

survivin 基因在化疗药物诱导的 喉鳞癌 Hep-2 细胞凋亡中的作用*

肖 辉 金德均 王 超 徐秀玉 李晓丹

(哈尔滨医科大学附属第二医院耳鼻咽喉科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:探讨 survivin 基因在化疗药物三氧化二砷(As_2O_3)和顺铂(DDP)诱导的喉鳞癌(Hep-2)细胞凋亡中的作用。方法:用 Hep-2 细胞株进行培养传代,以不同浓度的 As_2O_3 和 DDP 作用于 Hep-2 细胞,MTT 观察 As_2O_3 和 DPP 对 Hep-2 细胞生长的抑制情况,TUNEL 法检测细胞凋亡数量,用 RT-PCR 方法检测 survivin 基因的表达。结果: As_2O_3 和 DDP 对 Hep-2 细胞的生长均有抑制作用,具有时间-剂量依赖性,化疗药物组细胞凋亡率和 survivin 基因表达抑制率高于对照组。结论:在 As_2O_3 和 DPP 诱导的 Hep-2 细胞凋亡中 survivin 基因表达被抑制,survivin 基因可能在 DPP 和 As_2O_3 抗肿瘤中发挥重要作用。

关键词: survivin 基因;喉鳞癌 Hep-2 细胞;顺铂;三氧化二砷

中图分类号:R739.65 文献标识码:A

The role of survivin on the apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 strain Induced by chemotherapeutical drugs

XIAO Hui, JIN De-jun, WANG Chao, XU Xiu-yu, LI Xiao-dan

Department of otorhinolaryngology, the second hospital of Harbin Medical

University, Heilongjiang, Harbin 150086

ABSTRACT Objective: To study the role of survivin gene on the apoptosis of the laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 strain induced by arsenic trioxide (As_2O_3) and cisplatin (DDP). **Methods:** The laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 strain was chosen in this experiment. The inhibitory effects of chemotherapeutical drugs on Hep-2 strain were assayed with MTT test. Apoptosis was detected by TUNEL test. Expression of survivin gene was detected by reverse transcriptase PCR. **Results:** Both As_2O_3 and DDP obviously inhibited the laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cell growth with dose and time-dependent. Apoptosis and inhibitory rate of survivin gene expression induced by As_2O_3 and DDP was higher than that in control group. **Conclusions:** The survivin gene expression was inhibited during the course of apoptosis in the laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 strain induced by As_2O_3 and DDP. The survivin gene may play a critical role on the inhibiting carcinoma of As_2O_3 and DDP.

Key words: Survivin gene; Laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 strain; Cisplatin; Arsenic trioxide

近年的研究表明,某些化学治疗药物可以诱导肿瘤细胞发生凋亡^[1],但其作用机制尚未阐明。为此我们探讨了 survivin 基因在化疗药物三氧化二砷(As_2O_3)和顺铂(DDP)诱导的喉鳞癌(Hep-2)细胞凋亡中的作用。survivin 基因是近年来发现的一种新抗凋亡因子,属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的成员,能明显抑制细胞凋亡的产生^[2]。本研究以喉鳞癌 Hep-2 细胞为研究对象,观察在化疗药物诱导下 Hep-2 细胞株增殖的抑制情况,及诱导细胞凋亡过程中 survivin 基因表达的变化,探讨 As_2O_3 和 DDP 的抗肿瘤活性、抑制肿瘤细胞生长机制及其在促凋亡过程中与 survivin 基因表达的相互关系,以期进一步阐明 As_2O_3 和 DDP 的抗肿瘤作用的分子机制,为化疗药物的筛选和用药方式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

喉鳞癌 Hep-2 细胞株(哈医大二院耳鼻咽喉科)用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 5% CO_2 的 37℃ 孵箱中培养。细胞贴壁生长,0.25% 的胰酶消化传代。实验分为 As_2O_3 组、DDP 组和空白对照组, Hep-2 细胞浓度取 2×10^5 /ml 用于各项实验。

1.2 As_2O_3 和 DDP 对细胞增殖功能的影响及形态学观察

将细胞接种于 24 孔培养板中(0.5ml/孔),48h 后弃上清,加入 As_2O_3 或 DDP(0.125mg/ml, 0.5ml/孔),取不同培养时间 1d、2d、3d、4d、5d 和 6d 进行观察,台盼兰染色计算细胞存活率,

* 基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题资助,编号 2004-133

作者简介:肖辉,男,(1972-),硕士研究生,主治医师;

E-mail: ybhuiz@hotmail.com, 电话: 13946129836

(收稿日期:2006-03-16 接受日期:2006-04-23)

绘制生长抑制曲线。

1.3 噻唑蓝比色分析(MTT)实验

将细胞接种于96孔培养板中(100 μ l/孔),48h后弃上清,加入不同浓度的As₂O₃或DDP稀释液(4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/ml、0.03125mg/ml、0.015625mg/ml和0.0078125mg/ml,100 μ l/孔)。培养72h后,加入MTT溶液(5mg/ml,50 μ l/孔)继续孵育4h,终止培养。吸去上清液,加入150 μ l DMSO,振荡溶解10min。空白对照调零,选择490nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(A值),计算抑制率。抑制率=(阴性对照A值-实验组A值)/阴性对照A值。

1.4 3'-原位末端标记(TUNEL)检测细胞凋亡数

将细胞接种于24孔培养板中(0.5ml/孔),形成单层细胞后,弃上清,加入As₂O₃或DDP(0.125mg/ml,50 μ l/孔),继续培养。细胞出现50%病变时,弃上清,PBS洗三次,加入冷丙酮固定。TUNEL实验:^①用0.3%H₂O₂溶液及0.1% TritonX-100通透液和0.1%枸橼酸缓冲液阻断内源性过氧化物酶和细胞的通透;^②加入Tunel反应混合溶液,37 $^{\circ}$ C孵育60分钟;^③加入转化剂-POD,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;^④加入5010 μ l DAB底物溶液,室温孵育10分钟;^⑤苏木素复染;乙醇逐级脱水,二甲苯脱乙醇,封片、镜检观察。随机选择5个视野计凋亡细胞和正常的细胞数,计算平均数和凋亡细胞百分数。

1.5 RT-PCR检测survivin基因的表达

在培养瓶内加入As₂O₃或DDP(0.125mg/ml,1.5ml/孔),细胞出现100%病变后常规消化收集各组细胞,按TrizolTM试剂盒说明书用一步法提取总RNA,用DNA/RNA测定仪测定RNA的浓度和纯度。参考《PCR技术实验指南》的方法^[3]略作修改进行逆转录:^①反应体系如下:RNA样,含4 μ l; dNTP Mixture, 2 μ l; RWase Inhibitor, 0.5 μ l; MgCl₂, 4 μ l; 10 \times RNA Pruffer, 2 μ l; Oligo dT, 1 μ l; AWW Reverse Transcriptase, 1 μ l, 加 ddH₂O 至总体积为20 μ l。混匀后30 $^{\circ}$ C 10min, 42 $^{\circ}$ C 30min, 99 $^{\circ}$ C 5min, 5 $^{\circ}$ C 5min, 冰上冷却完成cDNA的合成。

survivin 基因引物序列^[4]5'-CACCGCATCTCTACATTCAA-3'(上游)和3'-GCACITTCCTCGTCGAGTTCC-5'(下游),扩增产物为344bp。50 μ l的反应体系包括10 μ l RT产物, MgCl₂, 3 μ l; LAtag, 30.75 μ l; 10 \times LAPCR Pruffer, 4 μ l; Survivin 基因上下游引物各1 μ l; ddH₂O, 0.25 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 30s, 54 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1.5min; 30个循环。用 β -actin做内对照。1%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段。Bio-Rad凝胶自动成像分析仪(USA)处理。

1.6 统计学处理

数据分析应用SPSS10.0软件处理(由哈尔滨医科大学公共卫生教研室指导完成),以均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,两组之间比较使用两本均数的t检验。

2 结果

2.1 不同培养时间As₂O₃和DDP对Hep-2细胞增殖能力的影响

图1显示,不同作用时间As₂O₃和DDP对Hep-2细胞生存数的影响。结果证实,随着As₂O₃或DDP对Hep-2作用时间的延长,细胞生存数量明显降低。第2-6天,药物组与细胞对照组比较均有显著性差异(P<0.01)。

2.2 不同浓度As₂O₃和DDP对Hep-2细胞增殖能力的影响

图2表示用MTT法检测不同药物浓度对Hep-2细胞增殖的影响。结果表明,随着As₂O₃和DDP浓度的增加,对细胞的增殖有明显的抑制效应,表现为剂量依赖性。As₂O₃在3.13、2.5和1.56 μ g/L浓度与Hep-2细胞对照组无显著差异,DDP在2.5和1.56 μ g/L浓度与Hep-2细胞对照组无显著差异,其它各药物浓度与细胞对照组相比,差异均有显著性意义(P<0.05, P<0.01)。

2.3 As₂O₃和DDP对Hep-2细胞凋亡的影响

图3显示,Tunel染色后,对照组细胞呈淡蓝色多角形,极少见到凋亡细胞;As₂O₃组有部分细胞凋亡,凋亡细胞呈圆形或梭形。DDP组可见大量凋亡细胞,呈褐色,细胞变圆和裂解。

2.4 As₂O₃和DDP诱导Hep-2细胞凋亡时survivin基因表达的变化

从图4可知,survivin基因在Hep-2细胞中存在表达。RT-PCR结果显示As₂O₃和DDP诱导Hep-2细胞凋亡时,survivin基因的mRNA受到抑制。Survivin gene/ β -actin:细胞对照组为0.552 \pm 0.180,As₂O₃组为0.368 \pm 0.096,DDP组为0.327 \pm 0.089,药物组与细胞对照组相比有显著性差异(P<0.05)。

3 讨论

肿瘤的发生和发展不仅同肿瘤细胞的增殖和分化异常有关,而且同肿瘤细胞凋亡基因的变化有关,因此促进肿瘤细胞凋亡的策略已成为近年来肿瘤治疗的研究重点之一^[5]。As₂O₃和DDP等化学药物治疗是目前常用的一种手段。As₂O₃能够通过多种方式抑制细胞生长,其作用最敏感的部位是作用于线粒体,影响细胞内氧化还原系统(ROS);As₂O₃作用于微管蛋白使细胞生长停滞,有丝分裂增加,不能进入分裂末期^[6];As₂O₃还可直接作用使线粒体膜通道转运孔直接开放^[7];此外砷剂还有诱导细胞分化抑制细胞增殖^[8]。DDP是一种铂类配合物,主要是通过高活性的阳离子水化物与DNA链上的碱基作用,改变正常复制的模板的作用,引起DNA复制障碍从而抑制细胞分裂^[9]。

本研究结果显示:随着As₂O₃和DDP剂量的增加,对Hep-2细胞的生长的抑制作用增强,无论是低浓度还是高浓度的As₂O₃和DDP均可抑制Hep-2细胞的增殖,而且As₂O₃和DDP在0.125mg/ml浓度时细胞存活率随着作用时间的延长而降低。Tunel染色表明,化疗药物组细胞凋亡率显著高于对照组,并且存在时间依赖性,说明,As₂O₃和DDP主要以凋亡的方式促进细胞的死亡。这与大量研究的结果相符合。有研究发现,As₂O₃可通过多种机制启动线粒体介导的凋亡途径,使

ROS 增加,过量的 ROS 导致细胞膜胞括线粒体膜脂质过氧化功能受损,激活细胞色素 C 途径诱导凋亡,ROS 还可使线粒体 mtDNA 突变老化死亡^[10]。As₂O₃ 可下调 bcl-2 基因水平导致肿瘤细胞凋亡^[11]。As₂O₃ 激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Capase),使抑制凋亡的细胞内物质失去活性,通过对一些细胞骨架的调节相关蛋白的酶解,改变细胞的结构诱导凋亡的发生。在细胞色素 c 的信号途径中最先激活 Capase-3,而在 Fas 途径中 Capase-8 最先被激活^[12]。

本研究发现, survivin 基因在喉鳞癌 Hep-2 细胞中存在表达,经 As₂O₃ 和 DDP 作用后, survivin 基因的表达率显著低于细胞对照组。 survivin 基因是近年来发现的一种新抗凋亡因子,是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的成员^[2]。由于其独特的结构特殊的组织分布及明显抗凋亡生物学作用成为近年来肿瘤研究的重点。在生理状态下多数组织测不到 survivin 基因的表达,而绝大多数肿瘤组织存在 survivin 基因的表达,其表达阳性率不同^[13]。其过度表达使细胞失去了正常增殖周期开关的限制,导致凋亡与增殖平衡被打破,最终导致肿瘤的发生,也是导致肿瘤对化疗药物耐药性的重要因素之一^[14]。本研究发现,但是 Hep-2 细胞经 As₂O₃ 和 DDP 处理后,无论是高浓度还是低浓度均有不同程度的抑制,而且 As₂O₃ 和 DDP 在 0.125mg/ml 时, survivin 基因表达受到明显抑制。由此表明, As₂O₃ 和 DDP 通过抑制凋亡抑制蛋白 survivin 基因的表达,促进细胞凋亡,抑制肿瘤生长。最近, Olie^[15] 将针对 survivin 基因的反义寡核苷酸链导入肺癌细胞中,封闭 survivin 基因表达,发现肺癌细胞对化疗药物诱导的细胞凋亡明显增加,增强了化疗药物的敏感性。这从另一个角度证实了 survivin 基因参与化学药物介导的肿瘤细胞的凋亡作用。在此基础上,我们将进一步结合病理分期,研究喉鳞癌组织中 survivin 基因的表达与肿瘤预后的相互关系,进而探讨化学药物抑制 survivin 基因表达的详细机制,为化疗药物的筛选和最佳用药时间和方式提供理论依据。

参考文献

[1] Raffo AJ, Kim AL, Fine RL. Formation of nuclear Bax/p53 complexes is associated with chemotherapy induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2000 Dec 14, 19(54): 6216-28

[2] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998 Dec 1, 58(23):

5315-5320

- [3] Dffenbach. CW, Dveksler GS, 黄陪常, 俞炜源, 等译. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 206-17
- [4] Lu CD, Alkrieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998 May 1, 58(9): 1808-1812
- [5] Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, et al. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2000 Aug 15, 60(16): 4386-90
- [6] Li YM, Broom JD. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells [J]. *Cancer Res*. 1999 Feb 15, 59(4): 776-780
- [7] Porosnicu M, Nimmanapalli R, Nguyen D, et al. Co-treatment with As₂O₃ enhances selective cytotoxic effects of SII-571 against Bcr-Abl-positive acute leukemia cells [J]. *Leukemia*, 2001 May, 15(5): 772-778
- [8] Sasaki CY, In Hc, Passaniti A. Expression of E-cadherin reduces bcl-2 expression and increases sensitivity to etoposide-induced apoptosis [J]. *Int. J cancer*, 2000, 86(5): 600-6
- [9] 周宏灏主编. 分子药理学. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1999: 144-60
- [10] Yang CH, Kuo ML, Chen JC, et al. Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in Cancer [J]. *Br J cancer*, 1999 Nov, 81(5): 796-799
- [11] Zhang W, Ohnishi K, Shigeno K, et al. The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms [J]. *Leukemia*, 1998 Sep, 12(9): 1383-1391
- [12] Kitamura K, Minami Y, Yamamoto K. Involvement of CD95-independent caspase 8 activation in arsenic trioxide-induced apoptosis [J]. *Leukemia*, 2000 Oct, 14(10): 1743-1752
- [13] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2000 Jan, 6(1): 127-134
- [14] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998 Dec, 396(6711): 580-584
- [15] Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2000 May, 31(5): 1080-1085

(图1-图5请见封3)

survivin 基因在化疗药物诱导的喉鳞癌 Hep-2 细胞凋亡中的作用

肖辉 金德均 王超 徐秀玉 李晓丹

(哈尔滨医科大学附属第二医院耳鼻喉科, 黑龙江, 哈尔滨 150086)

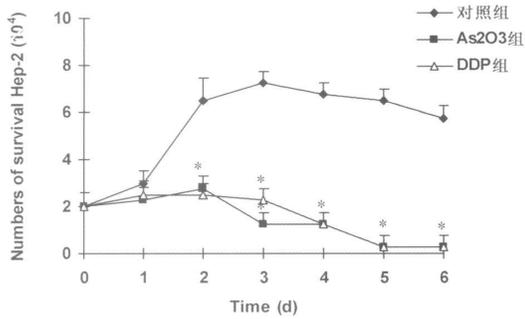


图 1 不同作用时间 As₂O₃ 和 DDP 对 Hep-2 细胞生存数的影响 (* P<0.01)

Fig. 1 Effects of As₂O₃ and DDP on the number of survival Hep-2 at different time (* P<0.01)

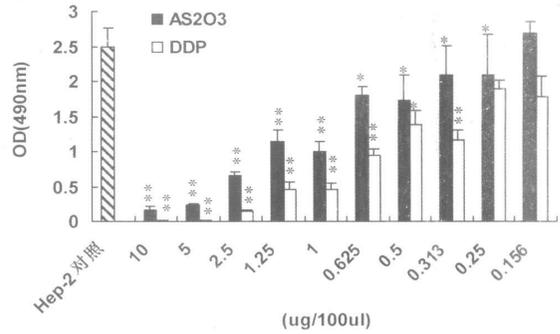


图 2 不同浓度 As₂O₃ 和 DDP 对 Hep-2 细胞增殖的影响 (* P<0.05, ** P<0.01)

Fig. 2 Effects of different concentration of As₂O₃ and DDP on Hep-2 proliferation (* P<0.05, ** P<0.01)

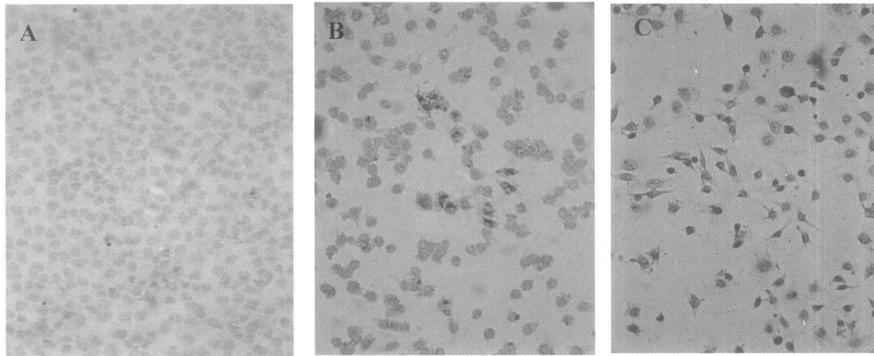


图 3 As₂O₃ 和 DDP 对 Hep-2 细胞凋亡的影响 (A: 对照组; B: As₂O₃ 组; C: DDP 组)
Fig. 3 Effects of As₂O₃ and DDP on Hep-2 apoptosis (A: control; B: As₂O₃; C: DDP)

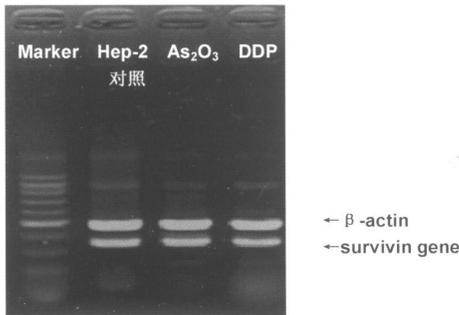


图 4 As₂O₃ 和 DDP 对 Hep-2 细胞 survivin 基因表达的影响
Fig. 4 Effects of As₂O₃ and DDP on Hep-2 gene expression

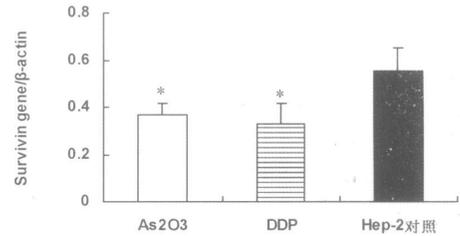


图 5 As₂O₃ 和 DDP 对 Hep-2 细胞 survivin 基因表达的影响 (* P<0.05)
Fig. 5 Effects of As₂O₃ and DDP on Hep-2 gene expression (* P<0.05)