论著

文章编号:1000-5404(2009)15-1488-03

Livinα和Livinβ在儿童急性白血病骨髓单个核细胞中的表达及临床意义

毛成刚[1],郭玥馨[1],罗 庆[2],徐酉华[1] (重庆医科大学附属儿童医院:[1]血液科,[2]儿科研究所,重庆 400014)

摘 要:目的 研究Livinα和Livinβ在儿童急性白血病(childhood acute leukemia,CAL)骨髓单个核细胞(marrow mononuclear cell,MMNC)中的表达与临床意义。**方法** 采用实时PCR(real-time PCR)和Western blot检测Livinα和Livinβ在CAL骨髓单个核细胞中mRNA水平和蛋白质水平的表达。**结果** Livinα和Livinβ在初诊的39例儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL)和12例急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia,AML)MMNC中的表达率和表达水平均高于对照组($P<0.05$),Livinα的表达水平高于Livinβ($P<0.01$)。ALL化疗后第19天,幼稚细胞≤5%组Livinα和Livinβ的表达水平较化疗前明显降低($P<0.01$)。幼稚细胞>5%组化疗后较化疗前也降低($P<0.05$),但化疗后Livinα和Livinβ的表达水平仍明显高于对照组($P<0.01$)。**结论** Livinα和Livinβ在CAL中高表达可能对评估CAL临床危险度及预后有重要意义;提示Livinα和Livinβ可作为观察CAL预后的分子指标之一。

关键词:Livin;凋亡抑制蛋白;急性白血病;儿童
中图法分类号:R394.3;R730.43;R733.71 **文献标识码**:A

Expressions of Livin α and Livin β in marrow mononuclear cells of childhood acute leukemia and the clinical significance

MAO Cheng-gang[1], GUO Yue-xin[1], LUO Qing[2], XU You-hua[1] ([1]Department of Hematology, [2]Institute of Pediatrics, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of Livin α and Livin β in marrow mononuclear cells (MMNCs) of childhood acute leukemia (CAL) and explore the clinical significance. Methods Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of Livin α and Livin β in MMNCs of CAL, respectively. Results Both Livinα and Livinβ expression rates and expression levels were higher in preliminary diagnosis group($n=51$) of CAL ,including acute lymphoblastic leukemia($n=39$) and acute myeloid leukemia ($n=12$), compared with the control group($P<0.05$), and the expression level of Livinα was higher than Livinβ($P<0.01$). The expression levels of Livinα and Livinβ were significantly lower in patients with a favorable day 19 bone marrow response (leukemic blasts ≤5%) to induction chemotherapy of ALL than in the patients without chemotherapy($P<0.01$). Though the expression levels of Livinα and Livinβ were also lower in patients with a unfavorable day 19 bone marrow response (leukemic blasts >5%) to induction chemotherapy of ALL than in the patients without chemotherapy($P<0.05$), the expression levels of Livinα and Livinβ were still significantly higher than that of the control group($P<0.01$). Conclusion The expression of Livinα and Livinβ may be associated with the genesis and development of CAL. It seems that the expression of Livinα and Livinβ may be used as a molecular marker of CAL.

Key words: Livin;IAP;acute leukemia;children

迄今为止,儿童急性白血病(childhood acute leukemia,CAL)的发病机制仍在研究之中,其中肿瘤细胞增殖与凋亡平衡失调是CAL发生发展的重要机制之一。Livin基因是凋亡抑制蛋白家族中的最新成员[1]。国内外初步研究表明,Livinα和Livinβ在正常成人大多数组织中不表达或低表达,而在肿瘤组织中特异性表达[2,3]。有报道称Livinα在膀胱癌中的表达与预后密切相关[4]。本研究检测Livinα和Livinβ在CAL中的表达,探讨其表达与CAL预后的关系及临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 收集重庆医科大学附属儿童医院血液科2007年9月至2008年5月间住院患儿的新鲜骨髓标本共79份,其中初诊的CAL 51份[急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL) 39份,急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia,AML) 12份],一对一跟踪收集ALL化疗(VDLP诱导缓解方案)第19天的骨髓标本18份。对照组为儿童特发性血

作者简介:毛成刚,男,山东省高密市人,硕士研究生,医师,主要从事血液肿瘤基础和临床方面的研究。E-mail:mcg-516@163.com
通信作者:徐酉华,电话:(023)63631890,E-mail:xiyushusheng2006@163.com
收稿日期:2008-09-14;修回日期:2008-11-17

小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura,ITP)10 例。初诊的 CAL 标本中男性 28 例,女性 23 例,中位年龄为 4 岁 11 个月(7 个月至 16 岁 3 个月)。

1.1.2　主要试剂和仪器　Ficoll 液购自天津 TBD 公司;RNA 和蛋白质提取试剂盒、逆转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司;SYBR Green I Real-time PCR 试剂盒购自 Bioer 公司;兔抗人 Livin 多克隆抗体和鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国Abcam 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司;辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物科技公司;蛋白分子量标准购自美国 MBI Fermentas 公司;羊抗鼠 IgG-HRP、化学发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司。主要仪器有岛津公司紫外可分光光度计,BIO-RAD Western blot 半干转系统,Rotor-Gene6000 Real-time PCR 仪等。Real-time PCR 引物由上海英骏生物公司合成。GAPDH 上游:5′-CATGAGAAGTATGACAA-CAGCCT-3′,下游:5′-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3′,产物长度 113 bp;Livinα 上游:5′-TGCCTCTGGGTACCCTGAGC-3′,下游:5′-TCTGGGCCTCGGCTGGACTGA-3′,产物长度 95 bp;Livinβ 上游:5′-TGCCTCTGGGTACCCTGAGC-3′,下游:5′-ACATCCCTG-GCTCCTGGCTC-3′,产物长度 81 bp。

1.2　实验方法

1.2.1　实验分组　将收集的骨髓标本分为初诊组、化疗组(一对一跟踪收集 ALL 化疗第 19 天的骨髓标本)和对照组,比较初诊组和对照组中 Livinα 和 Livinβ 的表达差别。根据免疫分型把初诊组分为 ALL 组和 AML 组,再根据临床危险度把 ALL 组分为标危组、中危组和高危组,横向比较各组与对照组中 Livinα 和 Livinβ 表达的差别。把接受 ALL 诱导缓解方案化疗的患儿依照化疗第 19 天骨髓幼稚细胞比例分为幼稚细胞≤5%组和幼稚细胞 >5%组,再将每一组患儿的骨髓标本分为化疗前组和化疗后组,纵向比较同一患儿化疗前后 Livinα 和 Livinβ 的表达变化以及与对照组的差别。本实验以对照组中 Livin 的表达率和表达水平为对照,用基因表达相对定量法比较 CAL 中 Livinα 和 Livinβ 的表达水平与对照组的倍数关系。

1.2.2　提取总 RNA 和蛋白质　收集 AL 骨髓标本。取新鲜无菌抗凝骨髓液 1 ~ 1.5 ml,Ficoll 液分离 MMNC,用 1 ml 含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基悬浮 MMNC 后于 -80 ℃临时保存。取 1×10^6 个 MMNC,依试剂盒说明在无 RNA 酶环境下提取总 RNA 和蛋白质。1% 的琼脂糖凝胶电泳验证总 RNA 完整性,同时紫外分光光度计测定总 RNA 纯度和浓度。为防止 RNA 降解,提取总 RNA 后尽快逆转录。蛋白提取液加蛋白酶抑制剂后 -80 ℃保存。

1.2.3　RNA 逆转录和实时定量 PCR　将提取的总 RNA 依 TaKaRa 试剂盒说明书进行逆转录,总体系为 10 μl,加总 RNA 1 μg,反应条件为 30 ℃ 10 min,42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,逆转录完成后的 cDNA -20 ℃保存。验证 Livinα、Livinβ、GAPDH 的扩增效率后,依试剂盒说明书取 2 μl cDNA 加入到 RT-PCR 反应体系中。每份标本设 3 个重复。总体系为 25 μl,反应条件为 95 ℃ 7 min;95 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s 共 40 循环,反应完成后记录 Ct 值。

1.2.4　Western blot　将上述提取的总蛋白 20 μl 上样到 12% SDS-PAGE 凝胶中进行蛋白电泳。电泳结束后,把凝胶中的蛋白半干转到 PVDF 膜上。用抗 Livin 和 GAPDH 抗体(Livin:1∶100;GAPDH:1∶8 000)及辣根过氧化物酶标记的相应二抗(Livin:1∶2 000,GAPDH:1∶4 000)相继孵育,化学发光液曝光成像,凝胶图像分析。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行 χ^2 检验和秩和检验。

2　结果

2.1　Real time PCR 检测 Livinα 和 Livinβ 在 mRNA 水平的表达

2.1.1　初诊组和对照组中 Livinα 和 Livinβ 的表达　在所有阳性表达的 CAL 骨髓标本中 Livinα 和 Livinβ 均同时表达,即二者在 CAL 各实验分组中有相同的表达率。Livinα 和 Livinβ 在初诊组中的表达率均为 49.0%(25/51),而对照组 Livinα 的表达率为 10%(1/10),Livinβ 无表达,Livinα 和 Livinβ 在初诊组中的表达率均高于对照组($P < 0.05$)。在初诊组中,Livinα 的表达水平高于 Livinβ($P < 0.01$)。

2.1.2　ALL 组和 AML 组中 Livinα 和 Livinβ 的表达　ALL 组中 Livinα 和 Livinβ 的表达率均为 46.2%(18/39),AML 组中 Livinα 和 Livinβ 表达率均为 58.3%(7/12),两组与对照组的差别有统计学意义($P < 0.05$),两组之间的差别未发现有统计学意义($P > 0.05$)。从表达水平来看,ALL 组 Livinα 和 Livinβ 的表达水平约为对照组的 3.21 倍和 2.82 倍,AML 组 Livinα 和 Livinβ 的表达水平约为对照组的 3.86 和 3.35 倍(表 1)。

表 1　ALL 组与 AML 组 Livinα 和 Livinβ 的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Livinα	Livinβ
对照组	1	1.01 ±0.09	1.01 ±0.09
ALL 组	18	3.21 ±0.53[a]	2.82 ±0.42[a]
AML 组	7	3.86 ±0.41[a]	3.35 ±0.38[a]

a:$P < 0.05$,与对照组比较

2.1.3　ALL 各危险组中 Livinα 和 Livinβ 的表达　Livinα 和 Livinβ 在高危组中的表达率均为 58.8%(10/17),在标危组中的表达率均为 37.5%(6/16),在中危组中的表达率均为 33.3%(2/6),各危险组间的差别未发现有统计学意义($P > 0.05$)。Livinα 和 Livinβ 在男性中的表达率均为 66.7%(14/21),在女性中的表达率均为 22.2%(4/18),二者的差别有统计学意义($P < 0.05$)。Livinα 和 Livinβ 在≥10 岁年龄组中的表达率均为 100%(5/5),在 1 ~ 10 岁年龄组中的表达率均为 38.2%(13/34),二者的差别也有统计学意义($P < 0.05$)。Livinα 和 Livinβ 的表达率在与其他 ALL 相关临床危险因素的比较中未发现差别有统计学意义($P > 0.05$)。从表达水平来看,ALL 各危险组均高于对照组($P < 0.05$),其中高危组约为对照组的 3.71 倍和 3.23 倍(表 2)。

表 2　ALL 各危险组 Livinα 和 Livinβ 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Livinα	Livinβ
对照组	1	1.01 ±0.09	1.01 ±0.09
标危组	6	2.66 ±0.23[a]	2.44 ±0.12[a]
中危组	2	2.77 ±0.09[a]	2.38 ±0.08[a]
高危组	10	3.71 ±0.08[a]	3.23 ±0.05[a]

a:$P < 0.05$,与对照组比较

2.1.4 ALL 化疗前后 Livinα 和 Livinβ 的表达变化 从表达水平来看,幼稚细胞≤5%组化疗后(第19天),Livinα 和 Livinβ 的表达水平较化疗前(初诊时)明显降低($P<0.01$)。幼稚细胞>5%组化疗后 Livinα 和 Livinβ 表达水平为对照组的2.95倍和2.71倍,较化疗前降低($P<0.05$),但明显高于对照组($P<0.01$,表3)。

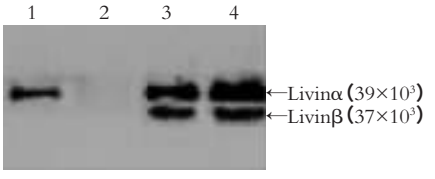
表3 ALL 化疗前后 Livinα 和 Livinβ 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Livinα	Livinβ
对照组	1	1.01±0.09	1.01±0.09
幼稚细胞≤5%组	7		
化疗前		2.97±0.46	2.64±0.37
化疗后		1.51±0.22[a]	1.41±0.20[a]
幼稚细胞>5%组	3		
化疗前		3.76±0.02	3.25±0.05
化疗后		2.95±0.15[bc]	2.71±0.10[bc]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与化疗前比较; c: $P<0.01$,与对照组比较

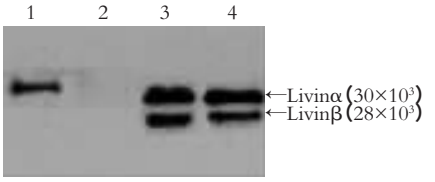
2.2 Western blot 检测 Livinα 和 Livinβ 在蛋白水平的表达

在阳性表达的 CAL 标本中 Livinα 和 Livinβ 二种蛋白均同时表达。在阳性表达的对照组中只见 Livinα 表达,Livinβ 无表达。AML 组中 Livinα 和 Livinβ 的表达水平均高于 ALL(图1)。ALL 化疗后(第19天)幼稚细胞≤5%组中 Livinα 和 Livinβ 表达水平低于幼稚细胞>5%组(图2)。Livinα 和 Livinβ 在蛋白水平的表达特点与 mRNA 水平基本一致。



1:对照组;2:Livin;3:ALL 组;4:AML 组

图1 ALL 组和 AML 组 Livinα 和 Livinβ 蛋白水平的表达



1:对照组;2:Livin;3:幼稚细胞>5%组;4:幼稚细胞≤5%组

图2 ALL 化疗后 Livinα 和 Livinβ 蛋白水平的表达

3 讨论

本研究发现,Livinα 和 Livinβ 在 CAL 初诊时均高表达,提示 Livinα 和 Livinβ 在 CAL 中都具有肿瘤特异性。Livinα 的表达水平高于 Livinβ($P<0.01$),这和 Ashhab 等[3]在多种肿瘤细胞株中的研究结果相符。Livinα 和 Livinβ 在 ALL 和 AML 中表达率的差别未发现有统计学意义,表明二者的表达可能与 CAL 的类型无关。

Livinα 和 Livinβ 在≥10岁年龄组中的表达率均高于1~10岁年龄组($P<0.05$),提示 Livinα 和 Livinβ 的表达可能对评估 ALL 临床危险度有重要意义。Livinα 和 Livinβ 在男性患儿中的表达率均高于女性($P<0.05$),结合临床上 ALL 男性患儿预后较女性差[5],提示二者可能对评估 CAL 男性患儿的不良预后有重要临床意义。

我们的研究结果还显示,在幼稚细胞≤5%组中,化疗后 Livinα 和 Livinβ 的表达水平较化疗前明显降低($P<0.01$),而幼稚细胞>5%组化疗后 Livinα 和 Livinβ 的表达水平虽然也降低,但明显高于对照组($P<0.01$)。结合化疗后骨髓幼稚细胞比例的临床意义,提示 ALL 化疗前后 Livinα 和 Livinβ 的表达水平变化具有预后意义。

国外研究发现 Livinα 蛋白和 Livinβ 蛋白在某些促凋亡因素的作用下发生裂解和亚细胞定位的改变。尽管二者被裂解掉了很小一部分,但二者的功能发生了逆转,由抗凋亡变成促凋亡[6,7]。在我们实验中也发现,幼稚细胞≤5%组化疗后 Livinα 和 Livinβ 的表达水平较化疗前明显下降。这种化疗前后表达水平的变化机制可能有:一是化疗药物直接引起的表达水平降低;二是在化疗药物诱导下蛋白功能发生了逆转。

综上所述,Livinα 和 Livinβ 在 CAL 中高表达,Livinα 和 Livinβ 与临床危险因素的关系以及在化疗前后的变化提示二者可作为观察 CAL 预后的分子指标之一。在已有的研究基础上,加强对 Livinα 和 Livinβ 功能、耐药及凋亡诱导等方面的研究,是以 Livin 为靶点的 CAL 研究今后的努力方向。

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] Liu B, Han M, Wen J K, *et al*. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment[J]. Cancer Lett, 2007, 250(2): 168-176.

[3] 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(1-2): 56-60.

[4] 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[J]. Ann Oncol, 2003, 14(1): 85-90.

[5] 王耀平. 急性淋巴细胞白血病[M]//高解春,王耀平. 现代小儿肿瘤学. 上海:复旦大学出版社, 2003: 370-371.

[6] Yan H, Brouha B, Liu T, *et al*. Proteolytic cleavage of Livin (ML-IAP) in apoptotic melanoma cells potentially mediated by a non-canonical caspase[J]. J Dermatol Sci, 2006, 43(3): 189-200.

[7] Nachmias B, Lazar I, Elmalech M, *et al*. Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and pro-apoptotic activity of Livin[J]. Apoptosis, 2007, 12(7): 1129-1142.

(编辑 吴培红)