论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1226-03

凋亡抑制因子 Livin 在喉鳞癌中的表达及临床意义

肖 虹, 姬长友, 陈继川 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所耳鼻咽喉-头颈外科, 重庆 400042)

提 要: 目的 探讨凋亡抑制因子 Livin 在喉鳞癌中的表达及临床意义。**方法** 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 40 例喉癌患者喉鳞癌组织及外周血细胞中 Livin 的表达,并以声带息肉患者和正常人外周血作对照。**结果** 在 40 例喉鳞癌标本中,Livin α 在 26 例(65%)癌组织中表达阳性,在 17 例(42.5%)外周血细胞中表达阳性;Livin β 在喉癌组织及外周血细胞和声带患者中均不表达。Livin α 的阳性表达率与喉癌患者的年龄、性别、肿瘤部位、分化程度无相关性($P>0.05$),与临床分期、淋巴结转移呈正相关($P<0.05$)。**结论** 凋亡抑制因子 Livin α 在喉鳞癌组织和血液中高表达且与喉癌淋巴结转移、临床分期密切相关。

关键词: 凋亡抑制因子;Livin;喉鳞癌;逆转录聚合酶链反应

中图法分类号: R730.23; R730.261; R739.65 **文献标识码**: A

Expression and clinical significance of inhibitor-of-apoptosis Livin in laryngeal squamous carcinoma

XIAO Hong, JI Chang-you, CHEN Ji-chuan (Department of Otolaryngology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the expression of inhibitor-of-apoptosis Livin in laryngeal squamous carcinoma and its clinical significance. **Methods** Expression of Livin was detected in 40 laryngeal squamous carcinoma tissues which were confirmed by pathological examination and the corresponding peripheral blood cell as wells as 40 polyp of vocal cord and peripheral blood cells of normal people as control by RT-PCR. **Results** Livin β was not detected in tissues and peripheral blood cells of patients with laryngeal squamous carcinoma and polyp of vocal cord. Livin α was detected in 26 of 40 (65%) carcinoma tissues and 17 of 40 (42.5%) peripheral blood from the patients with laryngeal carcinoma. Livin α expression had no relationship with age, sex, tumor size and histological grade ($P>0.05$), but had positive relationship with the clinical stages and lymphatic metastasis of the tumor. **Conclusion** Livin α is highly expressed in the tissues and peripheral blood cell from the patients of laryngeal squamous carcinoma, which is closely related to the clinical stages and lymphatic metastasis of the tumor.

Key words: apoptosis inhibitor; Livin; laryngeal squamous carcinoma; reverse transcriptase polymerase chain reaction

Livin 是最近发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的一个新成员,特异性表达于人的胚胎组织以及人类大多数实体瘤细胞。其转录产物因剪接方式不同而分为 α、β 两类亚型。杆状病毒 IAP 重复序列(baculoviral IAP repeats, BIR)是 Livin 具有抗凋亡活性的一个重要结构域。它通过抑制信号转导过程中的效应分子胱天蛋白酶-3/-7/-9(caspase-3/-7/-9)的活性而阻断凋亡的发生[1]。Livin 在膀胱癌、肺癌、胶质瘤等恶性肿瘤中的表达均有报道,在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义国内鲜见报道。我们检测了 40 例喉癌患者喉鳞状细胞癌组织及外周血细胞 Livin 的表达,同时以声带息肉患者和正常人外周血作为对照,以探讨其在喉鳞状细胞癌中的意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择本科 2005 年手术切除的喉癌标本 40 例,术后病理确诊均为喉鳞状细胞癌,其中男性 36 例,女性 4 例,年龄 37~75 岁,平均(60.30±8.88)岁。其中声门上型 14 例,声门型 24

基金项目:重庆市科委资助项目(2005)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing(2005)

作者简介:肖 虹(1978-),男,重庆市南川人,硕士研究生,医师,主要从事咽喉肿瘤的临床与实验方面的研究。电话:13110293550, E-mail: xiaohong911@163.com

收稿日期:2006-01-23;修回日期:2006-03-27

例，声门下型 2 例。按组织学肿瘤分级：高分化 26 例，中分化 12 例，低分化 2 例；TNM 分期：Ⅰ + Ⅱ期 17 例，Ⅲ期 15 例，Ⅳ期 8 例。其中根据病理检查无淋巴结转移 11 例，有淋巴结转移 29 例。患者术前均未行放、化疗及免疫治疗。对照组为 40 例声带息肉患者和 40 例正常人外周血。

1.2　试剂

总 RNA 提取试剂盒（TripureTM Isolation Reagent）为德国 Boehringer Mannheim（BM）公司产，全血 RNA 提取试剂盒为 O-MEGA 公司产，RT-PCR 检测试剂盒（Access RT-PCR system，A1250）为美国 Promega 公司产，引物序列为大连宝生物公司合成，Livin 正义链：5′-GTCCCTGCCTCTGGGTAC-3′；反义链：5′-CAGGGAGCCCACTCTGCA-3′，扩增产物：α 亚型 368 bp；β 亚型 314 bp。β-actin 正义链：5′-TTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTC-3′；反义链：5′-GTCGGATTGATGAAACCCAGACACA-3′，扩增产物 168 bp。

1.3　方法

1.3.1　逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）法　　采用 Tripure 试剂一步法提取癌组织和外周血细胞总 RNA。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计测定纯度并定量。

1.3.2　结果判断　　出现 368 bp 和 168 bp 电泳带为 Livin α 阳性，出现 314 bp 和 168 bp 电泳带为 Livin β 阳性；仅出现 168 bp条带为 Livin 阴性。

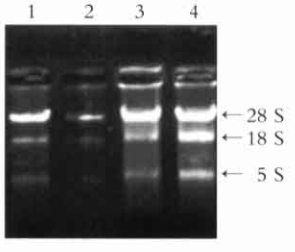
1.4　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件行 χ^2 检验及相关分析。

2　结果

2.1　RNA 电泳结果

所有标本提取的 RNA，经 2% 琼脂糖凝胶电泳都显示清晰的 28S、18S 和 5S 3 条区带，表明本法提取的 RNA 具有较好的完整性和均一性。RNA 电泳结果见图 1。



1，2：喉鳞癌外周血细胞总 RNA；3，4：喉鳞癌组织总 RNA

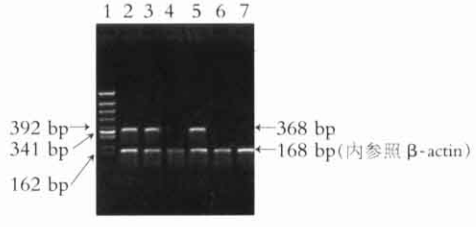
图 1　总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

2.2　喉鳞癌组织、外周血细胞与声带息肉中 Livin 的表达

2.2.1　Livin α 在喉鳞癌组织和外周血细胞中的表达　　40 例喉癌标本中，喉鳞癌组织 Livin α 表达阳性 26 例，占 65%，其中高分化 18 例，中分化 7 例，低分化 1 例；外周血细胞中表达阳性 17 例，占 42.5%，其中高分化 12 例，中分化 5 例，低分化 0 例；Livin α 在声带息肉中无阳性表达。Livin α 在喉鳞癌组织、外周血细胞中的表达与临床分期、淋巴结转移差异有统计学意义（$P<0.05$），与年龄、性别、喉鳞癌的发生部位和组织分化差异无统计学意义（$P<0.05$），见表 1。RT-PCR 电泳结果见图 2。

表 1　Livin α 在喉鳞癌组织、外周血中的表达

项目	n	组织（$n=26$）		P	外周血（$n=17$）		P
		n	阳性率（%）		n	阳性率（%）	
年龄（岁）							
≤55	7	6	85.7	0.55	4	57.1	0.99
55～65	21	11	52.4		8	38.1	
>65	12	9	75.0		5	41.7	
性别							
男	36	23	63.9	0.21	15	41.7	0.54
女	4	3	75.0		2	50.0	
部位							
声门上	14	9	64.3	0.50	6	42.9	0.54
声门	24	16	66.7		11	45.8	
声门下	2	1	50.0		0	0	
临床分期							
Ⅰ + Ⅱ	17	5	29.4	0.03	3	17.6	0.02
Ⅲ	15	13	86.7		8	53.3	
Ⅳ	8	8	100.0		6	75.0	
淋巴结转移							
有	29	21	72.4	0.01	15	51.7	0.01
无	11	5	45.5		2	18.2	
组织分级							
高分化	26	18	66.7	0.18	11	42.3	0.16
中分化	12	7	58.3		5	41.7	
低分化	2	1	50.0		1	50.0	



1：φX174-*Hinc* Ⅱ digest DNA 标记物；2，3：喉鳞癌组织 Livin α mRNA RT-PCR 产物；4：正常人外周血细胞无 Livin α mRNA RT-PCR 产物；5：喉鳞癌外周血细胞 Livin α mRNA RT-PCR 产物；6，7：声带息肉无 Livin α mRNA RT-PCR 产物

图 2　RT-PCR 检测 Livin α mRNA 在喉鳞癌组织及外周血细胞中表达

2.2.2　Livin β 在喉鳞癌组织和声带息肉中的表达　　Livin β 在喉鳞癌组织和声带息肉中均无 1 例阳性表达。

2.2.3　Livin α 或 β 在正常人外周血细胞中的表达　　Livin α 或 β 在正常人外周血细胞中均无 1 例阳性表达。

2.3　Livin α 在喉鳞癌组织、外周血细胞中的表达与各临床因素的相关分析

相关分析结果表明，Livin α 在癌组织和外周血细胞中的阳性表达与喉鳞癌临床分期的相关系数分别为 0.631 和 0.460（P 均 <0.001）；与淋巴结转移的相关系数分别为 0.282 和 0.303（P 均 <0.05）；说明 Livin α 在癌组织和外周血细胞中的阳性表达与喉鳞癌临床分期和淋巴结转移正相关。而与喉鳞癌患者的年龄、性别、肿瘤部位、组织分化无显著相关（$P>0.05$）。

3　讨论

Livin 是 2000 年 Lin 等[2] 根据凋亡抑制蛋白（in-

hibitor of apoptosis proteins, IAP）同源序列，用含有BIR序列的EST克隆，在人的胎肾cDNA文库中发现的一种新的细胞凋亡抑制因子。它位于染色体20q13，转录产物因剪接方式的不同有2种mRNA亚型，分别为1 351和1 297碱基。两者除相差54 bp外，其他完全一致，分别编码298个和280个氨基酸的蛋白质（β）。Livin同样含有IAP家族成员特有的BIR和RING指结构域。Livin能与caspase蛋白的多个成员相互作用，抑制凋亡的执行过程，例如与caspase-9前体蛋白和其激活形式结合从而抑制其功能，Livin也能与caspase-3，-6，-7，-8，-10作用，尤其是caspase-3。Livin中的BIR结构域（N端86-154）是其抗凋亡活性必需的。研究表明Livin的BIR结构域为一个新型的环指结构，它是与caspase蛋白的结合部位，可能阻止caspase蛋白在细胞凋亡时执行蛋白切除功能。Livin活性也受细胞内Smac的调控，Vucic等[3]研究表明，外界刺激，如正常细胞应激或DNA严重损伤，都能使线粒体释放细胞色素C和Smac蛋白，Smac能与Livin中的BIR结构域结合，抑制其活性，促进细胞凋亡。由此可见，Livin在细胞凋亡中起重要作用。Livin在一些癌细胞系中高表达，如淋巴瘤、HaCat细胞、MCF7乳腺癌细胞等，所有在黑色素瘤、膀胱癌、淋巴瘤、头颈部肉瘤中高表达[4]。

3.1 检测喉鳞癌组织Livin的表达

我们采用RT-PCR法检测喉鳞癌组织中Livin的表达，结果显示，Livin β在喉鳞癌和声带息肉中均不表达，而Livin α在喉鳞癌组织中的表达明显高于声带息肉，表明Livin α基因可能通过抑制肿瘤细胞凋亡，在喉鳞癌的发生发展过程中起重要作用。Livin α表达率随着喉鳞癌的淋巴结转移阳性率和临床分期的升高而增高，喉鳞癌临床分期越晚，淋巴结转移阴性的肿瘤高，表明Livin α对判断淋巴结转移，临床分期具有重要价值，Livin α表达阳性的肿瘤其恶性度可能更高，对Livin α表达阳性的肿瘤应采取更积极的治疗。

3.2 检测喉鳞癌患者外周血细胞中Livin的表达

喉癌是耳鼻咽喉科最常见的恶性肿瘤之一，根据目前喉癌常用TNM分期，很多病例虽然判断预后良好，但治疗后仍发生复发及远处转移，提示必须寻找更可靠的评价标准来预测肿瘤的预后及指导治疗。近年研究表明，原发肿瘤早期在阶段就有肿瘤细胞脱落到循环系统，这些脱落的肿瘤细胞是目前常用的临床诊断手法检测不到的，它们可导致肿瘤复发和转移；外周血循环中出现肿瘤细胞是肿瘤扩散的表现之一，检测这些肿瘤细胞可以帮助人们进一步认识肿瘤转移的特征、提高对肿瘤分期和预后的判断水平，以更好地指导治疗及监测治疗效果[5]。因此，检测外周血循环肿瘤细胞正逐渐被人们所重视。我们采用RT-PCR法检测40例喉鳞癌患者外周血细胞，结果显示，Livin α在17例中表达，阳性率为42.5%，提示检测外周血细胞中Livin α水平对诊断新生或转移的喉鳞癌具有重要意义，但需加大样本量进一步研究。

3.3 Livin α RNA在喉鳞癌组织和外周血细胞中表达的比较

本研究中，26例喉癌组织Livin α RNA表达阳性的喉鳞癌患者中，17例外周血细胞Livin α RNA表达阳性；14例喉癌组织Livin α RNA表达阴性的喉鳞癌患者中无1例外周血细胞中有表达，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明Livin α在喉鳞癌组织中表达阳性的，其外周血细胞中表达阳性的可能性也较大，即表达具有同向一致性。

喉鳞癌组织及外周血中Livin α高表达，而在声带息肉中不表达，根据这一表达的特异性，可将Livin α作为喉鳞癌生物治疗的新靶点，研究其结构和功能，对筛选抗肿瘤药物[6]有重要意义。Schmollinger等[7]提出，Livin可作为肿瘤免疫治疗的一个有效靶点，Livin的表达缺失则可使肿瘤实现免疫逃逸。利用Livin α的反义寡核苷酸技术，可增加肿瘤细胞凋亡，抑制细胞增殖，降低细胞凋亡的阈值，增强对化疗药物或免疫制剂的敏感性，为喉鳞癌的辅助治疗提供一条新的思路。

参考文献：

[1] KASOF G M, GOMES B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3238-3246.

[2] LIN J H, 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.

[3] VUCIC D, DESHAYES K, ACKERLY H, *et al*. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP)[J]. J Biol Chem, 2002, 277(14): 12275-12279.

[4] 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[J]. Oncogene, 2003, 22(51): 8330-8336.

[5] COULET F, BLONS H, CABELGUENNE A, *et al*. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis[J]. Cancer Res, 2000, 60(3): 707-711.

[6] DIAS N, STEIN C A. Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2002, 54(3): 263-269.

[7] SCHMOLLINGER J C, VONDERHEIDE R H, HOAR K M, *et al*. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6): 3398-3403.

（编辑 张大春）