

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.10.010

文章编号: 1005-8982(2017)10-0052-05

## SSTR2、Livin 和 Survivin 在结肠癌组织中的表达及其意义\*

王伟宁,徐赛群,刘丽,黄萍,潘佳,叶冠男,刘伟  
(湖南省长沙市第一医院 消化内科,湖南 长沙 410005)

**摘要:目的** 探讨生长抑素受体 2(SSTR2),凋亡抑制因子 Livin 和存活素(Survivin)在结肠正常黏膜、结肠腺瘤、癌旁组织及结肠癌组织中的表达水平的变化规律及临床意义。**方法** 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测收集到的 30 例结肠正常黏膜、30 例结肠腺瘤、30 例结肠癌旁组织、30 例结肠癌组织中 SSTR2、Livin 和 Survivin mRNA 的表达情况,对其表达水平进行测定,分析不同组织表达阳性率及表达强度的差别。**结果** 结肠癌标本中 Livin 和 Survivin mRNA 阳性表达率与结肠腺瘤比较明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而 SSTR2mRNA 的阳性表达率与结肠腺瘤比较明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Livin 和 Survivin mRNA 表达水平在结肠正常黏膜、结肠腺瘤、结肠癌旁组织、结肠癌组织为逐渐增高趋势,而 SSTR2mRNA 为逐渐下降趋势。**结论** SSTR2、Livin 和 Survivin 在结肠黏膜从腺瘤到癌的转变过程中起着重要作用。

**关键词:** SSTR2; Livin; Survivin; 结肠腺瘤; 结肠癌

**中图分类号:** R735.3

**文献标识码:** A

## Expressions of SSTR2, Livin and survivin in colon carcinomas and their clinical significance\*

Wei-ning Wang, Sai-qun Xu, Li Liu, Ping Huang, Jia Pan, Guan-nan Ye, Wei Liu  
(Department of Gastroenterology, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expressions of SSTR2, Livin and survivin in normal mucous membrane of colon, colon adenoma, colon carcinomas and their adjacent tissues and the clinical significance. **Methods** The qRT-PCR technique was utilized to detect the mRNA of SSTR2, Livin and survivin in colonic adenomas of 30 cases, colonic carcinomas and their adjacent tissues of 30 cases, and normal colon mucous membrane of 30 cases. **Results** The rates of positive expressions of Livin mRNA and survivin mRNA in the colon carcinomas were significantly higher than those in the colon adenomas ( $P < 0.05$ ). The expression rate of SSTR2 mRNA in the colon carcinomas was significantly lower than that in the colon adenomas ( $P < 0.05$ ). The expressions of Livin and survivin mRNA in the normal colon mucous membrane, the colon adenomas, the adjacent tissue of carcinomas, and the colon carcinomas had a gradually increased tendency, while the expressions of SSTR2 mRNA had a gradually decreased tendency. **Conclusions** SSTR2, Livin and survivin play important roles in the transition of colon mucosa from adenoma to cancer.

**Keywords:** SSTR2; Livin; survivin; colon adenoma; colon carcinoma

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,近年来在我国的发病率逐年增高,其防治是研究的热点<sup>[1]</sup>。结肠腺瘤是一种结肠的良性肿瘤,被认为是一种癌

前病变,大多数大肠癌的发生都经过了正常黏膜-腺瘤-癌的发展过程,因此早期检查发现和通过内镜切除结肠腺瘤是控制和减少结肠癌发生的重要途径

收稿日期:2016-11-28

\* 基金项目:长沙市科技局计划项目(No:K1403059-31)

径。细胞凋亡是肿瘤发生的重要机制,研究表明大肠癌的发生、发展过程与细胞凋亡的异常密切相关<sup>[2]</sup>。凋亡存活因子(Livin)和存活素(Survivin)是凋亡抑制家族新成员,Livin 蛋白在正常组织中低表达或不表达,而在一些癌组织或癌细胞株中高表达<sup>[3]</sup>,这种表达的异常可使细胞的凋亡机制损害,导致转化突变的细胞积累,从而导致肿瘤的发生,因此推测其与肿瘤的发生关系密切。Survivin 是凋亡抑制蛋白家庭新成员,可作用于各种凋亡通路末端效应分子,抑制凋亡,被认为是一种新的抗凋亡基因。生长抑素受体(SSTR)属于 G 蛋白偶联受体超家族,人类胃肠道正常组织和肿瘤组织均可表达多种 SSTR,在肿瘤性疾病中主要表达的是 SSTR2,SSTR2 是刺激离子运转的主要调节受体。本实验采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-PCR,RT-PCR)方法对结肠正常黏膜、结肠腺瘤、结肠癌旁组织及结肠癌组织中 SSTR2 受体及凋亡抑制蛋白 Livin 和 Survivin 的 mRNA 表达进行检测,研究 3 种因子在正常组织、癌旁组织、腺瘤组织及癌组织中表达的相关性,探讨其与结肠肿瘤发生、发展的关系,从而为结肠癌的早期诊断及靶向治疗提供理论基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2014 年 6 月 -2016 年 2 月长沙市第一医院外科手术及肠镜活检的部分标本,结肠癌 30 例、结肠腺瘤 30 例,结肠癌旁组织 30 例(距肿瘤边缘 5~10 cm 以内的组织),结肠正常黏膜 30 例(距肿瘤边缘 10 cm 以上的切缘)。

### 1.2 RT-PCR 检测

**1.2.1 引物设计与合成** 在 NCBI 数据库中查找基因序列,设计实时定量 PCR 引物,引物序列由美国 genecopeia 公司购买, $\beta$ -actin 作为内参照,Actin-正向引物:5'-CCACCATGTACCCAGGCATT-3',Actin-反向引物:5'-CGGACTCATCGTACTCCTGC-3'。

**1.2.2 总 RNA 提取及逆转录** 扩增用 Trizol 试剂从组织中抽提总 RNA,按每 100 mg 标本加入 1 ml Trizol 试剂,4℃充分匀浆;往已匀浆的样本内加入 RNAase-free 的 1.5 ml EP 管中,充分震荡混匀,室温静置 5 min;加入 0.2 ml 氯仿,用手剧烈摇晃振荡 15 s,室温静置 5 min;4℃,10 000 r/min,离心 15 min;倾斜 EP 管,将上层水相转入新的 1.5 ml EP 管中(约 400~500  $\mu$ l);加入等体积异丙醇,混匀室温静

置 10 min;4℃,10 000 r/min,离心 10 min,弃上清,管底白色沉淀即为 RNA;加入 1 ml 冰预冷的 75%乙醇,振荡洗涤沉淀;4℃,7 900 r/min,离心 5 min,弃上清;再加入 1 ml 冰预冷的 75%乙醇,振荡洗涤沉淀,4℃,7 900 r/min,离心 5 min,弃上清;室温晾干或置超净工作台中风机吹干 5~10 min;加 20~50  $\mu$ l DEPC 水以溶解 RNA 沉淀。待沉淀完全溶解后,凝胶电泳检测 RNA 质量,溶液于 -20℃保存。根据逆转录试剂盒说明书将解冻逆转录试剂盒中的反应液温和地颠倒混匀后,稍稍离心,置于冰上;往预冷的 200  $\mu$ l RNase-free 离心管中加入 total RNA 200 ng;1  $\mu$ l 60  $\mu$ mol Oligo(dT)18,13  $\mu$ l RNase Free dH<sub>2</sub>O;温和离心混匀反应液,65℃温浴 10 min,立即置于冰上使之冷却。冷却的反应液中加入以下试剂:13  $\mu$ l RNA-primer mix,5  $\mu$ l 5X RT Reaction Buffer,1  $\mu$ l 25 mmol dNTP,1  $\mu$ l 25 u/ $\mu$ l RNase Inhibitor,1  $\mu$ l 200 u/ $\mu$ l M-MLV Rtase,大约 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (RNase/DNase-free),温和混匀反应液,42℃温浴 60 min;85℃ 5 min 终止反应,将获得的 cDNA 置于 -20℃保存,备用。

**1.2.3 标准曲线制备** 稀释 cDNA 分别进行各项靶基因及内参基因  $\beta$ -actin 的 SYBR Green I 实时定量 PCR 反应,制备各个基因的标准曲线并检测扩增效率。

**1.2.4 SYBR 荧光实时定量聚合酶链反应** 设定 PCR 程序:95℃、10 min,然后 95℃、10 s,变性 60℃、20 s,72℃、15 s 退火及延伸。重复 45 个循环进行扩增,从 72℃缓慢升温至 95℃,产生目标靶基因和 GAPDH 的溶解曲线。最后 25℃ 30 s 结束反应。反应结束仪器自动生成 CT(threshold cycles)值及溶解曲线图。

**1.2.5 PCR 产物分析** 利用德国 Eppendorf 公司的 PCR 系统自带的 Applied Biosystems 软件进行分析,观察扩增曲线,并对 cDNA 的含量进行定量分析,计算样本的  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (样本同内参的对数比值)。计算目的基因 mRNA 转录水平的差异。

### 1.3 统计学方法

mRNA 相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法进行分析,应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析,在方差分析有意义的基础上行 LSD-*t* 检验进行两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。SSTR2 在结肠癌中的表达与 Livin 及 Survivin 相关性采用 Spearman 相关性分析。

## 2 结果

### 2.1 扩增曲线

扩增曲线见图 1, *SSTR2* 基因的扩增曲线平滑, 均有明显的指数扩增期, 扩增效率良好。

### 2.2 熔解曲线分析结果

图 2 熔解曲线分析显示, *SSTR2* 基因 PCR 产物的熔解曲线为单一锐利主峰, 说明引物的特异性好, 无引物二聚体及非特异性扩增。

### 2.3 *SSTR2*、*Livin* 和 *Survivin* 的表达

正常结肠黏膜、癌旁组织、结肠腺瘤及结肠癌组织中目的基因 *SSTR2*、*Livin* 和 *Survivin* 的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值见附表。

各蛋白在正常组织、癌旁组织、腺瘤组织、结肠癌 4 个组织中表达比较: *SSTR2* 表达差异有统计学意义 ( $F=3.834, P=0.000$ ), 经 LSD-*t* 进行两两比较, 结果显示, 正常组织表达与腺瘤组织、结肠癌组织差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 癌旁组织表达与结肠癌组织表达差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); *Survivin* 表达差异有统计学意义 ( $F=13.867, P=0.000$ ), 经 LSD-*t* 进行两两比较, 结果显示, 结肠癌组织表达与正常组织、癌旁组织、腺瘤组织差异有统计学意义 ( $P=0.000$ ); *Livin* 表达差异有统计学意义 ( $F=54.214, P=0.000$ ), 经两两比较, 结果显示, 结肠癌组织表达与正常组织、癌旁组织、腺瘤组织差异有统计学意义 ( $t=-2.718, -2.758, -2.241, P=0.000, 0.000, 0.029$ ), 腺瘤组织表达与正常组织、癌旁组织、结肠癌组织差异有统计学意义 ( $t=2.241, 2.19, -3.679, P=0.029, 0.033, 0.000$ )。

各组织中 *SSTR2*、*Survivin*、*Livin* 蛋白表达比较: 正常组织中, 各蛋白表达差异有统计学意义 ( $F=17.564, P=0.000$ ), 经两两比较, 结果显示, *SSTR2* 表达与 *Survivin*、*Livin* 表达差异有统计学意义 ( $t=4.203, 4.191, P=0.000, 0.000$ ); 癌旁组织中, 各蛋白表达差异有统计学意义 ( $F=19.018, P=0.000$ ), 经两两比较, 结果显示 *SSTR2* 表达与 *Survivin*、*Livin* 表达差异有统计学意义 ( $t=4.444, 4.434, P=0.000, 0.000$ ); 腺瘤组织中, 各蛋白表达差异无统计学意义 ( $F=0.046, P>0.05$ ); 结肠癌组织中, 各蛋白表达差异有统计学意义 ( $F=9.796, P=0.000$ ), 经两两比较, 结果显示, *SSTR2* 表达与 *Survivin*、*Livin* 表达差异有统计学意义 ( $t=3.467, 8.55, P=0.001, 0.000$ )。在结肠癌组织中, *SSTR2* 与 *Survivin* spearman 相关系数  $r=0.408 (P<0.05)$ , 提示两者呈正相关, *SSTR2* 与 *Livin*

spearman 相关系数  $r=0.279 (P>0.05)$ , *Livin* 与 *Survivin* spearman 相关系数  $r=0.237 (P>0.05)$ , 提示两者无相关性。

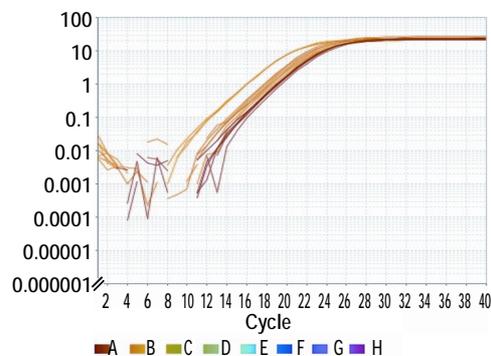


图 1 *SSTR2* 实时荧光定量 PCR 扩增曲线

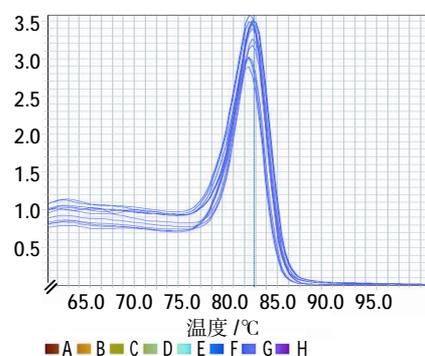


图 2 *SSTR2* 实时荧光定量 PCR 熔解曲线

附表 各组 *SSTR2*、*Livin* 和 *Survivin* mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>SSTR2</i>	<i>Survivin</i>	<i>Livin</i>
正常组织	12.165 ± 13.382	0.673 ± 0.560	0.694 ± 0.846
癌旁组织	10.821 ± 10.654	1.111 ± 1.108	1.305 ± 1.447
腺瘤组织	6.030 ± 8.343	6.179 ± 7.273	6.559 ± 7.118
结肠癌	4.416 ± 3.990	18.458 ± 21.351	20.432 ± 9.420
F值	3.834	13.867	54.214
P值	0.000	0.000	0.000

## 3 讨论

随着医学的发展及人们对结肠癌研究的深入, 对于结肠癌的发生、发展、早期诊断、治疗及预后有了新的认识。现代医学认为结肠癌的发生经历息肉-腺瘤-腺癌的一系列演化过程, 国外研究认为息肉发展为结肠癌需要经历 10~15 年时间。早期息肉的内镜下治疗, 可以阻断此演化过程, 明显降低结肠癌的发生率<sup>[4]</sup>。肿瘤的发展过程中遗传易感性及分子通路的机制是关注的重点, 其中主要涉及肿瘤基因的活化、抑癌基因的失活及异常增殖的启动<sup>[5]</sup>及细

胞凋亡不足有关。KEER 教授首次提出“细胞凋亡 (apoptosis)”的概念,认为细胞凋亡与增殖的动态平衡是维持机体细胞生长、发育和正常组织器官结构和功能的重要因素。凋亡过程受到抑制,发生基因突变的细胞得以生存与增殖,将会导致肿瘤的发生。

目前研究认为调节凋亡的基因主要有 3 个家族: Bcl-2 家族, Caspases 家族和 IAPs 家族<sup>[6-7]</sup>。IAPs 家族主要通过直接或间接抑制 Caspases 家族成员发挥抗凋亡的作用。Livin 是新发现的 IAPs 家族成员,与恶性肿瘤的发生密切相关,在多数恶性肿瘤组织中 Livin 呈高表达<sup>[8-11]</sup>,常使细胞凋亡受到抑制。而 Survivin 是 IAPs 家族中的另一个成员, Survivin 与 Caspase-3 和 Caspase-7 结合而抑制细胞凋亡。Survivin 在成人分化成熟的终末组织以及癌旁正常组织中无表达,常见的肿瘤组织中 Survivin 呈高度表达<sup>[12-14]</sup>。Survivin、Livin 均能抑制由凋亡刺激因子如 P53、Fas、化疗药物等诱导的细胞凋亡<sup>[15]</sup>。本研究采用 RT-PCR 法检测 Survivin mRNA、Livin mRNA 及 SSTR2 mRNA 在正常组织、癌旁组织、结肠腺瘤、结肠癌组织中的表达,发现 Survivin mRNA 和 Livin mRNA 表达水平在结肠正常黏膜、结肠癌旁组织、结肠腺瘤、结肠癌组织为逐渐增高趋势。结肠癌标本中 Livin mRNA 和 Survivin mRNA 阳性表达率与结肠腺瘤比较明显升高,结肠腺瘤标本 Livin mRNA 和 Survivin mRNA 阳性表达率与癌旁组织结肠及正常黏膜比较明显升高。研究表明 Livin mRNA、Survivin mRNA 在正常结肠组织及癌旁组织中几乎不表达,腺瘤中中量表达,结肠癌组织中过度表达,提示在基因水平上降低或消除 Livin、Survivin 基因在癌细胞中的过度表达,可解除 Livin、Survivin 对癌细胞凋亡的抑制作用,促进癌细胞凋亡和增强癌细胞对化学疗法药物的敏感性,有可能使 Livin、Survivin 成为结肠癌靶向治疗的一个新的分子靶点,从而有望在结肠癌发生的多步骤过程中,阻断结肠肿瘤发生的进程。

SSTR 在肿瘤性疾病中,主要表达的是 SSTR2,国外学者报道大肠癌组织中所表达的 SSTR 以 SSTR 2 为主<sup>[16]</sup>,且 SSTR2 与生长抑素的结合力最强,在介导生长抑素对肿瘤增殖方面起很重要作用,这也是目前 SSTR2 研究较多的原因。因此,生长抑素的生物学效应与肿瘤是否表达 SSTR 直接相关。本研究通过检测 SSTR2 mRNA 在正常组织、癌旁组织、结肠腺瘤、结肠癌组织中的表达发现结肠癌标本

中 SSTR2 mRNA 的阳性表达率与结肠腺瘤比较明显降低,与国内外研究一致。结肠腺瘤标本 SSTR2 mRNA 阳性表达率与结肠正常黏膜及癌旁组织比较有所下降,但两者无统计学意义,了解结肠癌细胞 SSTR 表达情况及其与 Livin mRNA、Survivin mRNA 的相关性,可能对 SSTR 表达阳性的结肠癌病人的靶向治疗提供理论基础。

本研究发现结肠癌标本中 SSTR2 mRNA 和 Survivin mRNA 表达呈正相关, Livin mRNA 和 Survivin mRNA 表达无相关性。有研究表明 Livin 和 Survivin 在促进结肠癌发生发展中有协调作用<sup>[15]</sup>, Livin mRNA 和 Survivin mRNA 的表达与结肠腺瘤的发生、发展密切相关,可能是通过抑制 Caspase-3 的活性调节细胞凋亡过程。而 SSTR2 mRNA 和 Survivin mRNA 表达存在正相关,提示 SSTR2 mRNA 表达与肿瘤细胞的增殖活性及凋亡相关, SSTR2 mRNA 介导的 SSTR2 减少,与生长抑素结合位点相应减少,在介导生长抑素对肿瘤增殖抑制作用减弱,同时 SSTR2 mRNA 抑制凋亡,是促进结直肠癌发生、发展及浸润的很重要的原因,这也提示 Survivin、Livin 和 SSTR2 在结肠黏膜从腺瘤到癌的转变过程中起着重要作用。结肠癌发生、发展及浸润机制复杂,注定其检查、治疗方法的综合性。Survivin、Livin、SSTR2 基因检测可考虑用于结肠癌的辅助诊断,对鉴别息肉良、恶性有一定作用,可以预测结肠肿瘤治疗效果及预后。Livin 和 Survivin 在结肠腺瘤、腺瘤中均高表达,以 Survivin、Livin 为治疗靶点,特别是对腺瘤的治疗,期望可以降低结肠腺瘤 EMR、ESD 术后复发率。

目前,国内外研究学者已经利用反义核酸技术、RNA 干扰技术来靶向性抑制 Survivin、Livin 的过表达,使 Caspases 的活性增强以及肿瘤细胞发生凋亡。本研究提示 SSTR 表达可能与肿瘤细胞的增殖活性及凋亡相关,因此运用药物或特殊手段使 SSTR2 低表达,再使用特异性的受体激动剂,可促进肿瘤细胞凋亡,且 Livin、Survivin 和 SSTR2 通过共同协作,联合抑制腺瘤细胞凋亡的过程,使研究人员对肿瘤细胞清除途径及机制有了更客观的认识,同时为结肠癌以 Livin、Survivin、SSTR2 为诊断、治疗靶点提供一定的理论基础。

#### 参 考 文 献:

[1] SCHMOLL H J, TABERNERO J, MAROUN J, et al. Capecitabine

- plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results of the NO16968 randomized controlled phase III trial[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(32): 3733-3740.
- [2] TANNAPFEL A, NEID M, AUST D, et al. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions[J]. *DtschArztebl Int*, 2010, 107(43): 760-766.
- [3] KLIONSKY D J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve[J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 740-743.
- [4] NISHIHARA R, WU K A, LOCHHEAD P, et al. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy[J]. *N ENGL J Med*, 2013, 369(12): 1095-1105.
- [5] HEHLGANS S, PETRAKI C, REICHERT S, et al. Double targeting of survivin and XIAP radiosensitizes 3D grown human colorectal tumor cells and decreases migration[J]. *Radiother Oncol*, 2013, 108(1): 32-39.
- [6] DUCKER C S. IAP proteins: sticking it to Smac[J]. *Biochem J*, 2005, 385(Pt1): 285-288.
- [7] SAMUEL T, WELSH K, LOBER T, et al. Distinct BIR domains of cIAP-1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases[J]. *Biol Chem*, 2006, 281(2): 1080-1090.
- [8] HUANG Q Y, ZHAO Z L, CUI S, et al. Expression of Livin gene esophageal cancer[J]. *J Chin Med Univ*, 2007, 36(5): 611-615.
- [9] WANG Z B, ZHANG Z Y, LUO X H, et al. Expression of Livin in human gastric carcinoma[J]. *J Mod Oncoi*, 2008, 16(4): 595-597.
- [10] 周冲, 刘学良, 郑晓梅, 等. 高、低级别卵巢浆液性癌 Livin 与 ki67 的表达特征及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(20): 68-72.
- [11] YANG S S, MA N, LEO X H. The expressions of Livin in cervical squamous cancer and its correlation with Bcl-2 [J]. *J Basic Clin Oncol*, 2009, 22(12): 116-119.
- [12] OSAKA E, SUZUKI T, OSAKA S, et al. Survivin expression levels as independent predictor of survival for osteosarcoma patients[J]. *OrthopRes*, 2007, 25(1): 116-121.
- [13] YE C P, QIU C Z, HUANG Z X, et al. Relationship between survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(46): 6264-6268.
- [14] 文善云, 张岳枫, 李鹏. Survivin 在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(20): 2518-2523.
- [15] DING Z Y, LIU G H, BIRGIT O, et al. Upregulation of the antiapoptotic factor Livin contributes to cisplatin resistance in colon cancer cell[J]. *Tumor Biology*, 2013, 34(2): 683-693.
- [16] IOULIA E, CONSTANTINA P, PAVLOS M, et al. Immunohistochemical expression of somatostatin receptor types 2 and 5 in colorectal cancer[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2012, 42(7): 777-783.

(张蕾 编辑)