

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.015

· 临床研究 ·

人骨肉瘤组织中 Livin 和 Caspase-7 蛋白的表达及其临床意义

李怀强, 孙廓[△], 蔡凤, 彭源祥, 刘春龙, 廖琦(南昌大学第二附属医院 骨二科, 江西 南昌 330000)

[摘要] **目的:**分析 Livin 和 Caspase-7 蛋白在骨肉瘤中的表达,探讨两者在骨肉瘤的临床诊断、治疗及预后中的意义。**方法:**收集 2001 年 2 月至 2012 年 12 月我院骨科收治的 51 例骨肉瘤患者的石蜡切片标本及 12 例正常骨组织标本,采用免疫组化法检测标本中 Livin 和 Caspase-7 蛋白的表达,并分析两者表达的相关性及与骨肉瘤各临床病理指标和预后之间的关系。**结果:**与正常骨组织相比,骨肉瘤患者组织中 Livin 蛋白的阳性表达率明显增高[66.7%(34/51) vs 8.3%(1/12), $P < 0.01$];而 Caspase-7 蛋白的阳性表达率则明显降低[49.0%(25/51) vs 100.0%(12/12), $P < 0.01$]。Livin 和 Caspase-7 蛋白的阳性表达与骨肉瘤的大小、Enneking 分期及患者 5 年生存率显著相关($P < 0.01$),与患者年龄、性别、病理分型及肿瘤的部位无相关性($P > 0.05$);Livin 蛋白的阳性表达和 Caspase-7 蛋白的阳性表达之间呈负相关性($r = -0.305, P = 0.029$)。**结论:**Livin 蛋白在骨肉瘤组织中高表达,而 Caspase-7 蛋白在骨肉瘤组织中低表达,两者表达呈负相关性;Livin 可能通过某种机制调控 Caspase-7 的表达,从而抑制了骨肉瘤细胞凋亡并促使骨肉瘤的发生与发展。

[关键词] 骨肉瘤; Livin; Caspase-7; 免疫组织化学

[中图分类号] R738.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)03-0320-05

Expression and clinical significance of Livin and Caspase-7 protein in human osteosarcoma tissues

Li Huaiqiang, Sun Kuo[△], Cai Feng, Peng Yuanxiang, Liu Chunlong, Liao Qi(Second Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to analyse livin and caspase-7 expression at the protein level in correlation with the clinical diagnosis, treatment and prognosis of osteosarcoma. **Method:** Paraffin-embedded 51 osteosarcoma and 12 normal bone tissue specimens were prepared by the Orthopedics Department of our hospital between February 2001 and December 2012. Livin and caspase-7 proteins in the specimens were assessed by immunohistochemical staining. The correlations of livin and caspase-7 protein levels with the clinicopathological features and prognosis of osteosarcoma were analyzed. **Results:** Compared with normal bone tissue, Osteosarcoma tissue had a significantly higher percentage of livin-positive cells (66.7% vs 8.3%, $P < 0.01$) but a significantly lower percentage of caspase-7-positive cells (49.0% vs 100.0%, $P < 0.01$), as compared with the normal bone tissue. The proportions of livin- and caspase-7-positive cells were significantly correlated with tumor size, Enneking stage and the 5-year survival rate ($P < 0.01$), but was independent of age, gender, pathological type and tumor site ($P > 0.05$). The expression of livin was negatively correlated with the expression of caspase-7 ($r = -0.305, P = 0.029$). **Conclusion:** Livin expression is positively correlated but caspase-7 expression is negatively correlated with the severity and prognosis of osteosarcoma, suggest that these two proteins may potential diagnostic and prognostic significance for osteosarcoma.

[Key words] osteosarcoma; Livin; Caspase-7; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 320-324]

[基金项目] 江西省科技支撑计划项目资助项目(No. 00160631121206025)。Project supported by Science and Technology of Jiangxi Province (No. 00160631121206025)

[作者简介] 李怀强(1987-),男,江西省宜春市人,硕士生,主要从事骨肿瘤生物治疗的临床研究,E-mail: 19870413love@sina.com;孙廓(1982-),男,江西省九江市人,博士,主治医师,主要从事骨肿瘤生物治疗的临床研究,E-mail: sunkuo1111@163.com。△共同第一作者

[通信作者] 廖琦(Liao Qi, corresponding author), E-mail: liaoqi@medmail.com.cn

骨肉瘤是骨科临床常见的恶性肿瘤之一,可发生于各个年龄段人群,但儿童、青少年多见,好发于长骨干骺端^[1],恶性程度极高,易早期转移且预后较差,其治疗仍是骨科当前所面临的难题。目前,骨肉瘤的治疗依然以手术为主,并辅以放化疗。但由于化疗的耐药性及毒性反应较大^[2],传统治疗受到了严峻的挑战,使得肿瘤的生物靶向治疗研究越来越受到重视^[3]。机体细胞的凋亡紊乱与骨肉瘤的发生、发展密切相关,是骨肉瘤形成过程中的一个重要机制之一,促进骨肉瘤细胞凋亡、彻底清除肿瘤细胞的关键是找到骨肉瘤的生物治疗的基因靶点。近年来发现^[4],Livin 蛋白是人凋亡抑制蛋白家族的新成员之一,其在正常组织中低表达或不表达,而在多种恶性肿瘤组织和肿瘤细胞系中则高表达,能抑制肿瘤细胞的凋亡。半胱天冬蛋白酶-7(Caspase-7)是机体执行凋亡过程的重要成员之一^[5],目前尚无有关 Caspase-7 在骨肉瘤中表达状况的研究报道。本研究应用免疫组化法检测 Livin 和 Caspase-7 蛋白在骨肉瘤及正常骨痂组织中的表达,探讨 Livin 和 Caspase-7 蛋白表达的相关性及与骨肉瘤预后的关系,有望为骨肉瘤的临床诊断、治疗及预后判定提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本及主要试剂

选取 2001 年 2 月至 2012 年 12 月在南昌大学第二附属医院骨科手术切除或肿瘤活检的骨肉瘤组织石蜡标本 51 例,所选用的标本术前均未行放化疗,术后标本经南昌大学第二附属医院病理科确诊为骨肉瘤,有完整的临床病理资料。其中男性 33 例,女性 18 例;年龄 ≤ 20 岁的 26 例, > 20 岁的 25 例;肿瘤位于股骨 21 例,胫腓骨 11 例,肱骨 8 例,其他部位 6 例;肿瘤直径 ≤ 5 cm 的 33 例, > 5 cm 的 18 例;病理学分型:成骨细胞型 20 例,软骨母细胞型 7 例,纤维母细胞型 11 例,其他类型 13 例。按骨肉瘤 Enncking 分期: I_B-II_A 期 19 例, II_B-III 期 32 例;另选取 12 例正常骨痂组织标本做对照。51 例骨肉瘤患者中有 39 例获得完全随访资料,均采用电话回访方式。

Livin 鼠抗人单克隆抗体(工作液浓度 1:100)购于 Abcam 公司, Caspase-7 兔抗人多隆抗体(工作液浓度 1:50)购于 ABclonal 公司,免疫组化 MaxVision™/AP 试剂盒、PBS 粉剂均购于福州迈新生物技术有限公司。

1.2 免疫组化法检测 Livin 和 Caspsse-7 蛋白的表达

免疫组化染色采用 MaxVision™/AP 法,染色方法严格按照 MaxVision™/AP 试剂盒说明书进行,用 PBS 代替一抗作为阴性对照,并以正常骨痂组织标本作为骨肉瘤对照组。

1.3 Livin 和 Caspsse-7 蛋白免疫组化结果判定

Livin 的阳性表达主要定位于细胞核,少数位于细胞质,呈棕黄色(图 1);Caspase-7 的阳性表达主要位于细胞质,少数位于细胞核,呈棕黄色(图 1)。参考文献[6]的结果判定标准:每例每个指标随机选取 10 个高倍视野($\times 200$),每个视野计数 100 个细胞;根据免疫组化染色强度及阳性细胞百分比进行计分:(1)染色强度计分:不着色或蓝色为 0 分;淡黄色(弱阳性)为 1 分;棕黄色(中度阳性)为 2 分;棕褐色(强阳性)为 3 分;(2)阳性细胞数计分:阳性细胞 $< 5\%$ 为 0 分; $6\% \sim 35\%$ 为 1 分; $36\% \sim 70\%$ 为 2 分; $> 70\%$ 为 3 分。根据这两项指标积分之和判定结果,即总积分 ≤ 2 为阴性(-),总积分 > 2 为阳性(+)

1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率表示,对 Livin、Caspase-7 蛋白的表达与骨肉瘤临床病理指标间的关系及 Livin 和 Caspase-7 蛋白表达的相关性采用卡方检验分析处理,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin 及 Caspase-7 蛋白在骨肉瘤组织、正常骨痂组织中的表达

Livin 蛋白阳性染色颗粒主要位于骨肉瘤细胞的细胞核,为棕黄色颗粒状(图 1)。骨肉瘤组织中 Livin 蛋白的表达显著高于正常骨痂组织[66.7% (34/51) vs 8.3% (1/12), $P < 0.01$]。Caspase-7 蛋白阳性染色颗粒主要位于骨肉瘤组织细胞的细胞质,少数位于细胞核,为棕黄色颗粒状(图 1)。骨肉瘤组织中 Caspase-7 蛋白的表达显著低于正常骨痂组织[49.0% (25/51) vs 100.0% (12/12), $P < 0.01$]

2.2 Livin 及 Caspase-7 蛋白表达与骨肉瘤患者临床病理参数间的关系

对 Livin 及 Caspase-7 蛋白表达与骨肉瘤患者临床病理参数之间的关系分析显示,Livin 和 Caspase-7 蛋白在骨肉瘤患者中的表达水平与患者的年龄、性别、肿瘤部位及病理学分型之间均无相关性,而与不同骨肉瘤 Enncking 临床分期、肿瘤大小及 5 年生存率分组之间呈显著相关性(表 1)。

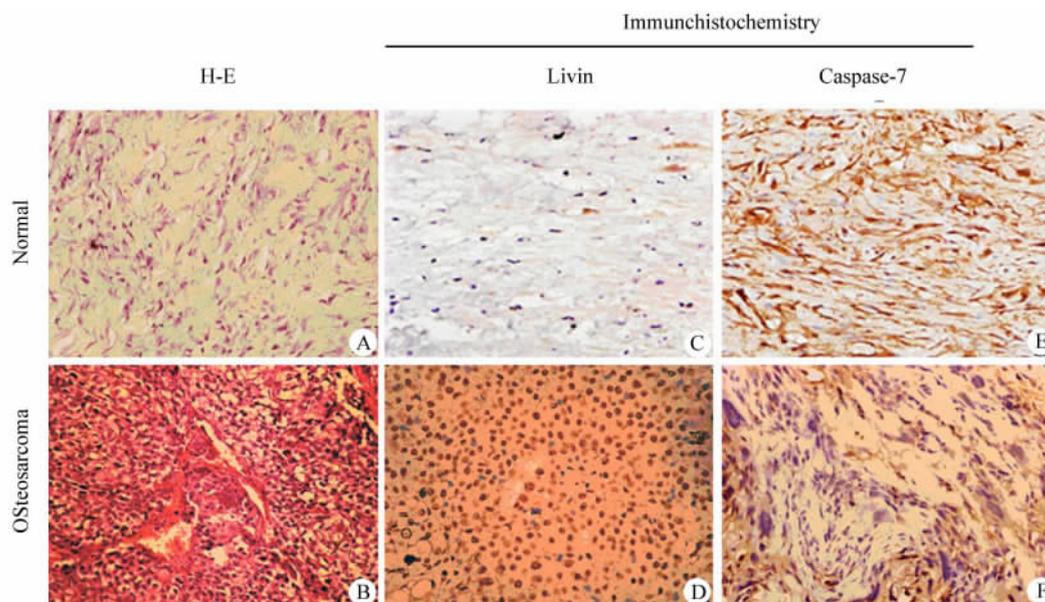


图1 骨肉瘤及正常骨组织免疫组化染色(AP, ×200)

Fig.1 Immunchistochemistry in Osteosarcoma and Normal bone tissues(AP, ×200)

A: Normal bone tissue H-E; B: Osteosarcoma tissue H-E; C: Negative expression of Livin in normal bone tissue; D: Positive expression of Livin in osteosarcoma; E: Positive expression of Caspase-7 in normal bone tissue; F: Positive expression of Caspase-7 in osteosarcoma

在 33 例肿瘤直径 ≤5 cm 的骨肉瘤患者组织标本中, Livin 蛋白阳性表达率明显低于 18 例肿瘤直径 > 5 cm 的骨肉瘤患者组织标本(45. 5% vs 77. 8%, 均 $P < 0. 01$); 而 Caspase-7 蛋白的阳性表达率前者则明显高于后者(60. 6% vs 27. 8%, $P < 0. 01$)。

在 Enncking 临床分期 I_B-II_A 期组(19 例), 其 Livin 蛋白的阳性表达率明显低于 II_B-III 期组(32 例)(31. 6% vs 87. 5%, $P < 0. 01$), 而 Caspase-7 蛋白的阳性表达率前者则明显高于后者(78. 9% vs 31. 3%, $P < 0. 01$)。

在随访完全的 39 例骨肉瘤病例中, Livin 和 Caspase-7 蛋白阳性表达率在患者生存时间 ≤5 年的分别为 73. 9% 和 30. 4%, >5 年的分别为 37. 5% 和 68. 8%, 差异均具有统计学意义($P < 0. 05$)。

2.3 Livin 与 Caspase-7 在骨肉瘤中表达的相关性

结果显示, Livin 及 Caspase-7 在骨肉瘤组织中的阳性表达具有相关性。34 例 Livin 阳性表达的骨肉瘤病例中, Caspase-7 阳性表达率为 38. 2% (13/34); 17 例 Livin 阴性表达的骨肉瘤病例中, Caspase-7 阳性表达率为 70. 6% (12/17)。相关性分析显示: Livin 及 Caspase-7 在骨肉瘤中的表达呈负相关($r = -0. 305, P = 0. 029$, 表 2)。

3 讨论

恶性肿瘤是当前威胁人类健康的主要疾病之一, 其发病机制及治疗仍未研究透彻。普遍认为恶性肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡所致, 细胞凋亡受阻、无限增殖是肿瘤发生、发展的重要机制^[7], 目前肿瘤生物靶向治疗的基础, 就是诱导肿瘤细胞凋亡。细胞凋亡受多种机制的调控, 其凋亡途径也多种多样, 近年来发现凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAPs) 是一类在结构上有同源的蛋白质, Livin 是其新成员之一, 是抑制细胞凋亡的重要调节分子^[8]。Livin 可以通过多种途径实现抗细胞凋亡, 但其主要是通过抑制特定的半胱天冬蛋白酶(caspases) 的活性, 阻断 caspases-3、caspases-7 的信号传导通路, 从而达到抑制细胞凋亡的效应^[9], 其抗凋亡功能远强于 Bcl-2 家族、FLICE-inhibitory 蛋白(c-FLIP), 在肿瘤的发生、发展中起着重要作用。Livin 是 IAPs 家族中的一个新成员, 基因位于人染色体 20q13. 3, 全长 4. 6kb, 包含 6 个内含子和 7 个外显子, 其包含一个单独的杆状病毒的 IAP 重复结构域和一个羧基末端结构^[10]。Livin 蛋白高表达于多种恶性肿瘤组织, 而在正常组织中极少表达。据有关文献报道^[11-14], Livin 在肺癌、结直

肠癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌及乳腺癌等大多数恶性肿瘤中都有特异性高表达,并认为 Livin 是一种具有潜在价值的肿瘤标志物^[15]。Li 等^[16]报道, Livin 在骨肉瘤细胞系中呈过表达,并认为 Livin 可以作为治疗骨肉瘤的一个基因靶点。

本研究结果显示, Livin 的表达主要见于骨肉瘤细胞核,总阳性表达率为 66.7%,患者年龄、性别、

肿瘤部位及肿瘤病理分型等各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。而在不同 Enncking 临床分期、肿瘤大小及患者 5 年生存率分组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。由上述结果可推测, Livin 蛋白的过表达可能参与了骨肉瘤恶性演进的过程,并可能为骨肉瘤的诊断、治疗及判断预后提供新的启示。

表 1 骨肉瘤中 Livin 及 Caspase-7 的表达与临床病理参数之间的关系

Tab. 1 Expression of Livin and Caspase-7 in osteosarcoma and it's correlation with clinicopathologic characteristics

Characteristics	N	Livin expression		χ^2	P	Caspase-7 expression		χ^2	P
		n	%			n	%		
Total case	51	34	66.7			25	49.0		
Gender				0.386	0.534			0.011	0.918
Male	33	23	69.7			16	48.5		
Female	18	11	61.1			9	50.0		
Age(t/a)				0.157	0.692			0.494	0.482
≤ 20	26	18	69.2			14	53.8		
> 20	25	16	64.0			11	44.0		
Tumor location				1.122	0.772			0.738	0.864
Femur	26	18	69.2			13	50.0		
Tibia and fibula	11	7	63.6			6	54.5		
Humer	8	6	75.0			4	50.0		
Other	6	3	50.0			2	33.3		
Enncking stage				9.280	0.002			10.853	0.001
I _B -II _A stage	19	6	31.6			15	78.9		
II _B -III stage	32	24	75.0			10	31.3		
Tumor size(l/cm)				4.961	0.026			5.023	0.025
≤ 5	33	15	45.5			20	60.0		
> 5	18	14	77.8			5	27.8		
Pathotype				0.937	0.816			0.491	0.921
Osteoblastic	20	14	70.0			9	45.0		
Chondroblastic	11	6	54.5			6	54.5		
Fibroblastic	7	5	71.4			3	42.9		
Other	13	9	69.2			7	53.8		
Return case	39	23	59.5			18	46.2		
Five survival(t/a)				5.171	0.023			5.574	0.018
≤ 5	23	17	73.9			7	30.4		
> 5	16	6	37.5			11	68.8		

Note: The survival rate of completely return data only 39 cases

Caspases-7 属于半胱氨酸蛋白酶家族成员,它是 CASP 系统执行细胞程序性死亡的重要效应分子

之一,其活化最终导致细胞凋亡,而且对肿瘤的发生、发展起了重要作用^[17]。文献报道^[18],抑制

Caspases-7 酶的活性或干扰 Caspases-7 的效应功能,可使细胞凋亡受阻,增加 Caspases-7 的表达,可以促进细胞凋亡,因此 Caspases-7 对细胞凋亡的执行起主要作用。沈小钢等人^[19]研究表明,Caspases-7 在结直肠癌组织中的表达明显低于正常组织,且 Caspases-7 可能参与了结直肠癌的发生、发展。

表 2 Livin 与 Caspase-7 在骨肉瘤中表达的关系
Tab.2 Correlation between the expression of Livin and Caspase-7 in osteosarcoma

Expression	Livin(+)	Livin(-)	Total
Caspase-7(+)	13	12	25
Caspase-7(-)	21	5	26
Total	34	17	51

本研究结果显示,Caspases-7 在骨肉瘤组织的表达主要位于细胞质,总阳性表达率为 49.0%,与患者年龄、性别、肿瘤部位及肿瘤病理分型等各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。而在不同 Enncking 临床分期、肿瘤大小及患者 5 年生存率分组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。这些数据提示:在骨肉瘤的发生、发展过程中,可能存在某种下调机制,降低了 Caspases-7 在骨肉瘤组织中的表达水平,抑制了肿瘤细胞的凋亡,促进了骨肉瘤的形成与发展。

通过分析发现,Livin 与 Caspase-7 在骨肉瘤中的表达呈显著负相关性($r = -0.305, P = 0.029, P < 0.05$;表 2),提示 Livin 与 Caspase-7 与骨肉瘤肿瘤细胞凋亡过程中关系密切,但两者的生物学效应相反,Livin 可通过多种机制抑制或下调 Caspase-7 的表达,阻止骨肉瘤细胞的凋亡,从而打破了细胞增殖与凋亡的平衡,导致细胞的恶性增殖,促进了骨肉瘤的形成与发展,而且随着研究的不断深入,Livin 与 Caspase-7 有望成为骨肉瘤基因治疗、免疫治疗的新靶点。

[参 考 文 献]

[1] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 15(2): 3-13.
 [2] Zhao D, Yuan H, Yi F, et al. Autophagy prevents doxorubicin-induced apoptosis in osteosarcoma [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(5): 1975-1981.
 [3] Ando K, Heymann MF, Stresing V, et al. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma [J]. *Cancers*, 2013, 5(2): 591-616.

[4] Yan B. Research progress on Livin protein: An inhibitor of apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(12): 39-45.
 [5] Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition [J]. *Biochem J*, 2004, 384(2): 201-232.
 [6] 马大烈,白辰光. 免疫组织化学阳性标记结果的观察和判断 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2003, 19(5): 557-559.
 [7] Shibata T, Noguchi T, Takeno S, et al. Disturbed XIAP and XAF1 expression balance is an independent prognostic factor in gastric adenocarcinomas [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(12): 3579-3587.
 [8] Guo H, Gao YT, Zhang Q, et al. Expression and clinical significance of livin protein in hepatocellular carcinoma [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 489-496.
 [9] Xu M, Xia LP, Fan LJ, et al. Livin and caspase-3 expression are negatively correlated in cervical squamous cell cancer [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2013, 34(2): 152-155.
 [10] 王秋. Livin 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2011, 24(5): 250-253.
 [11] 王莉娜,牟健,张彦兵,等. 凋亡抑制因子 Livin 在肺癌围手术期检测的临床研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(9): 889-890.
 [12] Xu M, Xia LP, Fan LJ, et al. Livin and caspase-3 expression are negatively correlated in cervical squamous cell cancer [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2013, 34(2): 152-155.
 [13] Ding ZY, Zhang H, Adell G, et al. Livin expression is an independent factor in rectal cancer patients with or without preoperative radiotherapy [J]. *Radiat Oncol*, 2013, 8(1): 280-281.
 [14] Li F, Yin X, Luo X, et al. Livin promotes progression of breast cancer through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of AKT signaling [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(6): 1413-1422.
 [15] Ou JM, Ye B, Qiu MK, et al. Knockdown of Livin inhibits growth and invasion of gastric cancer cells through blockade of the MAPK pathway in vitro and in vivo [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(1): 276-284.
 [16] Li X, Fan S, Li L, et al. RNA interference-mediated knockdown of Livin suppresses cell proliferation and invasion and enhances the chemosensitivity to cisplatin in human osteosarcoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1): 159-168.
 [17] Lee WK, Kim JS, Kang HG, et al. Polymorphisms in the Caspase7 gene and the risk of lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2009, 65(1): 19-24.
 [18] Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: A protease involved in apoptosis and inflammation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1): 21-24.
 [19] 沈小钢,郭志义,张伟,等. Caspase-7 在结肠正常黏膜、腺瘤和癌中的表达变化 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(3): 361-363.

[收稿日期] 2013 - 12 - 15 [修回日期] 2014 - 03 - 05
 [本文编辑] 阮芳铭