

文章编号:1005-6947(2008)09-0870-04

· 基础研究 ·

Livin mRNA 及 Bcl-2, p53 蛋白在胰腺癌中的表达

刘源, 白洁, 耿东华, 刘金钢

(中国医科大学附属盛京医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要:目的 探讨凋亡抑制蛋白 Livin 在胰腺癌组织中的表达及其与 Bcl-2 和 p53 蛋白表达的关系。方法 采用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)法检测 52 例胰腺癌和 12 例正常胰腺组织中 Livin mRNA 的表达;用免疫组织化学法检测胰腺癌组织中 Bcl-2 和 p53 蛋白的表达。结果 Livin mRNA 在胰腺癌中的表达率为 71.2%,明显高于正常胰腺组织($P < 0.01$)。Livin 基因表达与胰腺癌的分化程度和淋巴结转移有关($P < 0.05$)。Livin 基因表达与 Bcl-2 蛋白表达有关,而与 p53 蛋白无关。结论 Livin 基因在胰腺癌的发生发展中起重要作用;Livin 与 Bcl-2 的异常表达可能在胰腺癌的发生中起协同作用;Livin 基因过表达与抑癌基因 p53 的失活无关。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 870-873]

关键词: 胰腺肿瘤/遗传学;胰腺肿瘤/病理学;基因表达

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

Expression of Livin mRNA and Bcl-2, p53 proteins in pancreatic carcinoma

LIU Yuan, BAI Jie, GENG Donghua, LIU Jingang

(Department of the General Surgery, Shengjing Hospital China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of the apoptosis inhibitor Livin gene and its relationship with the expression of Bcl-2, p53 proteins in pancreatic carcinoma. **Methods** The expression of Livin mRNA was investigated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in pancreatic carcinoma tissue of 52 cases and normal pancreatic tissue of 12 cases. The expression of Bcl-2 and p53 was detected by immunohistochemical assay. **Results** The expression rate of Livin gene in pancreatic carcinoma tissue was 71.2%, which was obviously higher than that in normal pancreatic tissue ($P < 0.01$). There was relationship between Livin gene expression and the differentiation and lymph node metastasis of pancreatic carcinoma ($P < 0.05$). The expression of Livin gene was correlated with Bcl-2 expression, but was not with p53 expression. **Conclusions** Livin gene may play an important role in the pathogenesis of pancreatic carcinoma. The up-regulated expression of Livin and Bcl-2 may play synergetic roles in the process of carcinogenesis of pancreatic carcinoma. There was no relationship between Livin expression and dysfunction of p53.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9): 870-873]

Key words: Pancreatic Neoplasm / genet; Pancreatic Neoplasm / pathology; Gene Expression

CLC number: R 735.9

Document code: A

收稿日期:2008-04-17; 修订日期:2008-07-29。

作者简介:刘源,男,中国医科大学附属盛京医院讲师,主要从事肝胆胰肿瘤的基础研究及临床治疗方面的研究。

通讯作者:刘金钢 E-mail:surgliu2@yahoo.com.cn

胰腺癌是较常见的消化道恶性肿瘤之一,预后差。目前研究表明多种凋亡相关基因参与胰腺癌的发生、发展。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,特异性表达于人的胚胎组织及多种实体瘤细胞中。笔者检测 Livin mRNA 和 Bcl-2, p53 蛋白在胰腺癌组织的表达,旨在探讨 Livin 基因在胰腺癌发生、发展中的作用及其与 Bcl-2 和 p53 表达的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 分组及一般资料

1.1.1 胰腺癌组 收集中国医科大学附属盛京医院 2005 年 1 月—2006 年 12 月手术切除并经病理证实的胰腺癌标本 52 例。其临床病理学资料见表 1。所有患者术前未行放疗、化疗。

表 1 胰腺癌组织中 Livin 蛋白的表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	总例数	Livin 阳性表达		P 值
		例数	百分率(%)	
性别				
男	30	19	63.3	0.146
女	22	18	81.8	
年龄(岁)				
≥60	17	10	58.8	0.298
<60	35	27	71.1	
肿瘤直径(cm)				
≤2	16	10	62.5	0.557
>2	36	27	75.0	
分化程度				
高、中分化	28	16	57.1	0.016
低分化	24	21	87.5	
临床分期				
I ~ II	30	19	63.3	0.146
III ~ IV	22	18	81.8	
淋巴结转移				
阳性	19	17	89.5	0.027
阴性	33	20	60.6	

1.1.2 对照组 取同期手术切取经组织学检查证实的正常胰腺组织 12 例(标本取自胆管末端癌患者,男 7 例,女 5 例,年龄 42 ~ 69 岁,中位年龄

56 岁)作对照。

两组的每一标本分 2 块:1 块用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋;1 块液氮速冻后, - 70℃ 保存待用。

1.2 主要试剂

兔抗人 Livin 多克隆浓缩型抗体为美国 BIO-CHEMICALS 公司产口,抗体工作浓度为 1:100。Bcl-2 和 p53 单克隆抗体购自 Santa Cruze 生物技术公司。DAB 显色剂及通用型 UltraSensitive TMSB 超敏试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR 检测 Livin 基因表达 样品总 RNA 的制备:取组织 50 ~ 100 mg,采用 Trizol 法提取其中的总 RNA。cDNA 的合成:反应体系中加入提取的 RNA 5 μg, 2.5 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP) 4 μL,寡聚脱氧胸苷酸 0.3 μg, RNA 酶抑制剂 20 U, 0.1 mol/L 巯基乙醇 25 μL,加水至 19 μL。上述混合物 70 °C 加热 5 min 后,冰上冷却,然后加入 Moloney 小鼠白血病病毒逆转录酶 200 U, 5 × 逆转录酶缓冲液 5 μL,终体积 25 μL,离心、混匀后 37 °C 水浴 60 min,最后 90 °C 灭活逆转录酶活性,冰上冷却后即完成 cDNA 的合成。PCR 反应:cDNA 扩增 Livin 基因引物序列为 5'-CATGGTCTCCGTCTCG-3' (上游) 和 5'-CAGG-GAGCCCACTCCGT-3' (下游);内对照 β-actin 基因引物序列为 5'-CGCTGCGCTGGTCGTCGACA-3' (上游) 和 5'-GTCACGCACGATTTCCGCT-3' (下游)。在 25 μL 反应体系中含有 cDNA 1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 20 pmol/L 上、下游引物各 0.5 μL, Pfu DNA 聚合酶 1.25 U, 5 × Pfu DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL。反应条件为:94 °C 40 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min;共 32 个循环。以 β-actin 为内参照检测转录效率。用 2% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,溴化乙锭显色并照相。

1.3.2 免疫组织化学(免疫组化)法检测 Bcl-2 和 p53 蛋白表达 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组化方法,具体步骤参照说明书进行。以磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作阴性对照,用已知的阳性切片作阳性对照。

结果判断:Bcl-2 蛋白表达于细胞浆,p53 蛋白表达于细胞核。以细胞浆或细胞核出现棕黄色染色颗粒为阳性。每张切片随机选取 10 个高倍视野,每个高倍视野计数 100 个癌细胞,观察阳性细胞染色强度,计数阳性细胞百分数。首先按染色强度记分:0 分为无染色,1 分为浅染色,2 分为

中度染色,3分为强染色;再按阳性细胞所占的百分比记分:阳性细胞 $<5\%$ 为0分, $5\% \sim 25\%$ 为1分, $26\% \sim 50\%$ 为2分, $>50\%$ 为3分。两者之和0分为阴性(-),其余为阳性,1~2分为弱阳性(+),3~4分为阳性(++),5~6分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

应用SPSS12.0软件进行统计分析。组间差异采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin mRNA在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达

52例胰腺癌组织中Livin mRNA阳性表达率为71.2%,两种异构体表达量Livin β mRNA (67.3%)高于Livin α mRNA (61.5%),但差异无显著性($P > 0.05$)。正常胰腺组织中无Livin mRNA表达(图1)。胰腺癌组与对照组之间差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 Livin mRNA的表达与胰腺癌临床病理特征的关系

Livin mRNA的表达与胰腺癌的分化程度和淋巴结转移有关,分化程度低及有淋巴结转移者表

达率显著高于分化程度高及淋巴结无转移者。而Livin mRNA的表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期无关(表1)。

2.3 胰腺癌组织Livin基因表达与Bcl-2和p53蛋白表达的关系

Bcl-2在胰腺癌组织中的阳性表达率为34.6%(图2);Livin mRNA在Bcl-2阳性组中表达率为88.9%,显著高于Bcl-2阴性组(61.8%)($P < 0.05$)。p53在胰腺癌组织中阳性表达率为53.8%(图3),p53阳性和阴性组中Livin mRNA的阳性表达率分别为75.0%和66.7%,两者差异无显著性($P > 0.05$)。



图1 RT-PCR检测胰腺癌和正常胰腺组织Livin mRNA的表达 M: Marker; 1~8: 胰腺癌组织; 9~10: 正常胰腺组织

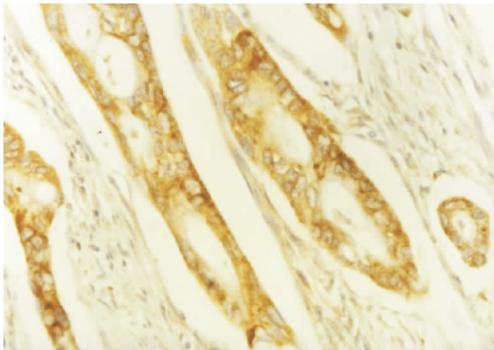


图2 Bcl-2在胰腺癌组织中的表达(SP×400)

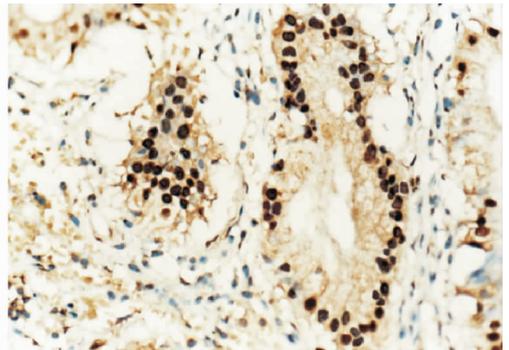


图3 p53在胰腺癌组织中的表达(SP×400)

3 讨论

Livin最初从人类胚肾cDNA文库中克隆而得,故称为肾凋亡抑制蛋白(kidney inhibitor of apoptosis protein, KIAP)^[1]。由于该基因在黑色素瘤细胞中高度表达,故也称为黑色素瘤凋亡抑制蛋白(melanoma inhibitor of apoptosis protein, ML-IAP)^[2]。Livin基因存在于染色体20q13.3,全长

4.6 kb,有 α 和 β 两种异构体,分别编码长度为298及280个氨基酸的蛋白质。两种蛋白质功能上无本质差别,均含有IAP家族成员特有的BIR和RING指结构域,BIR功能区是IAP家族发挥抗凋亡活性的必需结构^[3]。

Livin在正常成人组织中低表达或无表达,在多种肿瘤组织中高表达。提示该基因可能通过抑制细胞凋亡,在肿瘤的发生和发展中起重要作用

用^[4]。目前普遍认为, Livin 抑制细胞凋亡是通过直接抑制凋亡蛋白酶(caspases) 而实现的。Vucic 等^[2] 研究发现 Livin 可与 caspase3, caspase9 及 caspase9 前体发生免疫共沉淀现象, 由此推断 Livin 可以通过抑制 caspase3 及 caspase9 的活性而抑制细胞凋亡。Kasof 等^[4] 用 [35 -] S-甲硫氨酸标记的 Livin 与活化的 caspase3 及 caspase7 混合孵育后, 再用 caspase3 及 caspase7 抗体检测, 发现这两种 caspase 明显减少。进一步说明 Livin 抑制细胞凋亡的作用是通过抑制 caspases 的活性而实现的。最新的研究也表明: Livin 的抗凋亡作用还受到线粒体释放的 caspase 活化蛋白(SMAC) 的调节^[5]。SMAC 同时也是 IAPs 拮抗剂。在体内以抗凋亡信号转导为主的情况下, Livin 大量表达。Livin 通过与 SMAC 结合而中和 SMAC 的 caspase 活化蛋白的活性, 从而使多种 caspases 未能活化而发挥抗凋亡作用。然而, 在体内以促凋亡信号转导为主的情况下, SMAC 即会从线粒体中大量释放, 与 Livin 特异性地结合, 并占据 Livin 发挥活性的 BIR 结构域, 从而使 Livin 抗凋亡的作用大大降低^[6]。由此可见, 在凋亡中 Livin 与 SMAC 是相互作用、相互制约的。Ashhab 等^[7] 研究还发现, Livin α 和 Livin β 在抗凋亡机制中具有不同的作用。应用 Livin α 可以抑制由蛋白激酶 C (PKC) 的抑制剂星状孢子素(staurosporine, STS) 诱导的细胞凋亡, 但在由鬼臼乙叉苷(抗癌药) 诱导的细胞凋亡中, 只有 Livin- β 可以抑制其凋亡。

本研究结果显示, Livin 基因在胰腺癌中表达上调, 表明其与胰腺癌的发生关系密切, 有望成为胰腺癌早期诊断肿瘤的标记物。并且 Livin 的表达与胰腺癌的分化程度和淋巴结转移有关, 说明 Livin 基因表达是胰腺癌预后不良的指标之一。

肿瘤的发生是一个多因素、多步骤的发展过程, 是多基因共同作用的结果。原癌基因 Bcl-2 能抑制细胞色素 C 等从线粒体释放^[8], 从而发挥抗凋亡作用。吴晓康等^[9] 报道, 胰腺癌的凋亡指数(apoptosis index, AI) 与 Bcl-2/Bax 比值呈负相关关系。Bcl-2 作用于凋亡途径 Caspase-3 的上游, Livin 主要在下流直接抑制 Caspase-3, 两者作用于凋亡途径的不同阶段, 在胰腺癌发生、发展中起协同作用。p53 是涉及细胞周期调节和细胞凋亡的核蛋白, 是肿瘤中最常见的突变基因之

一。在与 Livin 基因异常表达的相互关系中发现, p53 与 Livin 之间无相关性, 表明抑癌基因 p53 的失活与凋亡抑制基因 Livin 各自通过不同的机制参与胰腺癌的发生, 两者在胰腺癌的发生方面无相互促进作用。

近来研究结果提示, 抑制 Livin 表达降低结直肠癌细胞株 LoVo 及肺癌细胞株 SPCA-1 的增殖活性, 并提高细胞株对化疗药物的敏感性^[10]。目前对 Livin 与胰腺癌关系的研究才刚刚起步, 还有许多问题尚未阐明。但随着研究的进一步深入, Livin 有望成为胰腺癌基因治疗的新靶点, 从而为胰腺癌的治疗开辟一条新途径。

参考文献:

- [1] Lin JH, Deng G, Huang Q, *et al.* KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(3): 820 - 831.
- [2] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, *et al.* ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(21): 1359 - 1366.
- [3] Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, *et al.* A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(6): 1415 - 1422.
- [4] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3238 - 3246.
- [5] Vucic D, Frankin MC, Walweber HJ, *et al.* Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP [J]. *Biochem J*, 2005, 385(1): 11 - 20.
- [6] Dukett CS. IAP proteins: sticking it to Smac [J]. *Biochem J*, 2005, 385(1): 1 - 2.
- [7] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, *et al.* Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern [J]. *FEBS Lett*, 2001, 495(1): 56 - 60.
- [8] Kluck R, Bossy-Wetzel E, Green D, *et al.* The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1132 - 1136.
- [9] 吴晓康, 吴育连, 郑樟栋, 等. 胰腺癌细胞凋亡与 Bcl-2, bax 基因的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3): 171 - 173.
- [10] Wang R, Lin F, Wang X, *et al.* Silencing Livin gene expression to inhibit proliferation and enhance chemosensitivity in tumor cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(6): 402 - 412.