

Livin、Beclin-1 在子宫内膜癌中的表达及临床意义

秦 燕¹, 王肖力²

(1. 潍坊医学院妇产科教研室, 山东 潍坊 261000; 2. 潍坊医学院附属潍坊益都中心医院, 山东 青州 262500)

摘要: [目的] 探讨 Livin、Beclin-1 在子宫内膜癌中的表达及其临床意义。[方法] 选择各类子宫内膜组织蜡块 143 例。以免疫组化法检测 Livin 和 Beclin-1 的表达并分析其与组织学分级、临床分期以及淋巴结转移等的关系。[结果] Livin 和 Beclin-1 表达在不同子宫内膜癌组织中差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Livin 和 Beclin-1 表达与组织学分级和肌层浸润有关 ($P < 0.05$), 而与 FIGO 分期和淋巴结转移无关 ($P > 0.05$)。[结论] Livin 和 Beclin-1 在子宫内膜癌发生和演化及浸润转移中可能起重要作用。

关键词: 子宫内膜癌; Livin; Beclin-1; 免疫组织化学

中图分类号: R711.74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)02-0128-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.02.B011

Expression of Livin, Beclin-1 in Endometrial Carcinoma and Its Clinical Significance

QIN Yan¹, WANG Xiao-li²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Weifang Medical University, Weifang 261000, China;

2. Weifang Medical University Affiliated Weifang Yidu Central Hospital, Qingzhou 262500, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of Livin and Beclin-1 in endometrial cancer and their clinical significance. [Methods] A total of 143 cases of paraffin-embedded endometrial tissues were enrolled. Immunohistochemical method was used to detect expression of Livin and Beclin-1. The relationships between expression of Livin, Beclin-1 and clinical pathological factors were analyzed. [Results] Livin and Beclin-1 expression in endometrial carcinoma tissues were significantly different ($P < 0.05$). Expressions of Livin and Beclin-1 related to histological grade and myometrial invasion ($P < 0.05$), but didn't relate to FIGO stage and lymph node metastasis ($P > 0.05$). [Conclusion] Livin and Beclin-1 might play important roles in the carcinogenesis and progress of endometrial cancer.

Subject words: endometrial carcinoma; Livin; Beclin-1; immunohistochemistry

子宫内膜癌是一种常见的妇科恶性肿瘤之一, 其发病机制至今尚不明确, 其发生发展是一种分子事件, 现已证实是有多种癌基因参与的复杂过程。Livin 是新近发现的凋亡抑制蛋白(IAPs)家族成员之一, 高表达于多种肿瘤组织中, 能够反映肿瘤的恶性程度, 与预后相关性密切。Beclin-1 是一种自噬基因, 高表达于人正常组织, 参与自噬的细胞保护作用, 并调节凋亡过程, 抑制肿瘤形成是通过提高自噬活性。本研究采用免疫组化法检测子宫内膜癌中 Livin、Beclin-1 的表达及其与肿瘤侵袭转移的关系,

为子宫内膜癌的预后判断及指导临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取益都中心医院 2010 年 1 月至 2013 年 1 月年门诊刮宫及住院手术切除标本共 143 例。其中正常子宫内膜 20 例; 子宫内膜增生症 53 例(单纯性增生 20 例, 非典型增生 33 例); 子宫内膜腺癌 70 例, 所有患者术前均未接受放、化疗及任何药物治疗, 年龄 45~75 岁, 中位年龄 55.2 岁。无淋巴结转移组 48 例, 有淋巴结转移组 22 例; 根据 2000 年国际妇产科联盟(FIGO)手术—病理分期: I~II 期 50 例、III~IV

通讯作者: 王肖力, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 学士; 潍坊市益都中心医院妇产科, 山东省青州市玲珑山南路 4138 号(262500); E-mail: xlwang125@sohu.com

收稿日期: 2014-07-03; **修回日期:** 2014-09-10

期 20 例;组织学分级:低分化腺癌 11 例,中分化腺癌 23 例,高分化腺癌 36 例;无肌层浸润及浅肌层浸润($\leq 1/2$)19 例、深肌层浸润($>1/2$)51 例。术后均经病理证实(所有 HE 组织切片均经两位资深病理医师复诊)。

1.2 试剂与方法

兔抗人 Livin、Beclin-1 多克隆抗体、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物公司。本实验用已知的子宫内膜癌切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。所有标本均经 10% 中性福尔马林溶液固定、石蜡包埋、4 μ m 切片,进行 HE 染色及免疫组织化学法染色。有关流程参考 SP9000 试剂盒以及 DAB 显色试剂盒有关说明书进行。

1.3 结果判定

Livin、Beclin-1 阳性物质为棕黄色,主要表达于细胞质。由两位病理医师进行双盲阅片,按阳性细胞所占百分比打分:阳性细胞数小于 10% 为 1 分;10%~50% 为 2 分;51%~80% 为 3 分; $>80\%$ 为 4 分;按染色强度打分:不着色(0 分)、黄色(1 分)、棕黄色(2 分)、棕褐色(3 分),两者相乘得出总分值(0~12 分),0~1 分为阴性(-),2~6 分为弱阳性(+),7~12 分

为阳性(++)。

1.4 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件包进行处理,分析 Livin、Beclin-1 在不同子宫内膜组织中表达的差异性,应用非参数检验进行。采用 χ^2 检验评价 Livin、Beclin-1 与临床病理特征的关系。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Livin 和 Beclin-1 在子宫内膜组织中的表达

正常子宫内膜、单纯增生型内膜、非典型增生内膜、子宫内膜癌组织中 Livin 表达的阳性率分别为 15.0%、30.0%、63.6% 和 77.1%;Beclin-1 表达的阳性率分别为 90.0%、75.0%、51.5% 和 41.4%,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。Livin、Beclin-1 阳性物质为棕黄色,主要表达于细胞质(Table 1、Figure 1)。

2.2 Livin、Beclin-1 与子宫内膜癌临床病理特征的关系

Livin 和 Beclin-1 在子宫内膜癌中的表达均与组织学分级、肌层浸润有关($P<0.05$),与 FIGO 分期、淋巴结转移无关($P>0.05$)(Table 2)。

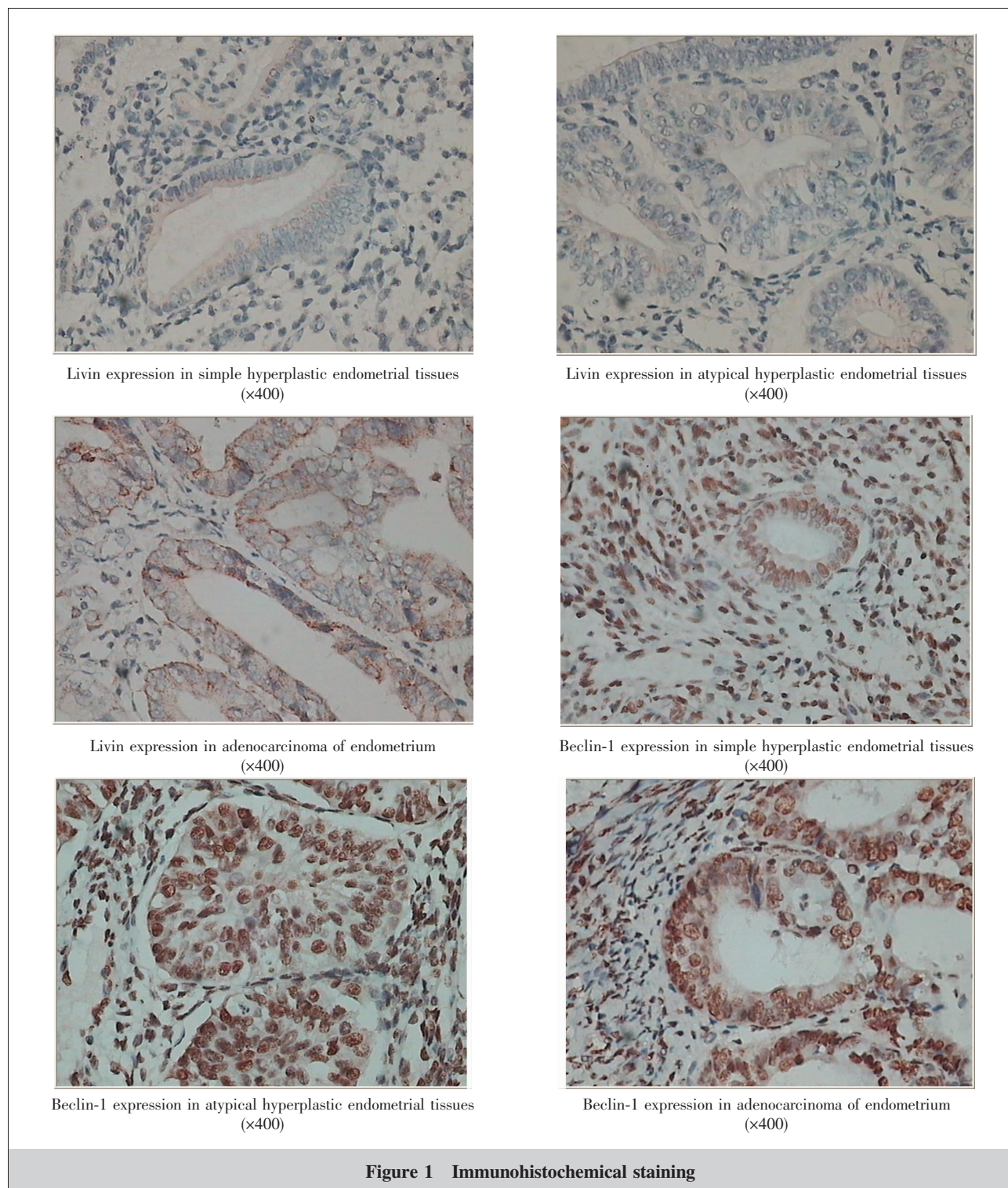
Table 1 Expression of Livin, Beclin-1 protein in a variety of endometrial tissues

Groups	N	Livin			Beclin-1		
		Negative	Positive	Positive rate(%)	Negative	Positive	Positive rate(%)
Normal endometrial tissues	20	17	3	15.0*	2	18	90.0 [#]
Simple hyperplastic endometrial tissues	20	14	6	30.0**	5	15	75.0 ^{##}
Atypical hyperplastic endometrial tissues	33	12	21	63.6***	16	17	51.5 ^{###}
Adenocarcinoma of endometrium	70	16	54	77.1	41	29	41.4

Note: Compared with adenocarcinoma of endometrium, *: $\chi^2=30.97$, $P=0.000$; **: $\chi^2=19.909$, $P=0.000$; ***: $\chi^2=4.248$, $P=0.039$; #: $\chi^2=23.323$, $P=0.000$; ##: $\chi^2=13.663$, $P=0.000$; ###: $\chi^2=4.921$, $P=0.027$.

Table 2 The relationships between Livin, Beclin-1 and clinicopathological factors in patients with endometrial carcinoma

Factors	N	Livin			Beclin-1		
		Positive(%)	χ^2	P	Positive(%)	χ^2	P
FIGO stage							
I ~ II	50	30(60.0)	1.400	0.196	25(50.0)	0.583	0.428
III ~ IV	20	15(75.0)			5(25.0)		
Histological grade							
High-differentiated	36	23(63.9)	7.385	0.025	20(55.6)	6.556	0.038
Middle-differentiated	23	20(87.2)			7(30.4)		
Low-differentiated	11	10(91.0)			2(18.2)		
Lymph node metastasis							
No	48	35(72.9)	1.547	0.213	17(35.4)	3.131	0.132
Yes	22	19(86.3)			12(54.5)		
Myometrial invasion							
$\leq 1/2$	19	5(25.0)	6.254	0.012	15(83.3)	8.303	0.004
$>1/2$	51	33(64.7)			19(37.3)		



3 讨 论

子宫内膜癌的发病率呈逐年上升的趋势,虽然其早期预后好,但晚期预后较差,IV期患者5年生存

率较低,准确判断预后极其重要。肿瘤的发生,一方面是细胞无限增殖,另一方面是细胞凋亡不足所致,因此积极寻找子宫内膜癌的病理机制、肿瘤侵袭转移的因素为临床诊治提供依据有重要意义。

IAPs 家族是由 Crook 等人于 1993 年在杆状病毒中发现并分离出来的一类新的内源性抗凋亡蛋白。到目前为止,在人类组织中一共发现了 8 个 IAP 家族成员,IAPs 家族最近发现的一种细胞凋亡抑制蛋白是 Livin。*Livin* 基因位于 20q13.3,含有一个 BIR 结构域和 RING 指结构域^[1],全长 46kb,包含 6 个内含子及 7 个外显子,其转录产物有 2 个 mRNA 亚型,即 *Livin-α* 和 *Livin-β*,两者结构很相像。BIR 结构域是结合 caspase 的重要部位;RING 是泛素化的靶位点,对细胞内的分布有重要作用。*Livin* 的抗凋亡活性最强,其发挥抑制细胞凋亡的作用是通过与各种凋亡刺激因子结合,直接或间接阻断外源性途径和内源性途径实现的,以凋亡受体及线粒体为基础^[2,3],*Livin* 主要表达于细胞质,同时也表达于细胞核中。*Livin* 在发育的胎儿组织、肿瘤组织中高表达,与临床预后相关^[4],常使细胞凋亡受到抑制,而在正常组织中表达很低,提示 *Livin* 的过高表达可能是肿瘤细胞在体内维持生长的重要因素。研究发现,在肺癌荷瘤裸鼠模型上注入病毒介导的 *Livin*-shRNA 可以抑制肿瘤生长,Cyclin D1 蛋白表达水平显著下降^[5],*Livin* 表达抑制诱导了细胞周期 G₀/G₁ 期停滞。王光伟等^[6]研究报道显示,*Livin* 几乎不表达在良性子宫内膜组织中,少量表达在子宫内膜不典型增生组织中,较高表达在子宫内膜癌组织中,在子宫内膜癌组织中的表达与正常内膜组织相比强度明显增高,并且在子宫内膜癌不同组织学分级中的表达具有显著性差异,在不同分期中无统计学意义,且与淋巴结转移情况无关,与本研究相似。许多研究都证实了 *Livin* 与多种肿瘤的生长及恶性程度均有关,而且表达的高低与肿瘤的治疗效果、预后都有关系^[7-9]。*Livin* 的表达水平可能预示着子宫内膜癌的高侵袭性和不良预后,检测 *Livin* 表达可能对子宫内膜癌的临床诊断治疗、预后评估有一定参考价值。抑制 *Livin* 的表达将有可能成为肿瘤靶基因治疗的理想靶点。

自噬的调节是一种极其复杂的过程,而且需要多种分子的参与,是一种存在于真核细胞当中并且有别于细胞坏死和凋亡的生命现象。*Beclin-1* 是一种抑癌基因,位于人类染色体 17q21 上,是启动自噬的必需基因,主要控制自噬体的形成与成熟,其表达产物为一种分子量为 60kD 的蛋白质,在正常组织中高表达^[10],参与自噬的细胞保护作用,而且

调节凋亡过程,为介导自噬的关键成分^[11]。对细胞内大分子物质及损伤细胞器的降解过程起重要作用,在细胞稳定的维持中起重要作用,是一种不同于坏死和凋亡的生命现象,对细胞的生长、增殖及肿瘤的发生起一定的作用,其降解产物重新参与能力代谢过程。*Beclin-1* 在自噬溶酶体的降解过程中起抑制肿瘤形成的作用,与自噬密切相关的抑癌基因。*Beclin-1* 可与 III 型磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K) Vps34 形成复合物,在调节自噬过程中该复合物起重要作用^[12]。已有研究发现,自噬功能紊乱与肿瘤的形成和生长密切相关^[13,14]。王赞宏等^[15]通过成功建造 *Beclin-1* 自噬基因真核表达载体 PcDNA3.1 (+)-*Beclin1*, 而且转染 HeLa 细胞的研究中发现 *Beclin-1* 在 HeLa 细胞中表达可使肿瘤细胞的增殖受抑制,促进细胞的自噬与凋亡过程。研究分析发现 *Beclin-1* 的表达与预后之间的关系,在弥漫大 B 细胞淋巴瘤及胰腺癌患者中高表达组的预后较好^[16,17]。李宝秀等^[18]在 *Beclin-1* 与 IIIb 期结肠癌 5 年生存率的关系研究中发现结肠癌中 *Beclin-1* 高表达者 5 年生存率相对较高,同样证实了恶性肿瘤组织中 *Beclin-1* 的高表达是一个预后好的分子标志物。结合本研究结果,我们推测 *Beclin-1* 蛋白低表达可能与子宫内膜癌发生发展、病理分级、侵袭转移及患者预后存在密切关系,但其确切关系尚需进一步临床随访资料进行明确。

本文通过研究发现,在四组中,*Livin* 表达的阳性率分别为 15.0%、30.0%、63.6%、77.1%;*Beclin-1* 表达的阳性率分别为 90.0%、75.0%、51.5%、41.4%,差异均具有统计学意义。同时,正常的子宫内膜组织有关 *Livin* 以及 *Beclin-1* 蛋白的表达与非典型增生以及子宫内膜癌相比,差异均显著。而与单纯性增生比较,差异不显著。表明两者在子宫内膜发生癌变的过程之中呈现动态变化。因此推测,可利于诊断癌前病变发展趋势,对两者进行联合检测,亦可当作此类癌症检测指标。*Livin* 和肿瘤组织学分级有一定联系,随着肿瘤分化程度的增高,则 *Livin* 表达的越低,符合杨侠等^[19]报道的结果。此外还表明,*Livin*、*Beclin-1* 与组织学分级、肌层浸润有关,与 FIGO 分期无关。在 22 例肿瘤转移患者中,*Livin* 阳性者 19 例,*Beclin-1* 阳性者 12 例;在 48 例无转移患者中 *Livin* 阳性者 35 例,*Beclin-1* 阳性者 17 例。*Livin*、*Beclin-1* 与淋巴结转移均无关,两者在子宫内膜癌

发生、发展过程中起一定作用。对两者实施联合检测分析,可针对性反映出子宫内膜癌变细胞侵袭和转移的情况。

综上所述,Livin 在子宫内膜癌发生和演化及浸润转移中可能起着重要的作用。而子宫内膜癌组织及正常子宫内膜组织中 Beclin-1 蛋白表达的阳性率差异则显示自噬活性的下降在子宫内膜癌的发生、发展中可能起着重要的作用,对两者进行联合检查具有重要意义。

参考文献:

- [1] Ka H, Hunt JS. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(2): 413-422.
- [2] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2007, 250(2): 168-176.
- [3] Kasof GM, Comes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3238-3246.
- [4] Choi J, Hwang YK, Sung KW. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood [J]. *Blood*, 2007, 109(2): 471-477.
- [5] Chen YS, Li HR, Miao Y, et al. Local injection of lentivirus-delivered livinshRNA suppresses lung adenocarcinoma growth by inducing a G0/G1 phase cell cycle arrest [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(8): 796-805.
- [6] Wang GW, Yang Q, Liu XF, et al. The expression of Livin in benign and malignant endometrial tissue [J]. *Journal of China Medical University*, 2007, 36(2): 179-190. [王光伟, 杨清, 刘晓菲, 等. 凋亡抑制蛋白 Livin 在良性及恶性子宫内膜组织中的表达 [J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(2): 179-190.]
- [7] Chen L, Ren GS, Li F, et al. Expression of livin and vascular endothelial growth factor in different clinical stages of human esophageal carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(37): 5749-5754.
- [8] Augello C, Caruso L, Maggioni M, et al. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 125-134.
- [9] Wang TS, Ding QQ, Guo RH, et al. Expression of livin in gastric cancer and induction of apoptosis in SGC-7901 cells by shRNA mediated silencing of livin gene [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(5): 333-338.
- [10] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The beclin-1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571-580.
- [11] Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the beclin-1 interactome [J]. *EMBO J*, 2010, 29(3): 515-516.
- [12] Yue ZY, Zhong Y. From a global view to focused examination: understanding cellular function of lipid kinase VPS34-Beclin-1 complex in autophagy [J]. *J Mol Cell Biol*, 2010, 2(6): 305-307.
- [13] Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR [J]. *Nature*, 2010, 465(7300): 942-946.
- [14] Bhutia SK, Dash R, Das SK, et al. Mechanism of autophagy to apoptosis switch triggered in prostate cancer cells by antitumor cytokine melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin-24 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3667-3676.
- [15] Wang ZH, Li L, Peng ZL, et al. Beclin1 gene on human cervical carcinoma HeLa effect of cell growth in vitro and in vivo [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2011, 33(11): 804-809. [王赞宏, 李莉, 彭芝兰, 等. 自噬基因 Beclin1 对宫颈癌 HeLa 细胞生长影响的体内外研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(11): 804-809.]
- [16] Huang JJ, Zhu YJ, Lin TY, et al. Beclin 1 expression predicts favorable clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP [J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(10): 1459-1466.
- [17] Kim HS, Lee SH, Do SI, et al. Clinicopathologic correlation of beclin-1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Pathol Res Pract*, 2011, 207(4): 247-252.
- [18] Li BX, Zhang XS. Beclin1 on the inhibition of tumor cell proliferation on improvement of stage B colon cancer prognosis analysis [J]. *Chinese Journal of Clinicians*, 2010, 4(4): 395-401. [李宝秀, 张晓实. Beclin1 对抑制肿瘤细胞增殖改善ⅢB期结肠癌预后的分析 [J]. *中华临床医师杂志*, 2010, 4(4): 395-401.]
- [19] Yang X, Zhang J, Chai CY, et al. The expression of Livin protein in primary bronchogenic carcinoma and its clinical significance [J]. *Chinese Journal of Clinicians*, 2012, 6(9): 82-84. [杨侠, 张洁, 柴春艳, 等. Livin 蛋白在原发性支气管肺癌中的表达及其临床意义 [J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(9): 82-84.]