

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.10.010

PDCD4 和凋亡抑制因子 Livin 在 TNBC 组织中的表达及与预后的相关性研究*

戴小丽¹, 张清¹, 邱静², 刘一飞³, 马林伟¹, 张慧丽^{1△}

(1. 江苏医药职业学院, 江苏盐城 224005; 2. 盐城市第三人民医院病理科, 江苏盐城 224001; 3. 南通大学附属医院病理科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 观察和分析程序性细胞死亡基因 4(PDCD4)和凋亡抑制因子 Livin 在三阴性乳腺癌(TNBC)组织中的表达及与预后的相关性。**方法** 选取 100 例 TNBC 肿瘤组织, 50 例癌旁组织, 50 例正常乳腺组织作为研究资料, 应用免疫组织化学法对 3 种组织中的 PDCD4、Livin 蛋白的表达阳性率进行检测和比较, 对纳入患者进行随访, 对其总生存期(OS)和无病生存期(DFS)进行观察和比较。**结果** TNBC 组织中 PDCD4 表达阳性率显著低于癌旁组织或正常乳腺组织, 比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 26.613, 32.000, P < 0.05$), 其表达情况与肿瘤直径、淋巴结转移数量、临床分期、腋下淋巴结转移、脉管癌栓等临床病理特征有关($\chi^2 = 26.936, 13.210, 22.774, 27.463, 5.803, P < 0.05$); Livin 蛋白表达阳性率显著高于癌旁组织或正常乳腺组织, 癌旁组织中的 Livin 蛋白表达阳性率显著高于正常乳腺组织, 差异均有统计学意义($\chi^2 = 14.614, 57.353, 19.048, P < 0.05$), 其表达情况与淋巴结转移数量、临床分期、腋下淋巴结转移、脉管癌栓等临床病理特征有关($\chi^2 = 10.788, 6.160, 27.350, 8.914, P < 0.05$); PDCD4 表达阴性患者的 OS、DFS 显著低于 PDCD4 表达阳性患者, Livin 蛋白表达阳性患者的 OS、DFS 显著低于 Livin 表达阴性患者, 比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 23.931, 19.163, 22.649, 17.213, P < 0.05$), TNBC 患者的 OS 与年龄($RR = 1.405$)、临床分期($RR = 2.897$)、肿瘤直径($RR = 2.722$)、腋下淋巴结转移($RR = 2.516$)、脉管癌栓($RR = 3.020$)、PDCD4 表达($RR = 1.752$)、Livin 表达($RR = 2.051$)等因素均具有相关性($P < 0.05$), 患者的 DFS 与临床分期($RR = 2.756$)、腋下淋巴结转移($RR = 2.437$)、PDCD4 表达($RR = 1.649$)、Livin 表达($RR = 1.804$)等因素均具有相关性($P < 0.05$)。**结论** TNBC 组织中存在 PDCD4 的低表达和 Livin 蛋白的过表达, 而且其异常表达情况与肿瘤的临床病理特征和患者的预后具有相关性, 可作为评价 TNBC 病情进展和预后的辅助指标。

[关键词] 三阴性乳腺癌; 程序性细胞死亡基因 4; Livin 蛋白; 预后; 生存分析**[中图分类号]** R737.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)10-1332-04

Expression of PDCD4 and apoptosis inhibitor Livin in triple negative breast cancer tissues and its relationship with prognosis*

DAI Xiaoli¹, ZHANG Qing¹, QIU Jing², LIU Yifei³, MA Linwei¹, ZHANG Huili^{1△}

(1. Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng, Jiangsu 224005, China; 2. Department of Pathology, Yancheng Municipal Third People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224001, China;

3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To observe and analyze the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) gene and apoptosis inhibitor Livin in triple negative breast cancer (TNBC) tissues and its relationship with prognosis. **Methods** One hundred cases of TNBC tumor tissue, 50 cases of adjacent carcinoma tissue, 50 cases of normal breast tissue were selected as the research data. The immunohistochemical technique was applied to detect and compare the expression positive rates of PDCD4 and Livin protein in three kinds of tissues. The patients were followed up. The overall survival (OS) and the progression free survival (PFS) were observed and compared. **Results** The expression positive rate of PDCD4 in TNBC tissue was significantly lower than that in adjacent carcinoma tissue or normal breast tissue, the differences were statistically significant ($\chi^2 = 26.613, 32.000, P < 0.05$). The expression was correlated with the clinical pathological features of tumor size, lymph node metastasis, clinical stage, axillary lymph node metastasis and cancer embolus ($\chi^2 = 26.936, 13.210, 22.774, 27.463, 5.803, P < 0.05$); the expression positive rate of Livin protein in TNBC tissue was significantly

higher than that in adjacent carcinoma tissue or normal breast tissue and the expression positive rate of Livin protein in adjacent carcinoma tissue was significantly higher than that in normal breast tissue, the differences were statistically significant ($\chi^2=14.614, 57.353, 19.048, P<0.05$). The expression was correlated with the clinical pathological features of lymph node metastasis, clinical stage, axillary lymph node metastasis and cancer embolus ($\chi^2=10.788, 6.160, 27.350, 8.914, P<0.05$); OS, PFS in the patients with PDCD4 negative expression were significantly lower than those in the patients with PDCD4 positive expression. OS, PFS in the patients with Livin positive expression were significantly lower than those in the patients with Livin negative expression, the above differences were statistically significant ($\chi^2=23.931, 19.163, 22.649, 17.213, P<0.05$). OS in the TNBC patients was correlated with age ($RR=1.405$), clinical stage ($RR=2.897$), tumor diameter ($RR=2.722$), axillary lymph node metastasis ($RR=2.516$), vascular invasion ($RR=3.020$), PDCD4 Expression ($RR=1.752$) and Livin expression ($RR=2.051$) ($P<0.05$). PFS in the patients was correlated with clinical stage ($RR=2.756$), axillary lymph node metastasis ($RR=2.437$), PDCD4 expression ($RR=1.649$) and Livin expression ($RR=1.804$) ($P<0.05$). **Conclusion** The PDCD4 low expression and Livin protein over-expression exist in TNBC tissues. Their abnormal expressions are correlated with the clinicopathological features of tumor and the prognosis of patient, and could be used as the auxiliary indexes in evaluation of progression and prognosis of TNBC.

[Key words] triple negative breast neoplasm; programmed cell death 4 gene; Livin protein; prognosis; survival analysis

乳腺癌是中国女性人群中最常见的恶性肿瘤,中国每年新发乳腺癌病例约占全世界新诊断乳腺癌病例的 12.0%,死亡病例约占全世界癌症死亡病例的 9.6%。20 世纪 90 年代至今,中国女性人群的乳腺癌发病率已增长近两倍,而且很多乳腺癌患者确诊时已进展到中、晚期,预后较差,乳腺癌已成为威胁中国女性人群身心健康的主要疾病之一^[1]。乳腺癌是一种高度异质性的恶性肿瘤,包括多种生物学行为、临床病理特点和分子生物学特征各不相同的类型,这些种类的乳腺癌对治疗的反应和预后也存在显著的差异^[2]。三阴性乳腺癌(TNBC)是一种特殊类型的乳腺癌类型,是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2(HER-2)均为阴性的乳腺癌,恶性度较高,预后较差,与 TNBC 预后相关的分子生物标记研究已成为学术界的焦点问题^[3]。本研究针对程序性细胞死亡基因 4(PDCD4)和凋亡抑制因子 Livin 在 TNBC 组织中的表达及与预后的相关性进行了研究和分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2008 年 1 月至 2013 年 12 月医院收治的临床资料完整的 TNBC 患者 100 例作为研究对象,患者均为女性,年龄为 24~68 岁,中位年龄为 42 岁,所有纳入患者术前均未经放化疗治疗,均经术后病理及免疫组织化学检查证实为 TNBC。临床分期:23 例为 I 期,47 例为 II 期,30 例为 III 期。腋下淋巴结转移患者 72 例,乳腺癌家庭史患者 37 例,脉管癌栓患者 43 例。

1.2 方法 选取上述患者肿瘤组织标本 100 例,癌旁组织标本 50 例及正常乳腺组织标本 50 例,均为石蜡包埋标本,经切片、脱蜡、脱水后应用免疫组织化学

法(S-P 法)进行染色,对标本组织中的 PDCD4、Livin 蛋白的表达阳性率进行检测和比较,PDCIM 多克隆抗体和 Livin 蛋白单克隆抗体均购自美国 UCL 公司,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,操作步骤严格按照试剂盒使用说明进行。随机选取 10 个 400 倍视野,每个视野计数 100 个细胞,利用染色强度等级和阳性细胞得分率进行综合分析,得分在 3 分及以上者为阳性表达。对纳入患者进行随访,对其总生存期(OS)和无病生存期(DFS)进行观察和比较。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析,计数资料采用百分比的形式表示,应用 χ^2 检验进行比较;计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,两组之间比较应用独立样本 t 检验进行处理,OS 和 DFS 的比较采用 Kaplan-Meier 生存分析法进行处理,采用 Log-rank 检验比较其差异是否具有统计学意义;应用 Cox 风险模型分析对影响 OS 和 DFS 的因素进行分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDCD4、Livin 蛋白表达阳性率的比较 3 种组织标本中 PDCD4 和 Livin 蛋白表达阳性率比较差异均有统计学意义($\chi^2=48.033, 60.442, P<0.05$)。其中,肿瘤组织中 PDCD4 表达阳性率显著低于癌旁组织或正常乳腺组织,比较差异均有统计学意义($\chi^2=26.613, 32.000, P<0.05$),而癌旁组织与正常乳腺组织中的 PDCD4 表达阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2=0.444, P>0.05$);肿瘤组织中 Livin 蛋白表达阳性率显著高于癌旁组织或正常乳腺组织,癌旁组织中的 Livin 蛋白表达阳性率显著高于正常乳腺组织,比较差异均有统计学意义($\chi^2=14.614, 57.353, 19.048, P<0.05$)。

2.2 TNBC 组织中 PDCD4、Livin 蛋白表达与临床病理特征的相关性 TNBC 组织中 PDCD4 表达情况与肿瘤直径、淋巴结转移数量、临床分期、腋下淋巴结转移、脉管癌栓等临床病理特征有关 ($\chi^2 = 26.936、13.210、22.774、27.463、5.803, P < 0.05$), TNBC 组织中 Livin 蛋白表达情况与淋巴结转移数量、临床分期、腋下淋巴结转移、脉管癌栓等临床病理特征有关 ($\chi^2 = 10.788、6.160、27.350、8.914, P < 0.05$)。

表 1 本组患者 OS 和 DFS 的比较

指标	估计值	标准误	95%CI	
			上限	下限
OS(月)	56.420	3.665	49.237	63.603
DFS(月)	47.748	3.582	40.727	54.769

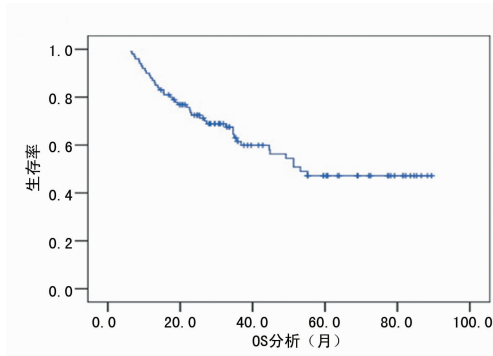


图 1 Kaplan-Meier 生存分析曲线

表 2 不同 PDCD4 表达情况患者的 OS、DFS 的比较(月)

项目	指标	估计值	标准误	95%CI	
				上限	下限
PDCD4 阴性	OS	37.705	4.634	28.662	46.789
	DFS	15.600	4.796	6.201	24.999
PDCD4 阳性	OS	73.076	3.987	65.261	80.890
	DFS	63.028	4.040	55.109	70.946

表 3 不同 Livin 表达情况患者的 OS、DFS 的比较(月)

项目	指标	估计值	标准误	95%CI	
				上限	下限
Livin 阴性	OS	77.119	3.831	69.690	84.708
	DFS	66.211	4.122	58.133	74.290
Livin 阳性	OS	40.330	4.641	31.233	49.426
	DFS	21.300	6.662	8.243	34.357

2.3 TNBC 组织中 PDCD4、Livin 蛋白表达与预后的相关性 本组 100 例病例的 OS、DFS 及其 95%CI 见表 1、图 1。不同 PDCD4、Livin 蛋白表达情况患者的 OS、DFS 比较:PDCD4 表达阴性患者的 OS、DFS 显著低于 PDCD4 表达阳性患者,Livin 蛋白表达阳性患者的 OS、DFS 显著低于 Livin 表达阴性患者,以上差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 23.931、19.163、22.649、$

17.213, $P < 0.05$), 见表 2、3, 图 2、3。

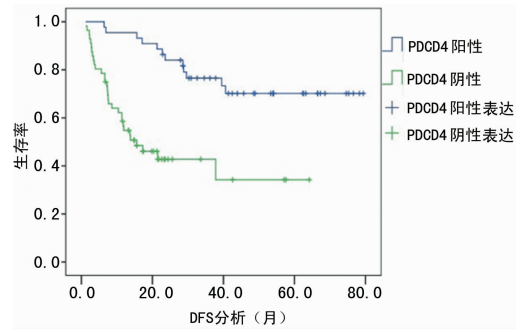


图 2 不同 PDCD4 表达情况患者 DFS 的 Kaplan-Meier 生存分析曲线

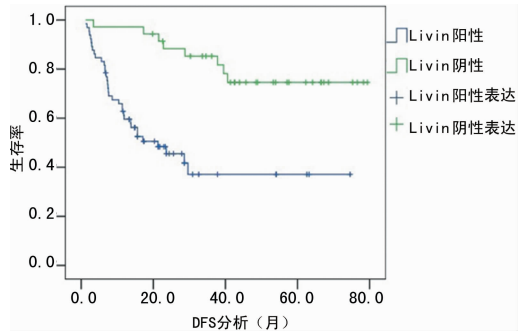


图 3 不同 Livin 蛋白表达情况患者 DFS 的 Kaplan-Meier 生存分析曲线

2.4 TNBC 患者预后的相关因素分析 Cox 风险模型分析结果显示, TNBC 患者的 OS 与年龄 ($RR = 1.405$)、临床分期 ($RR = 2.897$)、肿瘤直径 ($RR = 2.722$)、腋下淋巴结转移 ($RR = 2.516$)、脉管癌栓 ($RR = 3.020$)、PDCD4 表达 ($RR = 1.752$)、Livin 表达 ($RR = 2.051$) 等因素均具有相关性 ($P < 0.05$), 患者的 DFS 与临床分期 ($RR = 2.756$)、腋下淋巴结转移 ($RR = 2.437$)、PDCD4 表达 ($RR = 1.649$)、Livin 表达 ($RR = 1.804$) 等因素均具有相关性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究结果说明 TNBC 组织中存在 PDCD4 的低表达和 Livin 蛋白的过表达, 且它们的表达情况与肿瘤的临床病理特征具有一定的相关性。PDCD4 的低表达和 Livin 蛋白的过表达可导致患者生存期的缩短和预后的恶化, PDCD4 和 Livin 蛋白有望成为预测 TNBC 预后的新型分子标志物。

PDCD4 基因定位于人类染色体 10q24, 在许多肿瘤组织及细胞中均表达下调甚至丧失, 低表达的 PDCD4 能够促使肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[4]。在一般情况下, 低表达的 PDCD4 提示肿瘤患者的不良预后, 上调 PDCD4 表达会增加细胞对某些抗肿瘤药物的敏感性, 因此, PDCD4 有望作为潜在靶点广泛应用于肿瘤的诊断和靶向治疗^[5]。相关研究结果显示, PDCD4 表达缺失可能通过增加赖氨酰氧化酶的活性而促进乳腺癌细胞的浸润, PDCD4 表达缺失可能导致 TNBC 的高侵袭性^[6]; 也有研究显示, PDCD4 可作为抑

癌基因 P53 mRNA 翻译的调节因子,其低表达可直接导致 P53 mRNA 的翻译水平和表达量的下调,是导致 PDCD4 表达缺失的 TNBC 预后较差的重要原因^[7];同时,有研究者发现,PDCD4 表达的缺失可导致缺乏特异性治疗靶点的 TNBC 对多柔比星及紫杉醇等常规化疗药物的耐药^[8]。

Livin 是凋亡抑制蛋白家族(IAPs)最新的成员之一,特异性表达于人的胚胎组织及大多数人类实体瘤细胞和组织,在正常成人终末分化组织中低或无表达^[9]。Livin 主要通过抑制胱天蛋白酶 23/27/29(Caspase-23/27/29)的活性来阻断细胞凋亡过程,Livin 可通过死亡受体、线粒体等途径参与细胞凋亡的调节,参与肿瘤的发生、发展^[10]。近年发现诱导产生特异性地识别 Livin 的抗体可抑制、杀死肿瘤细胞,可作为一个新型的靶点应用于肿瘤研究^[11]。相关研究结果显示,乳腺癌中 Livin 表达上调与乳腺癌的发生、发展及转移、浸润密切相关,并与患者的术后生存率具有相关性^[12]。与非 TNBC 相比,Livin 在 TNBC 异常表达更为显著,这提示了分析 Livin 的表达水平对于评估 TNBC 的进展程度及预后更有意义^[13]。针对 Livin 设计并合成的反义核酸序列转染细胞株阻止 Livin mRNA 表达,以促进肿瘤细胞的凋亡,发挥抗肿瘤作用,这可能成为 TNBC 靶向治疗的新方向^[14]。

参考文献

- [1] QIU J, XUE X, HU C, et al. Comparison of clinicopathological features and prognosis in triple-negative and non-triple negative breast cancer[J]. *J Cancer*, 2016, 7(2): 167-173.
- [2] HURVITZ S, MEAD M. Triple-negative breast cancer: advancements in characterization and treatment approach[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28(1): 59-69.
- [3] MATT L, MOZAYEN M, GRESS T, et al. Outcome analysis of patients with triple negative breast cancer treated at marshall university[J]. *W V Med J*, 2015, 111(5): 30-34.
- [4] 陈泓伯. 外源性抑癌基因 PDCD4 在人肺癌细胞系的表达及其对肺癌细胞生长的影响[D]. 山东大学, 2016, 14(9): 465-469.
- [5] DOU X, WANG R B, MENG X J, et al. PDCD4a as a predictor of sensitivity to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2): 825-830.
- [6] ZHEN Y, LI D, LI W, et al. Reduced PDCD4 expression promotes cell growth through PI3K/Akt signaling in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Res*, 2016, 23(1): 61-68.
- [7] LIWAK-MUIR U, DOBSON C C, NAING T, et al. ERK8 is a novel HuR kinase that regulates tumour suppressor PDCD4 through a miR-21 dependent mechanism[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 1439-1450.
- [8] CHEN Z, YUAN Y C, WANG Y, et al. Down-regulation of programmed cell death 4 (PDCD4) is associated with aromatase inhibitor resistance and a poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 152(1): 29-39.
- [9] GU J, REN L, WANG X, et al. Expression of livin, survivin and caspase-3 in prostatic cancer and their clinical significance[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 14034-14039.
- [10] LIN X, LI H R, LIN X F, et al. Silencing of Livin inhibits tumorigenesis and metastasis via VEGF and MMPs pathway in lung cancer[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 657-667.
- [11] ZHAO X, YUAN Y, ZHANG Z, et al. Effects of shRNA-silenced livin and survivin on lung cancer cell proliferation and apoptosis[J]. *J BUON*, 2014, 19(3): 757-762.
- [12] ZOU A M, WANG H F, ZHU W F, et al. Effect of RNAi-mediated silencing of Livin gene on biological properties of colon cancer cell line LoVo[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 3832-3841.
- [13] 杜江, 钟红, 宋海涛, 等. Livin 在乳腺癌、乳腺原位癌和乳腺组织中的表达分析[J]. *新疆医学*, 2016, 46(8): 945-948.
- [14] BARTON V N, D'AMATO N C, GORDON M A, et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(3): 769-778.
- [15] SCHABUS D, PUCHER M, HOFER G. Joint audiovisual hidden Semi-Markov Model-Based speech synthesis[J]. *IEEE J Sel Top Signal Process*, 2014, 8(2): 336-347.
- [16] 李令, 陈丽, 吕小玲. 个性化视听分散干预对术前等候区患者焦虑及生命体征影响的研究[J]. *中国当代医药*, 2016, 23(17): 183-185.

(收稿日期:2017-10-13 修回日期:2017-12-18)

(上接第 1331 页)

- [13] DE HAAN J J, WINDSANT I V, LUBBERS T, et al. Prevention of hemolysis-induced organ damage by nutritional activation of the vagal anti-inflammatory reflex[J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(11): e361-367.
- [14] 李亚玲, 叶云, 易艺, 等. 地西洋联合阿托品预防吻合器痔上黏膜环切术中牵拉反射的效果[J]. *广东医学*, 2016, 37(16): 2486-2489.

(收稿日期:2017-09-23 修回日期:2017-12-21)