

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.01.010

Livin 基因在儿童急性白血病中的表达及其意义

李建厂, 贾秀红, 唐慎华, 韩琳

Expression and Significance of Livin Gene in Childhood Acute Leukemia

Li Jianchang, Jia Xiuhong, Tang Shenhua, Han Lin

Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China

Abstract: Objective To explore the expression of Livin gene in childhood acute leukemia (CAL) cells and its significance. **Methods** Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA of Livin of CAL, including acute lymphoblastic leukemia (ALL, $n=31$) and acute myeloid leukemia (AML, $n=22$), and non-leukemia group ($n=12$). **Results** The positive expression rate of Livin mRNA in CAL was 60.3%, and that of Livin mRNA in ALL cells and AML cells were 61.3% and 59.1%, respectively. The difference between them was not significant, but higher than that in control group (8.3%). And the remission rate of Livin mRNA positive AL children was lower than that of Livin mRNA negative children. **Conclusion** The overexpression of Livin mRNA plays an important effect on childhood acute leukemia, which can be used as one of the parameters in the diagnosis, prediction of recurrence and prognosis of the disease.

Key words: Livin gene; Children; Acute leukemia; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

摘要: 目的 观察 Livin 基因在急性白血病患者白血病细胞中的表达及其意义。**方法** 采用半定量反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测 31 例 ALL 及 22 例 AML 患儿白血病细胞 Livin mRNA 的表达水平, 并以 12 例非白血病患者为对照组。**结果** 急性白血病 (AL) 患儿白血病细胞 Livin mRNA 阳性表达率为 60.3%。ALL 组和 AML 组 Livin mRNA 阳性表达率分别为 61.3% 和 59.1%, 两者比较差异无统计学意义, 但均高于非白血病对照组 (8.3%), 并且 Livin mRNA 阳性患儿的缓解率明显低于阴性患儿的缓解率。**结论** Livin 基因的过度表达与 AL 的发病具有相关性, 可作为 AL 的诊断、复发及预后判断的指标之一。

关键词: Livin 基因; 儿童; 急性白血病; 反转录聚合酶链反应

中图分类号: R733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)01-0041-03

0 引言

Livin 基因是 2000 年发现的凋亡抑制蛋白家族 (IAPs) 的新成员, 它含有 BIR 序列。人类 Livin 基因定位于染色体 20q13, 全长 46 kb, 包含 7 个外显子及 6 个内含子, 其转录产物因剪接方式不同有两种 mRNA 亚型, 即 livin α 和 livin β , 分别编码 298 和 280 个氨基酸的蛋白质, 两种蛋白质在功能上没有本质差别^[1]。Livin 在胎儿发育过程中的多种组织内高表达, 在大多数健康成人的终末组织中 (除胎盘外) 低表达或不表达, 而在多数恶性肿瘤细胞中高表达^[2]。本研究旨在探讨 Livin 基因在儿童急性白血病中的表达及其与治疗预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 临床资料 收集 2008 年 8 月—2010 年 7 月间住院白血病患者的新鲜骨髓标本 53 例, 其中急性淋巴细胞白血病 (ALL) 31 例 (男 17 例, 女 14 例), 急性髓细胞白血病 (AML) 22 例 (男 10 例, 女 12 例), 并收集目前治疗缓解后骨髓标本 (共 32 例) 再次检测, 发病年龄在 14~148 月, 中位年龄为 61 月, 取 12 例同期住院的非恶性疾病 (特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、缺铁性贫血等) 患者作为对照。其中男 7 例, 女 5 例, 年龄 1~12 岁, 中位年龄 6 岁。

1.1.2 治疗方案 ALL 患儿采用全国儿科血液学组第 3 次修订方案^[3] 的 VDLP (长春新碱、柔红霉素、门冬酰胺酶、强的松) 方案进行诱导缓解化疗, AML 患者采用全国儿科血液学组 2006 年制定的方案^[4] 中的 DAE (柔红霉素、阿糖胞苷、VP16) 或 HAD (高三尖杉酯碱、阿糖胞苷、柔红霉素) 方案进行诱导缓解治疗。

收稿日期: 2011-04-25; 修回日期: 2011-10-08

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划资助项目 (2009HW005)

作者单位: 256603 山东滨州, 滨州医学院附属医院儿科

作者简介: 李建厂 (1972-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事小儿血液及肿瘤性疾病研究

1.2 标本采集

病例组及对照组均于治疗前采集新鲜骨髓液。无菌条件下抽取患儿骨髓 2 ml,置于预先准备的含 RPMI 1640 培养液的消毒离心管中,EDTA 抗凝。往容量 10ml 消毒过的离心管中加入 4 ml 淋巴细胞分离液,然后轻轻地沿管壁加入抗凝的骨髓液,1 200 r/min 离心 10 min,收集单个核细胞,用 1 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液悬浮收集的单个核细胞后于 -80℃ 临时保存。

1.3 提取总 RNA

取约 5 × 10⁶ 个细胞,用 PBS 液洗涤 2 次,加 Trizol 液 1 ml,混匀,在无 RNA 酶环境下提取总 RNA,按试剂盒说明操作。紫外分光光度计测定 RNA 纯度,同时进行 RNA 定量测定。在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳可见三条清晰亮带,说明所提取 RNA 完整,见图 1。

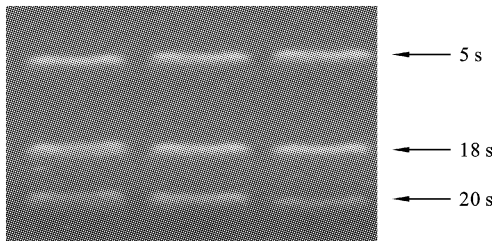


图 1 总 RNA 电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of Tissue RNA

1.4 半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

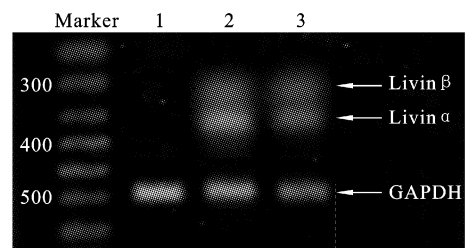
将提取的总 RNA 依试剂盒说明书进行反转录,PCR 反应体系包括:20 μmol/L 的 Livin 正、反义链引物各 0.5 μl,10 mmol/L 的 dNTPs 1.6 μl,10 × PCR 缓冲液 2 μl,TaqDNA 聚合酶 1 u,RT 产物 1 μl,其余以 DEPC 水补足至 20 μl。预实验确定产物与循环之间呈线性关系。PCR 反应条件:95℃ 预变性 2 min,然后 94℃ 变性 30 s,64℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 30 s,共 38 个循环,同时行 GAPDH 测定作为内参照。

Livin mRNA 的扩增引物序列:引物由上海生工公司设计合成,上游引物:5'-GTCCCTGCCTCTGGGTAC-3',下游引物:5'-CAGGGAGCCCACTCTGCA-3',目标片段:368 bp(Livin α)和 314bp(Livin β)。内参 GAPDH:上游引物:5'-ATGACATCAAGAAGGTG-GTG - 3',下游引物:5'-CATACCAGGAAAT-GAGCTTG-3',目的基因长度为 177 bp^[5]。

1.5 PCR 产物分析

取 PCR 产物 10 μl 与 LoadingBuffer 2 μl 混合,在 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,80 V、25 min。阳性结果可见 500、368 和 314 bp 处各有一条亮带,分别为 GAPDH、livin α 和 livin β。紫外线透射仪观察并照相,照片经图像分析软件进行分析,并读取吸光度值,取 Livin/GAPDH 吸光度比值进行半定量,代表 mRNA 表达水平。各标本重复 2 次,取平

均值,见图 2。



1: control group 2: ALL group 3: AML group

图 2 Livin α 和 Livin β 在 ALL 组和 AML 组中的表达

Figure 2 Expression of Livin α and Livin β in ALL group and AML group

1.6 统计学方法

用 SPSS 11.5 统计软件进行处理。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 及率来表示,采用 *t* 检验和秩和检验统计分析,以 *P* < 0.05 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利用 PCR 检测 Livin α、Livin β 的表达水平

在治疗前全部 53 例 AL 患儿中,白血病细胞 Livin 阳性率为 60.3% (32/53)。在所有阳性表达的白血病骨髓标本中 Livin α 和 Livin β 均同时表达,即两者具有相同的表达率(以下以 Livin α 结果表示 Livin 检测结果)。其中 ALL 组患儿的阳性率为 61.3% (19/31),AML 组患儿阳性率为 59.1% (13/22),非白血病对照组只有 1 例患儿有 Livin α 表达,表达率为 8.3% (1/12)。ALL、AML 组表达率及均明显高于非白血病对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。ALL 与 AML 组比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

2.2 利用半定量 RT-PCR 测定 Livin mRNA 的表达结果

ALL、AML 组及对照组 Livin/actin 的半定量结果分别为 (0.135 ± 0.106)、(0.124 ± 0.098)、(0.011 ± 0.008),ALL 与 AML 组患者 Livin mRNA 表达水平均高于对照组 (*P* < 0.05)。

2.3 白血病患儿缓解前后 Livin 阳性表达变化

在治疗前全部 53 例 AL 患儿中,白血病细胞 Livin 阳性率为 60.3% (32/53)。而在当前所检测的 32 例缓解后的 AL 患者中,其阳性表达率为 18.7% (6/32),明显低于治疗前,两者比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

2.4 Livin 阳性患儿与阴性患儿的缓解率

本组资料显示:32 例 Livin 阳性患儿缓解率为 78.1%,而 21 例阴性患儿的缓解率为 100%,Livin 阳性患儿的缓解率明显低于阴性患儿的缓解率,两者比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

2.5 Livin 阳性表达与治疗前外周血白细胞数量及危险分组的关系

在全部 53 例白血病患儿中,治疗前外周血白细

胞总数 $>30 \times 10^9/L$ 共 23 例,占 43.4%(23/53),其 Livin 阳性表达为 73.9%(17/23),而治疗前外周血白细胞总数 $<30 \times 10^9/L$ 共 30 例,占 56.6%(30/53),其 Livin 阳性率为 50.0%(15/30)。

Livin 基因的表达与急性白血病危险分组亦存在一定的关系(分组标准见参考文献^[3-4]),在 53 例白血病患者中,低危组 21 例,其中 8 例(38.1%) Livin 阳性,中危组 20 例,其中 14 例(70.0%) Livin 阳性,高危组 12 例,其中 10 例(60.3%) Livin 阳性。

3 讨论

细胞凋亡是目前肿瘤研究的热点,肿瘤的发生不仅和细胞过度增生有关,同时也和凋亡减少有很大的关系。细胞凋亡机制非常复杂,其过程受到多方面严密的控制。IAPs 是一类高度保守的内源性抗凋亡基因家族的表达产物,它能抑制多种途径引起的细胞凋亡。某些 IAPs 成员表达异常常引起组织细胞凋亡受阻,是肿瘤发生的重要原因之一。Livin 基因是 IAPs 家族的重要一员,它在胎儿发育过程的多种组织中高表达,提示它可能与生长发育有关;而在大多数健康成人的终末组织中低表达或不表达。研究表明,Livin 在多数恶性肿瘤,如黑色素瘤、膀胱癌、乳腺癌、鼻咽癌等多种肿瘤细胞中高表达。Ashhab 等^[1]研究证实,白血病细胞株 K562、HL-60 中 Livin 两种异构体均高表达。但在儿童白血病中研究甚少。

本研究显示,Livin 基因在儿童急性白血病中呈高表达。在治疗前全部 53 例 AL 患儿中,阳性率为 60.3%。而非白血病对照组仅为 8.3%,而缓解后的患儿中阳性表达率仅为 18.7%,明显低于治疗前。本研究还显示,ALL 组 Livin 基因阳性率为 61.3%,AML 组 Livin 基因阳性率为 59.1%,提示不同类型的 AL 患儿 Livin 基因阳性率无明显差别。因此,可以认为 Livin 的异常高表达与儿童 AL 的发病有密切关系。

在本组资料中,Livin mRNA 阴性 AL 患儿的缓解率为 100%,而阳性 AL 患儿缓解率为 78.1%,Livin mRNA 阳性患儿的缓解率明显低于阴性患儿的缓解率,提示 Livin 基因的表达与 AL 患儿的治疗效果具有相关性。目前有研究显示,白血病细胞耐药可能与 Livin 过表达有关,Livin 的高表达是白血病细胞耐药的根本原因^[6]。其机制主要是由于 Livin 过表达,抑制 Caspase-3 执行凋亡效应,促使白血病细胞对抗抗肿瘤药物诱导的凋亡,导致白血

病细胞耐药^[7],我们的结果也支持这一点。Livin 基因可作为该肿瘤的检测指标之一,这对临床治疗和评估预后具有重要意义。

综上,Livin 基因与白血病的发生、发展及治疗预后有密切的关系。Livin 基因可能成为白血病基因治疗的新靶点。目前以 Livin 作为肿瘤促凋亡治疗靶点的研究已有很大的进展,研究发现用针对 Livin 基因序列设计的特异性小干扰 RNA 和反义核酸序列技术对 Livin 基因的表达进行干预后,可阻断哺乳动物肿瘤细胞中 Livin mRNA 表达,细胞对诱导凋亡的化疗药物和射线的敏感度增加^[8]。相信今后针对 Livin 基因的研究将对儿童白血病的治疗提供新的思路 and 方向。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Subspecialty Group of Hematology Diseases, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association; Editorial Board, Chinese Journal of Pediatrics. Recommendations for diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia in childhood (3rd revised version) [J]. Chin J Pediatr, 2006, 44(5): 392-395. [中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第三次修订草案) [J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(5): 392-395.]
- [4] Subspecialty Group of Hematology Diseases; Society of Pediatrics; Chinese Medical Association; Editorial Board of Chinese Journal of Pediatrics. Suggestion of diagnosis and treatment of acute myelocytic leukemia in childhood [J]. Chin J Pediatr, 2006, 44(11): 877-878. [中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童急性髓细胞白血病诊疗建议 [J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(11): 877-878.]
- [5] Liu C, Wu X, Luo C, et al. Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell via a mechanism involving caspase 3 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 63.
- [6] Qiuping Z, Jie X, Youxin J, et al. Selectively frequent expression of CXCR5 enhances resistance to apoptosis in CD8(+)CD34(+)T cells from patients with T-cell-lineage acute lymphocytic leukemia [J]. Oncogene, 2005, 24(4): 573-584.
- [7] Lin JH, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(3): 820-831.
- [8] Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N et al. Detection of antilivin antibody in gastrointestinal cancer patients [J]. Clin Chem, 2003, 49(7): 1206-1208.

[编辑校对:刘红武]