

Livin 和 CXCR4 蛋白表达与肺癌生物学特征关系的初步探讨

陈愉生,王贵清,李鸿茹,黄丽萍,苗彦,林明,许能奎
(福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院,福建 福州 350001)

摘要:[目的] 探讨凋亡抑制蛋白 Livin 与趋化因子受体 CXCR4 在肺癌组织与癌旁组织中表达水平及两者的关系。[方法] 用 Western Blot 法检测 50 例肺癌组织及 20 例对照组中 Livin 及 CXCR4 的蛋白表达水平。[结果] 肺癌组织中 Livin 蛋白表达阳性率为 76%(38/50),显著性高于对照组 30%($P<0.01$);肺癌组织中 CXCR4 蛋白表达阳性率为 88%(44/50),高于对照组 50%($P<0.01$)。Livin 和 CXCR4 蛋白在肺癌组织中的表达与性别、年龄、肿瘤大小、病理类型、分化程度、淋巴结转移及肿瘤分期均无关($P>0.05$)。且 Livin 蛋白表达与 CXCR4 蛋白表达呈正相关($r=0.552, P<0.01$)。[结论] Livin 蛋白与 CXCR4 蛋白在肺癌组织呈高表达,两者表达呈正相关,这两种蛋白在肺癌发生、发展中可能存在协同作用。

关键词: 凋亡抑制蛋白;Livin;CXCR4;肺癌;肿瘤转移

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2013)09-0748-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2013.09.A016

Expression of Livin and CXCR4 Protein in Lung Cancer Tissue and Their Relationship with Clinicopathological Features

CHEN Yu-sheng, WANG Gui-qing, LI Hong-ru, et al.

(Fujian Medical University, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China)

Abstract:[Purpose] To investigate the expression of Livin protein and CXCR4 protein in lung cancer tissues and para-cancerous tissues, and their relationship. [Methods] Expression of Livin protein and CXCR4 protein was detected by Western Blot assay in 50 cases of lung cancer tissues as well as in 20 cases of the controls. [Results] Positive rate of Livin in lung cancer tissues was 76%(38/50), significantly higher than that in para-cancerous tissues 30% ($P<0.01$); positive rate of CXCR4 in lung cancer tissues was 88%(44/50), higher than that in the control group 50% ($P<0.01$). Moreover, expression of Livin and CXCR4 did not correlate to gender, age, tumor size, histologic type, grade, lymph node metastasis and clinical staging in lung cancer tissues ($P>0.05$). Positive correlation between the expression of Livin and CXCR4 was found ($r=0.552, P<0.01$). [Conclusion] Livin and CXCR4 are highly expressed in lung cancer tissues. The expressions of Livin show positive associated with CXCR4, and play synergistic effect in carcinogenesis and progress in lung cancer.

Key words: inhibitor of apoptosis protein; Livin; CXCR4; lung cancer; metastasis

Livin 是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的新成员,具有抗细胞凋亡功能,使肿瘤细胞数增加,并通过调控下游相关基因促进肝癌^[1]、胃癌^[2]、前列腺癌^[3]的侵袭与转移。CXCR4 是肿瘤细胞,尤其是恶性肿瘤细胞常见的趋化因子受体,是肿瘤侵袭、转移的表型,在肿瘤发生、发展中是必不可少的因子。研究表明 Livin 通过 NF- κ B 信号转导途径促进肿瘤 CXCR4 蛋白的表达从而增加

肿瘤细胞的侵袭性^[4]。本文探讨了 Livin 与 CXCR4 在肺癌组织中的表达及其与肺癌生物学特征的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集

收集福建省立医院 2010 年 9 月至 2012 年 3 月经手术切除的肺癌组织 50 例,标本于手术切取后投入液氮 24h,转移至 -70°C 冻存。其中男性 31 例,女性 19 例,年龄 35~74 岁,平均年龄 59 ± 7 岁。肺鳞癌

收稿日期:2012-11-13;修回日期:2013-01-07
E-mail: slyyywb@126.com

14例,肺腺癌32例,腺鳞癌3例,小细胞癌1例。按照2009年UICC的TNM分期标准,I期19例,II期13例,III期13例,IV期5例。淋巴结转移26例。另取20例癌旁肺组织作为对照,其中男性11例,女性9例,年龄35~69岁,平均年龄59±8岁。两组差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 主要仪器和试剂

垂直电泳仪及湿转电转膜仪(美国Bio-Rad公司),脱色摇床(北京DTY-2000型),BCA定量试剂盒(北京艾德莱生物公司),PDVF膜(美国PALL Gelman Laboratory),一抗兔抗人单抗GAPDH(美国cell signaling公司),一抗鼠抗人Livin单抗(美国Imegex公司),一抗兔抗人CXCR4多克隆抗体(美国Abcam公司),羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(美国Jackson公司),羊抗鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(上海Gene Operation),ECL化学发光液(美国PIERCE公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 组织蛋白提取及测定

取100mg组织加入650μl细胞组织裂解液(50mM Tris,150mM NaCl,1% NP-40,0.5% Sodium deoxycholate,0.1% SDS,PMSF等多种蛋白抑制剂),提取组织总蛋白,冰上裂解30~60min,4℃、12 000rpm离心10min,取上清。样品经BCA定量试剂盒测定蛋白浓度,-70℃保存。

1.3.2 Western blot

取等量蛋白上样于12% SDS-聚丙烯酰胺进行变性凝胶电泳,垂直电泳恒压80V,20min待所有泳道的溴酚蓝完全进入分离胶后将电压调成110V,直至溴酚蓝跑到凝胶底部时停止电泳。取出凝胶根据Mark标记切取所需的相应分子量蛋白条带,按三明治结构进行湿转1h,恒流300mA;5%脱脂奶粉室温封闭2h,稀释后的一抗于4℃过夜孵育(Livin 1:500,CXCR4 1:1 000,GAPDH 1:1 000);TBST洗膜漂洗3次,每次10min;二抗室温孵育2h,TBST洗膜漂洗4次,每次10min,滤纸吸干PDVF膜上的水分后进行ECL化学发光、显影、定影。应用Quantity one软件测量各指标灰度值,目

的蛋白表达水平用相对灰度值表示(目的蛋白灰度值/GAPDH灰度值<0.01为不表达^[7])。

1.4 统计学处理

应用SPSS17.0软件进行分析,实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本率($n>40$)比较采用 χ^2 检验, $n<40$ 或 T 值<5采用Fisher确切概率。灰度值比较:两组以上采用完全随机单因素方差分析,两组内采用成组 t 检验;相关性分析采用Pearson相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Livin及CXCR4蛋白表达

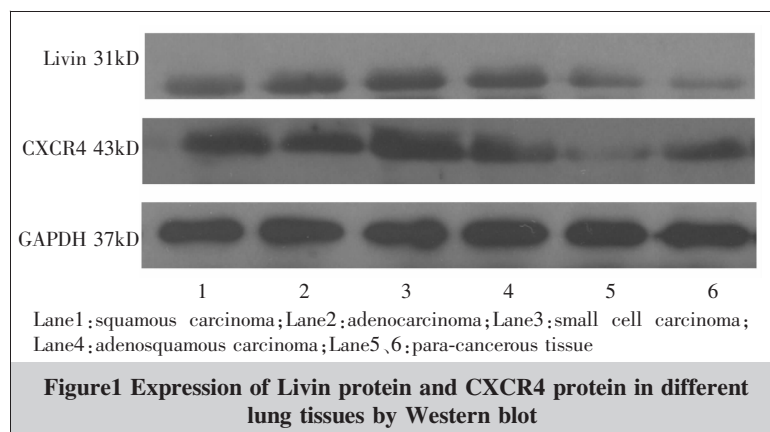
Livin及CXCR4在肺癌组织中均高表达,而在对照组中低表达。Livin在肺癌组织中的表达阳性率为76%(38/50),明显高于对照组30%(6/20)($\chi^2=12.948,P<0.01$);CXCR4表达阳性率为88%(44/50),也明显高于对照组50%(10/20)($\chi^2=11.699,P<0.01$)(Table1、Figure1)。

2.2 Livin及CXCR4蛋白表达与肺癌生物学特征的关系

肺癌组织中Livin蛋白及CXCR4蛋白在不同性别、年龄、病理类型、肿瘤大小、肿瘤分化程度、有

Table 1 Expression level of Livin protein and CXCR4 protein in different lung tissues

Histology	N	Livin	CXCR4
Lung cancer	50	0.3392±0.3124	0.8216±0.5601
Squamous carcinoma	14	0.2986±0.3069	0.7685±0.5020
Adenocarcinoma	32	0.3331±0.2855	0.8265±0.6109
Adenosquamous carcinoma	3	0.2976±0.3256	0.7627±0.1812
Small cell carcinoma	1	1.2271	1.6626
Para-cancerous tissues	20	0.0797±0.1523	0.3677±0.3965



无淋巴结转移及临床分期方面表达均无统计学差异 ($P>0.05$)(Table 2)。

2.3 Livin 与 CXCR4 表达相关性分析

Pearson 相关性分析显示,Livin 与 CXCR4 在肺癌组织中的表达呈正相关,相关系数 $r=0.552$, $P<0.01$ (Figure 2)。

3 讨 论

研究表明抗凋亡基因过度表达导致细胞凋亡减少,持续细胞增殖是发生肿瘤侵袭的必要条件^[5],主要通过凋亡抑制蛋白 Bcl-2 和 IAPs 的调节。Livin(又称 MI-IAP/KIAP)是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的成员之一,Livin 基因位于 20q13.3,含有一个 BIR 结构域和一个 RING 指结构域。Livin 在发育的胎儿组织和一些癌细胞系中呈高表达,而在大多数正常组织中低表达或不表达。Livin

被证实能够直接通过 BIR 结构域与 caspase 结合,并抑制 caspase 的活性,尤其是抑制 caspase-3、-7、-9 的活性从而发挥抗细胞凋亡作用。Livin 还可通过

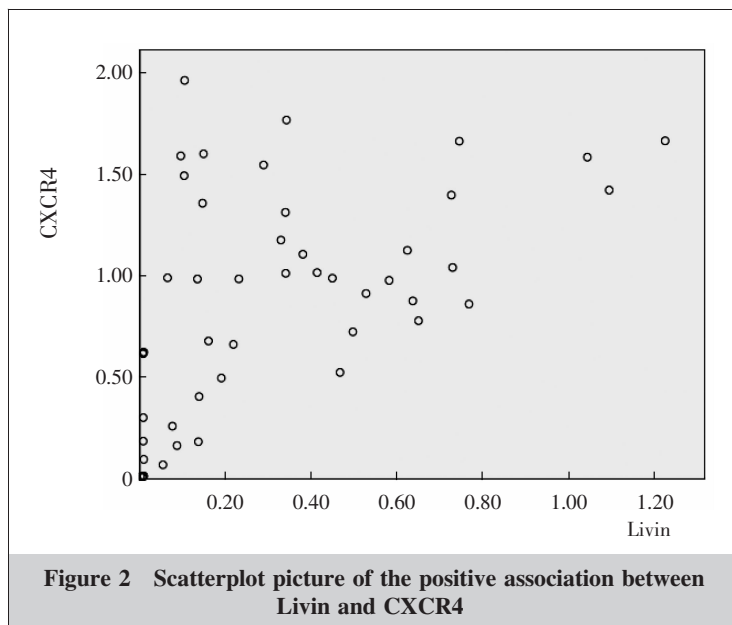


Table 2 Relationship of Livin,CXCR4 expression and clinicopathological features in lung cancer

Variable	N	Livin				CXCR4			
		n	%	$\bar{x}\pm s$	P	n	%	$\bar{x}\pm s$	P
Gender									
Male	31	25	80.6	0.3865±0.3066	0.174	28	90.3	0.8530±0.5041	0.660
Female	19	13	68.4	0.2620±0.3143		16	84.2	0.7809±0.6423	
Age(years)									
>65	12	10	83.3	0.3821±0.3374	0.590	12	100	0.8073±0.5456	0.897
≤65	38	28	73.7	0.3256±0.3076		32	84.2	0.8134±0.5655	
Histology									
Squamous carcin oma	14	10	71.4	0.2986±0.3069	0.185	13	92.9	0.7685±0.5020	0.757
Adenocarcinoma	32	25	78.1	0.3331±0.2855		27	84.4	0.8265±0.6109	
Adenosquamous carcinoma	3	2	66.7	0.2976±0.3256		3	100	0.7627±0.1812	
Small cell carcinoma	1	1	100	1.2271		1	100	1.6626	
Tumor size(cm)									
>3	26	18	69.2	0.3188±0.3081	0.635	22	84.6	0.8415±0.5902	0.836
≤3	24	20	83.3	0.3613±0.3221		22	91.7	0.8084±0.5270	
Differentiation									
Well	15	11	73.3	0.2221±0.2196	0.352	12	80	0.7966±0.6294	0.778
Moderate	21	15	71.4	0.3371±0.3381		19	90.5	0.7173±0.4961	
Poor	14	12	85.7	0.3212±0.3216		13	92.9	0.8447±0.5155	
Clinical stage									
I ~ II	32	25	78.1	0.3615±0.3224	0.515	28	87.5	0.8936±0.5747	0.253
III~IV	18	13	72.2	0.3007±0.2987		16	88.9	0.7048±0.5123	
Lymph node metastasis									
Yes	26	17	65.4	0.2791±0.3224	0.421	21	80.8	0.7032±0.5706	0.121
No	24	21	87.5	0.3225±0.3168		23	95.8	0.9466±0.5306	

TAK 使丝裂原活蛋白激酶 JNK1 和 JNK2 活化对抗 TNF 和 ICE 介导的细胞凋亡。前期研究也表明沉默 *Livin* 基因后,SPC-A1 肺癌细胞中 caspase-3 活性增加及 JNK1 活性被抑制,细胞凋亡增加^[6]。

本研究结果显示,肺癌组织中 *Livin* 的表达高于对照组癌旁组织,而 *Livin* 表达与病理类型、淋巴结是否转移、分化程度及临床分期无关,与课题组前期研究结果^[7-9]相吻合。然而,王敏等^[10]报道食管鳞癌中 *Livin* 的表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移、肿瘤分期相关。*Livin* 表达与肿瘤临床病理的关系尚未有统一论,仍需学者们进一步探讨。

CXCR4 是一种 G 蛋白偶联跨膜受体,是趋化因子 SDF-1 的受体,是肿瘤细胞表达最普遍的趋化因子受体,与趋化因子 SDF-1(CXCL12)结合,参与肿瘤的产生、生存、黏附、侵袭及转移等生物学行为。Müller 等^[11]在乳腺癌中发现 CXCR4 高表达并证实 SDF-1/CXCR4 在趋化转移中的关键作用,之后学者们陆续发现 CXCR4 在多种肿瘤中高表达。本研究显示 CXCR4 在肺癌组织中高表达并高于癌旁组织,且与肿瘤类型、分化程度无关,这与苏丽萍等^[12]研究结果一致。此外,研究中发现 CXCR4 的表达与肿瘤淋巴结转移、TNM 分期无关,这与一些研究^[12,13]报道不同。可能由于本研究样本量偏少及标本选择有关,有待于以后大样本继续研究。本研究肺癌组织标本均取至手术患者,而行手术的患者其肿瘤病灶均未发生远处转移,因此所得出的结论并不能完全代表 CXCR4 蛋白表达水平对肿瘤发生转移的影响。

目前国内外关于 *Livin* 与 CXCR4 两者关系的研究甚少,Chen 等^[4]对前列腺癌细胞(PCa)中 *Livin* 与 CXCR4 的关系进行研究,表明 PCa 细胞中 *Livin* 基因过表达,通过核转录因子 NF- κ B 途径促进其下游基因 *FN* 及 *CXCR4* 的表达,进而引起前列腺癌细胞凋亡减少,增殖及侵袭力增加;相反,沉默 PCa 细胞中 *Livin* 基因后,NF- κ B 表达下降,FN、CXCR4 蛋白表达明显降低,癌细胞增殖及侵袭力也下降。据有关研究^[14]报道 IAP 家族通过 caspase 活化参与肿瘤坏死因子(TNF)介导的信号转导诱导 NF- κ B 的激活从而发挥抗凋亡作用,同时 Helbig 等^[15]发现 NF- κ B 能够调节趋化因子 CXCR4 的表达而促进肿瘤细胞侵袭及转移。以上表明 *Livin* 可能通过 NF- κ B 信号

途径调节 CXCR4 表达而促进肿瘤侵袭及转移,但具体机制尚需深入研究。本研究检测到肺癌组织中 *Livin* 蛋白高表达的同时,趋化因子受体 CXCR4 蛋白也呈高表达,肺癌组织 *Livin* 蛋白表达与 CXCR4 蛋白表达呈正相关 ($r=0.552, P<0.01$),且肺腺癌中 *Livin* 表达水平略高于鳞癌,而 CXCR4 在肺腺癌的表达也高于鳞癌。研究中 1 例小细胞肺癌,其 *Livin* 与 CXCR4 的蛋白表达水平均明显较高。以上提示了 *Livin* 与 CXCR4 可能存在某种相关性,共同促进肿瘤形成、发生和发展。

综上所述,*Livin* 与 CXCR4 在肺癌组织中高表达,尤其是在小细胞肺癌中表达水平显著性增高,两者表达呈正相关,在肺癌发生发展中可能具有协同作用。

(致谢:感谢福州肺科医院对标本收集的支持!)

参考文献:

- [1] Liu H,Wang S,Sun H,et al. Inhibition of tumorigenesis and invasion of hepatocellular carcinoma by siRNA-mediated silencing of the *livin* gene[J].Mol Med Report,2010,3(6):903-907.
- [2] Zhao CL,Wang JX,Zhang XF,et al.Biological effects of PTEN and *livin* gene regulation in gastric cancer BGC823 cells[J].Chinese Journal of Experimental Surgery,2010,27(9):1265-1268.[赵春临,王家祥,张谢夫,等.调控胃癌 BGC823 细胞 PTEN 和 *Livin* 基因表达的生物学效应[J].中华实验外科杂志,2010,27(9):1265-1268.]
- [3] Chen F,Yang D,Che X,et al.*Livin* mediates tumor cell invasion in the DU-145 cell line via NF- κ B[J].Oncol Rep,2012,27(6):2010-2016.
- [4] Chen F,Yang D,Wang S,et al. *Livin* regulates prostate cancer cell invasion by impacting the NF- κ B signaling pathway and the expression of FN and CXCR4[J].IUBMB Life,2012,64(3):274-283.
- [5] Mehlen P,Puisieux A.Metastasis:a question of life or death [J].Nat Rev Cancer,2006,6(6):449-458.
- [6] Chen YS,Li HR,Lin M,et al.*Livin* abrogates apoptosis of SPC-A1 cell by regulating JNK1 signaling pathway[J].Mol Biol Rep,2010,37(5):2241-2247.
- [7] Li HR,Chen YS,Chen G,et al.Expression of *livin* protein in lung cancer and its relation with the expression of pro-caspase3 protein[J].Chinese Journal of Lung Cancer,2008,11(5):729-733. [李鸿茹,陈愉生,陈刚,等.*Livin* 在肺癌中的表达及与 pro-caspase3 表达的相关性分析初步探

- 讨[J].中国肺癌杂志,2008,11(5):729-733.]
- [8] Li HR,Chen YS,Chen G,et al.Expression of livin protein in lung cancer and its relation with the expression of caspase3 protein[J].Chinese Journal of Lung Cancer,2007,10(6):486-490.[李鸿茹,陈愉生,陈刚,等.livin 在肺癌组织中的表达及与 caspase3 相关性分析初步探讨[J].中国肺癌杂志,2007,10(6):486-490.]
- [9] Zheng CC,Chen YS,Chen XY,et al.Expression of livin, caspase-3,bcl-2 in lung tissue of NSCLC and their prognostic significances [J].Chinese Journal of Respiratory and Critical Care Medicine,2009,8(3):224-228. [郑春晨,陈愉生,陈小岩,等.Livin、Caspase-3 和 Bcl-2 在非小细胞肺癌的表达及生存分析[J].中国呼吸与危重监护杂志,2009,8(3): 224-228.]
- [10] Wang M,Cheng SG,Fan CH,et al. Expression and clinical significance of livin and caspase-9 in esophageal cell carcinoma[J].China Practical Medicine,2012,7(13):13-14. [王敏,程善光,范春华. Livin 和 Caspase-9 在食管鳞癌组织中的表达及临床意义[J].中国实用医药,2012,7(13):13-14.]
- [11] Müller A,Homey B,Soto H,et al.Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J].Nature,2001,410(6824):50-56.
- [12] Su LP,Zhang JP,Chen J,et al.Expression of CXCR4 in lung cancer and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Lung Cancer,2005,15(2):97-100. [苏丽萍,张进平,陈晋,等.CXCR4 在肺癌组织中的表达及临床意义[J].中国癌症杂志,2005,15(2):97-100.]
- [13] Xie SP,Zeng WH,Zuo T,et al.Expression and significance of CXCR4 chemokine receptor in non small cell lung cancer [J]. Applied Journal of General Practice,2012,10(9):1335-1336.[谢颂平,曾文慧,左涛,等.趋化因子受体 CXCR4 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J].中华全科医学,2012,10(9):1335-1336.]
- [14] Wang Q,Wang X,Evers BM.Induction of cIAP-2 in human colon cancer cells through PKC delta/NF-kappa B[J]. J Biol Chem,2003,278(51):51091-51099.
- [15] Helbig G,Christopherson KW,Bhat-Nakshatri P,et al.NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4[J].J Biol Chem,2003,278(24):21631-21638.

《中国肿瘤》编辑部关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。

使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将稿件处理费20元及以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到稿件处理费和上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿,《中国肿瘤》网址:<http://www.chinaoncology.cn>

如有任何问题,请与编辑部联系!联系电话:0571-88122280。