文章编号:1000-5404(2005)10-1023-03

论著

顺铂诱导 survivin 表达改变与宫颈癌细胞化疗敏感性的关系

赵晓利,李 力,郭建新,徐德斌,胡 珊,陈竹钦 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨 survivin 基因在顺铂(DDP)诱导的宫颈癌细胞凋亡中的作用。**方法** 用宫颈癌 Hela 细胞株进行培养传代,MTT 试验检测 DDP 不同药物浓度对宫颈癌细胞生长的抑制作用。分别在加药前、加药后 24、48、72 h 和 96 h 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹技术(Western blot)检测 survivin mRNA 和蛋白的表达。同时利用流式细胞术定量检测细胞周期和细胞凋亡。**结果** DDP 对宫颈癌细胞生长均有明显的抑制作用,并有浓度和时间的依赖性。随浓度增加,宫颈癌细胞凋亡率表现先上升,后下降;随时间延长,在高浓度 DDP 组凋亡率明显增加,在低浓度 DDP 组凋亡率增加不明显。0.1 mg/L 和 1 mg/L DDP 处理宫颈癌细胞,survivin mRNA 和蛋白表达随作用时间的延长而增加。**结论** 小剂量顺铂处理宫颈癌细胞,survivin mRNA 和蛋白表达随作用时间的延长而增加,这可能是宫颈癌细胞对化疗药物产生耐药性的重要因素之一。

关键词: survivin;凋亡;宫颈肿瘤;顺铂
中图法分类号: R341.32; R737.33; R979.19 **文献标识码**: A

The role of survivin in the apoptosis of cervical cancer cell line induced by cisplatin

ZHAO Xiao-li, LI Li, GUO Jian-xin, XU De-bin, HU Shan, CHEN Zhu-qin (Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the role of survivin in the apoptosis of cervical cancer cell line induced by cisplatin (DDP). **Methods** The inhibition effects of different doses of DDP on Hela cell line were assayed with MTT test. Cultured Hela cells were divided into 2 groups: DDP and control. DDP group was divided into 10, 4, 2, 1, 0.1, 0.01 mg/L groups. The expression of survivin was determined by RT-PCR and Western blotting on 24, 48, 72 and 96 h after Hela cells exposed to cisplatin. Apoptosis and cell cycle changes were determined by flow cytometry. **Results** DDP obviously inhibited the cervical cancer cell growth in a manner of dose- and time-dependent. Apoptosis induced by chemotherapeutical drug increased at first and then decreased as the concentrations of DDP got higher while as the time went by, the apoptosis in the high DDP concentration group increased significantly but in the low DDP concentration group increased slowly. As time went on, survivin mRNA and protein level were increased after Hela cells exposed to 0.1 mg/L and 1 mg/L of DDP. **Conclusion** A high expression of survivin was induced in Hela cells by low concentration of cisplatin in a time-dependent manner, which may be caused by chemoresistence of cervical carcinoma cells induced by chemotherapy agent.

Key words: surviving; apoptosis; cervical carcinoma; cisplatin

过去认为宫颈癌属于化疗不敏感肿瘤,近年来国内外基础及临床研究肯定了术前化疗及放化疗在进展型宫颈癌中的作用[1]。常用的化疗药物有:顺铂(cisplation, DDP)、紫杉醇(taxol)、卡铂(carboplatin)、氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)、长春新碱(vineristin)、丝裂霉素(mitomycin, MMC)等。但顺铂、紫杉醇在宫颈癌的治疗中,除存在过度表达 mdrl 编码的 P 糖蛋白增加化疗药物排除外,还在于能抵抗药物诱导的凋亡。

生存素(survivin)是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)的新成员,特异性表达于人的胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞,在正常成人组织中仅于胸腺、分泌期子宫内膜有少量表达[2,3]。在几乎所有的常见肿瘤中,survivin 的 mRNA 和蛋白都有过量表达[2,4,5],survivin 通过抑制 caspase 级联反应下游的 caspase3、7 活性,从而抑制细胞凋亡;survivin 能抑制 Fas、caspase、Bax、某些化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡[6]。本研究检测在小剂量顺铂作用下宫颈癌细胞株 Hela 内 survivin 表达的变化,探讨宫颈癌化疗抵抗的可能机制。

作者简介:赵晓利(1968-),女,山东省济南市人,博士研究生,主治医师,主要从事宫颈癌基因治疗方面的研究,现在济南军区总医院妇产科。电话:(0531)5062468,E-mail: xudebincq@Yahoo.com.cn
通讯作者:李 力,电话:(023)68757249
收稿日期:2004-11-01;修回日期:2005-03-10

1 材料与方法

1.1 细胞培养

宫颈癌细胞株 Hela 培养在含有体积分数为 10% 小牛血清(美国 Gibco 公司)、青霉素 100 IU/ml 和链霉素 0.1 mg/ml 的 RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司)中进行,在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的条件下培养,细胞为贴壁生长,0.25% 的胰酶消化传代。

1.2 MTT 试验(噻唑蓝比色分析法)

药物 DDP (山东齐鲁制药厂)组为 10、4、2、1、0.1、0.01 mg/L,共 6 个不同剂量组,用培养液稀释,Hela 细胞消化制成单细胞悬液,用含体积分数为 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液调整浓度为 $(1\sim5)\times10^8$/L,取上述细胞液 0.1 ml 置 96 孔细胞培养板中预培养 24 h。每组设 6 个复孔(实验重复 6 次),接种后 24 h 更换培养液。实验组加入含各浓度药物的培养液,阴性对照不加药,空白对照只加培养液,加药后于 24、48、72、96 h 加入 10 mg/L 的 20 μl MTT,同样条件下继续培养 4 h 后吸出培养液,加入 200 μl DMSO 振荡溶解 10 min,空白对照调零,酶联仪检测波长 595 nm 各孔的吸光值(D 值)。计算抑制率,抑制率 = (阴性对照 D 值 − 实验组 D 值)/阴性对照 D 值 × 100%。

根据 MTT 实验结果,确定 DDP 作用浓度:DDP 高浓度为 10、4、2 mg/L,低浓度为 1、0.1、0.01 mg/L。

1.3 应用双标记流式细胞术定量分析凋亡

常规消化收集细胞(每个浓度均 6 瓶),以预冷的 PBS 洗涤细胞,用试剂盒提供的结合缓冲液 490 μl 重悬细胞,各加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 和 PI,混匀,将试管置于冰浴中避光孵育 10 min,立即上流式细胞仪检测。结果判定:FITC-/PI-为活细胞,FITC + /PI-为凋亡细胞,FITC + /PI + 为坏死细胞。

1.4 逆转录 PCR 检测 survivin 基因表达

取常规消化收集细胞 5×10^6,800 r/min 离心 8 min,PBS 洗 2 遍后,加入 1 ml Tripure 溶液裂解。按 Tripure 试剂说明提取 Hela 细胞内的总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。按 Promega 公司 RT-PC 试剂盒(A1250)说明进行 PCR 扩增(PCR 扩增仪为美国 PTC-100TM 型)。RT-PCR 扩增 survivin 引物为 5′-TTCTCAAGGACCACCGCATCT-3′(正义),5′-GAAAGCG-CAACCGGACGA-3′(反义),扩增片段大小为 221 bp;β-actin 引物为 5′-GAATTCATTTTTGAGACCTTCAA-3′(正义),5′-CCGGATC-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′(反义),扩增片段大小为 326 bp。反应条件:50 μl 反应体系中各引物终浓度为 1 μmol/L,dNTP 各 50 μmol/L,$MgCl_2$ 1 mmol/L。提取的 RNA 1 μg,AMV 逆转录酶 5 U,Tf/DNA 聚合酶 5 U。48 ℃逆转录 45 min,94 ℃变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,57 ℃退火 1 min,68 ℃延伸 2 min,40 个循环,最后 68 ℃延伸 7 min,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下观察结果。用 DGL2000 DNA marker 为分子大小对照确定阳性琼脂糖凝胶电泳条带。用 Chemilmager™ 5500 凝胶成像分析仪进行摄像,并用 Chemilmager™ 5500 凝胶成像分析仪自带软件进行半定量分析。表达强度用 survivin RT-PCR 产物吸光度与内参 β-actin 吸光度的比值表示。

1.5 免疫印迹检测 survivin 蛋白的表达

蛋白质提取:将预冷至 4 ℃的约 5 倍体积的裂解缓冲液(50 mmol/L Tris 盐酸,0.02% 叠氮钠,0.1% SDS,100 μg/ml PMSF,1 μg/ml Aprotinin,1% NP40,0.5% 去氧胆酸钠,150 mmol/L NaCl)加入到经 PBS 漂洗的培养细胞中,冰上作用 20 min,于 4 ℃、12 000 × g 离心 2 min 后,上清液保存于 − 20 ℃。SDS-PAGE 电泳和免疫印迹:采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,以 50 μg/孔上样,在 15% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离,电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至 PVDF 膜,在含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 中 37 ℃封闭 90 min,加入一抗(兔抗人 survivin 抗体,稀释度为 1:300),4 ℃孵育过夜,TTBS 充分漂洗(10 min × 3 次),加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,稀释度为 1:200),37 ℃作用 40 min,TTBS 充分漂洗(10 min × 3 次),TTB 漂洗 1 次(10 min),DAB 显色,观察结果。数据分析 Chemilmager™ 5500 凝胶成像系统进行数据处理。

1.6 统计学处理

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 DDP 对细胞生长的抑制作用

随浓度增加及作用时间延长,DDP 对 Hela 细胞生长的抑制作用增强,且以高浓度药物作用时明显($P<0.01$);在 0.1、0.01 mg/L 浓度组,Hela 细胞抑制率随时间延长增加不明显($P>0.05$),结果见图 1。

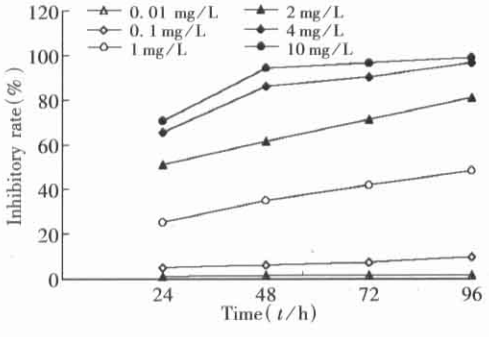


图 1 不同浓度顺铂对 Hela 细胞生长抑制率的影响

Fig 1 Effects of various concentrations of DDP on inhibitory rate of Hela cells

2.2 DDP 对 Hela 细胞凋亡的影响

随 DDP 浓度增加,Hela 细胞凋亡率上升($P<0.01$);DDP 浓度增加至 4 mg/L 凋亡率达高峰,继续增加浓度则凋亡率减低。0.1、0.01 mg/L 浓度组,Hela 细胞抑制率随时间延长增加不明显($P>0.05$);1、2、4、10 mg/L 浓度组,Hela 细胞凋亡率随时间延长明显增加($P<0.01$),见图 2。

2.3 DDP 对 survivin 基因表达的影响

Hela 细胞 survivin 表达强度在 DDP 处理后,均较未经化疗药物处理的对照组高,这种增高在高浓度组无显著性差异,而在低浓度组 survivin 表达强度的增加呈时间依赖性。检测 0.1 mg/L DDP 处理 24、48、72、96 h 的 Hela 细胞,可见随时间延长 survivin mRNA 表达明显增加,24 h 为对照组的 2.5 倍,48 h 为对照组的 3.6 倍,72 h 达最高 5.9 倍,96 h 已开始下降。低剂量 DDP 处理 Hela 细胞,survivin mRNA 表达均符合上述规律。

2.4 DDP 对 survivin 蛋白表达的影响

0.1 mg/L DDP 处理 Hela 细胞,分别在 24、48、72、96 h 采用

Western blot 检测 survivin 蛋白表达。分析表明随处理时间的延长，survivin 蛋白较对照组明显增加，24 h 为对照组的 1.6 倍，48 h 为对照组的 2.7 倍，72 h 为对照组的 3.9 倍，96 h 达 5.7 倍。低剂量 DDP 处理 Hela 细胞，survivin 蛋白表达均符合上述规律。但 10 mg/L 剂量组 survivin 蛋白表达，随时间延长是明显减少的，其抑制率甚至达 100%。

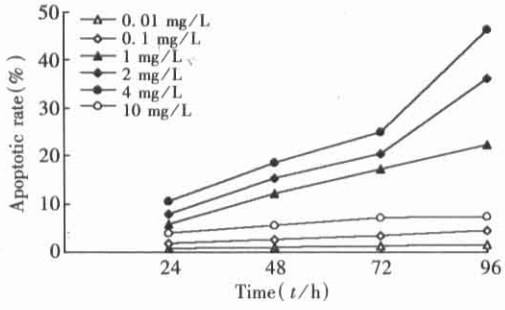


图 2　不同浓度顺铂对 Hela 细胞凋亡率的影响

Fig 2　Effects of various concentrations of DDP on apoptotic rate of Hela cells

3　讨论

顺铂(DDP)是宫颈癌化疗的一线药物，临床上广泛用于宫颈癌的治疗。但宫颈癌细胞对化疗药物的内在性及获得性耐药是化疗失败的主要原因，克服耐药将成为提高宫颈癌 5 年生存率的关键。

凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins，IAPs)是抑制细胞凋亡的重要成分，这一家族的作用远远大于 bcl-2 家族的作用。Survivin 是最近新发现的一种 IAP 家族成员，其基因全长 14.7 kb，在 G_2/M 期特异性表达，编码 1 个 16.5 kb 的蛋白，有抑制细胞凋亡的作用。早期的研究证实 survivin 存在于几乎所有的肿瘤及多种细胞株中[2,4,5]，survivin 与病理分期及分级相关[7]。而近期的研究结果显示 survivin 高表达与不良预后相关[8]，而且有报道认为 survivin 高表达与化疗耐药相关[9]。

本实验研究 DDP 处理宫颈癌 Hela 细胞时 survivin mRNA 和蛋白水平的表达及细胞生长抑制、细胞凋亡的关系。结果显示：Hela 细胞 survivin mRNA 表达强度在 DDP 处理后，较未经化疗药物处理的对照组高，这种增高在高浓度组无显著性差异，而在低浓度组 survivin mRNA 表达强度的增加呈时间依赖性。低剂量(0.1 mg/L) DDP 处理 Hela 细胞，随处理时间的延长，survivin 蛋白较对照组明显增加，24 h 为对照组的 1.6 倍，48 h 为对照组的 2.7 倍，72 h 为对照组的 3.9 倍，96 h 达 5.7 倍。另两低剂量 DDP 处理 Hela 细胞，survivin 蛋白表达均符合上述规律。而高剂量组 survivin 蛋白表达，随时间延长是明显减少的，其抑制率甚至达 100%。

Ikeguchi 等[9]报道 DDP 处理胃癌细胞系 MKN-45，survivin mRNA 随处理时间延长，先增加，8 h 达最高，随后又降低，蛋白也有同样趋势，12 h 达最高。本研究结果与 Ikeguchi 报道相近，但增加的倍数及时间点是不同的，这可能与不同的细胞系 survivin 表达差异有关。还可能与细胞周期是否阻滞于 G_2/M 期及阻滞时间有关，因为 survivin 是表达于 G_2/M 期的蛋白。本研究中 DDP 处理后 Hela 细胞阻滞于 G_2/M 期(结果另文发表)与 survivin 表达改变的时相是一致的。另外本研究中特别设置了高剂量组及低剂量组，发现高、低剂量药物处理组 survivin mRNA 和蛋白表达改变是不同的。低剂量药物处理组 survivin mRNA 和蛋白增加更明显；而高剂量药物处理组，survivin 蛋白表达是减少的，表明小剂量化疗药物作用 Hela 细胞后，更易诱导耐药的产生，提示不正规化疗产生耐药的原因。即使正规治疗，由于肿瘤深部血循环差等原因造成局部肿瘤细胞血药浓度明显降低，亦是其诱导 survivin 表达增高，从而产生耐药的原因。最近的研究表明 survivin 反义基因治疗可以降低 survivin 表达，诱导细胞凋亡。本研究结果提示：针对 survivin 的基因治疗在宫颈癌的治疗中可望产生协同作用，可能提高化疗药物的敏感性，降低耐药性的产生。

参考文献：

[1] 赵晓利，李　力. 宫颈癌治疗模式进展[J]. 国外医学肿瘤学分册，2004，31(5)：380－383.

[2] Ambrosini G，Adida C，Altieri D C，*et al*. A novel anti-apoptosis gene，survivin，expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med，1997，3(8)：917－921.

[3] Adida C，Crotty P L，McGrath J，*et al*. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation[J]. Am J Pathol，1998，152(1)：43－49.

[4] Yu J，Leung W K，Ebert M P，*et al*. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives[J]. Br J Cancer，2002，87(1)：91－97.

[5] Grabowski P，Kuhnel T，Muhr-Wilkenshoff F，*et al*. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer，2003，88(1)：115－119.

[6] 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，1998，58(23)：5315－5320.

[7] Kajiwara Y，Yamasaki F，Hama S，*et al*. Expression of survivin in astrocytic tumors：correlation with malignant grade and prognosis[J]. Cancer，2003，97(4)：1077－1083.

[8] Beardsmore D M，Verbeke C S，Davies C L，*et al*. Apoptotic and proliferative indexes in esophageal cancer：predictors of response to neoadjuvant therapy[J]. J Gastrointest Surg，2003，7(1)：77－86.

[9] Ikeguchi M，Liu J，Kaibara N，*et al*. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment[J]. Apoptosis，2002，7(1)：23－29.

(编辑　王　红)