

Livin 和 PTEN 在卵巢子宫内膜异位症癌变组织中的表达和相关性研究*

刘星娅, 王红静[△], 徐盼, 陈静, 潘海英, 刘亚

四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨 Livin、PTEN 蛋白在卵巢子宫内膜异位症癌变组织中的表达及其相关性。方法 采用免疫组织化学 EliVision 法检测 19 例卵巢子宫内膜异位症癌变组织、30 例卵巢子宫内膜异位症组织和 30 例卵巢良性肿瘤组织中 Livin 及 PTEN 蛋白的表达。结果 Livin 在卵巢子宫内膜异位症癌变组织中的阳性表达率(68%)高于卵巢子宫内膜异位症(36%)和卵巢良性肿瘤(13%)($P < 0.05$), Livin 阳性表达率与卵巢子宫内膜异位症癌变患者年龄、临床分期、分级、组织学类型和淋巴结转移均无关($P > 0.05$); PTEN 在卵巢子宫内膜异位症癌变组织中的阳性表达率(16%)低于卵巢子宫内膜异位症(65%)和卵巢良性肿瘤(80%)($P < 0.01$), PTEN 阳性表达率与卵巢子宫内膜异位症癌变患者年龄、临床分期、分级、组织学类型和淋巴结转移均无关($P > 0.05$); 卵巢子宫内膜异位症癌变组织中 Livin 与 PTEN 表达呈负相关($r = -0.559, P = 0.001$)。结论 Livin 表达上调和 PTEN 表达缺失与卵巢子宫内膜异位症癌变的发生、发展有关。

【关键词】 卵巢子宫内膜异位症癌变 凋亡抑制基因 Livin PTEN 相关性 免疫组织化学

Expressions of Livin and PTEN in Cancerous Tissues of Ovary Endometriosis LIU Xing-ya, WANG Hong-jing[△], XU Pan, CHEN Jing, PAN Hai-ying, LIU Ya. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: whjcdx@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of Livin and phosphate and tension homology deleted on chromosome ten (PTEN) protein in the cancerous tissues of ovary endometriosis. **Methods** Immunohistochemistry EliVision was used to examine the expressions of Livin and PETN protein in 19 samples of ovary endometriosis cancerous tissues, 30 samples of ovary endometriosis tissues and 30 samples of ovarian benign tumor tissues. **Results** The positive expression rate of Livin in ovary endometriosis cancerous tissues (68%) was obviously higher than that in ovary endometriosis tissues (36%) and benign tumor tissues (13%)($P < 0.05$). The positive expression rate of PTEN in ovary endometriosis cancerous tissues (16%) was obviously lower than that in ovary endometriosis tissues (65%) and benign tumor tissues (80%)($P < 0.01$). There was no correlations between positive expressions of Livin and age, clinical stage, grading, histological type and lymphatic metastasis of ovary endometriosis cancer ($P > 0.05$), the same result was also found for PTEN. Livin and PTEN expression presented an obviously negative correlation in ovary endometriosis cancer ($r = -0.559, P = 0.001$). **Conclusion** Up-regulation of Livin expression and down-regulation of PTEN may be involved in the occurrence and development of ovary endometriosis cancerization.

【Key words】 Ovary endometriosis cancerization Apoptosis inhibitor gene Livin PTEN Correlation Immunohistochemistry

卵巢子宫内膜异位症(EMS)是常见的妇科疾病,目前发病率呈逐年上升趋势,EMS大多表现为良性过程,但也具有恶变潜能,如进行性生长、浸润性生长、雌激素依赖性生长、复发和转移等。自20世纪提出EMS恶变的观点以来,其临床意义引起广泛的关注。EMS发生恶变的部位广泛,但最多

发生在卵巢。研究表明,凋亡与增殖失衡是恶性肿瘤形成的重要机制之一。近年发现,Livin是凋亡抑制因子蛋白(IAP)家族的新成员,可能作用于抑癌基因并抑制其活性,阻断肿瘤细胞凋亡,促进其不断增殖。第10号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(PTEN)是迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,其抑癌作用可能是通过促进细胞凋亡来实现的^[1]。因此,我们推测 Livin 及 PTEN 在卵巢 EMS 癌变中也具有相似的作用。目

* 四川省科技厅项目(No. 2012SZ0022)资助

[△] 通信作者, E-mail: whjcdx@163.com

前国内外有关 Livin、PTEN 蛋白在卵巢 EMS 癌变组织表达情况的研究很少,本研究拟通过免疫组织化学方法检测 Livin、PTEN 蛋白在卵巢良性肿瘤、卵巢 EMS、卵巢 EMS 癌变组织中的表达,以探讨它们在卵巢 EMS 癌变中所起的作用。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选择 2005 年 1 月至 2014 年 4 月在四川大学华西第二医院收治的 19 例卵巢 EMS 癌变手术切除的石蜡标本作为实验组,选取同期手术的 30 例卵巢 EMS 患者和 30 例卵巢良性肿瘤患者的石蜡标本作为对照组。所有病例均经病理检查确诊,术前均未做化疗、放疗、激素等治疗。

19 例卵巢 EMS 癌变患者,年龄 37~57 岁,平均 47 岁,其中 ≤ 45 岁 11 例, > 45 岁 8 例。病理分期(按照国际妇产科联盟 FIGO, 2006 年) I 期 12 例(其中 I A 期 7 例, I C 期 5 例), II 期 4 例(II A2 期 2 例, II B 期 2 例), III 期 3 例(III A 期 1 例, III C 期 2 例)。淋巴结转移 2 例。病理组织类型内膜样腺癌 11 例(58%),透明细胞癌 6 例(32%),其他类型 2 例(10%)。术后随访 16 例患者均存活,失访 3 例,失访率 18.7%,随访截止日期 2015 年 6 月 19 日。

1.2 试剂与方法

石蜡标本均连续切片,制成 $4 \mu\text{m}$ 厚切片,采取免疫组化 EliVision 法检测 Livin 及 PTEN 表达。兔抗人 Livin 多克隆抗体购自 Abcam 生物工程公司(工作浓度 1:400)。鼠抗人 PTEN 单克隆抗体购自 Abcam 生物工程公司(工作浓度 1:400)。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。免疫组织化学 EliVision 试剂盒购自 Abcam 生物工程公司。

1.3 结果判断

Livin、PTEN 阳性反应为淡黄至棕黄色颗粒,每例标本随机选取 10 个高倍镜视野,根据阳性细胞在全部组织细胞中所占比例判定。阳性细胞数占全部组织细胞数比例 $< 10\%$ 判断为(-),阳性细胞数占全部组织细胞数比例为 $10\% \sim 50\%$ 判断为(+),阳性细胞数占全部组织细胞数比例 $> 50\%$ 判断为(++),以(+)及(++)作为显色阳性^[2]。

1.4 统计学方法

组间比较采用 χ^2 检验, Livin 和 PTEN 的相关性采用 Spearman 等级相关分析, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 三组不同的卵巢组织中 Livin、PTEN 的表达

结果见图 1、图 2、表 1。Livin 阳性颗粒主要定位于细胞浆, PTEN 阳性颗粒定位于细胞浆及细胞核。卵巢 EMS 癌变组、卵巢 EMS 组和卵巢良性肿

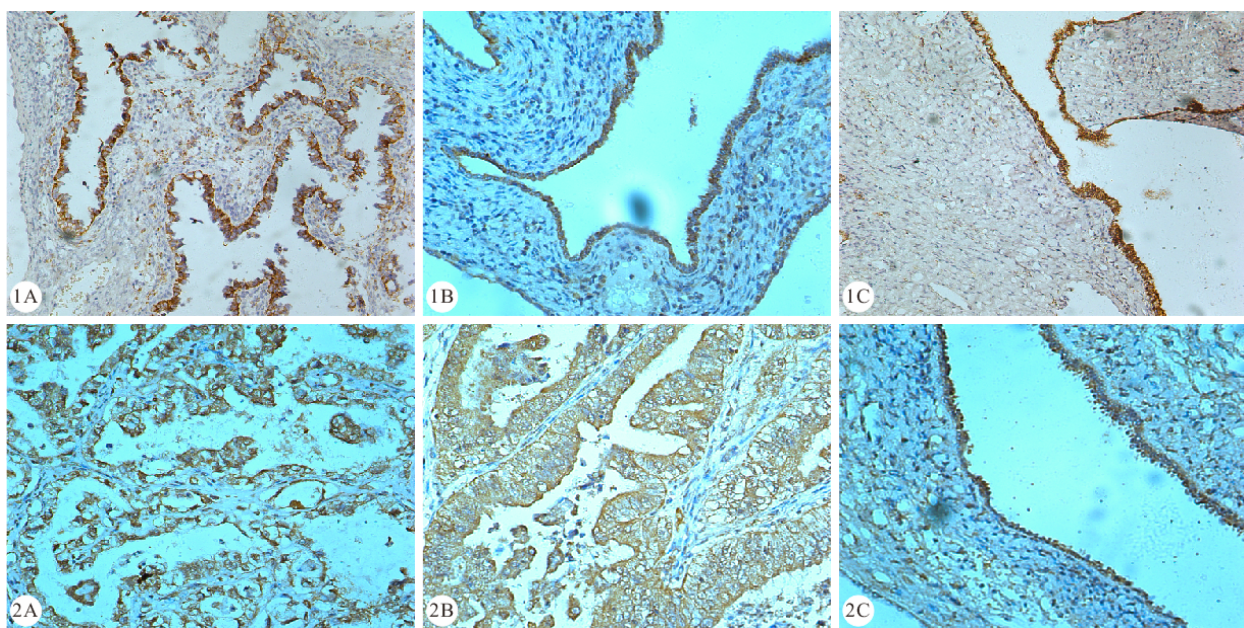


图 1 三组不同的卵巢组织中 Livin 的表达。EliVision $\times 400$

图 2 三组不同的卵巢组织中 PTEN 的表达。EliVision $\times 400$

Fig 1 Livin's positive expression in different ovarian tissues. EliVision $\times 400$

Fig 2 PTEN's positive expression in different ovarian tissues. EliVision $\times 400$

A: Ovary EMS canceration; B: Ovary EMS; C: Ovary benign tumor

表 1 不同卵巢组织中 Livin 和 PTEN 蛋白表达的比较

Table 1 Livin and PTEN protein's expression comparison in different ovarian tissues

Pathological type	n	Livin positive expression/case (%)	PTEN positive expression/case (%)
Benign ovarian tumor	30	4 (13)	24 (80)
Ovary EMS	30	11 (37)	13 (43)
Ovary EMS canceration	19	13 (68)	3 (16)
χ^2		12.98	20.22
P		<0.005	<0.01

瘤组 Livin 的阳性表达率分别为 68%、37% 和 13%，卵巢 EMS 癌变组高于卵巢 EMS 组和卵巢良性肿瘤组 (P 均 < 0.05)，卵巢 EMS 组与卵巢良性肿瘤组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。卵巢 EMS 癌变组、卵巢 EMS 组和卵巢良性肿瘤组

表 2 卵巢 EMS 癌变中 Livin 蛋白及 PTEN 蛋白表达与临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between expressions of Livin protein and PTEN protein and clinicopathologic features in ovary EMS canceration

Clinical expression	n	Livin/case			Positive expression/%	P	PTEN/case			Positive expression/%	P
		-	+	++			-	+	++		
Age						>0.05					>0.05
≤45 yr.	11	4	3	4	63.6		9	2	0	18.1	
>45 yr.	8	2	3	3	75.0		7	1	0	12.5	
Stage						>0.05					>0.05
I	12	5	4	3	58.3		9	3	0	25.0	
II	4	1	1	2	75.0		4	0	0	0	
III	3	0	2	1	100		3	0	0	0	
Lymphatic metastasis						>0.05					>0.05
Yes	1	0	1	0	100		1	0	0	0	
No	18	6	6	6	66.7		15	3	0	16.7	

3 讨论

Livin 是 IAP 家族中的新成员,于 2000 年由不同的研究者在人基因组库中,搜索 IAP 家族的同源序列时筛选克隆得出^[3-6]。Livin 存在于胚胎组织中,在正常成人的大多数终末组织中(除胎盘)低表达或不表达,但是 Livin 在多数恶性肿瘤中呈高表达,如乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、前列腺癌、白血病、淋巴瘤、食管癌及肺癌等^[7-9],由此提示 Livin 可能和其它凋亡抑制蛋白一样,通过抑制细胞凋亡而参与了肿瘤的发生、发展。因 Livin 在肿瘤组织中特异高表达的特性,许多学者将其运用于恶性肿瘤的治疗研究中,如泌尿系统、消化系统、呼吸系统、宫颈癌、卵巢上皮性癌等^[10-12],通过抑制 Livin 基因的表达,可使其恶性肿瘤细胞对放疗、化疗敏感性大大增加,从而提高了患者的生存率。目前卵巢 EMS 恶变的报道逐年增多,在生物学行为方面卵巢 EMS 与恶性肿瘤的生物学行为类似,而卵巢良性肿瘤无恶性肿瘤的生物学行为,故本研究选择卵巢良性肿瘤而非正常卵巢组织作为对照组。本研究结果显示,Livin 在卵巢 EMS 癌变组中

PTEN 的阳性表达率分别为 16%、43% 和 80%,卵巢 EMS 癌变组低于卵巢 EMS 组和卵巢良性肿瘤组 (P 均 < 0.01),卵巢 EMS 组与卵巢良性肿瘤组之间差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 卵巢 EMS 癌变组临床病理特征与 Livin、PTEN 表达的关系

结果见表 2。卵巢 EMS 癌变组织在不同的年龄、分期和淋巴结转移组间 Livin 和 PTEN 的阳性表达率比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

2.3 卵巢 EMS 癌变组 Livin 与 PTEN 蛋白表达的相关性

Livin 与 PTEN 蛋白在卵巢 EMS 癌变组的表达呈负相关 ($r = -0.559, P = 0.001$)。

的表达强度明显高于卵巢良性肿瘤组和卵巢 EMS 组,同时,Livin 在卵巢良性肿瘤、卵巢 EMS 组织、卵巢 EMS 癌变中的表达逐渐递增。这一结果提示在卵巢 EMS 癌变的演变过程中 Livin 可能通过抑制卵巢上皮细胞及卵巢 EMS 细胞正常凋亡,从而促进卵巢 EMS 癌变的发生、发展,Livin 在此过程中发挥了重要作用。同时研究结果显示 Livin 在卵巢 EMS 组表达有强于卵巢良性肿瘤组的趋势,故考虑虽卵巢 EMS 与卵巢良性肿瘤同属良性病变,但卵巢 EMS 与恶性肿瘤的生物学行为类似,卵巢 EMS 比卵巢良性肿瘤更易恶变。

抑癌基因 *PTEN* 是迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,其在细胞生长、增殖等多个过程起关键性负向调节作用。*PTEN* 基因主要通过调控信号传导和细胞周期从而抑制细胞生长、细胞黏附、浸润与迁移,促进细胞凋亡和调节血管生成。*PTEN* 表达的减少或杂合性缺失 (LOH) 的发生有望成为子宫内膜样癌及 EMS 恶变早期诊断的有效指标^[13]。研究表明,*PTEN* 是人类肿瘤中恶变率最高的基因之一,在子宫内膜样腺癌中突变率最高^[14],*PTEN* 基因功能的突变或丧失与子宫内膜病

变的发生与发展有着密切的联系。本研究结果显示,PTEN 在卵巢 EMS 癌变组中的阳性率明显低于卵巢良性肿瘤组和卵巢 EMS 组,同时,PTEN 在卵巢良性肿瘤、卵巢 EMS 组织、卵巢 EMS 癌变组织中的表达逐渐递减,提示 PTEN 蛋白表达下降或缺失,可能导致异位的子宫内膜细胞抗凋亡能力增强,从而促进卵巢 EMS 癌变的发生。因 PTEN 在卵巢良性肿瘤中的表达强于卵巢 EMS 组织,推断卵巢 EMS 比卵巢良性肿瘤更易恶变的原因可能系 PTEN 蛋白表达下降或缺失。

本研究结果显示,Livin 与 PTEN 蛋白在卵巢 EMS 癌变组织中的表达呈负相关($r = -0.559$, $P = 0.001$),提示二者在肿瘤的发展中发挥协同效应,Livin 促进卵巢子宫内膜异位症癌变的发生可能通过抑制 PTEN 活性实现。Livin 与 PTEN 均参与细胞周期调控和细胞凋亡,两者的作用环节一致,但生物学效应恰恰相反,增加 Livin 蛋白的表达,减少 PTEN 的表达从而减少细胞凋亡,使肿瘤细胞存活率上升,促进肿瘤细胞生长^[15-16]。目前 Livin 表达的调控机制尚不清楚,但 GAUTAM 等^[17]在对髓样白血病的初步论证了 Survivin 表达的调控机制,发现 PI3K 途径在 mRNA 水平和蛋白水平均对 Survivin 有调控作用。鉴于 Livin 与 Survivin 同属于 IAP 家族,两者在结构上具有高度同源性,在细胞内分布具有相似性,并且 Livin 的抗凋亡作用强于 Survivin,由此推测两者在细胞生长、凋亡过程中其机制为:在正常生理情况下 PTEN 抑制 PI3K/Akt 通路,从而抑制 Livin 的表达;当组织器官发生恶变时,PTEN 表达下调或缺失,其对 PI3K/Akt 通路的抑制作用减弱,Livin 表达上调,启动细胞周期,促进细胞分裂,抑制凋亡。

本研究结果还显示,Livin、PTEN 阳性表达率与卵巢 EMS 癌变患者年龄、临床分期、淋巴结转移无关,可能与样本量较少有关,有待扩大样本量进一步研究。

综上所述,卵巢 EMS 组织恶变时 Livin 表达上调,PTEN 表达下调或缺失,由此推断卵巢 EMS 癌变的发生可能系 Livin 通过抑制 PTEN 活性而实现。我们设想通过对 Livin 和 PTEN 蛋白的联合检测可以筛查卵巢 EMS 癌变高危人群,有利于早期诊断,判断肿瘤的恶性程度,为肿瘤的诊断及治疗提供新的靶点^[18],随着研究的不断深入,针对 Livin 的基因治疗有望为肿瘤的诊断与治疗开辟一条新途径。

参 考 文 献

[1] CHU EC, TARNAWSKI AS. PTEN regulatory unetions in

tumor suppression and cell biology. *Med Sei Monit*,2004,10 (10):235-241.

- [2] GOK M, ROZENDAAL L, BERKHOF J, *et al*. Cytology history preceding cervical cancer diagnosis:a regional analysis of 286 cases. *Br J Cancer*,2011,104(4):685-692.
- [3] KASOF GM, GOL-NES BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *Biol Chin*,2001,276(5):3238-3246.
- [4] LIN JH,DG G,HUANG Q,*et al*. KIAP,a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Conllnun*,2000,279(3):820-831.
- [5] VUCIC D,STENNICKE HR,PISABARRO MT,*et al*. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanorms. *Curt Biol*,2000,10(21):1359-1366.
- [6] ASHHAB Y,ALIAN A,POUIAEK A,*et al*. Two splicing variants of anew in 4hibitor of apoprosis gene with different bbgial pmpertiesan d tissued is tribution pattern. *FEBS Lett*,2001,495(1/2):56-60.
- [7] YAGIHASHI A, OHMURA T, ASANUMA K, *et al*. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta*,2005,362(122):125-130.
- [8] GANGAR SC, KOUL A. Histochemical ultrastructural, and biochemical evidences for Azadirachta indica-induced apoptosis in benzo (a) pyrene-induced murine forestomach tumors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*,2008,27(9):219-226.
- [9] LIU B,HAN M,WEN JK,*et al*. Livin/MLIAP as a new target for cancer treatment. *Cancer Lett*,2007,250(12):168-175.
- [10] YAN B, KONG M, CHEN S, *et al*. VEGF stimulation enhances livin protein synthesis through mTOR signaling. *J Cell Biochem*,2010,111(5):1114-1124.
- [11] EL ALI Z, GRZYMISBLAWSKI M, MAJEWSKI P, *et al*. Anti-livin antibodies; novel markers of malignant gastrointestinal cancers. *Pol Arch Med Wewn*,2010,120(1/2):26-29.
- [12] 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. *Clin Cancer Res*,2005,11(3):1000-1009.
- [13] 马佳佳, 陈必良. 抑癌基因 PTEN 与子宫内膜异位症癌变的相关性. *国外医学妇产科学分册*,2004,31(5):308-310.
- [14] TANG JM, HE QY, GUO RX, *et al*. Phosphorylated AKT over expression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer*,2006,51(2):181-191.
- [15] 李曙光, 李伟, 王明伟, 等. 宫颈癌中 Livin 和 PTEN 蛋白表达与预后的相关性研究. *南通大学学报*,2013,33(6):494-497.
- [16] 王玲玲. 凋亡抑制基因 Livin 在卵巢上皮性癌组织中的表达及其与 PTEN 的相关性研究. *蚌埠医学院学报*,2011,36(3):223-226.
- [17] GAUTAM A, LI ZR, BEPLER G. RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene*,2003,22(14):2135-2142.
- [18] LIU B,HAN M,WEN JK,*et al*. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment. *Cancer Lett*,2007,250(12):168-175.

(2015-08-31 收稿,2016-02-05 修回)

编辑 余琳