

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.36.021

cIAP 与 Caspase-7 在子宫内膜腺癌组织中的表达及其与预后的关系研究

徐 燕¹,何 涛¹,袁红瑛^{2△}

(1. 河南科技大学临床医学院/河南科技大学第一附属医院,河南洛阳 471003;

2. 河南科技大学医学院微生物实验室,河南洛阳 471003)

[摘要] 目的 探索细胞凋亡抑制蛋白 cIAP 和凋亡蛋白 Caspase-7 在子宫内膜癌组织中的表达及与预后的关系。

方法 选取 2009~2010 年在河南科技大学第一附属医院行子宫内膜癌根治且术后病理证实为子宫内膜腺癌患者 55 例,统计发病时组织学分类、病理分期、淋巴结转移、年龄等参数,电话随访无瘤生存期及总生存期,取病理标本石蜡切片行免疫组化,观察 cIAP 与 Caspase-7 的表达,并分析其与各参数的关系。**结果** cIAP 与 Caspase-7 的表达水平与子宫内膜癌组织学分类、病理分期、淋巴结转移相关($P<0.05$),而与肌层浸润、年龄无关($P>0.05$)。cIAP 与 Caspase-7 阳性表达和阴性表达的患者总生存期之间差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 子宫内膜腺癌患者 cIAP 与 Caspase-7 的表达水平与肿瘤分级、总生存期具有相关性,或可作为子宫内膜腺癌预后检测指标。

[关键词] 子宫内膜肿瘤;腺癌;凋亡抑制蛋白质类;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 7;免疫组织化学

[中图分类号] R71

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)36-5107-03

The expression of cIAP and Caspase-7 in endometrial adenocarcinoma and its relationship with the prognosis

Xu Yan¹, He Tao¹, Yuan Hongying^{2△}

(1. Clinical Medicine College, Henan University of Science and Technology/the First

Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China;

2. Laboratory of Microbiology, Medical College of Henan University of Science and Technology, Henan 471003, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of cIAP and Caspase-7 in endometrial adenocarcinoma tissue and its relation with prognosis. **Methods** Fifty-five cases tissues of endometrial adenocarcinoma patients were detected by immunohistochemistry assay from the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology from 2009 to 2010. Histological classification, pathological stage, lymph node metastasis, age and other parameters were collected, the survival and overall survival of the tumor were followed up, immunohistochemistry was used to observe the expression of cIAP and Caspase-7 in paraffin sections of pathological specimens, and the relationship between them and the parameters were analyzed. **Results** The expression level of cIAP and Caspase-7 was related to the histological classification, pathological stage and lymph node metastasis of endometrial carcinoma ($P<0.05$), but it was not related with the age, muscular layer infiltration ($P>0.05$). There was significant difference between the positive expression and the negative expression of cIAP and Caspase-7 ($P<0.05$). **Conclusion** The expression level of cIAP and Caspase-7 in patients with endometrial carcinoma is correlated with tumor grade and overall survival, or can be used as a prognostic indicator for endometrial cancer.

[Key words] endometrial neoplasms; adenocarcinoma; inhibitor of apoptosis proteins; Caspase 7; immunohistochemistry

凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)是一类高度保守的内源性抗细胞凋亡因子家族,主要通过抑制凋亡因子 Caspase 家族的活性而抑制细胞凋亡。cIAP(包括 cIAP-1 和 cIAP-2)是 IAP 家族的重要成员之一,不仅具有 IAP 家族的一般化学结构,还有其特殊结构-胱冬肽酶募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)^[1],参与多个细胞凋亡信号通路的转导交互作用^[2],可直接抑制 Caspase-3、Caspase-7 和 Caspase-9 的活性,从而抑制细胞凋亡^[3],在肿瘤发生、发展及肿瘤耐药性形成过程中发挥重要作用。本研究采用免疫组化联合检测了 cIAP、Caspase-7 在子宫内膜腺癌组织中的表达,以期寻找子宫内膜癌新的分子治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集河南科技大学第一附属医院 2009~2010 年刮宫和手术切除的 55 例子宫内膜腺癌患者存档石蜡标本,根据组织学类型分为正常增殖期子宫内膜组织(12 例)、子宫内膜不典型增生组织(17 例)与子宫内膜腺癌组织(55

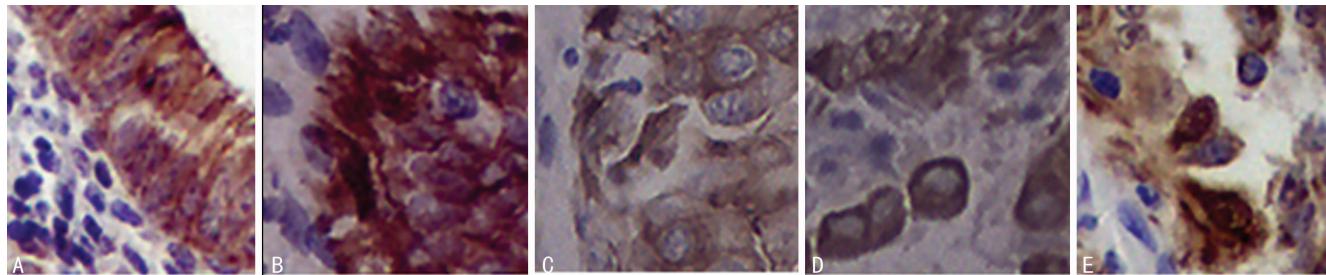
例)。临床分期按 FIGO(2009 年):I 期~II 期 37 例,III~IV 期 18 例;发生淋巴结转移 18 例,未发生转移 37 例。所有选取病例均无其他的恶性肿瘤,术前未进行放疗及化疗,术后均经过病理证实。通过查阅病例,术后门诊复查患者登记和电话随访的方法,统计患者手术方式、化疗方案及术后生存时间,截止日期为 2015 年 12 月 31 日。

1.2 方法 兔抗人多克隆 cIAP 抗体浓缩液(工作浓度 1:100),兔抗人多克隆 Caspase-7 抗体浓缩液(工作浓度 1:300),购于美国 Prosci 公司。免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色试剂均购于北京中山金桥生物技术有限公司。所有标本均为石蜡包埋的存档标本,连续切片 4 张,厚 4 μm 。采用免疫组化 SP 二步法,取已知切片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 cIAP 免疫组化阳性产物呈棕黄色细颗粒状,主要定位于肿瘤细胞细胞质中。Caspase-7 免疫组化阳性产物呈棕黄色细颗粒状,定位于肿瘤细胞细胞质中。根据其染色程

表1 cIAP、Caspase-7在各组织中的表达比较[n(%)]

组别	n	cIAP		χ^2	P	Caspase-7		χ^2	P
		阳性	阴性			阳性	阴性		
子宫内膜腺癌组织	55	43(78.2)	12(21.8)			20(36.3)	35(63.6)		
子宫内膜不典型增生组织	17	5(29.4)	12(70.6)	20.436	0.000	13(76.4)	4(23.5)	14.149	0.001
正常增殖期子宫内膜组织	12	3(25.0)	9(75.0)			10(83.3)	2(16.7)		



A: Caspase-7 在正常子宫内膜中的表达($\times 400$);B: Caspase-7 在不典型增生子宫内膜中的表达($\times 400$);C: cIAP 在高分化子宫内膜癌中的表达($\times 400$);D: cIAP 在中分化子宫内膜癌中的表达($\times 400$);E: cIAP 在低分化子宫内膜癌中表达($\times 400$)。

图1 Caspase-7、cIAP 在各组织中的表达

度与阳性的细胞数进行综合评分。阳性细胞计数:光镜下随机观察 10 个高倍视野,记录 10×100 个肿瘤细胞内阳性细胞数的百分比,无记 0 分,≤25% 记 1 分,≤50% 记 2 分,≤75% 记 3 分,>75% 记 4 分;着色强度:无色记 0 分,浅黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕褐色记 3 分;每例标本最后得分为二者相乘,0 分为阴性(-),1~2 分微弱阳性(+),3~4 分为阳性(++)>4 分为强阳性(++)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件,有序分类变量资料采用秩和检验,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,二者之间的相关性运用 Spearman 相关分析检验,术后生存时间采用 Log-rank 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组中 cIAP、Caspase-7 表达情况 cIAP 在各组中的表达比较差异有统计学意义($\chi^2 = 20.436, P < 0.05$)。cIAP 在子宫内膜腺癌组织的表达率 78.2% 高于正常增殖期子宫内膜组织 25.0%、子宫内膜不典型增生组织 29.4% ($\chi^2 = 12.947, 13.899, P < 0.05$), 正常增殖期子宫内膜组织和子宫内膜不典型增生组织比较差异无统计学意义($\chi^2 = 17.625, P > 0.05$)。Caspase-7 在各组中的表达比较差异有统计学意义($\chi^2 = 14.149, P < 0.05$)。Caspase-7 在子宫内膜腺癌组织的表达率 36.3% 低于正常增殖期子宫内膜组织 83.3%、子宫内膜不典型增生组织 76.4% ($\chi^2 = 8.798, 8.414, P < 0.05$), 正常增殖期子宫内膜组织和子宫内膜不典型增生组织比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.202, P > 0.05$)。见表 1。

2.2 cIAP、Caspase-7 表达与子宫内膜腺癌的临床生物学特征关系 随着肿瘤临床分期、病理分级的增高,cIAP 的阳性表达率明显升高,Caspase-7 的表达率明显降低。二者的表达与患者的年龄、肌层浸润深度无关($P > 0.05$)。见表 2、图 1。

表2 cIAP、Caspase-7 的表达与子宫内膜腺癌的临床生物学特性关系[n(%)]

生物学特征	n	cIAP			Caspase-7		
		阳性数	χ^2	P	阳性数	χ^2	P
组织学分类							
G ₁	10	5(50.0)			7(70.0)		

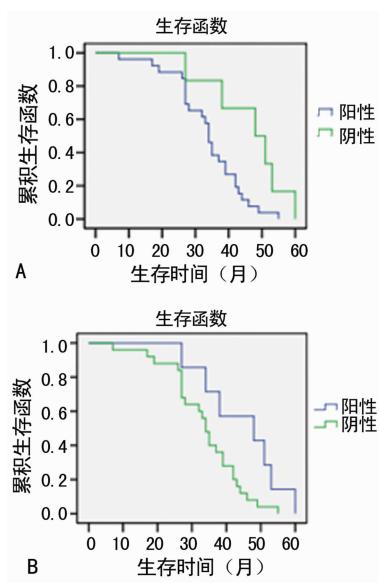
续表2 cIAP、Caspase-7 的表达与子宫内膜腺癌的临床生物学特性关系[n(%)]

生物学特征	n	cIAP			Caspase-7		
		阳性数	χ^2	P	阳性数	χ^2	P
G ₂	31	25(80.7)	6.543	0.038	12(38.7)	10.129	0.006
G ₃	14	13(92.9)			1(7.1)		
FIGO(2009)分期							
I~II期	37	26(70.3)	4.148	0.042	19(51.3)	10.975	0.001
III~IV期	18	17(94.4)			1(0.06)		
肌层浸润							
<1/2	29	24(82.8)	0.899	0.343	13(44.8)	1.899	0.168
≥1/2	26	18(69.2)			7(27.0)		
淋巴结转移							
有	18	17(94.4)	5.795	0.016	1(0.06)	5.795	0.016
无	27	17(63.0)			10(37.0)		
年龄(岁)							
<50	27	21(77.8)	0.005	0.943	10(37.0)	0.010	0.919
≥50	28	22(78.6)			10(35.7)		

2.3 cIAP、Caspase-7 表达在子宫内膜腺癌中的相关性 在 55 例子宫内膜腺癌组织中的 cIAP 阳性表达 43 例,Caspase-7 阳性有 20 例。cIAP 和 Caspase-7 共同阳性表达 9 例,阴性表达 1 例。采用 Spearman 等级相关分析,二者呈负相关($r_s = -0.607, P = 0.000$)。

2.4 cIAP、Caspase-7 表达与子宫内膜腺癌临床预后的关系 对 55 例子宫内膜腺癌患者术后生存时间的随访截止于 2015 年 12 月 31 日,统计化疗方案一致,共得到 32 例患者的总生存时间(I~II 期 19 例,III~IV 期 13 例),删失 23 例(Ia 期 9 例,Ib~II 期 9 例,III~IV 期 5 例),随访率为 58.2%,cIAP 表达阳性病例总体生存率低于阴性病例,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.286, P = 0.021$),Caspase-7 表达阳性病例总体生存率高于阴性病例,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.393, P = 0.036$)。

见图 2。



A:cIAP 的表达;B:Caspase-7 的表达

图 2 cIAP、Caspase-7 表达与子宫内膜腺癌临床预后分析

3 讨 论

子宫内膜癌为女性生殖器三大恶性肿瘤之一,其病理分型中腺癌占 80%~90%。近年来,随着我国经济高速发展,人们生活习惯及饮食结构西方化,肥胖人群增多,以及绝经延迟等多种因素导致子宫内膜癌发生率明显上升^[4]。在治疗方面,积极外科分期手术、化疗、放疗及激素治疗,对提高患者的生存率有很好的疗效。据报道,手术切除子宫及双侧输卵管对于早期子宫内膜癌术后 5 年无瘤生存率达到了 80%~95%,但是,晚期子宫内膜癌患者的 5 年生存率只有 17%^[5]。细胞凋亡调节紊乱有助于细胞的恶性转化和肿瘤的进展,参与肿瘤逃避机体免疫监督和术后复发,与肿瘤耐受化疗和放疗也密切相关^[6]。研究发现,肿瘤细胞在化疗过程中的凋亡是通过具有效应作用的 Caspase-3、6、7 蛋白水解介导的,而 cIAP 却抑制 Caspase 蛋白水解的过程:cIAP-1 能直接与激活的 Caspase-3 和 Caspase-7 结合,从而抑制细胞色素 C 从线粒体释放之后的凋亡信号通路^[7],继而抑制细胞凋亡。Psyrra 等^[8]通过对 150 例晚期卵巢癌患者的组织芯片研究发现,cIAP 高表达组的总生存率小于 3 年,提示在卵巢癌患者 cIAP 的表达中具有重要的预后意义。Gordon 等^[9]研究发现,cIAP1/2 蛋白过表达介导了恶性胸膜间皮瘤对顺铂或其他化疗药的耐药性。Montagut 等^[10]同样发现用基因敲除的方法联合敲除 cIAP-1、cIAP-2、XIAP,可恢复细胞对化疗药物的敏感性而促进肿瘤细胞凋亡。本研究发现,随着肿瘤临床分期和病理分级的增高,cIAP 的阳性表达率明显增强,同时 cIAP 表达阳性病例总体生存率低于阴性病例;而 Caspase-7 却相反,其表达与 cIAP 呈负相关,且 Caspase-7 表达阳性病例总体生存率高于阴性病例。本研究提示,cIAP 抑制 Caspase 家族促凋亡作用可能在子宫内膜腺癌形成的过程中发挥重要的作用,同时 cIAP 家族可能在子宫内膜癌细胞中存在相同或类似的致细胞耐药机制,从而导致肿瘤复发并影

响患者总生存期。因此,两因子的联合检测可能为子宫内膜腺癌的抗肿瘤药物,以及分子靶向治疗提供理论基础。在术后随访阶段,23 例删失病例中 9 例患者因为术前登记信息有误且患者术后均未及时来院复查而失访,6 例患者因家庭经济状况术后未到医院化疗,化疗信息不详而被剔除,8 例患者家属对随访持怀疑态度,拒绝提供患者的具体生存状况;这也提示,地方医院临床医师今后应提高科研意识,加强沟通,提高患者依从性,争取为较大规模的临床试验提供完善的临床资料。

参考文献

- [1] Yang QH, Du C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells[J]. Biol Chem, 2004, 27(17): 16963-16970.
- [2] Lopez J, Wicky Joh S, Tenev T, et al. CARD mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration[J]. Molecular Cell 2011, 42(5): 569-583.
- [3] Li X, Wu K, Fan D. CIAPIN1 as a therapeutic target in cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(6): 603-610.
- [4] 郑明蓉,张竹.子宫内膜癌流行病学及发病因素[J].中国实用妇科及产科杂志,2011,27(11):34-37.
- [5] Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the corpus uteri FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2006, 95(Suppl 1): S105-143.
- [6] Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 13(11): 239-253.
- [7] Park JS, Shin DY, Lee YW, et al. Apoptotic and anti-metastatic effects of the whole skin of Venenum bufonis in A 549 human lung cancer cells[J]. Int J Oncol, 2012, 40(4): 1210-1219.
- [8] Psyrra A, Yu Z, Bamias A, et al. Evaluation of the prognostic value of cellular inhibitor of apoptosis protein in epithelial ovarian cancer using automated quantitative protein analysis[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev Journal Article, 2006, 15(6): 1179-1183.
- [9] Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are regulated by tumour necrosis factor- α malignant pleural[J]. Mesothelioma Pathol, 2007, 21(4): 439-446.
- [10] Montagut C, Rovira A, Albanell J. The proteasome: a novel target for anticancer therapy[J]. Clin Transl Oncol, 2006, 8(5): 313-317.

(收稿日期:2016-07-21 修回日期:2016-09-22)