

Fas 相关死亡域样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白在结直肠癌中的表达意义

梁贤明, 张忠英, 黄如欣(厦门大学附属中山医院临床检验中心, 福建厦门 361004)

【摘要】 目的 探讨结直肠癌 Fas 相关死亡域样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白 (FLIP)(S)mRNA 的表达水平及其临床意义。**方法** 建立检测 FLIP(S)mRNA 荧光定量逆转录聚合酶链反应 (FQ-RT-PCR), 用该方法检测结直肠癌组织及其癌旁正常组织 FLIP(S)mRNA 表达水平。**结果** FLIP(S)mRNA 在结直肠癌组织和癌旁正常组织都有表达, 在结直肠癌组织表达水平为 0.23 ± 0.19 , 明显高于癌旁正常组织 0.13 ± 0.10 ($P < 0.05$)。FLIP(S)mRNA 表达水平与结直肠癌组织学分级密切相关 ($P < 0.05$), 肿瘤分化程度越低, FLIP(S)mRNA 的表达水平越高。**结论** FLIP(S)在结直肠癌组织中表达升高; 在分化越低组织中其表达水平越高; 为揭示结直肠肿瘤的发生、发展提供新的理论依据, 并为结直肠癌的有效治疗提供新的思路。

【关键词】 结直肠癌; 聚合酶链反应; Fas 相关死亡域样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.08.018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)08-0932-03

Expression and clinical significance of FLIP(S)mRNA in colorectal carcinoma LIANG Xian-ming, ZHANG Zhong-ying, HUANG Ru-xin (Xiamen Center for Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital Affiliated of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361004, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression and clinical significance of FLIP(S)mRNA in colorectal carcinoma. **Methods** A real-time fluorescence quantitative RT-PCR for FLIP(S)mRNA was established. Then the expression of FLIP(S)mRNA in colorectal carcinoma tissues and adjacent tissues was tested by the method. **Results** FLIP(S)mRNA was detectable in both tumor tissue and adjacent tissue. The expression level of FLIP(S) in colorectal carcinoma tissue (0.23 ± 0.19) was significantly higher than that in adjacent colorectal tissue (0.13 ± 0.10) ($P < 0.05$). The different expression of FLIP(S)mRNA in colorectal carcinoma was significantly associated with histological grade ($P < 0.05$). The poorer tumor differentiation became, the greater expression level of FLIP(S)mRNA was. **Conclusion** The expression of FLIP(S)mRNA is up-regulation and closely related to the malignant in colorectal carcinoma tissue. It may help to explore the genesis and development of colorectal carcinoma and find an effective therapeutic method for the tumor.

【Key words】 colorectal carcinoma; polymerase chain reaction; FLIP(S)

有研究表明, 多种肿瘤的发生和发展与 Fas 相关死亡域样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白 FLIP(S) 过度表达有关。本实验应用荧光定量逆转录聚合酶链反应 (FQ-RT-PCR) 技术, 建立 FLIP(S) 基因 FQ-RT-PCR 相对定量方法, 探讨结直肠癌组织中 FLIP(S) 基因表达与意义, 揭示 FLIP(S) 基因表达与结直肠癌发生及发展中的可能相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源 34 对新鲜结直肠癌组织及癌旁正常组织和 14 例结直肠癌组织取自本院胃肠外科 2006~2007 年结直肠癌手术患者, 均经病理组织学检查确诊。其中男 22 例, 女 26 例, 年龄 36~78 岁, 平均 59 岁; 直肠癌 38 例, 结肠癌 10 例; 淋巴转移 27 例, 无淋巴转移 21 例; 癌栓形成 20 例, 无癌栓形成 28 例; 组织学分级低分化 9 例, 中高分化 39 例; DUCK 临床分期 A、B 期 21 例, C、D 期 27 例。组织学定义癌旁正常组织: 距肿瘤边缘至少 5 cm 的肠段 (病理证实肿瘤标本切缘肿瘤细胞残留均为阴性)。标本取下立即投于液氮速冻后置 -80℃ 超低温冰箱保存。

1.2 主要试剂 总 RNA 快速抽取试剂盒购自上海飞捷公司, 两步法 RT-PCR 试剂盒 (AMV) 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, β -actin 基因试剂盒、热启动荧光 PCR 核心试剂盒均购自美国 ABI 生物公司。

1.3 主要仪器 ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 生物公司)、DU650 紫外分光光度计 (美国 Beckman 公司)、UVI 凝胶成像系统 (美国 UVP 公司)、Mastercycler 梯度 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)、低温离心机 (Eppendorf 公司)、超净工作台 (HEAL FORCE 公司)。

1.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成 根据 RNAfast1000 总 RNA 快速抽取试剂盒说明提取总 RNA, RNA 用 DU650 紫外分光光度计计量及纯度检测, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。根据 AMV 逆转录试剂盒操作说明合成 cDNA。

1.5 引物及探针的设计及合成 根据 FLIP(S) 的 mRNA 序列 (序列号: U97075), 并跨越一个内含子设计引物及探针。上游引物: 5'-ATG GAC AGA AAA GCT GTG GAG AC-3', 下游引物: 5'-CTC CTT GCT TAT CTT GCC TCG G-3', 探针: 5'-(FAM)TGC TCA GGA ACC CTC ACC TTG TTT CGG A (TAMRA)-3', 扩增片段长度为 165 bp。以 β -actin 作为内部参照物, 上游引物为 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3', 下游引物为 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3', Taqman 探针 5'-(FAM)ATG CCC-X(TAMRA)-CCC CCA TGC CAT CCT GCG T-3', 扩增产物 293 bp。探针及引物均由英骏生物公司合成, 并配成 100 μ mol/L, -30℃ 冰箱保存。

1.6 实时荧光定量 RT-PCR

1.6.1 反应成分 热启动荧光 PCR 核心试剂 12.5 μL,上游引物(12.5 μmol/L)0.5 μL,下游引物(12.5 μmol/L)0.5 μL, Taq 探针(10 μmol/L)0.5 μL,cDNA 2 μL 和 ddH₂O 9 μL 混均成 25 μL 反应体系。循环参数:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s;60 ℃ 退火延伸 1 min;60 个循环。

1.6.2 重复性检测 随机取 2 个组织样品,每个样品 cDNA 做 3 个复孔进行分析,根据所测的 CT 值,计算批内变异系数(CV),并且连续 3 d 对同 1 份标本重复检测 3 次,计算批间 CV。

1.6.3 扩增效率检验 随机取 1 份预实验阳性表达的扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳并胶回收,回收产物进行 10 倍系列稀释后进行扩增。各个稀释浓度均做 3 个复孔。应用 7500 System SDS 软件处理反应结果,生成标准曲线,得到标准曲线的斜率和相关系数。通过公式 $E = 10^{-1/k} - 1$ (E 为扩增效率, K 为标准曲线的斜率)计算扩增效率。同样方法进行 β -actin 扩增效率检验。

1.6.4 FLIP(S)mRNA 表达水平计算方法 本实验研究采用相对定量 PCR 方法,用 $(1 + E)^{-\Delta Ct}$ 表示目的基因相对于管家基因的表达式^[1],即 $(1 + E)^{-\Delta Ct}$ 作为 FLIP(S)mRNA 表达水平的指标。其中, E 为扩增效率; ΔCt 为同一份组织中 FLIP(S)与 β -actin 的扩增 CT 值之差。每个标本进行双孔检测,取双孔表达水平的均值为该标本 FLIP(S)mRNA 的表达水平。

1.7 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;结直肠癌与癌旁组织间比较用配对 t 检验,临床资料分组各组间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物鉴定 FQ-RT-PCR 扩增产物经 2%琼脂糖电泳,在 200~300 bp 之间约 293 bp 和 165 bp 处都可见一明显条带,分别为 β -actin 和 FLIP(S),与理论预期一致(见图 1)。

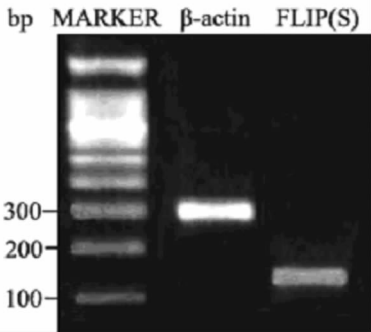


图 1 FLIP(S)荧光定量 RT-PCR 扩增产物电泳图

2.2 重复性测定 FLIP(S)和 β -actin 批内 CV 和批间 CV 都小于 3%,表明该方法重复性好(表 1)。

表 1 重复性试验结果

实验名称	标本 1				标本 2			
	1	2	3	CV(%)	1	2	3	CV(%)
β -actin 批内检测	26.58	27.10	26.81	1.0	23.35	22.64	22.73	1.7
β -actin 批间检测	26.21	26.92	26.32	1.4	22.31	22.95	22.12	1.9
FLIP(S)批内检测	30.68	30.17	30.53	0.9	35.10	34.87	34.42	1.0
FLIP(S)批间检测	30.59	30.08	30.95	1.4	35.23	35.12	34.29	1.5

2.3 扩增效率 扩增效率验证中,FLIP(S)和 β -actin 相对定

量标准曲线图见图 2、3。FLIP(S)和 β -actin 对应的相关系数分别为 0.984 4 和 0.997 3,斜率分别为 -3.64 和 -3.68,扩增效率为 0.88 和 0.87,FLIP(S)扩增效率和 β -actin 扩增效率基本一致,满足相对定量 PCR 的条件,用 $1.87^{-\Delta Ct}$ 来表示 FLIP(S)mRNA 的表达水平。

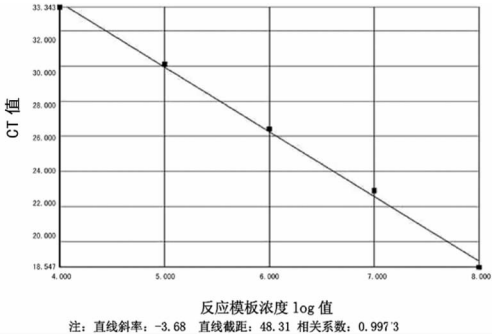


图 2 β -actin 相对标准曲线

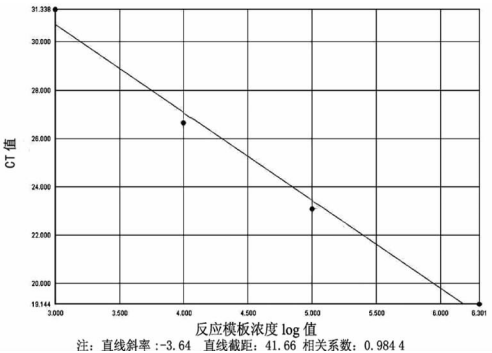


图 3 FLIP(S)相对标准曲线

2.4 结直肠癌及癌旁组织 FLIP(S)mRNA 表达 经检测,FLIP(S)mRNA 在结直肠癌组织和癌旁正常组织都有表达(图 4),其表达水平分别为 0.23 ± 0.19 和 0.13 ± 0.10 ,配对样本经 t 检验,差异具有统计学意义($P < 0.05$),FLIP(S)mRNA 在结直肠癌组织表达水平明显高于癌旁正常组织(表 2)。

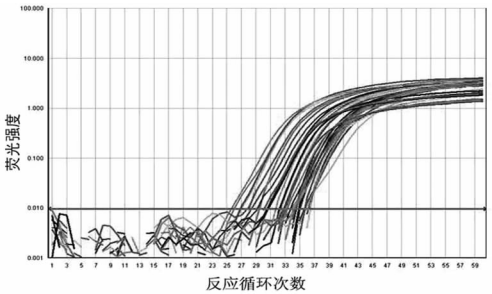


图 4 标本 FQ-RT-PCR 反应曲线

表 2 FLIP(S)mRNA 在 34 对结直肠癌组织及癌旁正常组织的表达水平

组别	$\bar{x}$	SD	P
结直肠癌组织	0.23	0.19	0.013
癌旁组织	0.13	0.10	—

注:—表示无数据。

2.5 FLIP(S)mRNA 表达与结直肠癌临床病理关系 FLIP(S)mRNA 表达水平与结直肠癌临床病理资料关系见表 3。组织学分级不同结直肠癌组织的 FLIP(S)mRNA 表达水平比较,两独立样本经 t 检验,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而

年龄、性别、发生部位、有无息肉、淋巴结转移、癌栓形成和 DUCK 分期不同的癌组织 FLIP(S)mRNA 表达水平比较,均无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 FLIP(S)mRNA 表达与结直肠癌临床病理关系				
临床病理因素	<i>n</i>	$\bar{x}$	<i>SD</i>	<i>P</i>
年龄(岁)				
≥59	23	0.24	0.18	—
<59	25	0.21	0.19	0.589
性别				
男	22	0.27	0.16	—
女	26	0.18	0.19	0.105
发生部位				
直肠	38	0.23	0.19	—
结肠	10	0.18	0.18	0.412
息肉史				
有	14	0.26	0.21	—
无	34	0.20	0.17	0.373
淋巴结转移				
有	27	0.23	0.18	—
无	21	0.21	0.19	0.691
癌栓形成				
有	20	0.17	0.13	—
无	28	0.26	0.21	0.098
组织学分级				
低分化	10	0.37	0.21	—
中高分化	38	0.18	0.16	0.019
DUCK 分期				
A+B	21	0.21	0.20	—
C+D	27	0.23	0.18	0.691

注:—表示无数据。

3 讨 论

FLIP(S)首先由 Irmeler 等^[2]于 1997 年报道的一个凋亡抑制蛋白,与胱冬肽酶 8(caspase 8)具有同源性,能同 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)强效结合,阻止 caspase 8 与 Fas 的死亡诱导信号复合物(DISC)结合,从而阻断 Fas 信号的传入。FLIP(S)还能通过其 C 端结构域和与死亡结构域相关蛋白 Daxx 的 Fas 结合域相互作用,阻止正常的 Daxx 和 Fas 的相互作用,抑制 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)的活化^[3]。FLIP(S)不但参与凋亡调控,而且在结合核因子 κB(NF-κB)信号途径中具有重要的作用^[4]。FLIP 能特异地与肿瘤坏死因子受体相关因子 2(TRAF2)相互作用,诱导 NF-κB 信号途径活化,参与机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡以及肿瘤生长抑制过程的信息传递。Nakagiri 等^[5]发现马疱疹病毒-2 编码的病毒不仅可以抑制死亡受体介导的细胞凋亡,还能增强许多细胞系的 Wnt/β-catenin 信号途径,与个体发育和肿瘤生成密切相关。

之前研究 FLIP(S)mRNA 均采用终点法半定量 RT-PCR,本研究采用以 Taqman 探针作为荧光模式的 FQ-RT-PCR 技术。该技术具有定量准确、特异性好、灵敏度高、重复性高、线性关系好、线性范围宽、操作简单、安全、自动化程度高、无污染等优点。并且 FQ-RT-PCR 相对定量法,无需制作反应标准曲线,并且通过加入管家基因作为内标准,可以消除存在于反应体系中的干扰因素,如样本不纯、试剂影响等,使方法更加简单、经济,而且也更为可靠和准确,为深入研究 FLIP(S)提供了有效手段。

研究显示,FLIP(S)mRNA 在结直肠癌组织与癌旁正常组

织都有表达,较文献报道中的表达率高^[6-8]。这可能是本实验采用 FQ-RT-PCR 技术,提高检测灵敏度。该结果进一步表明 FLIP(S)是一种天然存在的凋亡抑制蛋白。

FLIP(S)表达与结直肠癌患者临床、病理指标的相关性目前仍不明确。已有研究表明^[6-8],甲状腺癌、子宫内膜癌和肝癌组织 FLIP(S)高表达可能提示患者预后较差,子宫内膜癌和肝癌组织 FLIP(S)表达与临床分期及浸润范围等指标有关。本研究显示结直肠癌组织中 FLIP(S)mRNA 表达明显高于癌旁组织($P<0.05$);结直肠癌的组织学分级越低,FLIP(S)mRNA 的表达越高。与其在别的肿瘤研究结果类似:FLIP(S)表达失调可能是肿瘤发生发展的重要因素。在肿瘤中可能由于 FLIP(S)的高表达,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞免疫逃逸,活化 NF-κB 信号途径,影响机体防御反应、组织损伤和应激以及肿瘤生长抑制过程的信息传递,参与肿瘤的发生发展。

FLIP(S) mRNA 在结直肠癌组织中高表达,并与结直肠癌的组织分型关系密切,可能通过阻断凋亡通路促进结直肠癌的发生。加深对 FLIP(S)的研究将为结直肠癌的有效治疗提供新的思路。

参考文献

[1] 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: 402-408.

[2] Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP[J]. Nature, 1997, 388: 190-195.

[3] Kim YY, Park BJ, Seo GJ, et al. Long form of cellular FLICE-inhibitory protein interacts with Daxx and prevents Fas-induced JNK activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(2): 426-433.

[4] Kataoka T, Tschopp J. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(7): 2627-2636.

[5] Nakagiri S, Murakami A, Takada S, et al. Viral FLIP enhances Wnt signaling downstream of stabilized beta-catenin, leading to control of cell growth[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(21): 9249-9258.

[6] Mitsiades CS, Poulaki V, Fanourakis G, et al. Fas signaling in thyroid carcinomas is diverted from apoptosis to proliferation[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 3705-3712.

[7] Chen HX, Liu YJ, Zhou XD, et al. Expression of cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein is associated with malignant potential in endometrial carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2005, 15: 663-670.

[8] Schuchmann M, Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, et al. Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95 and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy[J]. Oncol Rep, 2006, 15: 227-230.