

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.21.017

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200706.1021.004.html\(2020-07-06\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200706.1021.004.html(2020-07-06))

c-IAP1 在喉癌组织中的表达及其临床意义*

陈华娇,王朝永[△],骆小华,王惠曦,陈 香,赵 瑜

(重庆市涪陵中心医院耳鼻咽喉头颈外科 408000)

[摘要] **目的** 探讨细胞凋亡抑制蛋白 1(c-IAP1)在喉癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学 EnVision 两步法检测 49 例喉癌、11 例声带息肉和 6 例喉乳头状瘤组织标本中 c-IAP1 的表达,并分析 c-IAP1 在 49 例喉癌中的表达情况与组织分化程度、分级分期、淋巴结转移、吸烟史、年龄等参数的关系。**结果** c-IAP1 在喉癌、喉乳头状瘤、声带息肉组织中的阳性表达率分别为 91.84%、33.33%、36.36%,喉癌组织中 c-IAP1 的阳性表达率明显高于声带息肉、喉乳头状瘤组织,差异均有统计学意义($\chi^2=13.990、10.653,P<0.001$);c-IAP1 在声带息肉与喉乳头状瘤组织中的表达率比较,差异无统计学意义($P=0.630$)。c-IAP1 阳性表达水平与喉癌患者的年龄、性别无关($\chi^2=1.107、0.050,P>0.05$);而与吸烟、淋巴结转移、肿瘤的分级、临床分期、组织分化程度明显相关($\chi^2=5.611、6.911、14.472、19.351、13.128,P<0.05$)。**结论** c-IAP1 可能参与喉癌的发生,其表达水平对评估喉癌的恶性程度可能有重要作用。

[关键词] 喉肿瘤;声带息肉;喉乳头状瘤;细胞凋亡抑制蛋白 1;免疫组织化学

[中图法分类号] R767.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)21-3578-04

Expression of c-IAP1 in laryngeal cancer tissue and its clinical significance*

CHEN Huajiao,WANG Chaoyong[△],LUO Xiaohua,WANG Huixi,CHEN Xiang,ZHAO Yu

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery,Fuling

Central Hospital,Chongqing 408000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (c-IAP1) in laryngeal cancer tissue and its clinical significance. **Methods** The immunohistochemical EnVision Two-step method was used to detect c-IAP1 expression level in 49 cases of laryngeal cancer tissue sample,11 cases of vocal cord polyps sample and 6 cases of laryngeal papilloma tissue,and the relationship between the c-IAP1 expression level in 49 cases of laryngeal cancer with the parameters such as the tissue differentiation degree,grade,stage,lymph node metastasis,smoking history and age were analyzed. **Results** The positive expression rates of c-IAP1 in laryngeal cancer,laryngeal papilloma,and vocal cords polyp tissues were 91.84%,33.33%,and 36.36% respectively. The positive expression rate of c-IAP1 in laryngeal cancer tissue was significantly higher than that in the vocal cord polyp and laryngeal papilloma tissues with statistically significant differences ($\chi^2=13.990,10.653,P<0.001$). The expression rate of c-IAP1 showed no statistically significant difference between vocal cord polyp and laryngeal papilloma tissues ($P=0.630$). The positive expression level of c-IAP1 had no relation with the age and gender in the patients with laryngeal cancer ($\chi^2=1.107,0.050,P>0.05$);but had significant correlation with smoking,lymph node metastasis,tumor grade,clinical stage,and tissue differentiation degree ($\chi^2=5.611,6.911,14.472,19.351,13.128,P<0.05$). **Conclusion** c-IAP1 may be involved in the occurrence of laryngeal cancer,and its expression level may have an important role in evaluating the malignant degree of laryngeal cancer.

[Key words] laryngeal neoplasms;vocal cords polyp;laryngeal papilloma;cellular inhibitor of apoptosis protein 1;immunohistochemistry

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目(2016MSXM127)。 作者简介:陈华娇(1989—),医师,硕士,主要从事耳鼻咽喉头颈外科疾病的诊治研究。 [△] 通信作者,E-mail:cqwchy@sina.com。

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,占头颈恶性肿瘤的 7.9%~35.0%,近年来其发病率呈明显上升趋势^[1]。虽然随着诊疗水平的提高,喉癌患者的生活质量得到较大程度的改善,但其 3 年生存率依然无明显提高。因此,寻找喉癌治疗的有效靶向标志物、开展靶向治疗来提高患者生存率已成为新的研究热点。抑制凋亡蛋白家族(IAPs)是近年来发现的一类细胞内凋亡抑制蛋白^[2],通过抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)家族成员介导的蛋白酶级联反应而发挥作用。其中细胞凋亡抑制蛋白 1(c-IAP1)是 IAPs 中的重要成员,在多种癌细胞中均有明显的高表达,特别是在肝癌、宫颈癌、大肠癌、胃癌等癌细胞中明显高表达^[3-7]。而关于 c-IAP1 与喉癌相关性的研究较少,且其与喉癌生物学特征之间的关系仍不明确。本研究采用免疫组织化学 EnVision 两步法检测喉癌组织中 c-IAP1 的表达,分析其表达高低与喉癌临床病理特点的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2011 年 2 月至 2016 年 10 月在本院耳鼻咽喉科确诊为喉癌的患者 49 例,其中男 47 例,女 2 例,年龄 39~81 岁,中位年龄 60 岁。根据 2002 年国际抗癌协会 TNM 标准进行分类: T_1 20 例, T_2 15 例, T_3 11 例, T_4 3 例;不伴淋巴结转移者(N^-)43 例,伴淋巴结转移者(N^+)6 例;临床分期:I 期 20 例,II 期 13 例,III 期 10 例,IV 期 6 例。分化程度:高分化 23 例,中分化 21 例,低分化 5 例。对 49 例喉癌(喉癌组)的石蜡标本进行免疫组织化学检测,并选取同期收治的喉乳头状瘤($n=6$)、声带息肉($n=11$)两种良性病变作为对照。所有喉癌病例术前均未接受放、化疗,入院后行单纯手术或手术加综合治疗。术后 1、3、6、12 个月来院随访,1 年后每 6 个月随访 1 次,随访 3~5 年,每次常规行体格检查和电子喉镜检查,根据患者情况选择做彩色超声、CT 或磁共振成像(MRI)等,对可疑复发病例取病理活检。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

9662S Caspase-3 Antibody (100 μ L/支)购自美国 CST 公司,ab108361 Anti-cIAP1(100 μ L/支)购于英国 Abcam 公司。

1.2.2 免疫组织化学检测

采用 EnVision 两步法,主要步骤如下:(1)脱蜡至水;(2)抗原修复:pH 8.0 乙二胺四乙酸(EDTA),高压修复 3 min;自然冷却至室温;(3)3% H_2O_2 封闭 15 min;聚丁二酸丁二醇酯(PBS)水洗 5 min $\times$ 3 次;(4)一抗 4 $^{\circ}C$ 过夜(1:200);(5)PBS 水洗 5 min $\times$ 3 次,

二抗,37 $^{\circ}C$,1 h;(6)PBS 水洗 5 min $\times$ 3 次,二氨基联苯胺(DAB)显色 10~30 s;(7)苏木素染色 3 min;(8)1% 盐酸乙醇分化、PBS 返蓝,水洗 15 min;(9)梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片、镜下观察。

1.2.3 结果判断

免疫组织化学结果判断参照 BOCKELMAN 等^[8]的方法,c-IAP1 主要表达在细胞质,以细胞质染色为阳性细胞。由 2 名病理科医师在未知患者临床特征情况下对免疫组织化学结果(阳性染色深度和阳性细胞数)进行评分,并将综合结果纳入统计分析中。根据染色深度评分(无染色 0 分,弱染色 1 分,中度染色 2 分,强染色 3 分)和阳性细胞数目(随机选取 10 个高倍镜下较为清晰的视野,计数阳性细胞占细胞总数的比例,取均值,阳性细胞数小于 5%为 0 分,5%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4 分),将两种评分结果相乘得出最终结果,并分为如下 4 个表达等级:阴性(-,0~1 分),弱阳性(+,>1~4 分),中度阳性(++,>4~8 分),强阳性(+++,>8 分)。当评分结果相差较大时(其中一名评分为 0 分而另一评分大于或等于 3 分)需扩大高倍镜选择视野后由两名评分者讨论决定评分结果。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,采用 Fisher 确切检验分析比较 c-IAP1 在声带息肉与喉乳头状瘤组织中的表达率,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

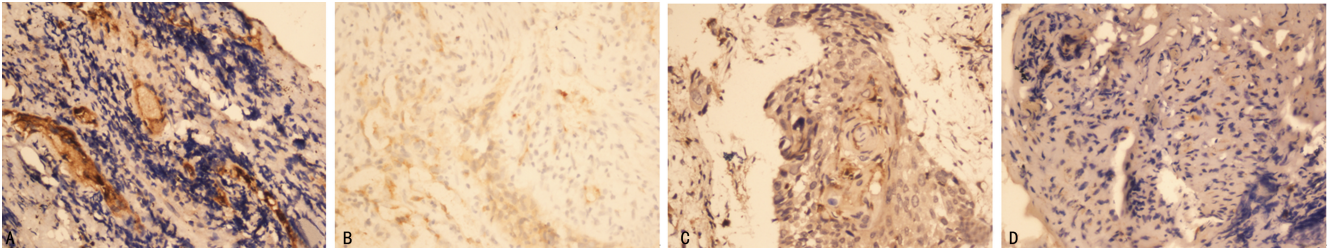
2 结果

2.1 c-IAP1 在喉癌、喉乳头状瘤、声带息肉组织中的表达情况

49 例喉癌 c-IAP1 的阳性表达率为 91.84%,其中弱阳性 18 例(36.73%)、中度阳性 19 例(38.78%)、强阳性 8 例(16.33%),c-IAP1 在喉癌中的 4 种表达等级,见图 1。c-IAP1 在喉乳头状瘤的阳性表达率为 33.33%(2/6),声带息肉中为 36.36%(4/11)。喉癌组织中 c-IAP1 的阳性表达率明显高于声带息肉、喉乳头状瘤组织,差异均有统计学意义($\chi^2=13.990$ 、10.653, $P<0.001$);而 c-IAP1 在声带息肉与喉乳头状瘤组织中的表达率比较,差异无统计学意义($P=0.630$),见表 1、图 2。

2.2 c-IAP1 表达与喉癌患者生物学特征的关系

c-IAP1 在喉癌中的表达水平与患者的年龄、性别无关($\chi^2=1.107$ 、0.050, $P>0.05$);而与吸烟、淋巴结转移、肿瘤的分级、临床分期及组织分化程度明显相关($\chi^2=5.611$ 、6.911、14.472、19.351、13.128, $P<0.05$),见表 2。

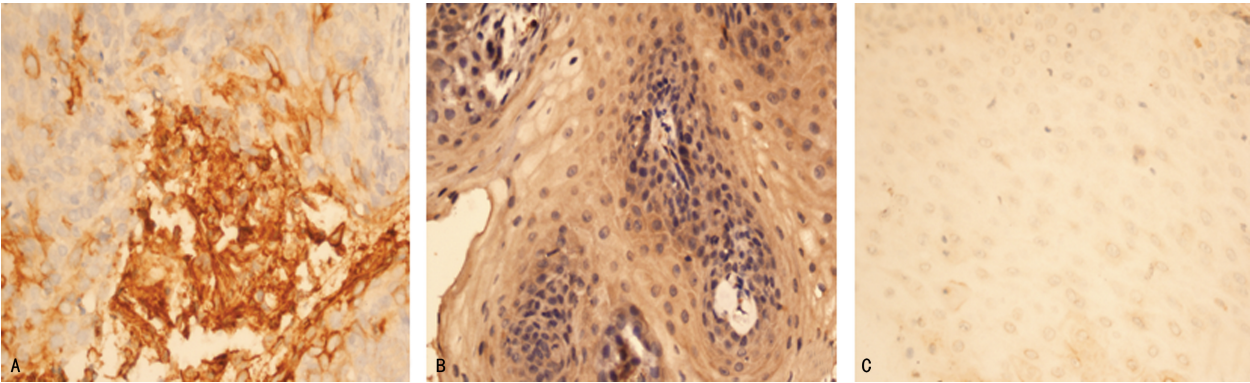


A:+++;B:++;C:++;D:-。

图 1 c-IAP1 在喉癌中的 4 种表达等级 (EnVision,×400)

表 1 cIAP-1 在声带息肉、喉乳头状瘤及喉癌组织中的表达[n(%)]

组别	<i>n</i>	—	+	++	+++	阳性率(%)
喉癌组	49	4(8.16)	18(36.73)	19(38.78)	8(16.33)	91.84
声带息肉组	11	7(63.64)	3(27.27)	1(9.09)	0	36.36
喉乳头状瘤组	6	4(66.67)	2(33.33)	0	0	33.33



A:喉癌;B:喉乳头状瘤;C:声带息肉。

图 2 cIAP-1 在喉部喉癌、喉乳头状瘤及声带息肉组织中的表达 (EnVision,×400)

表 2 cIAP-1 与喉癌患者临床病理参数间的关系[n(%)]

临床特征	<i>n</i>	—	+	++	+++	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)						1.107	0.293
≥60	35	3(8.57)	11(31.43)	14(40.00)	7(20.00)		
<60	14	1(7.14)	7(50.00)	5(35.71)	1(7.14)		
性别						0.050	0.823
男	47	4(8.51)	17(36.17)	18(38.23)	8(17.02)		
女	2	0	1(50.00)	1(50.00)	0		
吸烟史(年)						5.611	0.018
<40	27	3(11.11)	14(51.85)	7(25.93)	3(11.11)		
≥40	22	1(4.55)	4(18.18)	12(54.54)	5(22.73)		
T 分级						14.472	<0.001
T ₁	20	3(0.15)	10(50.00)	7(0.35)	0		
T ₂	15	1(6.67)	7(46.67)	6(40.00)	1(6.66)		
T ₃	11	0	1(9.09)	5(45.45)	5(45.45)		
T ₄	3	0	0	2(66.67)	1(33.33)		
淋巴结转移						6.911	0.008
无	43	4(9.30)	18(41.86)	16(37.21)	5(11.63)		
有	6	0	0	3(50.00)	3(50.00)		
临床分期						19.351	<0.001
I	20	3(15.00)	10(50.00)	7(35.00)	0		

续表 2 cIAP-1 与喉癌患者临床病理参数间的关系[n(%)]

临床特征	n	—	+	++	+++	χ ²	P
Ⅱ	13	1(7.69)	7(53.85)	5(38.46)	0		
Ⅲ	10	0	1(10.00)	5(50.00)	4(40.00)		
Ⅳ	6	0	0	2(33.33)	4(66.67)		
组织分化						13.128	<0.001
高	23	4(17.39)	11(47.83)	8(34.78)	0		
中	21	0	7(33.33)	8(38.10)	6(28.57)		
低	5	0	0	3(60.00)	2(40.00)		

3 讨 论

细胞凋亡是一个高度保守的细胞自杀的过程,是一种由基因控制的自主性有序死亡,对保持组织的健康和正常生长有重要意义,若正常的凋亡受抑制,将导致细胞生存期延长,有利于转化突变的细胞生长积聚,使肿瘤细胞逃避机体免疫监视最终导致肿瘤的发生^[9-10]。因此,细胞凋亡抑制与过度增殖在肿瘤发生中起着重要作用,而 IAPs 在其中扮演着重要角色。IAPs 可以抑制病毒感染的细胞死亡,并同时增强病毒复制,是目前发现的唯一可以和 caspase 直接结合而起抑制作用的蛋白家族,现已发现 8 种家族成员,包括 XIAP、c-IAP1、c-IAP2、Survivin、NAIP、Apollon、Livin、ILP-2。其中 c-IAP1 是 IAPs 的重要成员,通过 BIR 结构域与相应的 caspase 结合,从而抑制其激活来抑制凋亡的发生。此外,它还可以与肿瘤坏死因子受体(TNFR)相互作用,通过 NF-κB 的途径来抑制凋亡^[11-12]。

c-IAP1 在多种恶性肿瘤中均有高表达,且其高表达的程度与肿瘤的不良预后紧密相关^[13]。既往有学者发现,当 IAP 拮抗剂与 c-IAP1 进行特异性靶向结合后,可抑制 c-IAP1 的表达,从而抑制肿瘤细胞生长,还可诱导肿瘤细胞死亡,具有治疗恶性肿瘤的潜能^[14]。本研究发现,c-IAP1 在喉癌组织中表达率明显增高,而在良性肿瘤喉乳头状瘤和声带息肉中呈低表达或无表达,其差异有统计学意义($P<0.01$),表明 c-IAP1 可能与喉癌的发生有关。推测在喉癌的发生、发展过程中,在内外因素的影响下,细胞内 c-IAP1 表达水平升高,通过一系列的蛋白级联反应使细胞的正常凋亡受抑制而出现“免疫逃逸”现象,最终导致了肿瘤的发生。本研究还发现,c-IAP1 在喉癌中的表达与肿瘤细胞的分化程度有关,肿瘤细胞分化程度越低,组织中 c-IAP1 的表达越强。因此,c-IAP1 的表达水平在一定程度上反映了喉癌的恶性程度,是否可作为预估喉癌预后的参考指标,还需做进一步的研究。

路秀英等^[15]报道了 40 例喉癌中,c-IAP1 的表达与喉癌患者的性别、年龄、吸烟史、病理分级、临床分期等均无相关性。而本研究结果却发现,c-IAP1 在喉

癌组织中的表达与患者的性别和年龄无关,与吸烟、淋巴结转移、肿瘤的分级、临床分期及组织分化程度等生物学特征相关,烟龄越长,c-IAP1 的表达强度越强($P=0.018$);伴淋巴结转移的患者中 c-IAP1 表达的阳性程度大于无淋巴结转移者($P=0.008$);随着 T 分级的增高 c-IAP1 的阳性程度也增高($P<0.001$);临床分期越高,c-IAP1 的阳性度越大($P<0.001$);组织分化程度越低,c-IAP1 的表达强度越强($P<0.001$)。两个研究在结论上不完全一致,但本研究结果和杨静等^[7]报道的 c-IAP1 在胃癌组织中的作用具有相似性。因此,c-IAP1 的表达与喉癌临床病理特点及生物学特征的关系究竟如何,还需要扩大样本量或做多中心研究来进一步明确。

参考文献

[1] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127 (12):2893-2917.

[2] HRDINKA M, YABAL M. Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease[J]. Genes And Immunity, 2019, 20(8):641-650.

[3] HSUEH K C, LIN C L, TUNG J N, et al. Nimbolide induced apoptosis by activating ERK-mediated inhibition of c-IAP1 expression in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Environ Toxicol, 2018, 33(9/10):913-922.

[4] GULAN T, MINGYUE Z, JIYING C, et al. Expressions and clinical significance of Bcl-2, Bcl-xL and c-IAP1 protein in cervical cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2018, 11(11):12361-12367.

[5] 高艳梅, 魏芳. 细胞凋亡抑制蛋白-1 在宫颈癌及宫颈癌化疗耐药方面的研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2017, 11(4):681-685.

[6] TOMICIC M T, STEIGERWALD C, RASENBERGER B, et al. Functional (下转第 3586 页)

- [12] FAGARD K, WOLTHUIS A, D'HOORE A, et al. A systematic review of the intervention components, adherence and outcomes of enhanced recovery programmes in older patients undergoing elective colorectal surgery[J]. *BMC Geriatr*, 2019, 19(1):157.
- [13] 赵青川. 从医学伦理角度看加速康复外科[J]. *中华消化外科杂志*, 2016, 19(3):250-252.
- [14] 卫佼佼, 张越伦, 卢素芳, 等. 术中静脉输注利多卡因优化术后疼痛管理并加速胃肠功能恢复: 回顾性队列研究[J]. *协和医学杂志*, 2019, 10(6):600-604.
- [15] BAILEY C R, AHUJA M, BARTHOLOMEW K, et al. Guidelines for day-case surgery 2019: Guidelines from the Association of Anaesthetists and the British Association of Day Surgery [J]. *Anaesthesia*, 2019, 74(6):778-792.
- [16] ZHU A C, AGARWALA A, BAO X. Perioperative Fluid Management in the Enhanced Recovery after Surgery (ERAS) Pathway[J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2019, 32(2):114-120.
- [17] BOZZETTI F, MARIANI L. Perioperative nutritional support of patients undergoing pancreatic surgery in the age of ERAS[J]. *Nutrition*, 2014, 30(11/12):1267-1271.
- [18] CROSSON J A. Enhanced recovery after surgery-the importance of the perianesthesia nurse on program success [J]. *J Perianesth Nurs*, 2018, 33(4):366-374.
- [19] XU B, WANG Y X, QIU Y X, et al. Risk factors and consequences of conversion to open surgery in laparoscopic common bile duct exploration[J]. *Surg Endosc*, 2018, 32(12):4990-4998.
- [20] SPANJERSBERG W R, REURINGS J, KEUS F, et al. Fast track surgery versus conventional recovery strategies for colorectal surgery[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011(2):CD007635.
- [21] LAUBERT T, BADER F G, KLEEMANN M, et al. Outcome analysis of elderly patients undergoing laparoscopic resection rectopexy for rectal prolapse[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2012, 27(6):789-795.

(收稿日期:2020-01-11 修回日期:2020-06-20)

(上接第 3581 页)

- mismatch repair and inactive p53 drive sensitization of colorectal cancer cells to irinotecan via the IAP antagonist BV6 [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(8):2265-2277.
- [7] 杨静, 石晓虹, 程玉. c-IAP1、c-IAP2 和 Beclin-1 在胃癌组织中的研究进展[J]. *承德医学院学报*, 2017, 32(4):142-145.
- [8] BOCKELMAN C, HAGSTROM J, MAKINEN L K, et al. High CIP2A immunoreactivity is an independent prognostic indicator in early-stage tongue cancer[J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(12):1890-1895.
- [9] GRIFFIOEN A W, NOWAK-SLIWINSKA P. Apoptosis turns 21 [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(12):1485-1486.
- [10] NARAYANAN K B, PARK H H. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(2):196-209.
- [11] UEGAKI T, TANIGUCHI F, NAKAMURA K, et al. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) may be effective therapeutic targets for treating endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(1):149-158.
- [12] 骆小华, 李兵, 王朝永. 凋亡相关蛋白 Caspase-3 在头颈肿瘤的研究进展[J]. *中国医学文摘耳鼻喉科学*, 2018, 33(1):98-101.
- [13] LOPEZ J, MEIER P. To fight or die-inhibitor of apoptosis proteins at the crossroad of innate immunity and death[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(6):872-881.
- [14] GONCHAROV T, NIESSEN K, ALMAGRO M C, et al. OTUB1 modulates c-IAP1 stability to regulate signaling pathways[J]. *EMBO J*, 2013, 32(8):1103-1114.
- [15] 路秀英, 李晓明. 凋亡抑制蛋白 c-IAP1 在喉癌中的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2007, 21(5):401-402, 405.

(收稿日期:2020-03-04 修回日期:2020-06-20)