

• 临床检验研究论著 •

Livin α , β 在人脑胶质瘤中的表达及临床意义

李 璐¹, 夏为民², 张 一^{2△}

(1. 江苏常州市第一人民医院检验科, 江苏常州 213003; 2. 江苏常州市第一人民医院神经外科, 江苏常州 213003)

摘 要:目的 探讨 Livin α , β 基因在脑胶质瘤中的表达及意义。方法 采用荧光实时定量 PCR 技术检测 122 例人脑胶质瘤组织及其 33 例邻近正常脑组织, 10 例良性脑肿瘤中的 Livin α , β mRNA 及内参 Gapdh 的表达水平。结果 Livin α 在脑胶质瘤及其邻近正常脑组织, 良性脑肿瘤中的表达无统计学意义; Livin β 在高分化组(67 例)的表达明显高于低分化组(55 例)($P < 0.05$), 两组分别与良性脑肿瘤组(10 例)比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中 33 例胶质瘤与邻近正常脑组织比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Livin β mRNA 在胶质瘤的发生及发展中起重要作用。

关键词: Livin 基因; 脑胶质瘤; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0423-02

Expression of Livin α , β gene and its significance in human gliomas

Li Lu¹, Xia Weimin¹, Zhang Yi^{2△}

(1. Clinical Laboratory, 2. Department of Neurosurgery, the First People's Hospital of Changzhou, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

Abstract: Objective To observe the expression of Livin α , β gene in human gliomas. Methods Expression level of Livin mRNA was detected in 122 cases of human gliomas, 33 cases of adjacent normal brain tissue and 10 cases of benign brain tumors by real time quantitative polymerase chain reaction (PCR) technique. Results There was no difference of Livin α expression between gliomas and benign tumors. But the expression of Livin β in gliomas was significantly higher than that in benign tumors ($P < 0.05$), in grade I-II gliomas was much higher than that in grade III-IV gliomas ($P < 0.05$), and in gliomas was significantly lower than that in adjacent normal tissue ($P < 0.05$). Conclusion Livin β mRNA might be with significance in the origin and development of human gliomas.

Key words: Livin gene; human glioma; polymerase chain reaction

Livin 基因是近年发现的凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员, 有 α , β 两种异构体^[1-2]。其在黑色素瘤、膀胱癌等肿瘤组织中的表达及其生物学特性已被国内外学者广泛地研究与探讨, 而 Livin 基因与脑胶质瘤之间的关系研究鲜见报道, 特别是采用先进的荧光实时定量 PCR 技术检测 Livin 基因的还未见报道。因此, 本研究用该技术检测 Livin 在人脑胶质瘤组织中的表达, 以探讨 Livin 基因在胶质瘤的发生和恶性演变中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 1999~2006 年本院 122 例经手术后病理证实的人脑胶质瘤标本, 男 68 例, 女 54 例, 年龄 15~75 岁。同时收集 33 例胶质瘤患者肿瘤邻近正常的脑组织标本, 收集 10 例良性脑肿瘤标本。所有组织采集后立即置液氮中(-80℃)长期保存备用。肿瘤组织按 WHO 胶质瘤分级标准 I 级 21 例, II 级 46 例, III 级 29 例, IV 级 26 例, 其中 I 级, II 级为高分化组, III 级, IV 级为低分化组, 邻近正常脑组织为距离肿瘤边缘 3 cm 以上, 病理检查未发现肿瘤组织, 良性脑肿瘤病理为脑膜瘤 7 例, 听神经瘤 3 例。所有患者术前均未接受化疗和放疗。

1.2 仪器与试剂 RNA 抽提及 cDNA 合成 取组织块 50 mg, 采用 Trizol 试剂(上海申能博彩公司)抽提总 RNA。核酸蛋白检测仪(德国 Eppendorf)检测 RNA 浓度。取恒定量 RNA(2 μ g)按 RevertAid 首链 cDNA 合成试剂盒(立陶宛 MBI Ferments 公司)合成 cDNA(反应体积 20 μ L), 反应体系及条件详见试剂盒说明书。

1.3 方法 实时定量 PCR 检测: 采用 LightCycler 全自动荧光实时定量 PCR 仪(瑞士罗氏)检测。以 Gapdh 基因的表达作为内参。Livin 和 Gapdh 引物及 Taqman 探针序列由 Primer

primer 引物设计软件设计、上海英骏生物技术有限公司合成。共用 Livin Forward primer: 5'-ACC CGT GGG AAG AAC CG-3'; Livin α Reverse primer: 5'-GGG CTC AAG AAC CCA CCA C-3'; Livin β Reverse primer: 5'-ATC CCT GGC TCC TGG CT-3'; Livin Probe: 5'-AGC CCC TGT GGC CCC CTC CGT CCC T-3'。Gapdh Forward primer: 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TC-3'; Gapdh Reverse primer: 5'-CGT TCT CAG CCT TGA CGG T-3'; Gapdh Probe: 5'-FAM TTT GGT CGT ATT GGG CGC CTG TAMRA-3'。PCR 反应体积为 25 μ L, 内含 cDNA 2 μ L(相当于 200 ng RNA), 10 x Buffer 2.5 μ L, 25 mM MgCl₂ 1.5 μ L, 10 mM dNTP 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 100 uM 引物及探针各 0.1 μ L。反应条件为: 93℃ 120 s 预变性, 93℃ 45 s, 55℃ 45 s, 共 40 个循环。55℃ 延伸时采集荧光信号。Gapdh 的 RT-PCR 反应体系及条件同 Livin。

1.4 Livin 基因表达计算方法 计算方法为简化的 2- $\Delta\Delta$ Ct 法^[3]。在计算 Livin 基因的表达量时, 以同一份标本的 Livin Ct 值(C 代表 Cycle, t 代表 threshold, Ct 值的含义是反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数)减 GAPDH Ct 值, 设其为 Δ Ct。各标本的 0.5 Δ Ct 为 amount, 正常脑组织的 amount 平均数为 average。各标本的 amount/average 即为 Livin 基因的表达水平(相对于正常脑组织, 以倍数表示)。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件, 采用随机设计资料的方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 Livin α 在高分化组、低分化组、良性脑肿瘤组及邻近正常脑组织组中的表达无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 Livin β 在高分化组、低分化组和良性脑肿瘤组的表达 胶质瘤高分化组与低分化组相比 Livin β 的表达有统计学意义 ($P<0.05$), 同时这两组分别与良性脑肿瘤组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 胶质瘤与良性脑肿瘤 Livin β 表达			
组别	<i>n</i>	Livin β ($\bar{x}\pm s$)	<i>P</i> 值
高分化组(1)	67	0.0483 \pm 0.0106	$P=0.048^*$
低分化组(2)	55	0.0126 \pm 0.0031	$P=0.026^\#$
良性脑肿瘤组(3)	10	0.1628 \pm 0.0792	$P=0.031^\Delta$

*: (1)组与(2)比较; #: (2)组与(3)组比较; Δ : (1)组与(3)组比较。

2.3 Livin β 在 33 例胶质瘤组与邻近正常组织、良性脑肿瘤组的表达 统计分析显示胶质瘤组与邻近正常组织组、良性脑肿瘤组相比较 Livin β 的表达有统计学意义 ($P<0.05$), 而邻近正常脑组织组与良性脑肿瘤组相比无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 胶质瘤与邻近正常脑组织及良性脑肿瘤 Livin β 表达			
组别	<i>n</i>	Livin β ($\bar{x}\pm s$)	<i>P</i> 值
胶质瘤组(1)	33	0.0251 \pm 0.0039	$P=0.001^*$
邻近正常脑组织(2)	33	0.0628 \pm 0.0072	$P=0.078^\#$
良性脑肿瘤组(3)	10	0.1628 \pm 0.0792	$P=0.022^\Delta$

*: (1)组与(2)比较; #: (2)组与(3)组比较; Δ : (1)组与(3)组比较。

3 讨 论

细胞的凋亡是机体维持平衡的重要机制, 肿瘤的发生不仅与细胞的过度增殖有关, 也与细胞凋亡减少有关, 肿瘤细胞通过各种机制逃逸凋亡是恶性肿瘤发生的机制之一^[4]。Livin 基因是 IAP(凋亡抑制蛋白)家族近年新发现的一种凋亡抑制蛋白, Lin 等^[5]使用氨基酸一致序列结构的 BIR 从胚胎肾的 cDNA 文库中发现 Livin 的基因位于 20 号染色体的 q13.3, 转录的产物 mRNA 有两种, 分别为编码 298 个氨基酸(Livin α)和 280 个氨基酸(Livin β)的不同亚型结构的蛋白质。这两种微小差异的异构体仅后者外显子 6 缺失 54 bp, 均具有抗凋亡的作用, 但是二者在抗凋亡功能上并非完全一致且在组织表达谱上也不尽相同^[6], Kasof 和 Goes^[1]发现 Livin 仅在胎盘及胎脑中组织表达; Ashhab 等^[2]发现人胚胎组织中无 Livin α 的表达, 而在胎肾中有 Livin β 的高表达, 在心脏、脾脏中低表达; 在成人组织中发现心脏、肺、脾及卵巢中 Livin α, β 均有表达。在不同的肿瘤组织中, Livin 的表达情况亦不相同, 如黑色素瘤、膀胱癌、胰腺癌细胞系及结肠癌细胞系、非小细胞肺癌、前列腺癌细胞系等^[2,6-10]。Gazzaniga 等^[6]检测 30 例膀胱癌, 发现 Livin α 基因的表达显著上调, Livin α 基因表达阳性的病例组较阴性组肿瘤的复发间隔时间明显缩短, 推测 Livin α 基因表达可能与膀胱癌复发存在相关性。

荧光实时定量 PCR 技术是一项具有高灵敏性、高特异性和高精确性的新技术。为能准确调查 Livin 两种异构体在脑胶质瘤中的表达情况, 我们采用该技术同时检测脑胶质瘤中 Livin α, β 的表达情况。结果显示 Livin α, β 在良性脑肿瘤、邻近正常脑组织中均低表达, Livin α mRNA 在胶质瘤中少量表达, 且在良性脑肿瘤、邻近正常脑组织、高分化组和低分化组之间的表达无统计学意义 ($P>0.05$), 与靳峰等^[11]的研究相吻

合。进一步证明 Livin α, β 在不同组织中表达谱的差异。而 Livin β mRNA 在胶质瘤和良性脑肿瘤中的表达差异有统计学意义, 在低级别和高级别胶质瘤中的表达差异亦有统计学意义, 说明 Livin 在胶质瘤中的高表达实际上是 Livin β 的高表达, 是 Livin β 的过度表达抑制了肿瘤细胞的凋亡, 引起肿瘤细胞的过度增殖, 导致了肿瘤的发生。由此可以推测是 Livin β mRNA 参与了胶质瘤的发生及发展, 其强烈抑制凋亡的作用使胶质瘤成为恶性程度极高的脑肿瘤之一。亦可能与肿瘤的恶性生理学行为有关^[12]。胶质瘤的高复发率, 可能与 Livin 基因的高表达存在一定的相关性, 这也是下一步研究的目标。

另外, 肿瘤邻近正常脑组织与肿瘤组织是自身对照, 比较发现邻近正常脑组织组与良性脑肿瘤组之间 Livin β 的表达无统计学意义 ($P>0.05$), 而胶质瘤组与这两组比较均有统计学意义 ($P<0.05$), 说明肿瘤邻近脑组织与良性脑组织一样可以作为 Livin β 基因表达的正常对照。

Livin β 在正常脑组织中不表达或仅有少量表达, 在胶质瘤组织中特异性的高表达, 表明其与胶质瘤的发生、发展及预后关系密切, 研究 Livin β 的作用机制可为胶质瘤的治疗及预后提供新的理论依据。

参考文献

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

[2] Ashhab Y, A lian 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.

[3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[4] 刘俊华, 吴纪祥, 刘益飞, 等. Livin 在非小细胞癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(2): 247-249.

[5] Lin JH, Deng GHuang Q, Morser J. A novel member of the inhibitor of apoptosis protein family[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(3): 820-31.

[6] 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.

[7] 向欣, 黄正松, 石忠松, 等. 脑星形细胞瘤 livin 基因表达与细胞增殖的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(9): 1141-1142.

[8] Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, et al. Detection of an ti- Livin antibody in gastrointestinal cancer patients[J]. Clin Chem, 2003, 49(7): 1026-1027.

[9] Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, et al. Expression of survivin mRNA and Livin mRNA in non-small- cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2004, 46(3): 299-304.

[10] 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(11): 1359-1361.

[11] 靳峰, 赵洪洋, 郭守刚, 等. Livin 在人脑胶质瘤中的表达及生物学意义[J]. 中华神经外科疾病研究杂, 2006, 5(5): 418-421.

[12] 杨辛治, 袁贤瑞, 史帅涛. Livin 在脑胶质瘤中的表达及意义[J]. 中国耳鼻喉颅底外科杂志, 2007, 13(5): 321-323.