

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.005

APRIL, XIAP 及 caspase-9 在肝癌中的表达及意义 *

郭晓东¹ 杨 美¹ 张红萍¹ 熊 璐¹ 党惠娇^{2△}

(1 解放军第 302 医院 北京 100039; 2 解放军总医院特需一科 北京 100853)

摘要 目的:探讨增殖诱导配体 APRIL, X 染色体连锁凋亡抑制蛋白 XIAP 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 caspase-9 在人肝癌组织中的表达及意义。**方法:**采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法, 分别检测 62 例肝癌患者的肝癌组织、癌旁组织及 30 例正常人的肝脏组织中 APRIL, XIAP 和 caspase-9 的表达。对比分析 APRIL, XIAP 和 caspase-9 的表达与肝癌临床病理参数的关系。**结果:**在肝癌组织中, APRIL 和 XIAP 的表达明显高于其在癌旁组织及正常肝脏组织中的表达($P<0.05$); caspase-9 的表达则明显低于癌旁组织以及正常肝脏组织($P<0.05$); 在癌旁组织和正常肝脏组织中, APRIL, XIAP 和 caspase-9 的表达无显著差异($P>0.05$)。APRIL 和 XIAP 在肝癌组织中的表达与甲胎蛋白、肿瘤组织学分级、临床病理 TNM 分级有关($P<0.05$)。**结论:**APRIL, XIAP 和 caspase-9 在肝癌组织中的表达与肝癌临床病理特征密切相关, 不仅是检测肝癌的重要生物学标志, 也是潜在的肝癌治疗靶点。

关键词: 肝肿瘤; APRIL; XIAP; caspase-9

中图分类号: R735.7, R365 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)05-819-03

Expression and Significance of the APRIL, XIAP and caspase-9 on Hepatocellular Carcinoma*

GUO Xiao-dong¹, YANG Mei¹, ZHANG Hong-ping¹, XIONG Lu¹, DANG Hui-jiao^{2△}

(1 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China;

2 Department of VIP, General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and significance of APRIL, XIAP and caspase-9 in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression levels of APRIL, XIAP and caspase-9 in HCC. The liver cancer and its adjacent tissues of 62 patients with hepatocellular carcinoma, and the normal tissues of 30 healthy people were detected respectively. The correlations of APRIL, XIAP and caspase-9 expressions with the clinicopathological features were compared and analyzed. **Results:** In the liver cancer tissues, the expression levels of APRIL and XIAP were significantly higher than those of the adjacent tissues and the normal tissues ($P<0.05$), while the expression levels of caspase-9 was significantly lower than those of the adjacent tissues and the normal tissues ($P<0.05$); There was no statistically significant difference about the expression levels of APRIL, XIAP and caspase-9 between the adjacent tissues and the normal tissues ($P>0.05$). There is a close relationship among the expression levels of APRIL, XIAP, caspase-9 and the alpha fetoprotein level, the histological differentiation and the tumor node metastasis classification ($P<0.05$). **Conclusion:** The expressions of APRIL, XIAP and caspase-9 in HCC are closely relative to the clinicopathologic features of HCC which could be the potential markers for HCC and the target for the treatment of HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma; APRIL; XIAP; caspase-9

Chinese Library Classification(CLC): R735.7, R365 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-819-03

前言

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是指发生于肝脏的恶性肿瘤,包括原发性肝癌和转移性肝癌两种,我们通常所说的肝癌多是原发性肝癌^[1]。原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一。根据最新统计,全世界每年新发肝癌患者约六十万,居恶性肿瘤的第五位^[2]。肿瘤的发生不仅与细胞的异常增殖和分化有关,也与细胞凋亡异常密切相关^[3]。研究证实,细胞凋亡是

肿瘤发生的重要机制之一^[4]。目前,肿瘤领域研究的热点是细胞凋亡过程中起关键作用的基因和蛋白^[5,6]。APRIL, XIAP 和 caspase-9 是近年来发现的凋亡调控相关因子,在多种实体肿瘤组织和肿瘤细胞中呈差异性表达^[7-10]。我们采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),通过测定 APRIL, XIAP 和 caspase-9 在肝癌组织中的表达,探讨其与肝癌的发生和发展的关系,为临床诊断和治疗提供理论依据。具体实验内容如下:

1 材料与方法

* 基金项目:解放军第 302 医院院长创新基金(2012048)

作者简介:郭晓东, E-mail: gxd302@163.com

△ 通讯作者:党惠娇, E-mail: laohushanshang@163.com

(收稿日期:2013-07-30 接受日期:2013-08-18)

1.1 材料

收集我院 2010 年 10 月至 2012 年 8 月收治并采取手术治疗的 62 例肝癌患者的肝癌组织样本。所有患者经病理学证实均符合 2001 年实行的肝癌的临床诊断标准和临床分期。本组研究对象中,男性 46 例,女性 16 例;年龄分布在 32-68 岁,平均年龄 45 岁;肿瘤直径 5.8-13.5 cm;病灶 1-3 个;其中单发 44 例,多发 18 例;AFP 平均值为 826.76 ± 182.46 ng/ml。所有患者术前均未行化疗或射频消融治疗。切取规则肝叶或肝段及距离肿瘤边缘 2 cm 处的癌旁肝脏组织与 30 例正常肝脏组织进行对比。

1.2 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂盒(RNAisoTMPlus)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒均购于 Takara 公司。APRIL, XIAP, caspase-9 及 U6 引物序列由上海阅微基因技术有限公司设计;ABI PRISM 7900 实时荧光定量 PCR 仪购自 ABI 公司。

1.3 RT-PCR 检测 APRIL, XIAP 和 caspase-9 表达

1.3.1 RNA 的提取 将组织置于液氮中研磨成粉,每 100 mg 组织加入 1 ml Trizol 试剂匀浆,匀浆后经氯仿抽提,异丙醇法浓缩 RNA。NanoDrop® ND-1000 测定 RNA 浓度并评估纯度,Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 分子完整性。

1.3.2 cDNA 的合成 按照试剂盒的说明进行操作。构建 25 μ L 反应体系:5 $\times$ RT buffer 5 μ L,dNTP (10 μ M/ μ L) 2.5 μ L,RNasin (20 U/ μ L) 2 μ L,Total RNA 8 μ g,Random Primer (0.1 μ g/ μ L) 1 μ L,MMLV 反转录酶 (5U/ul) 6 μ L,Nuclease-Free Water 3.2 μ L。42 $^{\circ}$ C 反转录 50 min,95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活反转录酶。

1.3.3 Realtime PCR 反应 以 U6 为内参基因,采用 20 μ L 的反应体系:RT product 1 μ L,2 $\times$ Master Mix 10 μ L,10uM 的 PCR 特异引物 F 1 μ L,10 uM 的 PCR 特异引物 R 1 μ L,Nuclease-Free

Water 7 μ L。反应条件如下:6 $^{\circ}$ C 4 min,然后三步反应:94 $^{\circ}$ C 30S,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,进行 40 个循环,于每个循环的第三步即:72 $^{\circ}$ C 30s 收集荧光信号。数据采用 2- $\Delta\Delta$ CT 法(CT 值定义为每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数)分析 APRIL, XIAP 和 caspase-9 表达的相对变化。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,定量数据采用独立样本 t 检验,单因素方差分析比较各组数据的组间差异。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 APRIL, XIAP 和 caspase-9 在肝癌组织、癌旁组织及正常肝组织中的表达

以 U6 为内参基因,RT-PCR 结果显示:肝癌组织中,APRIL 和 XIAP 的表达水平分别为(3.64 ± 1.07)和(2.35 ± 0.69);癌旁组织中,APRIL 和 XIAP 的相对表达水平分别为 (0.79 ± 0.23)和(0.64 ± 0.17);正常肝组织中,APRIL 和 XIAP 的相对表达水平分别为(0.70 ± 0.19)和(0.59 ± 0.15)。APRIL 和 XIAP 在肝癌组织中的表达明显高于其在癌旁组织及正常肝脏组织中的表达水平,差异显著有统计学意义(P<0.05)。肝癌组织中,caspase-9 的表达水平为 (0.51 ± 0.14);癌旁组织和正常肝组织中,caspase-9 的表达水平为(1.78 ± 0.31)和(1.85 ± 0.35)。caspase-9 在肝癌组织中的表达则明显低于其在癌旁组织及正常肝脏组织中的表达水平,差异显著有统计学意义(P<0.05)。APRIL, XIAP 和 caspase-9 在癌旁组织和正常肝脏组织中的表达水平比较,差异无显著意义(P>0.05)。

表 1 APRIL, XIAP 和 caspase-9 在不同病理特征患者肝癌组织中的表达

Table 1 Expressions of APRIL, XIAP and caspase-9 in hepatocellular carcinoma tissues of patients with different pathological features

Pathological parameters		Cases(n)	APRIL	P	XIAP	P	caspase-9	P
Sex	Male	46	3.72 ± 1.12	>0.05	2.36 ± 0.70	>0.05	0.52 ± 0.15	>0.05
	Female	16	3.57 ± 1.06		2.32 ± 0.75		0.49 ± 0.17	
Age	<50	33	3.68 ± 1.07	>0.05	2.37 ± 0.71	>0.05	0.51 ± 0.16	>0.05
	≥ 50	29	3.59 ± 1.10		2.33 ± 0.72		0.53 ± 0.17	
Tumor Size	≤ 5 cm	35	3.54 ± 1.11	>0.05	2.28 ± 0.67	>0.05	0.50 ± 0.16	>0.05
	>5 cm	27	3.78 ± 1.16		2.41 ± 0.77		0.52 ± 0.18	
Differentiation	High	36	2.59 ± 0.69	<0.05	1.53 ± 0.42	<0.05	0.65 ± 0.19	<0.05
	Middle or lower	26	4.98 ± 1.36		3.48 ± 0.77		0.32 ± 0.15	
Cirrhosis	Yes	21	3.81 ± 1.16	>0.05	2.44 ± 0.73	>0.05	0.48 ± 0.16	>0.05
	No	41	3.56 ± 1.03		2.31 ± 0.71		0.53 ± 0.15	
AFP levels (ng/mL)	AFP<20	12	2.48 ± 0.51	<0.05	1.37 ± 0.40	<0.05	0.77 ± 0.21	<0.05
	AFP ≥ 20	50	4.34 ± 0.96		2.57 ± 0.76		0.45 ± 0.15	
TNM stages	I	20	2.78 ± 0.48	<0.05	1.66 ± 0.58	<0.05	0.39 ± 0.18	<0.05
	II	28	3.44 ± 1.05		2.51 ± 0.75		0.50 ± 0.19	
	III	14	4.36 ± 1.13		3.39 ± 0.82		0.68 ± 0.22	
Cancer	Yes	10	3.86 ± 1.27	>0.05	2.47 ± 0.89	>0.05	0.46 ± 0.21	>0.05
Embolus	No	52	3.60 ± 0.95		2.32 ± 0.55		0.52 ± 0.16	

2.2 APRIL, XIAP 和 caspase-9 的表达与 HCC 临床病理特征间的关系

根据 HCC 临床病理特征进行分组, 研究 APRIL, XIAP 和 caspase-9 的表达与 HCC 临床病理特征间的关系。相关性分析表明, 肝癌组织中 APRIL, XIAP 和 caspase-9 的表达与甲胎蛋白、肿瘤组织学分级、临床病理 TNM 分级有关($P < 0.05$), 而与年龄、性别、肿瘤大小肝硬化和癌栓无关($P > 0.05$)(表 1)。

3 讨论

细胞凋亡是一切生物胚胎发生和人类发育过程中细胞清除的正常途径^[1]。研究表明, 肿瘤的发生与细胞凋亡调控通路的紊乱和凋亡因子的异常表达有关^[2]。细胞凋亡对肿瘤的发生、发展及治疗具有重要的意义^[3]。

增殖诱导配体 (a proliferation inducing ligand, APRIL) 是肿瘤坏死因子(TNF)家族的成员之一, 人 APRIL 基因定位于染色体 17p13.1^[4]。APRIL 凭借自分泌或旁分泌两种方式, 以干扰凋亡信号通路或调控相关抗凋亡基因的表达来促进肿瘤细胞的增殖和抗凋亡^[6]。APRIL 在多种恶性肿瘤组织中呈高表达, 而在正常组织中仅有少量表达^[5]。

X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein IAPs)家族的重要成员之一, 基因定位于 Xq2^[7]。XIAP 特殊的 BIR 结构可与 Caspase 结合并抑制其活性, 促进肿瘤的发生和发展^[8]。XIAP 在多种肿瘤组织和细胞中呈高表达^[9]。

半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (caspase-9) 是内源性凋亡通路中最关键的蛋白酶。caspase-9 通过水解天冬氨酸残基 C 末端的肽键(P1 残基), 激活下游的 caspases 酶或分解细胞内相关的底物蛋白, 改变细胞结构和代谢, 引起细胞凋亡^[9]。caspase-9 在多种实体肿瘤组织中失表达或呈低表达^[11, 20]。

我们通过研究发现, 肝癌组织中 APRIL 和 XIAP 的表达明显高于癌旁组织及正常肝脏组织, caspase-9 在肝癌组织中的表达则明显低于癌旁组织及正常肝脏组织, APRIL, XIAP 和 caspase-9 在癌旁组织和正常肝脏组织中的表达水平比较无明显差异。HCC 临床病理因素分析显示, APRIL, XIAP 和 caspase-9 在肝癌组织中的表达与甲胎蛋白、肿瘤组织学分级、临床病理 TNM 分级有关。实验结果提示我们, APRIL, XIAP 和 caspase-9 可作为检测肝癌的重要生物学标志, 也可对肿瘤恶性程度进行评估。此外, 对 APRIL, XIAP 和 caspase-9 依赖的细胞凋亡相关肿瘤和疾病进行深入研究, 可作为肿瘤治疗的新靶点, 为基因治疗提供新的途径。

参考文献(References)

- [1] Slotta-Huspenina J, Berg D, Bauer K, et al. Evidence of prognostic relevant expression profiles of heat-shock proteins and glucose-regulated proteins in oesophageal adenocarcinomas[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e41420
- [2] Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zou L, et al. L1 cell adhesion molecule overexpression in hepatocellular carcinoma associates with advanced tumor progression and poor patient survival[J]. Diagn Pathol, 2012, 13, 7:96
- [3] Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zou L, et al. Upregulation of Bone morphogenetic Protein 4 is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma [J]. Pathology & Oncology Research, 2012, 18(3): 635-640
- [4] Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation[J]. Nature, 2011, 477(7364):330-334
- [5] 郭晓东, 张璇, 刘树红, 等. miRNA-125 在肝癌中表达变化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 07:1253-1255
Guo Xiao-dong, Zhang Xuan, Liu Shu-hong, et al. Expression of miRNA-125 in Hepatocellular Carcinoma[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 07:1253-1255
- [6] 郭晓东, 熊璐, 张红萍, 等. miRNA-181 在肝癌中表达变化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 05:869-871
Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zhang Hong-ping, et al. Expression of miRNA-181 in Hepatocellular Carcinoma[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 05:869-871
- [7] 郭晓东, 杨敏亮, 周艳贤, 等. miR-221 在肝癌干细胞亚群中的差异表达[J]. 现代生物医学进展, 2013, 03:465-467+563
Guo Xiao-dong, Yang Min-liang, Zhou Yan-xian, et al. Differential Expression of miR-221 in Subpopulations of Cancer Stem Cells Derived from Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 03:465-467+563
- [8] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA [J]. Science, 2005, 309(5740):1577-1581
- [9] Yu R, Deedigan L, Albarenque SM, et al. Delivery of sTRAIL variants by MSCs in combination with cytotoxic drug treatment leads to p53-independent enhanced antitumor effects[J]. Cell Death Dis, 2013, 21, 4: e503
- [10] Sun PH, Zhu LM, Qiao MM, et al. The XAF1 tumor suppressor induces autophagic cell death via upregulation of Beclin-1 and inhibition of Akt pathway[J]. Cancer Lett, 2011, 28, 310(2):170-180
- [11] Stegh AH, Brennan C, Mahoney JA, et al. Glioma oncoprotein Bcl2L12 inhibits the p53 tumor suppressor[J]. Genes Dev, 2010, 1, 24(19):2194-2204
- [12] Soengas M S, Alarcon R M, Yoshida H, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition[J]. Science, 1999, 284(5411):156-159
- [13] Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma [J]. Nature, 2001, 11, 409(6817):207-211
- [14] Schimmer A D, Welsh K, Pinilla C, et al. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity[J]. Cancer Cell, 2004, 5(1):25-35
- [15] Johnson C R, Jarvis W D. Caspase-9 regulation: an update[J]. Apoptosis, 2004, 9(4):423-427
- [16] Cotter T G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(7):501-507
- [17] Hyman BT, Yuan J. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(6):395-406
- [18] Bratton S B, Cohen G M. Death receptors leave a caspase footprint that Smacs of XIAP[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(1):4-6
- [19] Pettigrew C A, Cotter T G. Deregulation of cell death (apoptosis): implications for tumor development[J]. Discov Med, 2009, 8(41):61-63
- [20] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. Nature, 1999, 4, 397(6718):441-446