

Livin、Caspase-8 在人骨肉瘤组织中的表达及临床意义

付文娟¹ 常 娜¹ 王 帅² 李艳艳² 朱晓菊³ 佟 玲² 刘素艳²

1.河北省唐山市人民医院肿瘤内科放化五,河北唐山 063000;2.河北省唐山市人民医院药剂科,河北唐山 063000;3.河北省乐亭县中医院妇产科,河北乐亭 063000

[摘要] 目的 探讨 Livin、Caspase-8 在人骨肉瘤组织中的表达及临床意义。方法 选择 2008 年 3 月~2015 年 3 月于唐山市人民医院就诊的骨肉瘤患者 64 例为观察组,取其骨肉瘤组织作为生物样本;选择同期就诊的非骨肉瘤患者 64 例为对照组,取其正常骨组织作为生物样本。按照骨肉瘤诊治规范对相关生物样本进行分析,分析观察组所有样本的肿瘤位置、肿瘤大小、病理分型、Enncking 分期等;检测两组样本中 Livin 和 Caspase-8 的表达水平;分析其与肿瘤生物学行为的相关性。结果 Livin 在观察组骨组织阳性表达率显著高于对照组 ($P < 0.05$),Caspase-8 在观察组骨组织的阳性表达率显著低于对照组 ($P < 0.05$);性别、年龄、肿瘤位置和病理分型与 Livin 和 Caspase-8 的表达水平无关 ($P > 0.05$),而肿瘤的大小、Enncking 分期和患者最终生存时间与 Livin 和 Caspase-8 的表达相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Livin 蛋白表达和 Caspase-8 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.392, P < 0.05$)。结论 骨肉瘤组织中 Livin 的表达量显著升高,而 Caspase-8 的表达量显著降低,且 Livin 和 Caspase-8 的表达与骨肉瘤的肿瘤大小、Enncking 分期及患者最终生存时间有关。

[关键词] 骨肉瘤;Livin 蛋白;Caspase-8 蛋白;临床意义

[中图分类号] R738.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-4721(2016)10(c)-0033-04

Expression and clinical significance of Livin and Caspase-8 in tissues of human osteosarcoma

FU Wenjuan¹ CHANG Na¹ WANG Shuai² LI Yanyan² ZHU Xiaoju³ TONG Ling² LIU Suyan²

1.The Fifth Chemoradiotherapy District of Department of Internal Medicine-Oncology, Tangshan People's Hospital, Hebei Province, Tangshan 063000, China; 2.Department of Pharmacy, Hebei Province, Tangshan People's Hospital, Hebei Province, Tangshan 063000, China; 3.Department of Obstetrics and Gynecology, Chinese Medicine Hospital of Leting County, Hebei Province, Leting 063600, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of Livin and Caspase-8 in human osteosarcoma. **Methods** The osteosarcoma cancer tissues of 64 patients with osteosarcoma cancer who were examined and treated in Tangshan People's Hospital from March 2008 to March 2015 were collected as the observation group. Another 64 patients with non-osteosarcoma cancer were selected as the control group. The relevant biological samples were analyzed in accordance with the standard of diagnosis and treatment of osteosarcoma cancer. The tumor location, tumor size, pathological type, Enncking stage and so on of the observation group were analyzed and observed. The expression level of Caspase-8 and Livin was detected in the two groups and its correlation with tumor biological behavior was analyzed. **Results** The positive expression rate of Livin in the observation group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The positive expression rate of Caspase-8 in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). Sex, age, tumor location and pathological type were independent with the expression levels of Livin and Caspase-8 ($P > 0.05$), however, tumor size, Enncking stage and the final survival time were correlated with the expression of Caspase-8 and Livin protein ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of Livin protein was negatively correlated with the expression of Caspase-8 protein ($r = -0.392, P < 0.05$). **Conclusion** In osteosarcoma tissue, the expression of Livin is increased significantly and caspase-8 was significantly reduced. The expression level

of Livin and Caspase-8 is related to the tumor size, Enncking stage and the final survival time of osteosarcoma.

[Key words] Osteosarcoma; Livin protein; Caspase-8 protein; Clinical significance

[基金项目] 河北省唐山市科学技术研究与发展指导计划项目(101302114c)。

[作者简介] 付文娟(1973-),女,硕士,副主任医师;研究方向:肿瘤内科。

在我国,骨肉瘤的发病对象主要为青少年儿童,且近年来的发病率有逐年上升的趋势^[1],对社会稳定和青少年生命健康和安全造成了严重的影响^[2]。目前,临床对于骨肉瘤的发病机制研究尚不完全清晰,诸多学者认为^[3],细胞正常凋亡受阻可能直接参与了骨肉瘤的发生、发展^[4]。Livin 是最新发现的人凋亡抑制蛋白家族中的一种蛋白因子,半胱天冬酶(Caspase)则是一类在进化上非常保守的蛋白酶类分子^[5]。其中,Caspase-8 参与到细胞凋亡过程中^[6]。本研究旨在探讨 Livin、Caspase-8 在人骨肉瘤组织中的表达及临床意义,从而揭示骨肉瘤发病可能的生物学机制,为临床生物分子药物寻找有效靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2008 年 3 月~2015 年 3 月于唐山市人民医院(以下简称“我院”)就诊的骨肉瘤患者 64 例为观察组,取其骨肉瘤组织作为生物样本,其中男 38 例,女 26 例,平均年龄(19.8 ± 2.6)岁。选择同期我院就诊的非骨肉瘤患者 64 例为对照组,取其正常骨组织作为生物样本,其中男 38 例,女 26 例;平均(20.2 ± 2.2)岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经我院医学伦理委员会批准。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准:①符合临床诊断标准,其中骨肉瘤诊断符合全国软组织和骨肿瘤病理诊断学术研讨会论文汇编上制定的标准,且经影像学检查和病理组织学检查确诊。②心智健全,有自主判断能力。③术前未接受放化疗等治疗。④知情同意并签署知情同意书。排除标准:患有器质性疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病、精神性疾病,以及无法配合治疗者。

1.3 方法

1.3.1 两组骨组织组织中 Livin 和 Caspase-8 的检测方法 本研究中使用工作液浓度为 1:100 的 Livin 鼠抗人单克隆抗体,购于 Abcam 公司;工作液浓度 1:50 的 Caspase-8 兔抗人多克隆抗体购于 ABclonal 公司;PBS 粉剂和免疫组化 MaxVision™/AP 试剂盒购于杭州艾康生物技术有限公司。采用标准方法制作石蜡切片,即福尔马林固定和石蜡包埋,设定切片厚度为 4 μm 。采用免疫组化 MaxVision™/AP 法行 Livin 和 Caspase-8 检测,按照产品说明书步骤严格执行,阴性对照为 PBS 代替一抗,对照为对照组受试者的正常骨组织切片。

1.3.2 结果判定标准 细胞中可见棕黄色细小颗粒,可认定为阳性染色的 Livin 蛋白或 Caspase-8 蛋白。在

400 倍显微镜下记录每张切片的 10 个视野,观察每个视野中 100 个细胞的染色状况。判定标准要根据阳性染色的细胞数目和细胞染色强度进行判定,阳性染色细胞占比的评定标准:阳性染色的细胞占比 $<10\%$,记为 1 分;阳性染色的细胞数目占比为 $10\% \sim 50\%$,记为 2 分;阳性染色的细胞占比 $>50\% \sim 75\%$,记为 3 分;阳性染色的细胞占比 $>75\%$,记为 4 分。细胞染色强度的评定如下:染色强度为淡黄色,记为 1 分;染色强度为棕黄色,记为 2 分;染色强度为棕褐色,记为 3 分。将阳性染色的细胞数目得分与细胞染色强度得分相乘,得出最终结果。总分 ≥ 3 分为阳性,总分 <3 分为阴性。同时分析 Livin 蛋白表达和 Caspase-8 蛋白表达之间的相关性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,计量资料数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性采用 Pearson 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组骨组织组织中 Livin、Caspase-8 的表达情况

Livin 蛋白多在细胞核内呈阳性,极少在细胞浆内呈阳性。Caspase-8 蛋白多在细胞浆内呈阳性,极少在细胞核内呈阳性,见图 1。观察组骨组织中 Livin 阳性表达率(66.94%)明显高于对照组(10.94%)($P < 0.05$),而观察组骨组织中 Caspase-8 的阳性表达率(12.90%)明显低于对照组(90.63%)($P < 0.01$)。见表 1、2。

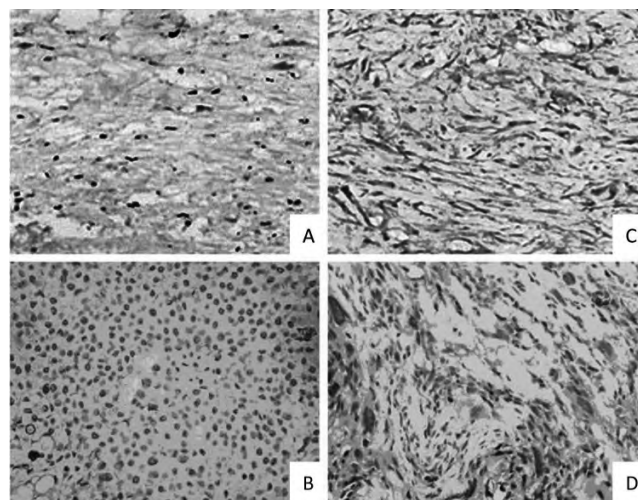


图 A: Livin 在正常骨组织中的表达; 图 B: Livin 在骨肉瘤组织中的表达; 图 C: Caspase-8 在正常骨组织中的表达; 图 D: Caspase-8 在骨肉瘤组织中的表达

图 1 Livin 和 Caspase-8 在两组骨组织中的表达(AP, 200 $\times$)

表 1 Livin 在两组骨癌组织中的表达(例)

组别	Livin		χ^2 值	P 值
	+	-		
观察组(n=64)	43	21	53.041	0.000
对照组(n=64)	7	57		

表 2 Caspase-8 在两组骨癌组织中的表达(例)

组别	Caspase-8		χ^2 值	P 值
	+	-		
观察组(n=64)	8	56	129.393	0.000
对照组(n=64)	58	6		

2.2 不同病理因素的骨肉瘤组织中两种蛋白的表达差异
性别、年龄、肿瘤位置和病理分型与 Livin 和 Caspase-8 的表达水平无关($P > 0.05$),而肿瘤的大小、Enncking 分期和患者最终生存时间与 Livin 和

Caspase-8 的表达相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中, Livin 在直径 ≥ 8 mm 的组织切片、B~ 期的组织切片和生存时间 < 5 年的患者的组织切片中的表达量更高($P < 0.05$),分别为 86.21%、88.46%和 90.24%; Caspase-8 在直径 ≥ 8 mm 的组织切片、B~ 期的组织切片和生存时间 < 5 年的患者的组织切片中的表达量更低($P < 0.05$),分别为 3.85%、5.71%和 4.89%。见表 3。

2.3 Caspase-8 蛋白和 Livin 蛋白表达在骨肉瘤组织中的相关性

在 64 例骨肉瘤患者的组织切片中,Livin 和 Caspase-8 同时呈阳性表达的患者仅有 2 例,而只有 Livin 阳性表达的患者为 41 例,只有 Caspase-8 阳性表达的患者为 6 例,余 15 例患者为阴性表达。相关性分析结果显示,Livin 蛋白表达与 Caspase-8 蛋白呈明显负相关性($r = -0.392, P < 0.05$)。见表 4。

表 3 不同病理因素骨肉瘤组织中两种蛋白的表达差异(例)

项目	例数	Livin			Caspase-8		
		阳性表达	χ^2 值	P 值	阳性表达	χ^2 值	P 值
性别			0.171	0.985		0.424	0.514
男性	38	24			5		
女性	26	29			3		
年龄			1.172	0.279		1.823	0.177
< 20 岁	27	17			3		
≥ 20 岁	37	26			5		
Enncking 分期			12.424	0.000		3.867	0.049
B~ A 期	38	20			7		
B~ 期	26	23			1		
肿瘤直径			6.753	0.024		7.342	0.016
< 8 mm	29	25			6		
≥ 8 mm	35	18			2		
病理分型			2.546	0.094		1.527	0.218
纤维母细胞型	14	8			1		
软骨母细胞型	13	8			1		
骨母细胞型	16	10			2		
其他	21	17			4		
肿瘤位置			1.472	0.210		2.686	0.086
肱骨	12						
股骨	17	11			2		
胫腓骨	16	12			2		
其他	19	12			3		
存活时间			7.977	0.013		8.435	0.009
< 5 年	41	37			2		
≥ 5 年	23	6			6		

表 4 Caspase-8 蛋白和 Livin 蛋白在骨肉瘤组织中的相关性分析

Caspase-8	Livin		r 值	P 值
	+	-		
+	2	6	-0.392	0.015
-	41	15		

3 讨论

骨肉瘤是常发于青少年中的一种恶性肿瘤,其恶

变程度高,发病初期症状不明显,出现明显症状患者就医时往往已经处于中晚期。对于骨肉瘤的治疗目前临床上仍然以手术和放化疗为主。研究认为^[8-9],骨肉瘤的出现与细胞凋亡系统功能紊乱有关^[10-12]。细胞凋亡过程受抑制,导致肿瘤细胞无限增殖和转移。因此,寻找与细胞凋亡系统相关的基因靶点作为未来骨肉瘤的治疗靶点是战胜和治愈骨肉瘤的关键。

结果显示,骨肉瘤组织 Livin 表达水平明显偏高,且显著高于正常骨痂组织,且 Livin 的阳性表达还与骨肉瘤的肿瘤大小、Enncking 分期及患者最终生存时间有关。在直径较大、Enncking 分期处于 B~ 期和最终生存时间短于 5 年的患者体内 Livin 阳性表达率显著升高。进一步研究 Caspase-8 蛋白后发现,骨肉瘤组织细胞内的 Caspase-8 表达水平明显低于正常骨痂组织。且 Caspase-8 表达与肿瘤细胞病理因素之间的关系与 Livin 蛋白与肿瘤细胞病理因素之间的关系一致。Caspase-8 蛋白在直径较大、Enncking 分期处于 B~ 期和最终生存时间少于 5 年的患者体内的阳性表达显著下降。进一步分析 Caspase-8 蛋白和 Livin 蛋白之间的相关性可以发现,骨肉瘤组织中 Caspase-8 蛋白的表达与 Livin 蛋白呈负相关。

由此说明,Livin 对细胞凋亡具有抑制作用^[13-14],也有可能可以抑制 Caspase-8 蛋白的表达。Caspase-8 蛋白介导的细胞外凋亡途径中,Caspase-8 蛋白活化 Procaspase-3 时需要去除 prodomain,之后才能启动核心蛋白酶 Caspase-3 的凋亡作用。Livin 蛋白可能可以抑制 prodomain 的去除,从而抑制之后的一系列凋亡过程^[15-20]。根据研究结果,Livin 蛋白和 Caspase-8 蛋白具有作为治疗骨肉瘤基因靶点的潜力。

综上所述,Livin 在骨肉瘤组织中表达量显著升高,而 Caspase-8 在骨肉瘤组织中表达量显著降低,且与骨肉瘤的肿瘤的大小、Enncking 分期和患者最终生存时间有关。

【参考文献】

- [1] Morrow JJ,Khanna C. Osteosarcoma genetics and epigenetics: emerging biology and candidate therapies [J]. Crit Rev Oncog, 2015,20(3-4):173-197.
- [2] Moriarity BS, Otto GM, Rahrmann EP, et al. A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis [J]. Nat Genet, 2015,47(6):615-624.
- [3] 李旭,李岩,程世孝,等. Livin 基因增强骨肉瘤转化和顺铂耐药性的体外实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(8):673-677,696.
- [4] Liu F, Chang H, Xu W, et al. The effects of LivinshRNA on the response to cisplatin in HepG2 cells [J]. Oncol Lett, 2015,10(5):2957-2961.
- [5] Gurung P, Kanneganti TD. Novel Roles for Caspase-8 in IL-1 β and Inflammasome Regulation [J]. Am J Pathol, 2015, 185(1):17-25.
- [6] 祁伟祥,何爱娜,汤丽娜,等. 儿童骨肉瘤与青年骨肉瘤临床特点比较及预后影响因素分析[J]. 中国肿瘤临床, 2011,38(21):1330-1334.
- [7] 隋官杰,曲珍,罗含笑,等. 骨膜骨肉瘤病理组织学诊断体会[C]//全国软组织和骨肿瘤病理诊断学术研讨会论文汇编, 2004:121.
- [8] Huang S, Okamoto K, Yu C, et al. p62/Sequestosome-1 Up-regulation Promotes ABT -263 -induced Caspase -8 Aggregation/Activation on the Autophagosome [J]. J Biol Chem, 2013,288(47):33654-33666.
- [9] Basu-Roy U, Basilico C, Mansukhani A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma [J]. Cancer lett, 2013, 338(1):158-167.
- [10] 黄秀芳,原向伟. α 干扰素增强骨肉瘤细胞对依托泊苷敏感性的实验研究[J]. 中国医药导报, 2014,11(7):4-7,14.
- [11] 翟墨. 不含大剂量甲氨蝶呤新辅助化疗治疗骨肉瘤的效果观察[J]. 中国当代医药, 2015,22(35):52-54.
- [12] 叶建平,余飞,徐文玲等. 伽玛刀治疗骨肉瘤肺转移疗效分析[J]. 中国医药科学, 2011,01(17):21-22,27.
- [13] 江丽琴,周静,黄伟政,等. Livin、Beclin1 在上皮性卵巢癌中的表达及与肿瘤侵袭转移的关系[J]. 中国现代医生, 2014,52(23):135-137.
- [14] 黄伟强. 凋亡抑制蛋白 Livin 在结肠癌组织中的表达及与细胞增殖的关系[J]. 中国现代医生, 2014,52(12):85-87.
- [15] 张远贵,段冬,李攀登,等. 瘢痕疙瘩组织中 Livin、Smac、Caspase-3 的表达及其相关性[J]. 中国组织工程研究, 2016,20(11):1558-1563.
- [16] 张永奎,郝延科,陈义强,等. 人骨肉瘤组织钙网蛋白表达及其意义探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014,21(10):757-761.
- [17] 王璐,朱莹,陈昱静,等. Livin 与 Caspase-9 在皮肤鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2012,29(5):943-945.
- [18] 蔡玉亮,崔森,李占全,等. 慢性高原病患者骨髓造血细胞凋亡及 caspase-8 和 caspase-9 表达研究[J]. 中华血液学杂志, 2011,32(11):762-765.
- [19] 魏百合,叶芳,李国霞,等. 凋亡抑制基因在急性白血病及骨髓增生异常综合征中的研究[J]. 中国当代医药, 2014, 21(9):15-18,23.
- [20] 王新成,曲国蕃,徐永军,等. Podoplanin 在恶性肿瘤中表达的研究进展[J]. 中国医药导报, 2016,13(14):41-44.

(收稿日期:2016-07-16 本文编辑:任 念)