

凋亡抑制蛋白 Livin 在大肠腺瘤-癌序列中的表达差异及意义

王永 宋怡才 尹作文 喻军 刘军辉 李一帆 郭梅梅

【摘要】 **目的** 探讨凋亡抑制蛋白 Livin 在大肠癌、大肠腺瘤及正常大肠黏膜中的表达差异及在不同临床病理特征的大肠癌中的表达差异。**方法** 应用免疫组化 ABC 法检测 Livin 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤及大肠癌中的表达部位;应用实时荧光定量聚合酶链反应法检测 Livin mRNA 在 64 例大肠癌、36 例大肠腺瘤及 12 例正常黏膜中表达量的差异及其意义。**结果** (1)Livin 在正常大肠黏膜中不表达,在大肠腺瘤组织中,Livin 少量表达在腺泡的底部,而在大肠腺癌组织中呈全层上皮高表达,但两者在 Livin mRNA 水平上的表达量差异有统计学意义($P=0.001$)。大肠腺瘤与正常黏膜相比较,Livin mRNA 表达上调,但差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)在大肠癌组织中,Livin mRNA 在直肠癌组中表达高于结肠癌组($P=0.001$),Livin mRNA 表达与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度、Duke's 分期、淋巴转移及肿瘤组织类型无关,与肿瘤浸润深度有相关性。**结论** (1)凋亡抑制蛋白 Livin 参与了大肠肿瘤的发生,且在大肠腺瘤-腺癌阶段起到了作用。(2)Livin 基因在直肠癌中表达更高,其高表达与大肠癌的浸润密切相关。

【关键词】 结直肠肿瘤; 腺瘤; 逆转录聚合酶链反应; 凋亡抑制蛋白质类

Expression of Livin mRNA in colorectal carcinoma, adenoma, and normal colorectal mucosa and its clinical significance WANG Yong, SONG Yi-cai, YIN Zuo-wen, YU Jun, LIU Jun-hui, LI Yi-fan, GUO Mei-mei. Department of Gastrointestinal Surgery, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, China

Corresponding author: WANG Yong, Email: wydoctor1974@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression differences of Livin mRNA and protein among colorectal adenocarcinoma, colorectal adenoma and normal mucosa, and among different clinicopathological types of adenocarcinomas. **Methods** 112 specimens, including 36 colorectal adenomas, 64 colorectal adenocarcinoma, and 12 normal mucosa were included. Each specimen was divided into two parts, one for immunohistochemistry and the other for real-time RT-PCR. Expression differences of Livin mRNA among colorectal adenocarcinoma, adenoma and normal colonic mucosa were evaluated by REST-XL[®] software. **Results** The expression of Livin was examined in the basal third to half of the colorectal crypts in adenomas, while throughout the epithelium in the colorectal adenocarcinomas, and not examined in the normal mucosa. However, the expression of Livin mRNA in the adenocarcinomas was significantly higher than that in the adenomas ($P=0.001$). The significant difference of Livin mRNA expression between adenomas and normal mucosa were not obtained by REST-XL[®] software ($P>0.05$). The expression of Livin mRNA in rectum cancer was significantly higher than that in colonic cancer ($P=0.001$), Livin mRNA expression in cancer's invasive depth at serosa or penetrate the serosa was significantly elevated than those cancer which encroach into submucosa or proper muscle ($P=0.009$), and Livin mRNA expression was no correlation with patient's age, sex, and tumor's type, degree of cell differentiation, lymph nodes metastasis, pathologic category, Duke's stage. **Conclusions** The difference in expression of Livin between adenoma and

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.08.083

基金项目: 深圳市科技计划项目(201003280)

作者单位: 518052 深圳, 广东医学院附属南山医院胃肠外科(王永、宋怡才、尹作文、喻军、刘军辉), 中心实验室(李一帆), 消化内科(郭梅梅)

通讯作者: 王永, Email: wydoctor1974@yahoo.com.cn

adenocarcinoma indicated the potential value of it in carcinogenesis of colorectal cancer .

【Key words】 Colorectal neoplasms adenoma ; Adenoma ; Reverse transcriptase polymerase chain reaction ; Inhibitor of apoptosis proteins

大肠癌是目前全球最为高发的恶性肿瘤之一,且发生率逐年增高^[1]。大多数大肠癌的发生都经过了正常黏膜-腺瘤-癌的过程,细胞凋亡的异常在大肠癌的发生、发展过程中起到重要作用^[2-4]。Livin 是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAP)成员之一。Livin 在人体的大多数正常组织中不表达或低表达,而在大多数恶性肿瘤中表达,研究表明 Livin 可能和其他凋亡抑制蛋白一样通过抵抗凋亡而参与了肿瘤的发生^[5-9]。本实验将探讨 Livin 在结直肠良、恶性肿瘤中的表达变化,尤其是在腺瘤中的表达情况及 Livin 与大肠癌临床病理特征之间的关系。

材料与方 法

一、材料来源

选取 2006 年 1 月至 2009 年 12 月广东医学院附属南山医院胃肠外科开腹手术患者及门诊纤维肠镜患者切除的标本,其中大肠癌 64 例、大肠腺瘤 36 例。所有病例术前均未行放、化疗,并从 64 例大肠癌术后标本中取 12 例近端超过 10 cm 的正常黏膜作对照。术后标本均经病理证实,且有完整的临床和病理资料,组织标本实时保存于 -70 ℃ 冰箱内。

二、大肠癌标本临床病理特征及组织形态学分类、分级

本组 64 例大肠癌患者中,男 34 例,女 30 例;≥60 岁 33 例, <60 岁 31 例,平均年龄 57.2 岁(21 ~ 80 岁);直肠癌 47 例,结肠癌 17 例;根据其分化程度,高/中分化腺癌 54 例,低分化腺癌 10 例;管状/乳头状腺癌 51 例,黏液腺癌/印戒细胞癌 13 例;根据其肿瘤浸润深度,侵及黏膜下层-肌层 23 例,侵及全层或穿透浆膜外 41 例;按照肿瘤的大体肉眼观,溃疡型 30 例,蕈伞型 34 例;病理学检测报告显示伴有淋巴结转移 27 例,不伴有淋巴结转移 37 例;临床病理 Duke's 分期 A + B 期 37 例, Dukes 分期 C1 + C2 期 27 例。

三、免疫组化检测 Livin

收集上述病例的手术切除标本蜡块 5 μm 切片,用 SP 法行免疫组织化学染色以检测大肠癌、腺瘤及正常组织中 Livin 的表达情况。抗 Livin 单抗购自武汉博士德公司,工作浓度为 1:200, DAB 显色, Mayer 苏木素复染,中性树胶封片, PBS 代替一抗作为阴性对照。

四、实时荧光定量 PCR 方法(RT-PCR)测 Livin mRNA

1. 组织总 RNA 的提取:采用 Trizol(深圳晶美生物工程有限公司)一步法抽提组织总 RNA。实验步骤严格按照试剂说明书进行。紫外分光光度仪测定 RNA 的量,琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的完整性。-70 ℃ 冻存。

2. cDNA 的制备:使用 TaKaRa 逆转录试剂盒(大连生宝生物工程有限公司)进行逆转录反应。取 1 μg 的总 RNA, 2.5 mmol/L Random hexamers 加水至 14 μl, 70 ℃ 反应 5 min, 迅速置冰水冷却, 再加入 10 mmol/L dNTP 混合液 1 μl, 20 U RNasin, 100 U M-MLV 和 5 × M-MLV 缓冲液, 总体积 20 μl, 混合。反应条件:20 ℃ 10 min, 42 ℃ 1 h, 95 ℃ 10 min 终止反应。

3. 引物及 Taqman 探针:引物及探针均由本室设计,由大连生宝生物工程有限公司合成。Livin 基因的上游引物为 5'-GGCGTGGTGGTCTTGA-3', 下游引物为 5'-CGCACGGCACAAGACGA-3', Taqman 探针为 5'-FAM-CTCTCCAGCATCACGCGGA-TAMRA-3'。看家基因 β-actin 的上游引物为 5'-CCTCAAGATCATCAGCAAT-3', 下游引物 5'-CCATCCACAGTCTTCTGGGT-3', Taqman 探针 5'-FAM-ACCACAGTCCATGCCATCAC-TAMRA-3'。

4. RT-PCR:样品在 iQcyler iQ 荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行扩增。采用相对定量法,在测定目的基因的同时测定内源性看家基因 β-actin,用以标准化标本。取 cDNA 1 μl, 依次加入 1 × PCR 缓冲液, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.3 mmol/L dNTP, 0.16 μmol/L Taqman 探针, 上、下引物各 0.33 μmol/L, 1.25 U Taqman 聚合酶(大连生宝生物工程有限公司), 反应体系为 30 μl。反应条件:95 ℃ 5 min; 95 ℃ 20 s, 56 ℃ 30 s, 共

50个循环。反应结束由计算机自动计算定量结果。

五、统计学处理

采用新开发的 REST-XL[®] 软件作基因表达的相对定量统计学分析^[10-11]。不同的大肠癌分化程度、病理类型及临床特征分类的 Livin mRNA 表达的比较采用 REST-XL[®] 软件做两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、免疫组化法 Livin 在大肠癌、腺瘤、正常黏膜中的表达

在免疫组化中, Livin 棕黄色信号颗粒在细胞质及细胞核中均有表达; 在大肠腺瘤, Livin 少量表达在腺泡的底部, 而在大肠癌组织中 Livin 蛋白则呈全层高表达(图 1A、B); 在 12 例正常大肠黏膜组织中 Livin 均无表达(图 1C)。

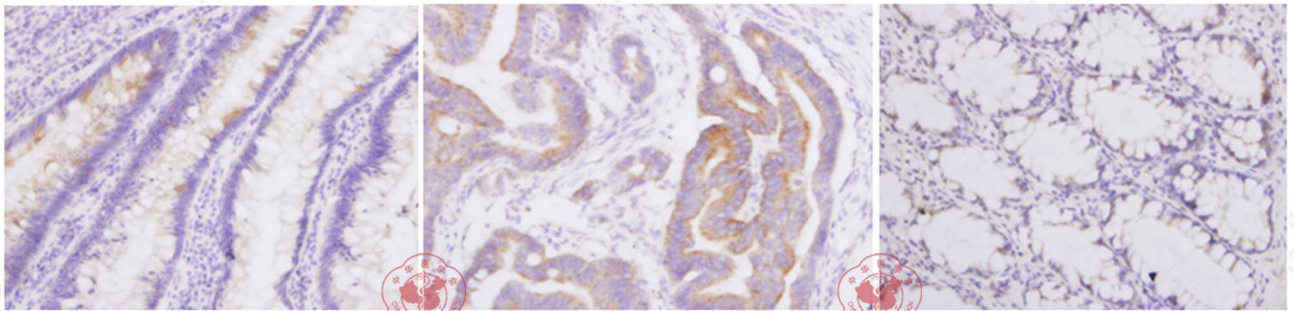


图1A 绒毛状腺瘤Livin (×400)

图1B 直肠中分化腺癌Livin (×200)

图1C 正常黏膜组织Livin (×200)

二、RT-PCR 测定 Livin mRNA 在大肠癌、腺瘤及正常黏膜中的表达定量

1. 大肠癌和大肠腺瘤中 Livin 的表达差异: 分别把 36 例大肠腺瘤和 64 例大肠癌的 Livin mRNA 和 β -actin 值输入 REST-XL[®] 软件, 分析显示, 大肠癌组织中 Livin mRNA 的水平比大肠腺瘤组上调 12.465, 且两组间差异有统计学意义 ($P = 0.001$)。

2. 大肠腺瘤和正常黏膜中 Livin 的表达差异: 分别把 36 例大肠腺瘤和 12 例正常黏膜的 Livin mRNA 和 β -actin 值输入 REST-XL[®] 软件, 分析显示, 大肠腺瘤组织中 Livin mRNA 的表达比正常黏膜组上调 3.659, 但两组间差异无统计学意义 ($P = 0.196$)。

3. Livin 的表达与大肠腺瘤临床病理特征的关系: 结直肠癌中 Livin mRNA 的表达水平与肿瘤浸润深度及肿瘤发生部位有关 ($P < 0.05$); 结直肠癌中 Livin mRNA 的表达水平与患者年龄、性别、肿瘤大体类型、淋巴结转移、肿瘤细胞分化程度、肿瘤病理类型以及 Duke's 分期无关 ($P > 0.05$, 表 1)。

讨 论

多数大肠癌的发生都经过了正常黏膜-腺瘤-癌的过程, 细胞凋亡和增殖的失衡是肿瘤发生的重要原因之一, 不断理解肿瘤细胞凋亡阻滞的调节机制, 有望为肿瘤治疗新策略的建立提供理论基础^[3,4,12-14]。Livin 是 IAP 成员之一, 研究表明, Livin 通过调节半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-3、Caspase-7 和 Caspase-9 可抵抗多种凋亡前体诱导的凋亡。降低或消除 Livin 基因在肿瘤细胞中的过度表达, 可解除 Livin 对肿瘤细胞凋亡的抑制作用, 促进肿瘤细胞死亡和增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[15-17]。

在我们的本次研究中, 通过免疫组化研究显示, Livin 蛋白在正常大肠黏膜不表达, 在大肠腺瘤中微量表达, 而在大肠癌组织中高表达, 而 RT-PCR 结果显示大肠癌、腺瘤和正常大肠黏膜中均存在 Livin mRNA 的表达。提示在正常黏膜细胞, 细胞内虽然有少量的 Livin mRNA 存在, 但没有 Livin 蛋白的表达。这与 Vucic 等^[8]人在乳腺癌中的研究结果类似。我们推测认为, 对于正常黏膜细胞, 细胞的凋亡并没有受到 Livin 的调控。而在大肠腺瘤阶段, 由于 Livin mRNA 的表达上调, 已经有少量 Livin 蛋白的表达, 并且仔细观察发现大肠腺瘤的 Livin 蛋白表达主要集中在增殖相对活跃的腺泡底部, 细胞增生活跃而凋亡受到抑制。这些现象说

明, Livin 蛋白表达在大肠肿瘤的发生过程中起了作用, Livin 蛋白抑制了细胞的凋亡, 延长了肿瘤细胞的生长期, 增加了这些细胞发生其他基因突变的机会, 从而有利于结直肠癌的发生。

通过分析大肠癌 Livin mRNA 表达结果与临床病理特征的关系, 我们发现大肠癌 Livin mRNA 表达结果与肿瘤浸润深度和肿瘤发生部位有关。按大肠癌浸润深度不同, 我们把结直肠癌分为侵及黏膜下层-肌层和侵及全层或穿透浆膜外两组, 两组间比较 Livin mRNA 表达有统计学差异。这提示我们 Livin 的基因表达可能和肿瘤的侵袭能力有一定的关系。我们按肿瘤发生部位不同, 分为结肠癌组和直肠癌组, Livin 的表达在两组间有统计学差异, 这提示我们直肠癌和结肠癌在 Livin 的基因表达上可能存在一定的差异, 但由于本组研究中, 直肠癌病例纳入偏少仅有 17 例, 不排除统计学偏差的可能, 该结果尚待进一步加大样本量研究确证。同时, 我们也按肿瘤不同分化程度、病理类型、有无淋巴转移、Duke's 分期及患者性别、年龄分组, 发现 Livin 的基因表达均无显著性差异 ($P > 0.05$), 这于 Kemphensteffen 等^[18] 在肾癌中的研究是类似的, 他们在研究了肾癌中 Livin 的表达后认为 Livin 的表达与肾癌的临床病理特征无明显相关性, 也不能评估肾癌患者的预后。

表 1 64 例大肠癌患者的临床病理因素与 Livin mRNA 表达的关系

临床病理因素	例数	randomization test by REST-XL [®] 上调倍数 ^a	P 值
年龄		1.61	0.164
≥60 岁	33		
<60 岁	31		
性别		1.81	0.057
男	34		
女	30		
肿瘤部位		3.025	0.001
结肠	17		
直肠	47		
肿瘤分化程度		1.41	0.419
高-中分化	54		
低分化	10		
淋巴结转移		1.05	0.878
阳性	27		
阴性	37		
病理类型		1.97	0.061
黏液腺癌	13		
管状和乳头状腺癌	51		
肿瘤大体类型		1.28	0.422
溃疡型	30		
增生型	34		
肿瘤浸润深度		2.24	0.009
黏膜下层或肌层	23		
全层或浆膜外	41		
Duke's 分期		1.05	0.889
C1 + C2	27	-	
A + B	37		

注:^a 上调倍数: 表示 Livin mRNA 表达通过看家基因(β -actin)归一化处理后不同临床病理类型腺癌分组之间的比较结果

本次研究证实凋亡抑制蛋白家族成员 Livin 基因在正常黏膜-腺瘤-癌序列中表达逐渐升高,且在结直肠腺瘤中,Livin 的蛋白已有表达在腺凹底部,这有望使 Livin 成为干预结直肠腺瘤-癌自然发生进程的一个新的分子靶点,提供了理论基础。相信通过对 Livin 抑制细胞凋亡机制的研究,开发针对 Livin 基因或蛋白的新型药物,有望在结直肠癌的治疗上获得新的突破。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57:43-66.
- [2] Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer*, 2001, 91:2026-2032.
- [3] Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and apoptosis. *Am J Surg*, 2006, 191:517-526.
- [4] Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, et al. Colon Cancer: genomics and apoptotic events. *Biol Chem*, 2004, 385:449-464.
- [5] Watson AJ. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 57:107-121.
- [6] Lin JH, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279:820-831.
- [7] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem*, 2001, 276:3238-3246.
- [8] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol*, 2000, 10:1359-1366.
- [9] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene*, 2003, 22:8330-8336.
- [10] Michael WP. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29:2002-2007.
- [11] Michael WP, Graham WH, Leo D. Relative expression software tool (REST-XL[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30:e36.
- [12] Tannapfel A, Neid M, Aust D, et al. The Origins of Colorectal Carcinoma: Specific Nomenclature for Different Pathways and Precursor Lesions. *Dtsch Arztebl Int*, 2010, 107:760-766.
- [13] Abdulamir AS, Hafidh RR, Mahdi LK, et al. Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. *BMC Cancer*, 2009, 9:403.
- [14] 德力格图, 张茂, 代建国. 比较 VEGF 及其受体 KDR 在结直肠腺瘤和腺癌中的表达及与预后的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2009, 3:746-755.
- [15] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment. *Cancer Letter*, 2007, 250:168-176.
- [16] 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. *Ann Oncol*, 2003, 14:85-90.
- [17] Choi J, Hwang YK, Sung KW, et al. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2007, 109:471-477.
- [18] Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, et al. Expression of the Apoptosis Inhibitor Livin in Renal Cell Carcinomas: Correlations with Pathology and Outcome. *Tumour Biol*, 2007, 28:132-135.

(收稿日期:2011-01-06)

(本文编辑: 戚红丹)

王永, 宋怡才, 尹作文, 等. 凋亡抑制蛋白 Livin 在大肠腺瘤-癌序列中的表达差异及意义[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(8): 2304-2308.