基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0575-03

凋亡相关基因 livin 及 cyclin B1 在乳腺癌中的表达及意义

王勇军
(中南大学湘雅二医院输血科,长沙 410011)

【摘 要】目的:探讨 livin 在乳腺癌组织中的表达情况及其与细胞周期素 B1(cyclin B1)的关系;方法:应用免疫组织化学方法检测 Livin 和 cyclin B1 在 57 例乳腺癌和 10 例正常乳腺组织中的表达情况,并分析 livin 和 cyclin B1 与临床病理学特征的关系。结果:Livin 和 cyclin B1 蛋白在乳腺癌阳性表达率分别为 77.2% (44/57)和 68.4% (39/57),两者的表达呈正相关性($\gamma=0.701$, $P<0.001$);Livin 的表达与淋巴结转移、年龄、临床分期、肿瘤大小未见显著相关性,cyclin B1 的表达与淋巴结转移有显著相关性,而与年龄、临床分期、肿瘤大小未见明显相关性。结论:Livin 和 cyclin B1 在乳腺癌组织中表达上调,提示其可能在乳腺癌发生、发展中起重要促进作用,cyclin B1 和淋巴结转移的密切关系表明它的高表达可能反映患者较差的预后。

【关键词】乳腺癌;细胞周期素 B1;livin
【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-05

The overexpression of cyclin B1 and livin in breast carcinoma and its clinical significance

WANG Yong-jun
(*Department of Blood Transfusion, Second Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of livin and its correlation with cyclin B1 in breast cancer. *Methods*: The expressions of livin and cyclin B1 in breast cancer paraffin embedded specimens were detected by immunohistochemical technique.The relationship between livin and cyclin B1 and clinicopathological characteristics was analyzed. *Results*: The rates of positive expression of livin and cyclin B1 protein in breast cancer were 77.2% and 68.4%, respectively, and the correlation was psitive ($\gamma=0.701$, $P<0.001$).The significant correlation of cyclin B1 with lymphnode metastasis expression was found in breast cancer. *Conclusions*: Our findings suggest that upregulated expression of livin and cyclin B1 proteins may play an important role in the development of breast cancer.The relationship between cyclin B1 and lymphnode metastasis expression indicates that higher cyclin B1 expression may imply patient's poor prognosis.

【Key words】Breast carcinoma; Cyclin B1; livin

近年来,乳腺癌发病率及检出率正逐年上升,已居女性恶性肿瘤之前列。目前研究表明肿瘤的发生、发展与抑制细胞凋亡基因、细胞周期的失控等因素密切相关。livin 基因是抑制细胞凋亡基因[1],其作用途径主要通过与 Caspase 家族相互作用。Cyclin B1 是一类与细胞周期有关的蛋白质,它参与细胞周期的调节。本研究应用免疫组织化学技术检测乳腺癌中 livin 蛋白的表达情况并探讨其与 cyclin B1 的表达的关系,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 资料来源

乳腺癌组织标本均取自中南大学湘雅二医院病理科 2006 年 6 月 ~ 2007 年 6 月手术标本,标本离体后立即切块固定,乳腺癌全部病例行根治手术,术前均未接受过放疗或化疗。所有病例均为女性,年龄 23 ~ 78 岁,平均(49.88 ± 11.26)岁。肿瘤大小(2.74 ± 0.89) cm。所有病例均经 HE 切片证实,非特殊类型 57 例按国际抗癌联盟的 TNM 分期法分期,1 期 13 例,2 期 20 例,3 期 13 例,4 期 11 例。正常乳腺组织 10 例病理标本亦均来自中南大学湘雅二医院病理手术标本。

1.2 方法

免疫组化染色,livin 和 cyclin B1 单克隆抗体购自武汉博士德生物技术公司,工作浓度分别为 1∶100 和 1∶50。组织蜡块 4 μm 连续切片,68℃烤片过夜,脱蜡和水化后,切片浸入 3%H_2O_2 5 min, 用 0.01 mol/L pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液进行微波抗原修复,98℃ ~ 100℃10 min,室温冷却后 PBS 冲洗,小牛血清封闭 15 min,滴加一抗 4℃过夜后,PBS 浸泡冲洗 3 次,每次 2 min,滴加二抗,37℃室温孵育 20 min,PBS 冲洗后,滴加 SABC,37℃室温孵育 20 min,PBS 冲洗后 DAB 显色,苏

作者介绍:王勇军(1970-),男,主管技师,
研究方向:乳腺癌早期的相关因子检测。

木精复染。设 0.01 mol/L PBS 代替一抗作为阴性对照，省略一抗为空白对照。

1.3　判断标准

显微镜下观察，免疫组化结果呈棕黄色，Livin 和 cyclin B1 主要表达于胞质，也可表达于胞核。结果判断标准，采用半定量的方法，光镜下进行分析，在排除非特性染色前提下，以黄色、棕黄色、棕褐色为阳性。记分方法：按切片中细胞染色的深浅评分，0 分无着色；1 分呈浅黄色；2 分呈棕黄色；3 分呈棕褐色。按切片中的阳性细胞比例评分，每例随机观察 5 个视野，每个视野 100 个细胞，计数 500 个细胞中染色阳性的细胞数，0 分显色细胞数≤5%；1 分显色细胞数占 5%～25%；2 分显色细胞数占 25%～50%；3 分显色细胞数占 50%～75%；4 分显色细胞数占 75%～100%。每例标本染色积分为 2 种记分的乘积，若乘积≤1 为阴性，>1 为阳性。结果判定采用双盲法，由 2 位有丰富临床经验的病理医师进行。

1.4　统计学分析

SPSS11.0 统计软件进行统计分析，livin 和 cyclin B1 的表达与临床病理指标间的关系采用卡方检验，Spearman 相关分析二者的相关性。

2　结　果

2.1　乳腺癌中 Livin 和 cyclin B1 的表达

Livin 免疫组化阳性物主要定位于肿瘤细胞的细胞质中，少数定位于细胞核中，为粗细不一的棕黄色颗粒。cyclin B1 细胞质和细胞核内均可出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性（图 1~4）。Livin 阳性表达率为 77.2%（44/57），cyclin B1 的阳性表达率为 68.4%（39/57）。

2.2　乳腺癌组织中 Livin 和 cyclin B1 表达的关系

由表 1 可知 57 例标本中 Livin 蛋白与 cyclin B1 蛋白的表达有明显的正相关性。

2.3　Livin 和 cyclin B1 在乳腺癌中的表达与临床病理参数的关系

Livin 的表达与淋巴结转移、年龄、临床分期、肿瘤大小未见显著相关性。cyclin B1 的表达与淋巴结转移有显著相关性，而与年龄、临床分期、肿瘤大小未见明显相关性，见表 2。

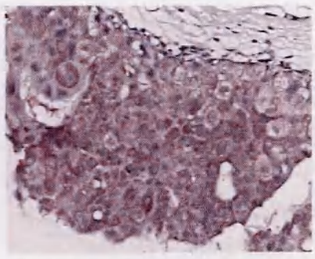


图 1　Livin 在乳腺癌组织中强表达，细胞质表达为主(×200)

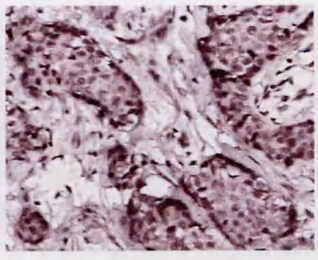


图 2　Livin 在乳腺癌组织中表达，细胞质细胞核均有表达(×200)

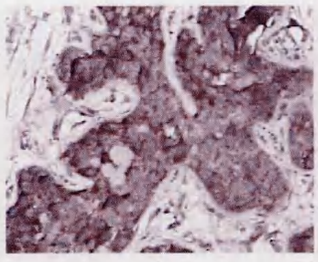


图 3　cyclin B1 在乳腺癌组织中表达，细胞质表达为主(×200)

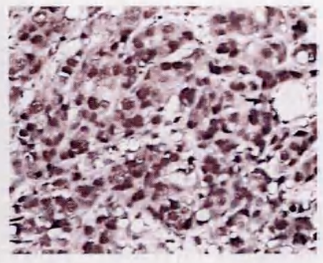


图 4　cyclin B1 在乳腺癌组织中细胞质和细胞核均有强表达 (×200)

表 1　Livin 和 cyclin B1 在乳腺癌中的表达关系

	cyclin B1(+)	cyclin B1(−)
Livin(+)	35	9
Livin(−)	4	9

$\chi^2=11.04, P<0.005$；$\gamma=0.701, P<0.001$

表 2　乳腺癌 Livin 和 cyclin B1 蛋白表达与临床病理特征

项　目		例数	Livin 表达阳性		P	cyclin-B1 表达阳性		P
			例数	%		例数	%	
年　龄	≥45	37	29	78.3	>0.05	26	70.2	>0.05
	<45	20	15	75.5		13	65.5	
淋巴结转移	有	31	25	80.6	>0.05	24	77.4	<0.05
	无	26	19	73.1		15	57.7	
临床分期	1～2	33	24	72.7	>0.05	21	63.6	>0.05
	3～4	24	20	83.3		18	75.0	
肿瘤大小	<2 cm	27	20	74.1	>0.05	18	66.7	>0.05
	2～5 cm	16	13	81.3		11	68.8	
	>5 cm	14	11	78.6		10	71.4	

3 讨 论

乳腺癌的发生、发展是一个多基因、多阶段的演进过程,涉及多种原癌基因的激活和抑癌基因的失活。Livin 是(Inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族是重要的凋亡抑制因子。Livin 抑制细胞凋亡作用主要通过其(Baculoviral IAP repeat,BIR)区与半胱氨酸蛋白水解酶(Caspases 家族)结合,抑制其活性,与 Caspases 蛋白家族中的多个成员相互作用,尤其是 Caspases-3/-7 和 Caspases-9 的活性,阻止 Caspase 蛋白在细胞凋亡时执行蛋白切除功能,达到阻断凋亡受体及以线粒体为基础的凋亡途径而起作用[2]。本实验结果表明 livin 蛋白在乳腺癌组织中大量表达,而正常乳腺组织 10 例中无一例有 livin 阳性表达,与 Singh 的报道一致[3]。Livin 在乳腺癌中表达上调,提示在乳腺癌发生、发展中起重要作用,可作为判断乳腺癌预后新的分子标记物[4],为乳腺癌基因治疗提供新靶点[5]。

肿瘤除与细胞凋亡有关外,细胞周期的失控在肿瘤的发生中亦有着重要作用[6]。cyclin B1 是控制细胞进入 G_2/M 期的关键因子。作为 M 期周期蛋白,Cyclin B1 出现于 S 期,主要合成于 S/G_2 期,在 G_2/M 期达到最高,并转运到核中,在有丝分裂后期迅速被泛素化降解。cyclin B1 与细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 1 (Cyclin dependent kinase 1,CDK1) 结合,发挥生物作用,使细胞进入分裂期[7,8]。正常 G_2/M 期检查点具有阻止恶性转化的功能,通过 p53 调节细胞内 Cyclin B1 水平和活性,来调节检查点功能。研究表明,细胞周期调节紊乱是导致肿瘤形成的原因之一。细胞周期调控机制的破坏可导致基因组不稳定性增加,有助于细胞失控生长和癌肿形成。因为 cyclin B1 能直接影响有丝分裂,它的过度表达可导致细胞生长失控、恶性转化、最终形成肿瘤[9,10]且有助于肿瘤的侵蚀性生长。本实验中,乳腺癌组织 cyclin B1 水平较正常乳腺组织明显升高,Livin 阳性表达的乳腺癌组织 cyclin B1 较 Livin 阴性表达的乳腺癌组织高,说明 cyclin B1 过度表达时,可导致细胞生长失控、增殖、发展乃至恶性转化、最终形成肿瘤。

我们通过实验证明了凋亡抑制蛋白 livin 以及 cyclin B1 在乳腺癌组织中表达上调,提示其可能在乳腺癌发生、发展中起重要促进作用,cyclin B1 淋巴结转移的密切关系,表明它的高表达客观地提示 cyclin B1 在乳腺癌肿的临床病例意义[11]。对过度表达 cyclin B1[12,13]和(或)livin[14]的肿瘤细胞进行干扰,降低 cyclin B1 和(或)livin 后对肿瘤有明显阻断作用,这些发现表明,cyclin B1 的下调尤其联合其他分子靶点,如 livin,很可能是抗肿瘤干预的新的策略,尤其是对 cyclin B1 和(或)livin 表达水平较高的肿瘤,是一颇具应用前景的、针对性强的抗癌分子靶点。

参 考 文 献

[1] Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3238-3246.

[2] Gzzaniga 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(1): 85-90.

[3] Singh M, Michelle J, Bleile B S, et al. Analysis of survivin expression in a spectrum of benign to malignant lesions of the breast[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004, 12(4): 296-304.

[4] Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, et al. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer[J]. Clin Chim Acta, 2005, 362(1-2): 125-130.

[5] Zhang H D, Yuan S J, Chen H P, et al. Indution effects of antisense phosphorothioate oligodeoxynucle-otides of Livin mRNA on apoptosis in MCF27 cells[J]. Chin J Clin Pharm Ther, 2004, 9(12): 1353-1356.

[6] Yuan J, Krmer A, Matthess Y, et al. Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo[J]. Oncogene, 2006, 25(12): 1753-1762.

[7] Toyosh I F, Tan I E, Sh I N, et al. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase[J]. Nature, 2001, 410(6825): 215-220.

[8] Jakman M, Lindon C, Nigg E A, et al. Active cyclin B1-CDK1 first appears on centrosomes in prophase[J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(2): 143-148.

[9] Yang J, Song H, Walsh S, et al. Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3604-3609.

[10] Sarafan-Vasseur N, Lamy A, Bourguignon J, et al. Overexpression of B-type cyclins alters chromosomal segregation[J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2051-2057.

[11] Suzuki T, Urano T, Miki Y, et al. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor[J]. Cancer Sci, 2007, 98(5): 644-651.

[12] Kuo P L, Hsu Y L, Cho C Y. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer[J]. cells Mol Cancer Ther, 2006, 5(12): 3209-3221.

[13] Barascu A, Besson P, Le Floch O, et al. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(2): 196-208.

[14] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. et al. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML2I-AP/KIAP gene[J]. Oncogene, 2003, 22(51): 8330-8336.

(责任编辑:关蕴良)