

Livin 和 HIF-1 α 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义

张勇¹ 陈忠¹ 杨为民¹ 叶章群¹

[摘要] 目的:探讨凋亡抑制蛋白 Livin 和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在膀胱尿路上皮癌组织中的表达及其与膀胱尿路上皮癌复发的关系。方法:应用免疫组化 SABC 法检测 45 例膀胱尿路上皮癌及 15 例正常膀胱黏膜组织石蜡切片中 Livin 和 HIF-1 α 的表达情况,并结合临床资料进行分析。结果:45 例膀胱尿路上皮癌组织中分别有 23(51.1%)例 Livin 阳性和 39(86.7%)例 HIF-1 α 阳性。在正常组织中有 1(6.7%)例 Livin 阳性,3(20.0%)例 HIF-1 α 阳性。二者在膀胱尿路上皮癌组织中的表达均明显高于相应正常膀胱组织($P < 0.01$)。Livin 蛋白和肿瘤复发成正相关,病理分级之间存在差异;但 Livin 和 HIF-1 α 的表达均与膀胱尿路上皮癌的临床分期和患者年龄无关($P > 0.05$);此外,HIF-1 α 在病理分级上无显著差异;Livin 与 HIF-1 α 之间也不存在相关性。结论:检测 Livin 和 HIF-1 α 蛋白有助于评估肿瘤的生物行为,并有利于膀胱尿路上皮癌患者的临床治疗决策。

[关键词] 膀胱尿路上皮癌;Livin;HIF-1 α ;免疫组化

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)04-0268-03

Expression and significance of Livin and HIF-1 α protein in carcinoma of urinary bladder

ZHANG Yong CHEN Zhong YANG Weimin YE Zhangqun

(Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

Corresponding author: CHEN Zhong, E-mail: chenzhongtj@126.com

Abstract Objective: To investigate the expression of the inhibitor of apoptosis protein Livin and HIF-1 α in human carcinoma of urinary bladder and their relationship with cancer development and relapse. **Method:** The expression of Livin and HIF-1 α protein in 45 carcinoma of urinary bladder specimens and 15 corresponding normal mucosa tissues were detected by immunohistochemical staining. **Result:** Livin and HIF-1 α protein positive expression rate in tumor samples were 51.1% (23/45), 86.7% (39/45), respectively. While Livin and HIF-1 α protein positive expression rate in corresponding normal mucosa tissues samples were 6.7% (1/15), 20.0% (3/15), respectively. The expression of Livin and HIF-1 α protein in the carcinoma of urinary bladder were significantly higher than normal tissue ($P < 0.01$). Tumor recurrence and tumor stage were found with expression of Livin. But no correlation was found between the expression of Livin and HIF-1 α in tumor grade and age ($P > 0.05$). There was no significant correlation between the expression of Livin and HIF-1 α . **Conclusion:** The determination of Livin and HIF-1 α will be useful in predicting tumor biological behavior and may help for clinical decision-making in the treatment of carcinoma of urinary bladder patients.

Key words carcinoma of urinary bladder; Livin; HIF-1 α ; immunohistochemistry

膀胱尿路上皮癌的发生、发展是一个多步骤、多因素长期作用的结果,除了原癌基因的激活,抑癌基因的失活外,某些凋亡调控基因及关键性转录调控因子的异常表达也是促进其发展的因素。Livin 是 2000 年发现的凋亡抑制蛋白家族(IAPs)新成员,已有研究表明其在细胞凋亡和多数实质性肿瘤的发生过程中具有重要的影响作用。而凋亡抑制是肿瘤发生的重要机制,Livin 作为凋亡抑制蛋白家族中的新成员,可能在膀胱尿路上皮癌的发生和发展中起着重要的作用^[1]。HIF-1 α 是介导细胞对缺氧微环境进行适应性反应的关键性转录调控因子,在低氧负荷下能够诱发多种相关基因的表

达,对维持肿瘤细胞的能量代谢、细胞增殖和肿瘤血管发生具有重要的作用,并且与肿瘤的发生、发展和转移密切相关。本次研究初步探讨了 Livin 和 HIF-1 α 在膀胱尿路上皮癌组织中的表达情况以及临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集我院 2006 年 2 月~2008 年 10 月存档膀胱尿路上皮癌标本 45 例,男 39 例,女 6 例;年龄 38~90 岁,中位年龄 61 岁。病理分级按 2004 年 WHO 标准。临床分期按照 UICC-TNM 标准(表 1)。所有标本均经再次病理检查证实。另取 15 例正常膀胱黏膜作为正常对照组。

1.2 检测方法和材料

采用免疫组织化学 SABC 法。抗体,免疫组化

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科(武汉,430030)

通信作者:陈忠,E-mail: chenzhongtj@126.com

试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。DAB 显色,苏木素复染,氨水透明。已知结肠癌阳性切片做阳性对照,PBS 代替一抗做阴性对照。

1.3 结果判断

Livin 蛋白主要定位于细胞质中,很少出现在细胞核中,阳性染色为粗细均一的棕黄色颗粒^[1]。HIF-1 α 主要在组织上皮细胞和肿瘤细胞核及胞浆内呈局限性或弥散性表达,后者表达方式更常见于肿瘤细胞中。Livin 和 HIF-1 α 阳性结果判断采用免疫组化染色强度和细胞百分比评分的方法^[2]。同时用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文等级采集高倍镜视野图像进行图像分析,获取的平均光密度值作为评价试验结果的量化指标。

1.4 统计学处理

表 1 膀胱尿路上皮癌的 Livin 和 HIF-1 α 蛋白的表达

	总例数	Livin(+)	χ^2	P 值	HIF-1 α (+)	χ^2	P 值
年龄							
≥60	21	10	0.568	0.451	15	0.02	0.965
<	24	13			17		
组织种类							
正常膀胱组织	15	1	9.259	0.002	3	23.81	0
BTCC	45	23			39		
肿瘤分期							
T _{is} ~T ₁	11	4	1.267	0.26	7	3.441	0.064
T ₂ ~T ₄	34	19			30		
肿瘤病理分级							
I	15	9	7.153	0.028	12	0.21	0.901
II	14	10			11		
III	16	4			11		
肿瘤初发与复发							
初发	25	9	5.14	0.023	21	0.563	0.453
复发	20	14			14		

2.2 Livin 和 HIF-1 α 在膀胱尿路上皮癌组织中的相关性

相关性分析显示膀胱尿路上皮癌中 Livin 和 HIF-1 α 蛋白表达不存在正相关性($P = 0.361$) (表 2)。

表 2 Livin 和 HIF-1 α 表达的相互关系

Livin	例数	HIF-1 α		R	P 值
		阳性	阴性		
阳性(+)	23	21	2	0.139	0.361
阴性(-)	22	18	4		

2.3 平均光密度与病理分级之间的联系

采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统可以得到两种蛋白在不同病理分级中的平均光密度值。Livin 和 HIF-1 α 蛋白表达在不同病理分级中平均光密度值差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

SPSS 13.0 软件包处理数据。采用 χ^2 检验, Spearman 相关分析分析资料相关性。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin 蛋白和 HIF-1 α 蛋白的表达

膀胱尿路上皮癌组织中的 Livin 表达明显高于正常膀胱组织。初发和复发病例存在差异。病理分级(I、II、III 之间)存在差异。但是 Livin 表达与发病年龄和肿瘤分期没有显著差异。HIF-1 α 在对照组 3 例阳性,在膀胱尿路上皮癌中 39 例阳性。正常组织与肿瘤组织中 HIF-1 α 表达存在统计学差异。HIF-1 α 表达与年龄、肿瘤分期、病理分级以及是否复发均无统计学差异(表 1)。

3 讨论

肿瘤的发生、发展与细胞凋亡的紊乱密切相关。凋亡受抑制将导致细胞存活时间延长,利于发生突变的细胞生长积累,最终导致肿瘤的产生。凋亡抑制蛋白(IAP)是目前发现的唯一一种可以和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶直接结合发挥凋亡抑制作用的蛋白家族。它的过度表达引起的凋亡不足与肿瘤的发生密切相关^[1,3]。而 Livin 则是由 Ashhab 等^[4]发现的一种新的细胞凋亡抑制蛋白,它含有 IAP 家族成员特有的 BIR 和 RING 指结构域。Livin 主要通过阻断凋亡受体及以线粒体为基础的外源性和内源性凋亡途径发挥抑制细胞凋亡的作用^[5]。

国内外的研究证实了 Livin 的表达在各种实质性肿瘤中的重要临床意义。实验观察到在肿瘤组织中 Livin 表达明显高于正常组织。说明 Livin 在膀胱尿路上皮癌的发生、发展中确实发挥着某种作

用。并且复发病例中 Livin 的阳性率明显升高,这进一步证明了 Livin 在膀胱尿路上皮癌中的作用。也为我们对部分患者术后辅助治疗以及及时、早期诊断提供了依据。Gazzaniga 等^[6]对 30 例浅表膀胱癌患者的研究发现, Livin 可能与癌的进展有关,并且可以作为预测复发的标志物。这与我们的实验结果相一致。但是入组对象较少,并且缺乏相应的临床随访,对于 Livin 和膀胱尿路上皮癌复发之间的关系还无法完全证实。但是对于来院就诊的初发与复发患者的对比研究中,复发患者的 Livin 表达要高于初发患者,有统计学意义。说明 Livin 的表达确实可能与膀胱尿路上皮癌的复发有关。另一方面 Livin 的致肿瘤作用也是双重的,有研究表明 Livin 虽然在致肿瘤中起着主要的作用,但是其在 NK 细胞的作用下会分裂产生截短的促凋亡蛋白质,从而抑制肿瘤生长。在膀胱尿路上皮癌中是否也存在这样的作用还需要我们继续研究。若确实如此,那么,除了 Livin 外,截短的 Livin 也可以作为癌症治疗的潜在靶点^[7]。

氧在新陈代谢中起着重要的作用,需氧器官要获得氧以生产能量。而肿瘤的快速生长对氧的依赖性更为显著。但大量证据表明实体肿瘤大多遭受低氧负荷。因此,在实体肿瘤中常表现出 HIF 的高水平积聚^[8]。此外,氧剥夺似乎也与氧自由基的积聚有联系,他们能够对细胞内的蛋白质和 DNA 产生额外的压力,促进正常细胞向肿瘤细胞转化。在哺乳动物中有三种 HIF α 亚基(HIFs),即 HIF-1 α , HIF-2 α 和 HIF-3 α 。HIF-1 α 在细胞中任何部位都有表达^[8]。HIFs 在肿瘤的发展过程中有着不同的影响,因为他们都具有环境依赖型的功能和不同的作用方式。在哺乳动物,相对缺氧负荷的主要转录反应就是通过缺氧诱导因子来完成调节的。这些都表明 HIFs 在肿瘤的发展中发挥着重要的作用。

研究发现, HIF-1 α 在癌组织中的表达明显高于正常组织,这说明 HIF-1 α 在膀胱尿路上皮癌中确实存在表达升高。但是在肿瘤分级、分期和年龄以及初发和复发之间却并没有发现差异。这与 Ioachim 等^[9]的研究报道相类似。而 Ord 等^[10]在对高级别膀胱尿路上皮癌的研究中也观察到 HIF-1 α 与分级、分期和淋巴结没有关联。另一方面,也有研究表明, HIF-1 α 和血管发生标记物在预后和预测膀胱癌中起着重要的作用^[11]。这可能是由于我们现存的资料不足,单个研究单位的病例存在选择性偏倚,而且入组病例数量相对较少等因素导致无法真实反映 HIF-1 α 在膀胱尿路上皮癌中的情况。大量临床研究则是解决这个问题的最佳方法。

本次研究 Livin 和 HIF-1 α 在本院既往膀胱尿路上皮癌患者中的表达变化。虽然研究结果显示

膀胱尿路上皮癌组织中 Livin 和 HIF-1 α 表达水平均明显高于正常组织,但是 Livin 和 HIF-1 α 之间却不存在相关性。他们在肿瘤的发生、发展过程中是共同起着抑制凋亡,促肿瘤的作用,还是相互之间存在一定的竞争拮抗作用? 这还有待进一步的深入研究。在复发病例中, Livin 蛋白的表达明显升高,高于初发患者。说明 Livin 是检测膀胱尿路上皮癌预后的潜在指标。而 HIF-1 α 在复发患者中的表达与初发病例相比,虽然阳性率增高,但是却无显著差异。但是这并不能否定 HIF-1 α 在膀胱尿路上皮癌的复发过程中也起着积极作用。也许其可作为肿瘤复发诊断的辅助指标。

[参考文献]

- 1 蒋蕾, 李向新, 白玲, 等. Livin 在口腔鳞癌浸润前沿中的表达及临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(6): 1398-1400.
- 2 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231.
- 3 Liu C, Wu X, Luo C, et al. Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell via a mechanism involving caspase 3[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 63.
- 4 Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J]. FEBS Lett, 2001, 495: 56-60.
- 5 Ka H, Hunt J S. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas[J]. Am J Pathol, 2003, 163: 413-422.
- 6 Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer[J]. Ann Oncol, 2003, 14: 85-90.
- 7 Abd-Elrahman I, Hershko K, Neuman T, et al. The inhibitor of apoptosis protein Livin (ML-IAP) plays a dual role in tumorigenicity[J]. Cancer Res, 2009, 69: 5475-5480.
- 8 Bertout J A, Patel S A, Simon M C. The impact of O₂ availability on human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8: 967-975.
- 9 Ioachim E, Michael M, Salmas M, et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α expression in bladder cancer and their associations with other angiogenesis-related proteins[J]. Urol Int, 2006, 77: 255-263.
- 10 Ord J J, Agrawal S, Thamboo T P, et al. An investigation into the prognostic significance of necrosis and hypoxia in high grade and invasive bladder cancer[J]. J Urol, 2007, 178: 677-682.
- 11 Theodoropoulos V E, Lazaris A C h, Sofras F, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer[J]. Eur Urol, 2004, 46: 200-208.

(收稿日期: 2012-05-06)