维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2007)07-0689-03

# 凋亡抑制蛋白 Livin 在良性前列腺增生和前列腺癌中的表达及临床意义

李家兵[1],李锦秀[1],姚 惠[2]

(1.四川省绵阳市第三人民医院泌尿外科,绵阳 621000;2.四川省绵阳市第三人民医院,绵阳 621000)

【摘 要】目的:探讨凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein IAP)家族的新成员 Livin 及其两种异构体 Livinα 和 Livinβ 在良性前列腺增生和前列腺癌组织中的表达,及其与前列腺癌发生发展的关系。方法:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 26 例前列腺癌、20 例良性前列腺增生和 10 例正常前列腺组织中 Livinα 和 Livinβ 的表达。结果:26 例前列腺癌组织中 Livinα 表达阳性率为 65.38%,20 例良性前列腺增生组织中阳性表达率为 60.00%,而在正常前列腺组织中均不表达,Livinβ 在前列腺癌组织及良性前列腺增生和正常前列腺组织中均不表达。Livinα 在正常前列腺组织中的表达率与在前列腺癌、良性前列腺增生中的阳性表达率有显著差异,而在良性前列腺增生和前列腺癌中的阳性表达率无显著差异,同时 Livinα 的表达与前列腺癌的病理分级和临床分期均无明显相关关系。结论:Livinα 在前列腺癌和良性前列腺增生中的高表达及与前列腺癌和良性前列腺增生的发生、发展密切相关。

【关键词】良性前列腺增生;前列腺腺癌;Livin;RT-PCR

【中国图书分类法分类号】R697;R737.25 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-01

# Expression and clinical significance of Livin in benign prostate hyperplasia and prostate cancer

*LI Jiabing, et al*

(*Department of Urology, the Third Hospital of Manyang*)

【Abstract】*Objective*: To examine and analyze the expression of two isoforms of Livin (Livinα and Livinβ), a novel inhibitor of apoptosis protein(IAP)family member in benign prostate hyperplasia(BPH) and prostate cancer(PC), and to explore relationship between Livin expression and prostate cancer. *Methods*: Livin mRNA in BPH, PC and normal protate tissue(NP)were detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). *Results*: Livinα mRNA was expressed in 17 of 26 PC cases(65.38%) and in 12 of 20 BPH cases (60.00%), No Livinα expression was detected in NP, Livinβ was not detected in BPH, PC and NP. The Livinα positive expression ratios had significant differences($P<0.05$) between NP and BPH or PC, No significant difference of Livinα positive expression ratio was found between BPH and PC ($P>0.05$). There was no relationship ($P>0.05$) between the Livinα expression and histologic grade or clinical stage of PC. *Conclusion*: Livinα is highly expressed in PC and BPH, which may play an important role in generation and progression of PC and BPH

【Key words】Benign prostate hyperplasia; Prostate cancer; Livin; RT-PCR

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,存在同基因不同剪切的两个异构体 Livinα 和 Livinβ,特异性表达于人的胚胎组织以及人类大多数实体瘤中,与肿瘤发生有密切关系,并可能作为诱导肿瘤凋亡治疗的新靶点。本文运用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测了 Livin 在前列腺癌和良性前列腺增生组织的表达情况并初步探讨其临床意义。

作者介绍:李家兵(1973- ),男,主治医师,在读博士,主要研究方向:泌尿系肿瘤。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

26 例前列腺癌患者的前列腺癌组织,20 例良性前列腺增生组织和 10 例正常前列腺组织均取自我院手术标本。术后均经病理学确诊。前列腺癌患者年龄 56~88 岁,平均 66 岁。前列腺腺癌按照Gleason 标准分级,高分化腺癌 6 例,中分化腺癌 9 例,低分化腺癌 11 例;临床分期 A+B 期 12 例,

维普资讯 http://www.cqvip.com



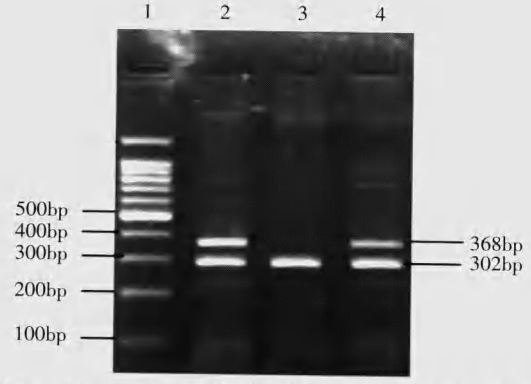
C+D 期 14 例。

1.2 方法

采用 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)严格按照说明书提取总 RNA。引物序列由上海生物工程技术服务有限公司根据 GeneBank 设计合成。Livin 上游引物 5'-GTCCCTGCCTCTGGGTAC-3',下游引物 5'-CAGGGAGCC-CACTCTGCA-3', 扩增片断 α Ⅱ型为 368bp β Ⅱ型 314bp。β-actin 引物序列: 上游引物 5'-GTGGACATCCGCAAA-GAC-3',下游引物 5'-AAAGGGTGTAACGCAATCAA-3',扩增片断为 302bp。RT-PCR 采用一步法 RT-PCR 试剂盒(Bio Basic 公司,MMLV Single Step RT-PCR Kit)。应用 BIO-RADPCR 扩增仪,37℃逆转录 30min;94℃2min 灭活逆转录酶,94℃变性 1min53℃退火 30s、72℃延伸 1min 共 30 个循环,最后 72℃再次延伸 10min 后降至 4℃结束反应。

1.3 结果判定

Marker 采用 100bp DNA maker (TAKARA 生物公司),与反应产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳 25min,经 BIO-RAD 图象分析仪上观察并拍照,以 368bp、314bp 处出现目的条带为表达阳性(图 1)。




1.100bp DNA maker;2.前列腺癌组织;3.正常前列腺组织;4.良性前列腺增生组织

**图 1 Livin mRNA 的表达情况**

1.4 统计分析

应用 SPSS14.0 软件进行统计分析, 两样本率的比较用 $\chi^2$ 检验及 Fisher 精确概率法计算。

## 2 结 果

2.1 Livin mRNA 在前列腺癌、良性前列腺增生与正常前列腺组织中的表达

Livinα mRNA 在前列腺癌、良性前列腺增生与正常前列腺组织中的阳性表达率分别为 65.38%(17/26)、60.00%(12/20)和 0(0/10),见表 1;Livinβ 在前列腺癌组织及良性前列腺增生和正常前列腺组织中均不表达。前列腺癌和良性前列腺增生组织中 Livinα mRNA 的表达率分别明显高于正常前列腺组织 ($P=0.002<0.05$; $P=0.001<0.05$), 但 Livinα mRNA 在前列腺癌和良性前列腺增生组织中表达差异无统计学意义($\chi^2=0.141$, $P=0.708>0.05$)。

2.2 Livinα mRNA 在不同病理分级、临床分期的前列腺癌组织中的表达(见表 1)

**表 1 Livinα mRNA 在前列腺癌、良性前列腺增生及正常前列腺组织中的表达及与病理分级、临床分期的关系**

| 类别 | n | Livina | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | − | | + | |
| | | n | % | n | % |
| 组织标本 | | | | | |
| 正常前列腺组织 | 10 | 10 | 100.00 | 0 | 0.00 |
| 良性前列腺增生组织 | 20 | 8 | 40.00 | 12 | 60.00 |
| 前列腺癌组织 | 26 | 9 | 34.62 | 17 | 65.38 |
| 病理分级 | | | | | |
| 高及中分化组 | 15 | 6 | 40.00 | 9 | 60.00 |
| 低分化组 | 11 | 3 | 27.27 | 8 | 72.73 |
| 临床分期 | | | | | |
| A+B 期 | 12 | 5 | 41.67 | 7 | 58.33 |
| C+D 期 | 14 | 4 | 28.57 | 10 | 71.43 |

前列腺癌组织中高及中分化组与低分化组的 Livinα mRNA 阳性表达率分别为 60.00%(9/15)和 72.73%(8/11),无显著性差别($P=0.683>0.05$)。临床分期中 A+B 期与 C+D 期 Livinα mRNA 阳性表达率分别为 58.33%(7/12)和 71.43%(10/14),无显著性差别($P=0.683>0.05$)。

Livinα 在正常前列腺组织、良性前列腺增生和前列腺癌组织中的表达及与病理分级、临床分期的关系。

## 3 讨 论

Livin 是凋亡蛋白抑制因子 (Inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族中的最新成员,于 2000 年由 4 个不同的试验小组几乎在同一期间所发现, 均采用 IAP 同源序列(BIR 或 RING)寻找的方法,分别从人类基因 cDNA 文库中克隆得到, 人类的 Livin 基因位于人染色体 20q13.3,全长 46kb,其编码的蛋白质因剪接方式的不同分为两种 mRNA 亚型,α 和 β 型,分别含有 1351 和 1297 个碱基,分别编码 298 个氨基酸蛋白质 (α) 和 280 个氨基酸蛋白质(β)。Livin 在正常成人的大多数组织中(除胎盘外)均不

维普资讯 http://www.cqvip.com



表达，在表皮、淋巴、脾脏和黑色素细胞中表达很低，在胎儿发育过程中高表达，如胎儿的脑、胸腺和肝[1]。有研究[2-4]表明，Livin 与许多肿瘤密切相关，其在多数肿瘤，如黑色素瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌、白血病以及淋巴瘤等组织中高表达。

肿瘤细胞的凋亡机制受到抑制或破坏是肿瘤发生发展的一个重要促进因素，也与肿瘤细胞耐药，对化疗、放疗不敏感等特性密切相关。IAP 家族成员通过不同途径抑制细胞凋亡、抑制 IAP 蛋白的表达在目前已成为研究的热点。Livin 抗凋亡的作用机制主要是：①外在途径：Livinα 和 Livinβ 可通过阻止 TNF-a 或 Fas(CD95)抗体诱导的抗凋亡作用。当外界信号 TNF-α(配体)与细胞表面的受体结合后能激活丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)家族的另一个成员 C-JUN N 末端激酶 1（JNK1）并激活 caspase，而 Livin 能够抑制 C-JUN N 末端激酶 1（JNK1）和 caspase 从而抑制由 TNF-a 介导的细胞凋亡，作用明显强于 bcl-2[5]。Livin 还可抑制 APO-1、RIP-3、RIP 等配体物质对 caspase 的激活作用，从而抑制它们介导的细胞凋亡[6]。②内在途径：Livin 被 Apaf-1、细胞色素 C 和 dATP 等诱导后从线粒体内膜中释放到细胞质中发挥抗凋亡的作用，它们抑制凋亡也是通过干扰 caspase 来实现的。Livin 中的 BIR 结构能够抑制和/或结合特异的 caspases，使级联反应中 caspase 间的相互作用和核酸的裂解受到抑制，从而导致肿瘤细胞的无限增殖。Livinα 和 Livinβ 在抗凋亡机制中作用有所差异，Ashhab 等[5]研究发现应用 Livinα 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，相反，鬼臼乙甙苷诱导的凋亡却只能被 Livinβ 所抑制。

前列腺癌的生长取决于细胞的增生率和死亡率之间的平衡，正常的前列腺上皮的增生率和死亡率均很低，并且是平衡的，没有净生长，但当上皮细胞转化为高分级前列腺上皮内瘤时，细胞的增殖已超过细胞的凋亡，在前列腺癌早期细胞增殖是因为凋亡(Apoptosis)受抑制而不是因为增殖细胞分裂，进一步导致了基因异化的危险性的增加。凋亡蛋白抑制因子 Livin 与前列腺癌的相关研究资料比较匮乏。Ashhab 等[5]等研究发现 Livin 在前列腺癌腺癌细胞株 PC-3 和 DU-145 中高表达。鞠文等[7]采用免疫组化法研究显示：Livin 基因在正常前列腺组织中均不表达，Livin 在 BPH 和前列腺腺癌组织中的表达上调，提示 Livin 基因可能通过抑制细胞凋亡对 BPH 和前列腺腺癌的发生和发展起重要作用。

本研究发现：Livinα 在正常前列腺组织中不表达，而在良性前列腺增生与前列腺癌组织中高表达，两者阳性率差异有统计学意义，提示 Livinα 在抑制细胞凋亡，促进细胞的增生，以及前列腺肿瘤的发生与发展过程中起了重要的作用，Livinα 是前列腺癌发生和演进中的早期事件之一。研究还发现 Livinα 的表达与前列腺癌病理分级和临床分期无关，可能与本实验样本例数不够大有关；Livinβ 在前列腺癌组织及良性前列腺增生和正常前列腺组织中均不表达。哪些可以诱导 Livin 表达，其调节过程跟哪些信号转导通路有关，以及两种异构体功能的差异等问题目前仍不清楚，有待进一步研究。

另外现有研究还发现 Livin 可能在免疫治疗中发挥重要的作用。识别与肿瘤生存有关的抗原是肿瘤免疫学的一个主要目标，这些抗原可以作为免疫破坏的靶点。同时此抗原的表达对于肿瘤的生存是必须的. 这样就不会发生抗原在治疗中由于免疫选择而消失，从而造成免疫逃避。初步研究成果显示了 Livin 可能成为免疫干预(Immunologicintervention)的一个合适的目标[8,9]。

Livin 作为 IAP 家族的一个新成员，其确切的抗细胞凋亡作用已得到证实。随着对 Livin 抗细胞凋亡作用、信号传导途径及与人肿瘤关系研究的深入，相信对于进一步揭示细胞凋亡机制、肿瘤形成机理以及对于肿瘤的诊断和治疗都会提供新的重要启示。Livinα 在正常前列腺组织不表达，而在良性前列腺增生和前列腺癌中高表达，为我们提供了一个新的探索思路：以 Livinα 基因为靶点治疗良性前列腺增生和前列腺癌，特别是以其为靶点治疗早期良性前列腺增生，是否可以降低手术发生率。目前针对 Livin 基因与前列腺腺癌和良性前列腺增生的发生发展的相关性的研究甚少，为进一步明确它们之间的关系，仍有待于更深入的研究。

## 参 考 文 献

[1] Vucic D,Stennicke HR,Pisabarro MT,et al.MI-IAP,a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas[J].Curr Biol,2000;10(21):135-166.

[2] Yagihashi A,Asanuma K,Tsuji N,et al.Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients[J].Clin Chem,2003;49

（下转第 717 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 1 力学测试结果(最大载荷值)

| 组别 | 标本数 | 前 屈(N) | 后 伸(N) | 左侧弯曲(N) | 右侧弯曲(N) | 左侧扭转(Nmm) | 右侧扭转(Nmm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A 组 | 5 | 35.70±0.63 | 35.93±0.38 | 43.30±0.76 | 43.65±0.81 | 3567.80±143.65 | 3582.40±108.96 |
| B 组 | 5 | 35.56 ±0.43 | 35.42±0.17 | 42.86±0.85 | 43.01±0.78 | 3466.40±53.22 | 3498.60±56.93 |
| C 组 | 5 | 36.25±0.44 | 36.13±0.57 | 44.19±1.07 | 44.15±0.85 | 3670.80±76.63 | 3649.00±48.43 |

## 3 讨 论

本项实验中 X 线检查、组织学检查及生物力学稳定性测试均显示复合 rhBMP-2 的 n-HA/PA66 组和自体髂骨移植组在新骨形成和力学稳定性方面无明显差异,而优于单纯的 n-HA/PA66 组。分析其原因, 一方面本实验中选用的 n-HA/PA66 复合材料具有与人体骨组织更为接近的理化性能,其弹性模量达 7GPa,更接近于人体骨皮质的弹性模量(7~25GPa)。复合材料中 n-HA 针晶在形态、组成上与人体骨磷灰石针晶相似, 具有优良的生物相容性,能充分发挥 HA 的骨传导性。在植入后,HA 释放出 $Ca^{2+}$和 $PO_4^{3-}$,营造了一个利于成骨的微环境。$Ca^{2+}$和 $PO_4^{3-}$沉积在纤维上,对基质起钙化作用,促进新骨的生成。这一过程与骨组织中的基质钙化过程相似[4]。而融合器表面的粗糙处理也为骨组织的长入提供了条件。另一方面骨形态发生蛋白-2 是诱导成骨活性最强的细胞因子之一, 其基因重组产品 rhBMP-2 能促进脊柱的融合,FDA 已经批准临床应用于腰椎前路椎间融合术。胶原蛋白海绵能使 rhBMP-2 的逐步释放,使其在植入体内的一段时间能维持一定的浓度,以更有利于诱导新骨的形成[5]。这些均可能是在早期 (12 周) 复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器就可以达到与自体髂骨移植相近融合效果的原因,而单纯的 n-HA/PA66 椎间融合器因为缺乏骨诱导作用,新生骨形成较慢,故早期(12 周)融合的效果低于自体髂骨和复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器。

组织学、影像学和生物力学检测结果显示,12 周时复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器与自体髂骨在椎体间的融合度及力学稳定性比较均无显著性差异。说明复合 rhBMP-2 的 nHA/PA66 椎间融合器具有良好的椎间融合效果。由于 nHA/PA66 具有优良的生物相容性、骨传导性和生物力学特性, 复合 hBMP-2 后又具有了一定的骨诱导性,促进了新生骨组织的形成,增强了椎体间的早期融合效果,可作为一种理想的椎间融合器材料。

(通讯作者: 蒋电明, 教授, 博士导师,E-mail: jdm571026@vip.163.com)

## 参 考 文 献

[1] 李玉宝,主编.纳米生物医药材料[M].第 1 版,北京:化学工业出版社,2004.36-40.

[2] Harvinder S,Sandhu,Jeffrey M.Toth,Ashish D.Diwan, et al.Histologic Evaluation of the Efficacy of rhBMP-2 Compared With Autograft Bone in Sheep Spinal Anterior Interbody Fusion[J]. Spine, 2002;27:567-575.

[3] Robert Pflugmacher,Philipp Schleicher,Sarah Gumnior,et al. Biomechanical Comparison of Bioabsorbable Cervical Spine Interbody Fusion Cages[J].Spine,2004;29:1717-1722.

[4] 王学江,李玉宝.羟基磷灰石纳米针晶与聚酰胺仿生复合生物材料研究[J].高技术通讯,2001;5:1-5.

[5] Harvinder S,Sandhu.Bone Morphogenetic Proteins and Spinal Surgery[J].Spine,2003;28:S64-S73.

(上接第 691 页)

(7):1206-1208.

[3] Gazzaniga P,Gradilone A,Giuliani L,et a1.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.

[4] Crnkovic-Mertens I,Hoppe-Seyler F,Butz K.Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML2IAP/KIAP gene[J].Oncogene,2003;22(51):8330-8335.

[5] Ashhab Y,Alian A,Plliack A,et a1.Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J].FEBS Lett,2001;495(4):56-60.

[6] Kasof GM,Gomes BC.Livin,a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J].J Biol Chem,2001;276(5):3238-3246.

[7] 鞠 文,何远桥,杨 军,等.BP H 和前列腺腺癌中 Livin 的表达及其意义[J].临床泌尿外科杂志,2005;20(12):762-764.

[8] Schmollinger JC,Vonderheide RH,Hoar KM,et al.Melanoma inhibitor of apoptosis protein(ML-IAP)is a target for immune-mediated tumor destruction[J].Proc Natl Acad Sci USA,2003;100(6): 3398-4403.

[9] Andersen MH,Becker JC,Straten P.Identification of an HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte(CTL)epitope from ML-IAP[J].J Invest Dermatol,2004;122(5):392-399.