

## 凋亡抑制因子Livin在三阴性乳腺癌中的表达及其判断预后的价值

陈亮 戴殿禄 崔国忠 杨猛 丁明剑

**摘要** 目的:探讨凋亡抑制因子Livin在三阴性乳腺癌中的表达及与预后的关系,分析三阴性乳腺癌的独立预后影响因素。方法:用免疫组织化学SP法检测90例三阴性乳腺癌、35例癌旁乳腺组织、10例正常乳腺组织中Livin的表达;结合临床病理特征和随访资料,建立Cox模型进行回归分析。结果:Livin在三阴性乳腺癌中的表达率为57.8%,在癌旁乳腺组织中的表达率为34.3%,在正常乳腺组织中表达率为0,三者之间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Livin的表达与临床分期、脉管癌栓及腋淋巴结转移均有显著性差异( $P<0.05$ ),而与年龄、肿瘤大小、乳腺癌家族史及组织学分级无显著性差异( $P>0.05$ )。Kaplan-Meier生存曲线显示,Livin蛋白低表达组患者的无瘤生存时间及总生存时间明显优于Livin蛋白高表达组患者。多因素Cox回归分析显示,年龄、临床分期、脉管癌栓及腋淋巴结转移情况是影响患者DFS的独立危险因素;仅临床分期及腋淋巴结转移情况是影响患者总生存时间的独立危险因素;而Livin均被剔除。结论:Livin的异常高表达可能与三阴性乳腺癌的发生、发展及预后有相关性,提示Livin的表达可能成为判断三阴性乳腺癌浸润进展及预后的指标之一。

**关键词** 三阴性乳腺癌 Livin 免疫组织化学 预后 多因素分析

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.23.012

### Protein Expression of Livin in Triple-negative Breast Cancer and Its Value in Prognosis

Liang CHEN, Dianlu DAI, Guozhong CUI, Meng YANG, Mingjian DING

Correspondence to: Dianlu DAI; E-mail: czddl@tom.com

The Second Department of Surgical Oncology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, China

**Abstract Objective:** To investigate the expression of the apoptosis inhibitor Livin and its correlations in the prognosis of triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods:** The expression of Livin was determined by immunohistochemical Streptavidin-Peroxidase method in 90 cases with TNBC, 35 with paraneoplastic tissues, and 10 with normal tissues. The Cox model analysis was established using clinico-pathological features and follow-up data. **Results:** The positive expression of Livin was 57.8% in the TNBC tissues and 34.3% in the paraneoplastic breast tissues. No Livin expression was observed in all 10 normal tissues, indicating the absence of statistical significance among the groups ( $P<0.05$ ). The expression of Livin was significantly correlated with clinical stage, lymph-vascular invasion, and axillary lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). The expression of Livin did not show correlations with the patient's age, tumor size, family history of breast cancer, and histologic grade ( $P>0.05$ ). The plotted survival curves by the Kaplan - Meier method demonstrated that disease-free survival and overall survival were significantly better in patients with low expression than in patients with high expression of Livin protein. Multivariate Cox regression analysis showed that age, clinical stage, lymph-vascular invasion, and axillary lymph node metastasis were independent risk factors affecting the five-year disease-free rate of the patients, whereas clinical stage and axillary lymph node metastasis were independent risk factors affecting the five-year overall rate of the patients. The Livin protein was then rejected. **Conclusion:** The abnormal expression of Livin is related to the development and prognosis of TNBC, suggesting that the expression of Livin may be used as one of the indicators in determining the progress and prognosis of TNBC.

**Keywords** Triple-negative breast cancer; Livin; Immunohistochemistry; Prognosis; Multivariate analysis

三阴性乳腺癌(TNBC)是一种特殊类型的乳腺癌,其雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体2(HER2)表达均为阴性,恶性度较高,不能从针对激素受体的内分泌治疗和HER2的靶向治疗中获益,因此较其他类型乳腺癌相比,三阴性乳腺癌的预后较差。目前影响三阴性乳腺癌预后的分子指标逐渐成为研究的焦点。Livin蛋白

是最新发现的凋亡抑制蛋白(IAP)家族成员,其在大多数正常成人组织中不表达,而在一些肿瘤组织细胞中高表达,与肿瘤的关系密切,乳腺癌中同样存在Livin的异常高表达。本研究探讨Livin蛋白在三阴性乳腺癌这一特殊类型乳腺癌中是否同样存在异常高表达,并分析其与三阴性乳腺癌预后的关系,便于指导临床。

作者单位:河北省沧州市中心医院肿瘤外科(河北省沧州市061001)

通信作者:戴殿禄 czddl@tom.com

## 1 材料与方法

### 1.1 临床材料

收集2000年8月至2005年5月于河北省沧州市中心医院住院治疗的90例三阴性乳腺癌患者的蜡块及随访材料,乳腺癌患者均为女性;年龄23~75岁,平均年龄47.6岁。临床分期:I期21例,II期42例,III期27例;组织学分级:I级18例,II级34例,III级38例;腋下淋巴结转移患者65例;乳腺癌家族史32例;脉管癌栓39例。并选取35例三阴性乳腺癌旁乳腺组织及10例正常乳腺组织作为对照。所有患者均接受手术治疗并根据患者情况给予放化疗等综合治疗。符合伦理委员会认可。

### 1.2 方法

**1.2.1 随访** 本组所有乳腺癌患者均进行了随访,随访率100%。随访起始时间为抗癌治疗开始日,观察终止时间为2010年5月。随访采用门诊定期复查和电话相结合的方式。预后评价指标为患者的5年无瘤生存时间(DFS)及总生存时间(OS)。

**1.2.2 免疫组织化学法** 采用免疫组织化学SP法。以SP免疫组织化学试剂盒说明书为依据操作。Livin单克隆抗体购于美国UCL公司。以PBS代替一抗作阴性对照,用已知Livin阳性结肠癌组织作为阳性对照。

**1.2.3 结果判定** Livin的判断:Livin蛋白主要表达于细胞浆,以棕黄色颗粒为特征。采取以每一切片中随机选取10个高倍镜视野及每个高倍镜视野计数100个细胞的方法判定。染色强度等级:浅黄染为1分,中度黄染为2分,强度黄染为3分;阳性细胞的百分率:阳性细胞<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,>50%为3分;将两者的结果综合分析:0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为中度阳性(++),5~6分为强阳性(+++);将PTEN和Livin蛋白的(-)、(+)组计为低表达组,将PTEN和Livin蛋白的(++、+++组计为高表达组。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0软件进行统计学处理。计数资料应用 $\chi^2$ 检验,用Kaplan-Meier法描述生存曲线,组间比较采用Log rank法进行,用Cox模型进行多因素分析,以 $P<0.05$ 为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 Livin蛋白在正常乳腺组织、癌旁组织及癌组织中的表达

Livin蛋白在三阴性乳腺癌组织中的表达率为57.8%(52/90),在癌旁乳腺组织中的表达率为34.3%(12/35),在正常乳腺组织中表达率为0(0/10),三者之间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图1,2)。

### 2.2 Livin蛋白表达与三阴性乳腺癌临床病理特征的关系

在三阴性乳腺癌中,Livin的表达与临床分期、脉管癌栓及腋淋巴结转移均有显著性差异( $P<0.05$ ),而与年龄、肿瘤大小、乳腺癌家族史及组织学分级无显著性差异( $P>0.05$ ,表1)。

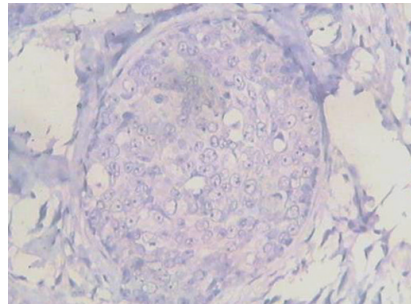


图1 正常乳腺组织中Livin的阴性表达(SP×200)

Figure 1 Negative expression of Livin protein in normal tissues(SP×200)

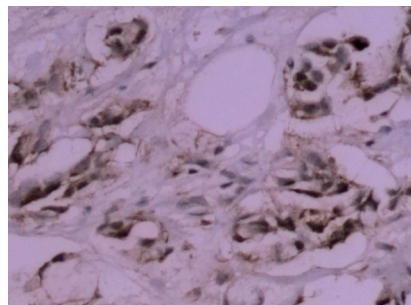


图2 乳腺癌组织中Livin的阳性表达(SP×400)

Figure 2 Positive expression of Livin protein in triple-negative breast cancer (TNBC) (SP×400)

### 2.3 各临床因素对三阴性乳腺癌患者预后的影响

影响DFS的单因素分析显示,年龄、临床分期、组织学分级、腋淋巴结转移、脉管癌栓及Livin的蛋白表达与三阴性乳腺癌预后有关( $P<0.05$ )。影响OS的单因素分析显示,临床分期、组织学分级、腋淋巴结转移、脉管癌栓及Livin的蛋白表达与三阴性乳腺癌预后有关( $P<0.05$ ,表2)。

### 2.4 影响生存期的Cox模型多因素分析

经Log rank检验筛选对三阴性乳腺癌生存有影响的各个因素再进行多因素Cox模型分析。结果显示,年龄、临床分期、脉管癌栓及腋淋巴结转移情况是影响患者DFS的独立危险因素。仅临床分期及腋淋巴结转移情况是影响患者OS的独立危险因素,而Livin均被剔除。其中临床分期及腋淋巴结转移情况,反映不良预后的危险性最大(表3,4)。

### 2.5 Livin蛋白表达与生存期的关系

Kaplan-Meier法绘制的生存曲线提示Livin蛋白低表达组患者的DFS及OS明显优于Livin蛋白高表达组患者(图3,4)。

表1 Livin蛋白在三阴性乳腺癌中的表达与临床病理特征的关系 例

Table 1 Correlation between the expression of Livin protein and the pathological characteristics of TNBC

项目	例数	Livin		高表达率(%)	$\chi^2$	P
		低表达	高表达			
年龄(岁)						
≤45	49	17	32	65.3	2.499	0.114
>45	41	21	20	48.8		
肿瘤大小(cm)						
<2	25	13	12	48.0	2.636	0.268
2~5	42	14	28	66.7		
>5	23	11	12	52.2		
临床分期						
I	21	12	9	42.9	6.845	0.033
II	42	20	22	52.4		
III	27	6	21	77.8		
组织学分级						
I	18	10	8	44.4	3.402	0.182
II	34	16	18	52.9		
III	38	12	26	68.4		
腋淋巴结转移						
阳性	65	22	43	66.2	6.730	0.009
阴性	25	16	9	36.0		
乳腺癌家族史						
阳性	32	12	20	62.5	0.454	0.500
阴性	58	26	32	55.2		
脉管癌栓						
阳性	39	10	29	74.4	7.757	0.005
阴性	51	28	23	45.1		

表2 影响三阴性乳腺癌患者预后的单因素分析

Table 2 Univariate analysis of the prognosis of TNBC patients

项目	例数	DFS(%)	$\chi^2$	P	OS(%)	$\chi^2$	P
年龄(岁)							
≤45	49	50.8	4.127	0.042	69.3	2.960	0.098
>45	41	75.6			85.4		
肿瘤大小(cm)							
<2	25	80.1	3.542	0.056	90.3	3.143	0.091
2~5	42	60.6			71.8		
>5	23	49.9			56.2		
临床分期							
I	21	83.8	7.329	0.008	96.5	7.962	0.006
II	42	61.4			68.8		
III	27	39.6			46.5		
组织学分级							
I	18	82.2	7.218	0.010	94.7	7.037	0.009
II	34	52.7			69.4		
III	38	34.4			49.2		
腋淋巴结转移							
阳性	65	49.8	6.642	0.021	59.6	7.561	0.007
阴性	25	76.6			89.3		
乳腺癌家族史							
阳性	32	59.9	1.650	0.128	69.5	3.650	0.063
阴性	58	67.3			82.5		
脉管癌栓							
阳性	39	50.4	5.423	0.023	61.6	6.317	0.010
阴性	51	76.1			88.4		
Livin表达							
低表达	38	73.7	4.222	0.040	86.8	4.163	0.041
高表达	52	51.9			67.3		

表3 影响三阴性乳腺癌患者DFS的多因素分析

Table 3 Multivariate Cox regression analysis of the disease-free survival (DFS) of TNBC patients

影响因素	回归系数	标准误	Wald值	P	相对危险度(RR)	95%CI
年龄(>45岁 vs. ≤45岁)	-0.558	0.214	0.315	0.012	2.112	0.224 ~ 1.125
临床分期(I+II期 vs. III期)	0.607	0.152	1.532	0.009	3.543	1.543 ~ 3.251
脉管癌栓(阴性 vs. 阳性)	0.533	0.478	1.124	0.001	3.053	1.842 ~ 2.074
腋淋巴结转移(阴性 vs. 阳性)	0.692	0.211	1.953	0.016	3.246	2.267 ~ 5.428

表4 影响三阴性乳腺癌患者OS的多因素分析

Table 4 Multivariate Cox regression analysis of the overall survival (OS) of TNBC patients

影响因素	回归系数	标准误	Wald值	P	相对危险度(RR)	95%CI
临床分期(I+II期 vs. III期)	1.128	0.127	3.815	0.012	2.943	1.153 ~ 3.185
腋淋巴结转移(阴性 vs. 阳性)	1.235	0.414	3.930	0.006	3.015	2.016 ~ 5.181



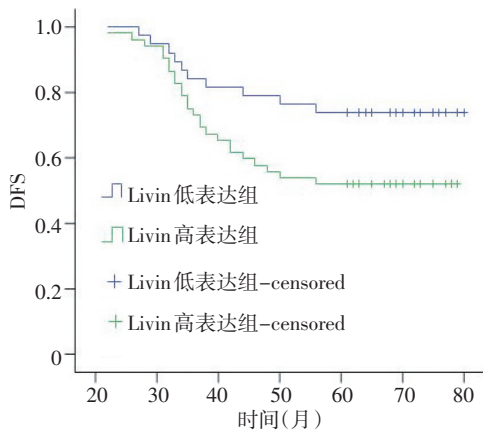


图3 Livin 高表达组与低表达组 DFS 生存曲线的比较  
Figure 3 Comparison of DFS between patients with low and high expressions of Livin

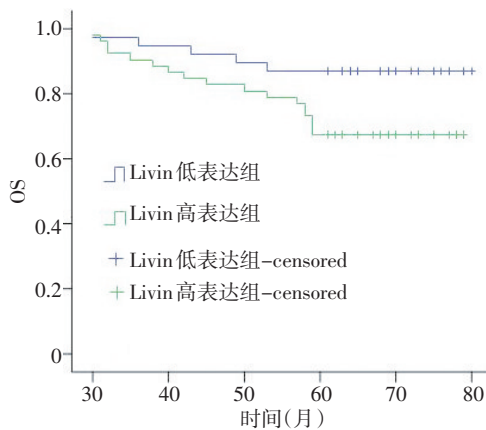


图4 Livin 高表达组与低表达组 OS 生存曲线的比较  
Figure 4 Comparison of OS between patients with low and high expressions of Livin

### 3 讨论

三阴性乳腺癌缺乏内分泌治疗及针对 HER2 基因的分子靶向治疗,同时具有侵袭性强,易于局部复发及侵袭转移等特点。近年来对三阴性乳腺癌基础研究、治疗的选择及临床预后等方面引起国内外学者的广泛关注。Livin 作为 IAPs 家族的新成员,是迄今发现最强的凋亡抑制因子之一,其通过下调 Caspase-3 的表达抑制细胞的凋亡,因此在肿瘤的发生发展中具有重要意义。目前已有报道<sup>[1]</sup>证实在许多恶性肿瘤中存在 Livin 蛋白的过度激活及表达,并且 Livin 的表达与许多恶性肿瘤较短的无瘤生存率及总生存率有很强的相关性,甚至在某些类型的肿瘤患者中被认定为预后不良的独立预后指标。吴国武等<sup>[2]</sup>报道乳腺癌中同样存在 Livin 的异常高表达,且 Livin 蛋白过表达组患者生存时间较阴性表达组短( $P < 0.05$ )。而有关 Livin 在三阴性乳腺癌这一特殊类型乳腺癌中的表达及其预后影响的相关研究较少。

本研究显示,Livin 蛋白在三阴性乳腺癌组织中的阳性表达率(57.8%)显著高于乳腺癌旁组织

(34.3%)及正常乳腺组织(0),提示三阴性乳腺癌组织中同样存在着 Livin 蛋白的异常高表达,Livin 可能参与了三阴性乳腺癌的发生发展过程。刘慧敏等<sup>[3]</sup>应用免疫组织化学法及 RT-PCR 检测了 Livin 在乳腺癌及癌旁组织中的表达率依次降低,且 Livin mRNA 及蛋白的表达趋于一致。其结果与本研究类似。本组还显示:Livin 蛋白表达与临床分期、脉管癌栓及腋淋巴结转移有相关性,说明随着恶性度的增加,Livin 的蛋白表达逐渐升高,提示 Livin 的表达上调可能参与了乳腺癌的恶性演变过程。

本研究将 Livin 的蛋白表达纳入了单因素生存率分析,结果显示 Livin 低表达组患者 5 年 DFS 及 OS 显著高于 Livin 高表达组的患者,提示 Livin 蛋白表达可能同样与三阴性乳腺癌的预后有关。Gazzaniga 等<sup>[4]</sup>通过 RT-PCR 检测膀胱癌中 Livin 的表达并对预后进行分析:Livin 阳性患者的中位无复发时间为 3.5 个月,明显短于 Livin 阴性患者的 27.2 个月,成为不良的预后因素。周利军等<sup>[5]</sup>通过 Cox 回归分析提示 Livin 蛋白的表达是髓母细胞瘤患者预后的独立危险因素。Livin 的表达在结直肠癌<sup>[6-7]</sup>及胃癌<sup>[8]</sup>中同样成为不良的预后因素,而 Livin 的表达在肺癌<sup>[9]</sup>及鼻咽癌<sup>[10]</sup>的预后研究中未能得出不良预后的结果,甚至在儿童急性淋巴细胞白血病<sup>[11]</sup>的研究中却显示出相反的结论,即 Livin 成为有利的预后因素,具体原因不完全明确。而本研究 Cox 模型多因素分析发现,Livin 蛋白表达均被剔除出模型,说明 Livin 的表达可能是影响三阴性乳腺癌预后的因素,但不是影响其预后的独立危险因素。

在单因素生存率分析中,影响 DFS 的单因素有年龄、临床分期、组织学分级、腋淋巴结转移及脉管癌栓;影响 OS 的单因素有临床分期、组织学分级、腋淋巴结转移及脉管癌栓。据张丽等<sup>[12]</sup>报道,年龄、肿瘤大小、临床分期、组织学分级及腋淋巴结转移情况与三阴性乳腺癌预后明显相关。郭慧琳等<sup>[13]</sup>报道乳腺癌的预后与肿瘤直径有明显相关,原发肿瘤在  $\leq 2.0$  cm、2.1 ~ 5.0 cm、 $> 5.0$  cm 组的 5 年生存率分别为 93.7%、80.3%、48.1%,显示乳腺癌 5 年生存率随着肿瘤体积的增加而降低。以上两个研究均得出肿瘤大小对预后产生影响,本研究中根据肿瘤大小所分各组的 5 年 DFS 及 OS 比较差异无统计学意义,与以上文献不符,可能与病例数目较少,产生了统计学上的误差有关。Cox 模型多因素分析还得出年龄、临床分期、脉管癌栓及腋淋巴结转移情况是影响患者 DFS 的独立危险因素;仅临床分期及腋淋巴结转移情况是影响患者 OS 的独立危险因素,说明临床分期和腋淋巴结转移情况反映不良预后的危险性最大。

综上所述, Livin的异常高表达可能与三阴性乳腺癌的发生及发展有相关性, Livin可能是影响三阴性乳腺癌预后的因素, 并可能成为判断三阴性乳腺癌浸润进展及预后的指标之一。

#### 参考文献

- 1 Wang L, Zhang Q, Liu B, et al. Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(12):3661-3669.
- 2 吴国武, 曾娟紫. Livin蛋白在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(4):372-373.
- 3 刘慧敏, 周士福, 时伟锋, 等. Livin和脆性组氨酸三联体的表达在确定乳腺癌保乳手术切缘及术中放疗安全靶区中的意义[J]. 肿瘤, 2010, 30(5):419-422.
- 4 Gazzaniga 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.
- 5 周利军, 况建国. Livin蛋白在髓母细胞瘤中的表达及临床意义[J]. 江西医药, 2011, 46(2):117-119.
- 6 Xi RC, Biao WS, Gang ZZ. Significant elevation of survivin and livin expression in human colorectal cancer: inverse correlation between expression and overall survival[J]. Onkologie, 2011, 34(8-9):428-432.
- 7 菅金波, 葛莲英, 罗小玲, 等. Livin蛋白在人大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国癌症防治杂志, 2011, 3(1):43-46.
- 8 陈晓燕, 韩子华. 胃癌组织中Livin蛋白的表达及其与临床病理特征和预后的关系[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(11):1230-1232.
- 9 Dai CH, Li J, Shi SB, et al. Survivin and Smac gene expressions but not livin are predictors of prognosis in non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant chemotherapy following surgery[J]. Jpn J Clin Oncol, 2010, 40(4):327-335.
- 10 Xiang Y, Yao H, Wang S, et al. Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma[J]. Laryngoscope, 2006, 116(1):126-130.
- 11 Choi J, Hwang YK, Sung KW, et al. Expression of Livin, an anti-apoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2007, 109(2):471-477.
- 12 张丽, 赵晓辉, 佟仲生, 等. 356例三阴性乳腺癌的临床特征及预后多因素分析[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(18):1045-1049.
- 13 郭慧琳, 张幸平. 166例乳腺癌患者临床病理学特征及其与预后的关系[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(4):486-506.

(2012-01-30收稿)

(2012-05-13修回)

(本文编辑:邢颖)

## · 简 讯 ·

### “临床病例讨论”栏目简介

临床病例讨论为本刊特色栏目之一, 重点报道疑难与典型肿瘤病例的诊疗过程, 旨在鼓励临床工作者相互交流易误诊、误治或少见、罕见肿瘤和并发症的处理经验, 使肿瘤临床医师从中得到启示与借鉴, 提高对疑难病例的辨别与治疗水平。

来稿将以论著形式刊登。稿件内容具体要求如下: 1) 应有完整的病历摘要和详细的检查结果; 2) 临床讨论部分要有参加讨论的医师发言, 就所讨论病例提出各自的看法; 3) 能提供有说服力的图片或病理检查结果, 并结合本例患者的特点进行讨论; 4) 最后的分析要能总结经验教训, 为临床工作提供借鉴与参考。

质量优秀的稿件将优先刊登。欢迎踊跃来稿!