

## Livin 和 Bcl-2 在喉鳞状细胞癌的表达及相关性研究

刘守洲<sup>1</sup> 林立强<sup>2</sup> 王 孝<sup>1</sup> 孙艳艳<sup>3</sup> 韩在文<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup> 潍坊医学院耳鼻喉科教研室, 山东 潍坊 261042; <sup>2</sup> 临沂市人民医院, 山东 临沂 276000;

<sup>3</sup> 威海市立医院, 山东 威海 264200; <sup>4</sup> 潍坊医学院附属潍坊市人民医院, 山东 潍坊 261000)

**摘要 目的** 探讨 Livin 和 Bcl-2 蛋白在喉鳞状细胞癌(简称喉鳞癌)组织中的表达及其相关性。**方法** 采用免疫组化法检测 Livin 和 Bcl-2 在喉癌组织和正常喉粘膜组织中的表达。**结果** 喉鳞癌组织中 Livin 阳性率 77.5%, Bcl-2 阳性率 72.5%, 与正常喉粘膜组织比较其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Livin 蛋白的表达与喉鳞癌的 TNM 分期及有无淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ), 与患者年龄、性别和组织学分级比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在喉鳞癌组织中 Livin 和 Bcl-2 蛋白的表达呈正相关( $r = 0.339, P < 0.05$ )。**结论** Livin 的高表达提示其参与了喉鳞癌的发生、发展及转移。Livin 与 Bcl-2 在喉鳞癌癌变中发挥了协同作用。

**关键词** 凋亡抑制蛋白; 鳞状细胞癌; Livin; Bcl-2; 免疫组织化学

**中图分类号**: R766.5 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)04-090-03

### The expressions of livin in laryngeal squamous cell carcinoma and its correlation with Bcl-2

LIU Shou-zhou, LIN Li-qiang, WANG Xiao, et al

(Ear-nose-throat staff room of Weifang Medical University, Weifang 261042, China)

**Abstract. Objective** To explore the expression of Livin and Bcl-2 and the interrelation of Livin and Bcl-2 in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma(LSCC) tissue. **Methods** The expression of Livin and Bcl-2 was examined by immunohistochemical staining in LSCC tissue and normal laryngeal mucosa tissue. **Results** Compared with those of normal laryngeal mucosa tissues, the positive rate of Livin in LSCC tissues was significantly higher ( $P < 0.05$ ). Compared with those of normal laryngeal mucosa tissues, the positive rate of Bcl-2 in LSCC tissues was significantly higher ( $P < 0.05$ ). The expression of Livin was closely related to TNM staging and lymphatic metastasis of LSCC, but the expressions of Livin had no relationship with age, sex and histological grade ( $P > 0.05$ ). The expressions of Livin in LSCC were positively related to the expressions of Bcl-2 in LSCC ( $r = 0.339, P < 0.05$ ). **Conclusion**

The overexpressions of Livin may play an important role in process of the pathogenesis, development and transfer of LSCC. The overexpressions of Livin and Bcl-2 may play synergetic roles in process of carcinogenesis of LSCC.

**Key words**: Inhibitor of apoptosis protein; Squamous-celled carcinoma; Livin; Bcl-2; Immunohistochemistry

凋亡抑制蛋白 Livin 是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)中最近发现的新成员, 高表达于肿瘤及胎儿发育过程中多种组织如胎儿的脑、胸腺、肾和肝等, 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发展中其重要作用<sup>[1-4]</sup>。然而, Livin 基因在喉癌中的表达及与 Bcl-2 表达相关性的研究鲜见报道。本实验研究采用免疫组织化学 SABC 法对喉癌组织及癌旁

正常组织中 Livin 和 Bcl-2 蛋白的表达情况进行了研究, 以探讨 Livin 和 Bcl-2 癌基因在喉癌发生发展中的关系, 以期对临床工作有一定的指导意义。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

选用山东省潍坊市人民医院病理科 2009 年 9 月至 2010 年 10 月存档的喉鳞癌组织标本 40 份(观察组), 均经病理检查证实。其中男 34 例, 女 6

例;年龄 44~78 岁,中位年龄 57 岁。术前均未行放、化疗。TNM 分期: I~II 期 23 例, III~IV 期 17 例;有颈部淋巴结转移 14 例,无转移 26 例;组织分化程度:高分化 28 例,中低分化 12 例。另选 20 份正常喉黏膜标本作为对照组,其中男 15 例,女 5 例;年龄 30~68 岁,中位年龄 54 岁。

1.2 Livin 和 Bcl-2 表达的检测

主要试剂包括兔抗人 Livin 多克隆抗体浓缩液,兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体工作液,SABC(兔 IgG)-POD 试剂盒,DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。所有标本均经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,常规制成 4μm 厚切片。采用 SABC 法免疫组化染色技术,严格按照产品说明书步骤操作。以本研究中已知阳性切片做阳性对照,以 0.01M PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。每组均作常规苏木精-伊红染色。

1.3 判断标准

Livin 蛋白主要表达于细胞质,Bcl-2 蛋白主要表达于胞质和核膜,二者均以出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞。每例标本随意选取 5 个高倍视野,计数每个视野中阳性表达细胞所占比例,取其平均数求其阳性百分率作为结果。阳性细胞 ≤ 5% 为阴性,阳性细胞数 > 5% 为阳性<sup>[5]</sup>。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行统计分析,不同组间蛋白表达差异采用  $\chi^2$  检验和方差分析,Spearman 相关分析 Livin 和 Bcl-2 蛋白的相关性。 $P < 0.05$  具有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin、Bcl-2 在喉鳞癌组织、正常喉黏膜组织的表达

40 例喉鳞癌组织中,有 31 例 Livin 蛋白呈阳性表达,其阳性表达率高达 77.5%;而对照的 20 例正常喉黏膜组织,仅 1 例(5%)蛋白阳性表达。Livin 蛋白在喉鳞癌组织中阳性表达显著高于正常喉黏膜组织( $P < 0.05$ )。Bcl-2 蛋白在喉鳞癌组织及正常喉正常黏膜的阳性表达率分别为 72.5%、0%,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 Livin 在喉鳞癌组织学分级

高分化组及中低分化组的阳性表达率分别是 82.1%、75%,其阳性表达与组织学分级比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );Livin 在喉鳞癌组织中

的表达随临床分期的增加而升高,经统计学分析,差异有显著性( $P < 0.05$ ),Livin 在喉鳞癌有、无淋巴结转移组织中的阳性表达率分别为 85.7%、50%,其阳性表达与有无淋巴结转移比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

2.3 Livin 与 Bcl-2 在喉鳞癌中表达的关系

31 例 Livin 表达阳性的喉鳞癌组织中有 25 例 Bcl-2 表达阳性,9 例 Livin 表达阴性的喉鳞癌组织中 4 例 Bcl-2 表达阳性。经统计学处理:Livin 与 Bcl-2 在喉鳞癌中表达呈正相关( $r = 0.339, P < 0.05$ )。见表 3。

表 1 Livin、Bcl-2 在喉鳞癌及正常喉黏膜组织中的表达

组别	n	Livin(例)		$\chi^2$	P	Bcl-2(例)		$\chi^2$	P
		+	-			+	-		
癌组	40	31	9	28.16	<0.05	29	11	28.07	<0.05
正常组	20	1	19			0	20		

表 2 Livin 在喉鳞癌组织中表达与临床病例参数的关系

分类	n	Livin(例)		$\chi^2$	P
		+	-		
年龄(岁)					
≥60	21	16	5	2.43	>0.05
<60	19	10	9		
性别					
男	34	21	13	0.05	>0.05
女	6	4	2		
TNM 分期					
I~II 期	23	12	11	5.79	<0.05
III~IV 期	17	15	2		
组织分化					
高分化组	28	23	5	0.27	>0.05
中低分化组	12	9	3		
淋巴结转移					
有	14	12	2	4.95	<0.05
无	26	13	13		

表 3 喉鳞癌组织中 Livin 和 Bcl-2 表达的相关性分析

Livin	Bcl-2		合计	r	P
	阳性	阴性			
阳性	25	6	31	0.339	<0.05
阴性	4	5	9		
合计	29	11			

3 讨论

Livin, 又称 ML-IAP/KIAP, 是迄今发现的最

强的凋亡抑制因子之一,2000年Lin等<sup>[6]</sup>根据凋亡抑制蛋白(IAPs)同源序列,在人胎肾cDNA文库中发现的新成员。Livin基因位于染色体20q13。Livin含有IAP家族成员特有的BIR和RING指结构域<sup>[6]</sup>。研究表明Livin能够结合caspase蛋白,可能阻止caspase蛋白在细胞凋亡时执行蛋白切除功能,而发挥抗凋亡作用<sup>[2,7]</sup>。Livin在一些癌细胞系中高表达,如淋巴瘤、HaCat细胞、MCF7乳腺癌细胞等,所有在黑色素瘤、膀胱癌、淋巴瘤、头颈部肉瘤中高表达<sup>[8]</sup>。本实验通过免疫组化方法检测40例LSCC中Livin蛋白的表达,结果显示:Livin在喉鳞癌组织中高表达,而在正常喉黏膜组织中不表达或极低表达,表明Livin与喉鳞癌有一定的关系,可能参与了喉鳞癌的发生。Livin蛋白在喉鳞癌组织中的表达与患者年龄、性别无关,而随着肿瘤的TNM分期的增加、淋巴转移的出现,其阳性表达率明显增高,提示Livin蛋白的过度表达可能参与了喉鳞癌的发展,可能成为指示预后不良的指征。

Bcl-2是B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2)的缩写,是第1个被发现的细胞凋亡抑制基因,于1984年由Tsujiimoto等<sup>[9]</sup>在研究人类滤泡性淋巴瘤时发现。目前认为Bcl-2蛋白可通过阻断caspase酶类活化的上游信号传递通路而抑制诱发细胞凋亡,参与细胞增殖与凋亡动态平衡的调控,从而抑制细胞凋亡;或通过阻止Smac的释放,使Livin蛋白发挥抑制细胞凋亡的作用。本实验结果显示:Bcl-2蛋白在喉鳞癌组织中过度表达,而在正常喉黏膜组织中无表达,提示Bcl-2蛋白的高表达参与了喉鳞癌的发生。

肿瘤的发生是细胞增殖和凋亡动态平衡的破坏所致,细胞凋亡的抑制是肿瘤发生的重要机制。Bcl-2主要在Caspase的上游抑制线粒体释放细胞色素C(Cyt C)等,从而发挥抑制细胞凋亡的作用<sup>[10]</sup>,而Livin主要在其下游直接抑制Caspase的活性而抑制细胞凋亡<sup>[2,7]</sup>,它们的区别在于作用于细胞凋亡的不同阶段而发挥作用。本研究中发现,31例Livin蛋白阳性表达的喉鳞癌组织中,Bcl-2蛋白的阳性表达的有25例,阳性表达率为80.6%;9例Livin蛋白表达隐性的喉鳞癌组织中,

Bcl-2蛋白表达阴性的有5例。经统计学分析,两者呈显著性正相关( $r=0.339, P<0.05$ )。提示Livin与Bcl-2在喉鳞癌的发生发展中可能有一定的协同作用。目前有关研究Livin与Bcl-2在喉鳞癌发展中协同作用的文献报道甚少,还有很多问题未阐明,有待更深入的研究。

综上所述,Livin的高表达在喉鳞癌的发生、发展及转移中起一定作用,而Bcl-2的高表达提示其参与了喉鳞癌的发生。Livin与Bcl-2在喉鳞癌的癌变中起协同作用。

#### 参考文献:

- [1] 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: 125-130.
- [2] Wagener N, Cmkovic-Mertens I, Vetter C, et al. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in renal cell carcinoma and nontumorous adult kidney[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(7): 1271-1276.
- [3] 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): 135-166.
- [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] Dong Y, Sui L, Watanabe Y, et al. Survivin expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implication[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(4): 2377-2383.
- [6] 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.
- [7] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3238-3246.
- [8] Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, et al. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis(ML2IAP)[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(14): 12275-12279.
- [9] Tsujiimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation[J]. *Science*, 1984, 226(4678): 1097-1099.
- [10] Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366(12): 127-137.

(收稿日期 2011-03-11)