

Livin 与 Caspase-3 在口腔鳞状细胞癌中的表达及相关性研究

解传斌, 颜雨春

摘要 目的 探讨凋亡抑制蛋白(IAP) Livin 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达及其相关性,为对患者诊断及监测、评估术后复发、转移的风险程度提供参考。方法 采用 RT-PCR 法对 45 例 OSCC 组织及 11 例正常口腔组织(NOT)中的 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 的表达进行检测。结果 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 45 例 OSCC 组织及 11 例 NOT 组织均有不同程度的表达; Livin mRNA 在 OSCC 组织中的表达高于 NOT 组织($P < 0.05$),在有淋巴结转移组的表达高于无淋巴结转移组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两者在 OSCC 组织中的相对含量均与患者的性别和年龄无关,但与肿瘤的病理分期、分化程度有关,相关分析显示 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 组织中的表达呈相关关系,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 Livin 与 Caspase-3 基因的异常表达与 OSCC 的病理生物学行为密切相关,联合检测 Livin 与 Caspase-3 可为评价 OSCC 的浸润、转移及患者预后提供临床参考,为研究 OSCC 发病机制提供新的思路。

关键词 口腔鳞状细胞癌; 凋亡抑制蛋白 Livin; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; RT-PCR

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0498-04

在头颈部恶性肿瘤中,口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)较常见,因其恶性程度较高,且具有较强的浸润性,易发生淋巴结及远处脏器转移,严重危害患者的生命安全。我国口腔颌面部的恶性肿瘤 80% 以上为鳞状细胞癌,5 年生存率约为 60%,且发病率呈逐渐上升趋势^[1]。目前针对 OSCC 的研究较多集中于细胞凋亡和增殖的平衡

机制方面,已证实凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP) Livin 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在上述过程中发挥重要作用。在乳腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、脑星形细胞瘤等多种恶性肿瘤组织中均发现 Livin 的表达^[2-3]; Caspase-3 作为半胱氨酸蛋白酶家族中的一员,在细胞凋亡过程中发挥重要作用,而拮抗或抑制 Caspase-3 的活性可抑制细胞凋亡发生^[4]。但二者在 OSCC 及正常口腔组织(NOT)中表达情况则少有报道,该实验采用 RT-PCR 技术检测分析 OSCC 及 NOT 中 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 的表达程度,探讨两者在 OSCC 发生、发展中的作用及相互关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2011 年 10 月~2013 年 2 月在安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科就诊,并均经组织病理检查确诊为 OSCC 患者新鲜组织标本 45 例,另选 11 例患者为阴性对照组(NOT 组)。所有 OSCC 组患者均为首次确诊,术前均未行放、化疗或其他抗肿瘤治疗,均无远端脏器的转移,无其他恶性肿瘤史,无家族肿瘤史。所有切取的 45 例 OSCC 组织中男 28 例,女 17 例;年龄 43~79(43.21 ± 16.73)岁;依国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)(2002)口腔癌 TNM 分类分期: I~II 期 30 例, III~IV 期 15 例;参照 1997 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)病理学标准分级:高分化 29 例,中低分化 16 例;伴有颈部淋巴结转移 18 例,无淋巴结转移者 27 例。另 11 例 NOT 组织标本中 7 例取自阻生齿拔除患者,4 例取自牙槽嵴修整患者。所有标本均于术中取材后立即置于液氮中,然后移至 -80℃ 超低温冰箱中贮存备用。

1.2 主要试剂及仪器 PCR 试剂、逆转录试剂盒、

2013-12-05 接收

基金项目:安徽省卫生厅科研项目(编号:2010-B-15)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院口腔科,合肥 230022

作者简介:解传斌,男,硕士研究生;

颜雨春,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 99yyc@sina.cn

cantly higher than that in 30 control people. The serum levels of MMP-2 and MMP-9 in UC patients were correlated with the the change of intestinal mucosal permeability. **Conclusion** The serum levels of MMP-2 and MMP-9 in UC patients are significantly increased, which is correlated with the change of intestinal mucosal permeability.

Key words MMP-2; MMP-9; ulcerative colitis; intestinal mucosal permeability

TRIzol 试剂、DNA Marker、Taq DNA 聚合酶(Fermentas 公司,美国); TGL-16H 冷冻离心机(黑马仪器公司,中国); 琼脂糖凝胶(OXOID 公司,英国); TGL-18R 冷冻离心机、DY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂); 溴化已锭(10 mg/ml) (Sigma 公司,美国); 2720PCR 仪器(ABI 公司,美国); GSM 凝胶图像分析管理系统(3.0) (美国 SIM 公司)。

1.3 实验方法 Livin 与 Caspase-3 及内参 β -actin 引物均由上海生工生物工程技术有限公司运用 Primer Premier 5.0 软件设计并合成引物,见表 1。取备用组织 100 mg 按 TRIzol 法提取总 RNA,用 M-MLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒逆转录。RT-PCR: 以逆转录产物 2 L 作为模板,选用 PCR 扩增试剂在 PCR 仪上进行 PCR 扩增,以 β -actin 为内参。在 PCR 仪中,Livin 的扩增条件为: 94 °C 45 s,退火 53 °C 45 s,延伸 72 °C 45 s,冰上冷却,扩增 35 个循环; Caspase-3 的扩增条件: 94 °C 45 s,退火 55 °C 45 s,延伸 72 °C 45 s,冰上冷却,扩增 35 个循环; 内参 β -actin 的 PCR 扩增条件为: 94 °C 30 s,退火 55 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,冰上冷却,扩增 30 个循环。反应结束后,取适量 PCR 反应产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色。用数字化凝胶成像系统采集图像,半定量分析电泳条带的灰度值。结果以目的条带与内参条带的灰度值的比值表示。每个样本重复 3 次。

表 1 Livin、Caspase-3 及内参 β -actin 引物序列和片段长度

基因	引物序列	片段大小 (bp)
Livin	F: 5'-GTCAGAGCCACTGTTCCCTC-3' R: 5'-GCAGAAGAAGCACCTCACCT-3'	402
Caspase-3	F: 5'-CCTGTGGCTGTGTATCCGTG-3' R: 5'-CCGAGATGTCATTCACAGTGC-3'	348
β -actin	F: 5'-GCCGAGGACTTTGATTGCAC-3' R: 5'-ACCAAAAGCCTTCATACATCTCA-3'	307

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,采用 χ^2 检验分析 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 组织中的表达差异,两种指标之间的表达相关性采用 Pearson 列联系数相关分析。

2 结果

2.1 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 的在 OSCC 和 NOT 组织中的表达 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA RT-PCR 产物电泳结果提示 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 NOT 组织中均少量表

达,但在 OSCC 中,Livin mRNA 的表达量高于 Caspase-3 mRNA,见图 1。Caspase-3 mRNA 在 OSCC 与 NOT 组织中的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),Livin mRNA 在 OSCC 中的表达量(0.542 ± 0.074) 高于 NOT 组织(0.181 ± 0.026),差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 及 NOT 组织中的表达率,见表 3。

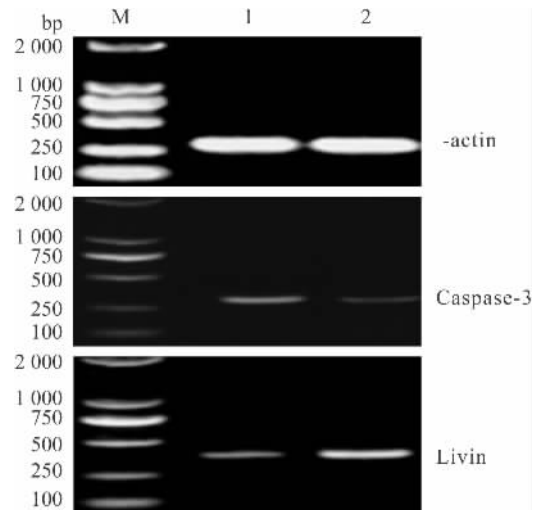


图 1 RT-PCR 检测 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 的表达

M: DL2000 Marker; 1: NOT 组; 2: OSCC 组

表 2 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 和 NOT 组织中的相对含量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Livin mRNA	Caspase-3 mRNA
OSCC	45	$0.542 \pm 0.074^{\Delta\Delta}$	0.102 ± 0.025
NOT	11	0.181 ± 0.026	0.193 ± 0.031

与 NOT 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 及 NOT 组织中的表达率 [%]

组别	Livin		Caspase-3	
	阳性	阴性	阳性	阴性
OSCC	33(73.3)	12(26.7)	14(31.1)	31(68.9)
NOT	2(18.2)	9(81.8)	10(90.9)	1(9.1)

2.2 Livin mRNA、Caspase-3 mRNA 表达与 OSCC 患者临床病理参数的关系 Livin mRNA 在伴有淋巴结转移、中低分化、III ~ IV 期的 OSCC 组织中的表达高于无淋巴转移、高分化、I ~ II 期的 OSCC 组织($P < 0.01$)。Caspase-3 mRNA 在伴有淋巴结转移、中低分化、III ~ IV 期的 OSCC 组织中的表达低于无淋巴转移、高分化、I ~ II 期的 OSCC 组织($P < 0.05$)。Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 的表达在 OSCC 患者年龄、性别参数方面的差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 Livin mRNA 在 OSCC 组织中

表4 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 组织中的表达与临床病理的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	n	Livin mRNA	t 值	P 值	Caspase-3 mRNA	t 值	P 值
性别			0.872	0.388		-0.162	0.872
男	28	0.533 ± 0.080			0.101 ± 0.023		
女	17	0.555 ± 0.071			0.103 ± 0.030		
年龄(岁)			0.682	0.278		-0.154	0.864
<54	16	0.539 ± 0.061			0.099 ± 0.019		
≥54	29	0.543 ± 0.082			0.104 ± 0.026		
分期			-11.843	<0.001		2.839	0.007
I ~ II	30	0.395 ± 0.051			0.113 ± 0.024		
III ~ IV	15	0.836 ± 0.082			0.081 ± 0.028		
淋巴结转移			-10.209	<0.001		3.234	0.004
无	27	0.412 ± 0.065			0.115 ± 0.025		
有	18	0.737 ± 0.069			0.084 ± 0.027		
分化程度			-12.014	<0.001		3.005	0.001
高分化	29	0.399 ± 0.071			0.116 ± 0.021		
中低分化	16	0.801 ± 0.064			0.076 ± 0.030		

表5 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 中表达的相关性

Caspase-3	Livin mRNA		n	χ^2 值	r 值	P 值
	阳性	阴性				
阳性	2	12	14			
阴性	31	0	31	35.841	0.668	<0.01
总数	33	12	45			

的相对含量,随着 OSCC 组织分化的增高而增高,亦随着组织学分级的增高而增高,且与淋巴结转移有关,见表4。

2.3 Livin mRNA、Caspase-3 mRNA 在 OSCC 组织中表达的相关性 在45例 OSCC 组织中,仅测得2例 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 同时表达,未测得两基因同时不表达的组织。仅 Caspase-3 mRNA 表达者12例,仅 Livin mRNA 表达者31例。根据 Pearson 列联系数相关分析, Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 组织中的表达呈相关关系,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表5。

3 讨论

细胞凋亡是细胞的生理性死亡过程,它是受基因控制的,不但需要许多与免疫相关的凋亡信号介导,还需要凋亡诱导剂和抑制剂的参与来共同完成细胞凋亡。Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的凋亡执行者之一, Caspase-3 被激活后能水解大量蛋白底物,激活其他种类的 Caspase,最终导致细胞凋亡^[7],说明 Caspases-3 对细胞凋亡是必需的。Caspase-3 在 OSCC 组织中明显降低,提示 Caspase-3 活化减少,不能引起足够的细胞凋亡,使细胞异常增殖,引发癌变^[8]。

Livin 作为凋亡抑制基因,是近年来发现的凋亡抑制蛋白家族(IAPs)中的新成员。目前发现的人类 IAP 家族成员共有8个,其共同结构特点是N端有一个或多个(目前最多为3个)串联的杆状病毒 IAP 重复序列,C端含有或不含有一个环指结构^[9]。Livin 抑制细胞凋亡作用主要是通过其 BIR 区与 Caspases 家族结合,抑制其活性,尤其是抑制 Caspases-3/-7 和 Caspases-9 的活性,阻止 Caspase 蛋白在细胞凋亡时的正常功能^[10]。因此,细胞凋亡途径失去重要的酶,使凋亡酶依赖的细胞凋亡无法正常进行。

本研究结果提示,在 OSCC 组织中, Caspase-3 mRNA 的阳性表达率明显低于 NOT 组织,其相对含量也低于 NOT 组织,且随着临床分期的增加、肿瘤分化程度的降低,其相对含量也相应降低,而与年龄、性别因素无关。在 NOT 组织中, Caspase-3 mRNA 的相对含量和表达率都比较高;而在 OSCC 组织中, Caspase-3 mRNA 的表达较低。这与毛丽梅等^[11]报道相似。提示 Caspase-3 可能在 OSCC 的发生、发展、侵袭和转移机制中起抑制作用。

Schmollinger et al^[12] 研究发现 Livin 的表达缺失可使肿瘤实现免疫逃避,提示 Livin 或可作为肿瘤免疫治疗的一个有效靶点。陶菲克等^[13] 研究发现皮肤鳞癌组织中 Livin 蛋白的阳性表达率为72.2%,提示 Livin 基因在皮肤鳞癌发生、发展中起作用。本实验结果显示, Livin 在 OSCC 组织中阳性表达率高于 NOT 组织,并且其表达与 OSCC 的病理分期、分化程度及淋巴结转移有关,提示 Livin 可能在 OSCC 的发展、浸润、转移中起重要作用,这与吴文新等^[14] 在结肠腺癌癌变中的研究一致,刘俊华等^[15] 在非小

细胞肺癌中的研究也得出了类似的结论。

本研究表明, Livin mRNA 在 NOT 中低表达或表达缺失,而在 OSCC 组织中的阳性表达率和相对含量明显升高,差异有统计学意义;同时显示 Livin mRNA 在伴有淋巴结转移组的 OSCC 组织中, Livin mRNA 的相对含量也高于无淋巴结转移组,并且在 OSCC 组织中的相对含量与病理分化程度、临床分期呈正相关,而与年龄、性别因素无关。提示 Livin 可能参与促进了 OSCC 的发生、发展,其或可作为评价 OSCC 临床分期,评估其恶性程度及预后的一个有用指标,说明 Livin 在 OSCC 的发生、发展过程中起重要作用。Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OSCC 组织中的表达呈相关关系,差异有统计学意义,提示 Livin 与 Caspase-3 在 OSCC 的发生、发展中可能存在相互抑制的作用。Caspase-3 编码的蛋白表达降低,从而减弱了其对 Livin 的抑制作用,而 Livin 表达增加,促进细胞增殖活性,过多的细胞凋亡抑制,引起细胞周期调控异常,使口腔黏膜上皮过度增生,在各种理化因素作用下最终发生癌变。本研究提示联合检测 Livin 与 Caspase-3 可以为 OSCC 临床分级、分期、评估预后提供数据支持,但仍需大量的临床数据进一步研究。

参考文献

- [1] 张志愿. 口腔颌面外科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 324-9.
- [2] Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, et al. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 362(1-2): 125-30.
- [3] 宋希双, 张志伟, 车翔宇, 等. 凋亡抑制基因 Livin 在膀胱癌中的表达及意义 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2006, 27(suppl): 37-9.
- [4] Wagener N, Cmkovic-Mertens I, Vetter C, et al. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in renal cell carcinoma and non-tumorous adult kidney [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(7): 1271-6.
- [5] 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.
- [6] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 251-2.
- [7] Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Ring J, et al. Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(2): 227-31.
- [8] 张志伟, 张月兰. 口腔鳞癌组织中 Survivin、Caspase-3 的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2009, 49(34): 89-90.
- [9] Salvesen G S, Duetkett C S. IAP proteins: Blocking the road to death's door [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(6): 401-10.
- [10] 刘芳, 周克元. 新的凋亡抑制因子 Livin [J]. *生命的化学*, 2004, 24(1): 19-21.
- [11] 毛丽梅, 王向红, 李丽华, 等. Livin 和 Caspase-3 在宫颈鳞状细胞癌癌变中的表达及意义 [J]. *河北医药*, 2010, 32(23): 3288-90.
- [12] 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 USA*, 2003, 100(6): 3398-403.
- [13] 陶菲克, 涂亚庭. 凋亡抑制蛋白 livin 在人皮肤鳞状细胞癌中表达的初步研究 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2009, 38(1): 15-7.
- [14] 吴文新, 刘惠民, 崔爱荣, 等. Livin 和 Caspase-3 在散发性大肠管状腺癌癌变过程中的表达及相关性研究 [J]. *中国全科医学*, 2012, 15(60): 2049-51.
- [15] 刘俊华, 吴纪祥, 刘益飞, 等. Livin 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(2): 247-9.

Expression and relativity of Livin and Caspase-3 in human oral squamous cell carcinoma

Xie Chuanbin, Yan Yuchun

(Dept of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To investigate the expression and relativity of Livin and Caspase-3 in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The expression of Livin mRNA and Caspase-3 mRNA in 45 cases of OSCC and 11 cases of normal oral tissue were detected by reverse RT-PCR. **Results** The positive expression rates of Livin mRNA in OSCC were significantly higher than those in normal oral tissue ($P < 0.05$). Compared with those without lymph node metastasis in OSCC, the positive ratios of Livin mRNA with lymph node metastasis were significantly higher ($P < 0.05$). The expressions of Livin were significantly related with pathological stage and the lymph node metastasis, but neither of them was correlated with sex and age. Correlation analysis showed that Livin expression level was related to Caspase-3 level ($P < 0.01$). **Conclusion** The abnormal expressions of Livin and Caspase-3 are closely related to the occurrence, progress and metastasis of OSCC, which can evaluate the degree of malignancy and prognosis of patients with OSCC reference.

Key words oral squamous cell carcinoma; inhibitor of apoptosis protein Livin; Caspase-3; RT-PCR