

凋亡抑制基因 *livin* 在食管癌中的表达

黄青远,赵志龙,崔肃,陈东义,张林

(中国医科大学附属第一医院胸外科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的:探讨凋亡抑制蛋白 *livin* 在食管癌组织中的表达及其与食管癌临床病理的相关性。方法:采用 RT-PCR 结合银染技术检测食管癌组织中 *livin*- α mRNA 和 *livin*- β mRNA 的表达。结果:36 例食管癌组织中 *livin* 表达阳性率为 50%,其表达与癌组织浸润深度和淋巴结转移有关($P < 0.05$),而与癌组织分化程度无关($P > 0.05$)。18 例癌旁正常食管组织中 *livin* 低表达,阳性率为 5.6%,与食管癌组织比较差异十分显著($P < 0.01$)。结论:*livin* 在食管癌组织中异常表达,有望成为食管癌诊断和基因治疗的新靶点。

[关键词] *livin* 基因;食管癌;逆转录-聚合酶链反应

[中图分类号] R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-4646(2007)05-0611-02

Expression of *livin* gene in esophageal cancer

HUANG Qing-yuan, ZHAO Zhi-long, CUI Su, CHEN Dong-yi, ZHANG Lin

(Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of *livin* in esophageal cancer, and to explore its relationship with the clinical pathology of esophageal cancer. **Methods:** The expressions of *livin*- α and *livin*- β mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction combined with silver staining technique in 36 patients with esophageal cancer. **Results:** The positive expression rate of *livin* mRNA in the tumor tissues was 50.0%. The expression of *livin* was correlated with the depth of invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$), not the histological grade. The positive expression rate of *livin* in the para-cancerous tissues was 5.6%. **Conclusion:** Aberrant expression of *livin* may be a new target for the diagnosis and gene treatment of esophageal cancer.

[Key words] *livin* gene; esophageal cancer; reverse transcription polymerase chain reaction

livin 是最近发现的凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族中的新成员,其基因位于染色体 20q13.3,全长 4.6 kb,有 α 及 β 两种异构体,分别编码长度为 298 及 280 个氨基酸的蛋白质^[1-3]。近期研究表明,*livin* 在某些恶性肿瘤中异常表达,但该基因与食管癌关系至今国内外未见报道。本试验采用 RT-PCR 结合银染技术方法对食管癌组织中 *livin* 表达情况进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 病例标本 36 例食管癌手术标本及部分相应的癌旁 6 cm 以上正常食管组织标本 18 例均来自我院胸外科,男 33 例,女 3 例,年龄 41~66 岁,平均年龄 54.9 岁。36 例肿瘤组织中,3 例低分化,18 例中分化,15 例高分化。其中食管鳞癌 35 例,食管腺癌 1 例,18 例有淋巴结转移。所有患者术前均未行放疗、化疗,手术标本取材后立即放入液氮罐保存。

1.2 引物设计及试剂 PCR 引物由大连 Takara

宝生物公司合成。引物设计:根据 GenBank 的基因序列,采用 Oligo5.0 软件设计引物序列如下:*livin* 上游引物为 5'-catgggtctccgtccctg-3',下游引物为 5'-caggagcccactctgca-3';PCR 产物长度:*livin*- α 为 368 bp,*livin*- β 为 314 bp。内参照 β -actin 上游引物为 5'-atcatgttgagacctcacca-3',下游引物为 5'-catctcttctcgaagtcca-3';PCR 产物长度为 318 bp。

1.3 RT-PCR 采用 Trizol 试剂一步法提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定纯度并定量。反应条件:94 °C 5 min 预变性;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1min,35 个循环;72 °C 5min 后结束扩增反应。取 2 μ l PCR 产物与 2 μ l Lodding Buffer 混合,进行 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,100 V 1.5 h,电泳结束后,凝胶进行银染,凝胶成像仪成像分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS11.0 软件进行统计分析,两样本率的比较用 χ^2 检验。

2 结 果

RT-PCR 检测食管癌组织 癌旁正常食管组织 *livin* mRNA 表达情况 36 例食管癌组织中有 18 例 *livin* mRNA 表达(阳性率为 50%),两种异构体基本

[作者简介] 黄青远(1970-),男,主治医师,博士。

E-mail:hqylhjj@163.com

同时表达,但 *livin-α* 表达稍高于 *livin-β*,而 18 例癌旁正常组织仅有 1 例 *livin* mRNA 表达 (阳性率为 5.6%)。在食管癌组织中,*livin* mRNA 的表达与癌组织浸润深度及淋巴结转移有关,而与癌组织分化程度无关。见图 1、图 2、表 1。

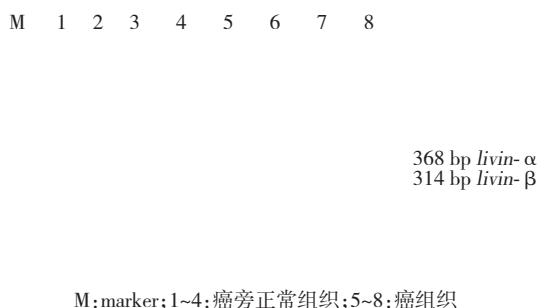


图 1 RT-PCR 检测 *livin* mRNA 表达情况
Fig.1 The expression of *livin* mRNA was measured by RT-PCR

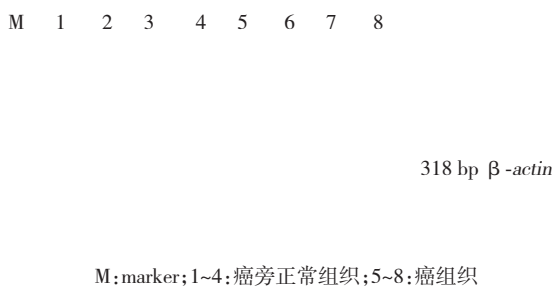


图 2 RT-PCR 检测 β -actin mRNA 表达情况
Fig.2 The expression of β -actin mRNA was measured by RT-PCR

表 1 *livin* mRNA 在食管癌中的表达与生物学特性的关系
Tab.1 The expression of *livin* mRNA in esophageal carcinoma and its relationship with clinical pathology of esophageal carcinoma

病理分类	<i>n</i>	阳性例	阳性率 (%)	<i>P</i>
组织类型				
癌旁正常食管组织	18	1	5.6	<0.01
食管癌组织	36	18	50.0	
癌组织分化程度				
高	15	6	40.0	>0.05
中	18	10	55.6	
低	3	2	66.7	
癌组织浸润深度				
肌层	23	8	34.8	<0.05
外膜	13	10	76.9	
淋巴结转移				
无	18	5	27.8	<0.05
有	18	13	72.2	

3 讨论

人类 IAP 家族现已有 8 个成员,即 NAIP, XIAP (ILP-1/MIHA), cIAP-1 (HIAP- 2/MIHB), cIAP-2 (HIAP-1/MIHC), Survivin (TIAP), Apollon (Bruce), ILP-2 (Ts-IAP) 和 *livin* (ML-IAP/ KIAP)^[4]。*livin* 是 IAP 家族中的新成员,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,在正常成人组织中低或无表达,提示该基因可能在肿瘤的发生和发展中起着重要作用^[1,5]。同时,这种肿瘤特异性表达使其成为近几年肿瘤诊断和基因治疗研究的新靶点。目前,已有在浅表性膀胱癌、胃肠道肿瘤和肺癌等实体瘤组织中检测出 *livin* 异常表达的研究报道^[6-10],但对 *livin* 和食管癌关系的研究国内外尚未见报道。

本实验中利用 RT-PCR 结合银染技术方法,以 β -actin 为内参照,检测了食管癌组织和癌旁正常食管组织中 *livin* 的表达,结果显示:36 例食管癌组织中有 18 例 *livin* 表达 (阳性率为 50%),两种异构体基本同时表达,但 *livin-α* 表达稍高于 *livin-β*,而 18 例癌旁正常组织仅有 1 例 *livin* 表达 (阳性率为 5.6%)。*livin* 在肿瘤中的阳性表达率明显高于在癌旁正常组织中的阳性表达率 ($P < 0.01$)。这一结果表明,*livin* 的异常表达与食管癌关系密切,参与了食管癌的发生。本实验的研究结果还发现,*livin* 的表达与癌组织浸润深度及淋巴结转移有关:浸润外膜患者 *livin* 阳性率显著高于浸润肌层患者,有淋巴结转移患者 *livin* 阳性率显著高于无淋巴结转移患者,表明 *livin* 基因的表达与癌组织浸润深度及淋巴结转移呈正相关,而与癌组织分化程度无关,这一结果提示 *livin* 也参与了食管癌的演进,有可能作为预后不良的一个参考指标之一。

最近 CRNKOVIC-MERTENS 等^[11]报道,应用 RNA 干扰技术使内源性表达的 *livin* 基因沉默能导致 caspase-3 活性增强,并且显著提高不同凋亡刺激因子如阿霉素、紫外线照射和 TNF- α 的凋亡率。另外,干扰 *livin* 表达质粒的稳定转染选择性抑制了表达 *livin* 肿瘤细胞的生长。这提示利用反义寡核苷酸、siRNA 技术或免疫介导途径使 *livin* 基因沉默,对于表达 *livin* 的肿瘤来说,*livin* 或许能成为一个治疗靶点。

目前对 *livin* 的研究刚刚起步,还有许多问题尚未阐明,但相信随着研究的进一步深入,由于其既参与食管癌的发生又参与食管癌的进展,因此 *livin* 有望成为食管癌诊断和基因治疗的新靶点,为食管癌的诊断治疗开辟一条新途径。

(下转第 615 页)