘤的预后具有一定价值, 有可能成为某些肿瘤诊断和治疗的一个新的潜在靶点。

Smac 是 DU 等^[12]从 HeLa 细胞中分离出一种新型线粒体蛋白质, 命名为第 2 个线粒体衍生的胱天蛋白酶激活剂 (second mitochondria-derived activator caspase)。同时, Verhagen 等^[13]从 293T 细胞中分离出一种蛋白质, 命名为低等电点凋亡抑制蛋白 (IAPs) 直接结合蛋白 (direct IAP binding protein with low PI, DIABLO)。经过对比分析, Smac 和 DIABLO 完全等同, 合并称为 Smac/DIABLO。免疫分析确定 Smac/DIABLO 定位于线粒体内, 调

表 2 Livin,Smac 蛋白表达与食管鳞癌临床生物学的关系(n)
Tab 2 Protein Expression of Smac,Livin and clinicopathologic features of ESCC patients

Clinicopathologic features	n	Livin protein			χ^2	Smac protein			χ^2
		-	+	Percentages/(%)		-	+	Percentages/(%)	
Gender									
Male	36	6	30	83.3	1.073	24	12	33.3	0.011
Female	26	6	20	76.9		17	9	34.6	
Age/year									
≥60	33	6	27	81.8	0.062	22	11	33.3	0.009
<60	29	6	23	79.3		19	10	34.5	
Histological grade									
Grade I	15	7	8	53.3		11	4	26.7	
Grade II	25	3	22	88.0	7.030 ^a	11	14	56.0	9.835 ^a
Grade III	22	2	20	90.9		19	3	13.6	
Invasion depth									
Within mucosa, submucosa,or shallow layer	7	3	4	57.1		3	4	57.1	
Deep muscle	14	5	9	64.3	7.298 ^a	6	8	57.1	6.354 ^a
Fiber membrane	41	4	37	90.2		32	9	22.0	
Lymph node metastasis									
No	42	12	30	71.4	7.086 ^a	24	18	42.9	4.694 ^a
Yes	20	0	20	100.0		17	3	15.0	

^a P<0.05

表 3 食管鳞癌组织中 Livin 蛋白和 Smac 蛋白表达的关系
Tab 3 Relationship between protein expression
of Livin and Smac in ESCC

Protein expression of Livin	Protein expression of Smac	
	+	-
+	12	38
-	9	3

亡刺激(包括抗癌药物、电离辐射、化学信号和 DNA 损伤)可使其与细胞色素 c(Cyt c)一同从线粒体膜间区释放出来,发挥促凋亡作用。人类 Smac/DIABLO 基因位于 12 号染色体长臂,由 7 个外显子组成。Smac mRNA 全长 1.5 kb,编码 239 个氨基酸的开放性阅读框,最初合成的前体蛋白相对分子质量约 27 000^[14]。

目前,细胞凋亡中主要的途径包括死亡受体途径和线粒体途径,这两条途径都有 Caspases 家庭成员的参与。IAPs 正常情况下,与 Caspase 结合而使其丧失活性,从而抑制细胞凋亡。Smac/DIABLO 在凋亡刺激物作用下,从线粒体中释放出来,和 IAPs 结合,解除其对 Caspase 的抑制作用,进而发挥促凋亡作用^[15]。

我们发现,从正常鳞状上皮→癌旁不典型增生→鳞癌组织,Livin 蛋白的阳性表达率逐渐上升,阳性率分别为 38.7%(24/62)、61.3%(19/31)和 80.6%(50/62),差异有统计学意义($\chi^2=22.742,P<0.05$);且 Livin 阳性信号呈细胞膜→细胞膜和(或)细胞浆→细胞浆和(或)细胞核表达,其原因有

待于进一步研究。另外,Livin 的表达与食管癌的组织学分级、浸润深度和淋巴结转移有关,浸润至食管纤维膜的 Livin 阳性表达率显著高于浸润至食管肌层的阳性表达率,有淋巴结转移的 Livin 阳性表达率显著高于无淋巴结转移的阳性表达率,本研究结果与黄青远等^[5]报道相符。提示 Livin 参与了食管癌的进展,有可能作为食管癌患者预后不良的参考指标之一。

我们的研究结果还显示,食管癌组织中 Smac 的阳性表达率明显低于癌旁不典型增生组织和食管正常组织,从鳞癌组织→癌旁不典型增生→正常鳞状上皮,Smac 的阳性表达呈现由低到高而后又降低的趋势。我们的研究结果还发现,Smac 的表达与食管癌的组织学分级、浸润深度和淋巴结转移有关,浸润至食管纤维膜的 Smac 阳性表达率显著低于浸润至食管肌层的阳性表达率,有淋巴结转移的 Livin 阳性表达率显著低于无淋巴结转移的阳性表达率,提示 Smac 的表达降低可能与食管癌的发生、发展有关,另外我们还发现 Livin 和 Smac 蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈负相关。我们将构建 Smac 基因的腺病毒载体,转染食管癌细胞系,进一步研究高表达 Smac 基因对食管癌细胞中 Livin 蛋白表达和细胞凋亡的影响。

致谢:感谢导师张云汉教授和郑州大学第一附属医院病理科、河南省肿瘤病理重点实验室李惠翔教授、陈奎生教授对本课题的指导;感谢任秀花老师、高冬玲老师、张岚老师、庞霞老师和李晟磊、赵志华、刘宗文、张功员等同学对本实验

的帮助!

参考文献:

[1] Takeuchi H, Kim J, Fujimoto A, et al. X-Linked inhibitor of apoptosis protein expression level in colorectal cancer is regulated by hepatocyte growth factor/C-met pathway via Akt signaling[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(21): 7 621-7 628.

[2] Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, et al. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer[J]. Clin Chim Acta, 2005, 362(1-2): 125-130.

[3] 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(3): 1 000-1 009.

[4] Gaither A, Porter D, Yao Y, et al. A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-alpha signaling[J]. Cancer Res, 2007, 67(24): 11 493-11 498.

[5] 黄青远, 赵志龙, 崔肃, 等. Livin 在食管癌中的表达及与 Bcl-2 相关性研究[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(3): 326-328.

[6] 赵进明, 朱志华, 吴秋良, 等. Smac 在 I ~ II 期非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 癌症, 2006, 25(5): 631-634.

[7] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3 238-3 246.

[8] Li JH, He WJ, He YJ. Expression and clinical significance of Survivin and Livin in DukesB colorectal cancer[J]. Ai Zheng,

2007, 26(5): 547-551.

[9] Song T, Hong BF, Gao JP, et al. Expression of apoptosis inhibitor gene Livin in bladder transitional cell carcinoma and clinical implication thereof[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2007, 87(12): 806-807.

[10] Yuan D, Liu L, Gu D. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 306(1-2): 171-178.

[11] Crnković -Mertens I, Muley T, Meister M, et al. The anti-apoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells[J]. Lung Cancer, 2006, 54(2): 135-142.

[12] DU C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by elimination IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1): 33-42.

[13] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. Cell, 2000, 102(1): 43-53.

[14] 王志成, 龚守良. Smac/DIABLO 与肿瘤[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(8): 942-945.

[15] Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1): 24-30.

[编辑: 贺 文; 校对: 杨 卉]