经验交流

文章编号:1000-5404(2005)21-2194-02

胃癌组织中 *survivin*, *caspase*-3 和 *caspase*-9 基因表达的变化

Expression changes of *survivin*, *caspase*-3 *and* *caspase*-9 genes in gastric cancer tissues

文亚渊,刘宝华,付 涛 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

Survivin 是新近发现的一个抑制细胞凋亡蛋白(inhibitory apoptosis proteins, IAP)家族成员,特异性表达于人和鼠的胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞。*caspase* 是一类促凋亡蛋白。本实验在有关 *survivin* 和 *caspase* 在胃癌组织中表达方面进行了研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 收集本院2001年1月至2002年12月间手术切除、病理证实的胃癌标本30例。组织学类型:高分化腺癌9例,黏液腺癌9例,低分化腺癌9例,印戒细胞癌3例。

1.1.2 组织来源和分组 ①正常对照组:30例胃癌患者手术时,随机取10块来自不同患者距癌组织边缘10 cm以上经病理证实的正常胃组织标本。②实验组:取30块来自不同患者的胃癌组织标本。

1.1.3 标本处理 所有标本取出后作好标记,立即置入液氮中保存。

1.1.4 酶和试剂 Tripure试剂盒、Oligo(dT)15为美国Sigma公司产品,RNA酶抑制剂、M-Mulv逆转录酶为美国MBI公司产品,dNTP为加拿大Sagon公司产品,*Taq* DNA聚合酶为美国Promega公司产品,PCR-Markers由中国华美生物工程公司提供。

1.1.5 PCR扩增引物 *survivin*、*caspase*-3和*caspase*-9以及PCR内参照GAPDH引物均由上海生物工程公司合成。*survivin* 引物序列为:A: 5′-ATGGCCGAGGCTGGCTTCATCCAC-3′, B: 5′-TTGTAGTTTGTGCTATTCTGTGAATTA-3′,扩增片段长度为963 bp。*caspase*-3引物序列为:A: 5′-ATGGACAACAACGAAACCTCCGTG-3′, B: 5′-CCACTCCCAGTCATTCCTTTAGTG-3′,扩增片段长度857 bp。*caspase*-9引物序列为:A: 5′-GGCCCTTCCTCGCTTCATCTC-3′, 5′-GGTCCTTGGGCCTTCCTGGTAT-3′, 扩增片段长度885 bp。GAPDH引物序列为:A: 5′-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3′, B: 5′-TCACGCCACAGTTTCCCGGA-3′,扩增片段长度372 bp。

1.2 方法

采用RT-PCR方法测定正常胃组织、胃癌组织 *survivin*、*caspase*-3 和 *caspase*-9 的mRNA表达。

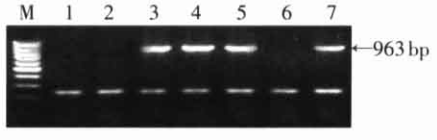
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0软件进行 χ^2 检验、方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 Survivin mRNA 在正常胃组织及胃癌组织中的表达

10例正常胃组织中均无survivin mRNA表达,30例胃癌组织中有20例survivin mRNA表达阳性,阳性率为66.7%。从图1中可以看出survivin mRNA在正常胃组织中不表达,在胃癌组织中高表达。

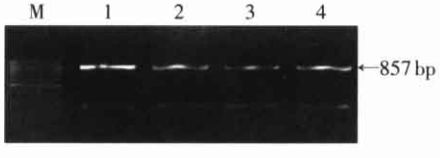


M: Marker; 1: *survivin* 在正常胃组织中的表达; 2~7: *survivin* 在胃癌组织中的表达

图1 Survivin mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达

2.2 Caspase-3 mRNA 在正常胃组织及胃癌组织中的表达

如图2所示:caspase-3 mRNA在正常胃组织及胃癌组织均有表达,在857 bp处可见一透亮条带。



M: Marker; 1: *caspase*-3 在正常胃组织中的表达; 2~4: *caspase*-3 在胃癌组织中的表达

图2 Caspase-3 mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达

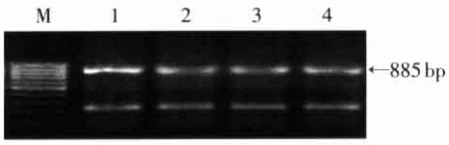
基金项目:重庆市科委科技基金资助项目(2002-6832)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2002-6832)

作者简介:文亚渊(1964-),男,湖北省黄梅县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胃及十二指肠疾病诊治方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68757248

收稿日期:2004-09-12;**修回日期**:2005-02-20

2.3　Caspase-9 mRNA 在正常胃组织及胃癌组织中的表达

如图 3 所示:caspase-9 mRNA 在正常胃组织及胃癌组织均有表达,在 885 bp 处可见一透亮条带。



M: Marker; 1: *caspase*-3 在正常胃组织中的表达; 2 ~ 4: *caspase*-3 在胃癌组织中的表达

图 3　Caspase-9 mRNA 在正常胃组织及胃癌组织中的表达

2.4　survivin 与 caspase-3 及 caspase-9 mRNA 在正常胃组织及胃癌组织中表达的关系

如表 1 所示:30 例胃癌组织 caspase-3 和 caspase-9 mRNA 水平均较正常胃组织显著下降($P<0.01$)。survivin mRNA 表达阳性胃癌组织的 caspase-3 mRNA 水平较 survivin mRNA 表达阴性的胃癌组织显著下降($P<0.01$);survivin mRNA 表达阳性胃癌组织的 caspase-9 mRNA 水平与 survivin mRNA 表达阴性的胃癌组织相差不显著。survivin mRNA 表达与 caspase-3 mRNA 表达呈负相关,与 caspase-9 mRNA 表达不相关。

表 1　Survivin mRNA 与 caspase-3 mRNA 及 caspase-9 mRNA 表达的关系($\bar{x}\pm s$)

Groups	*n*	*caspase*-3	*caspase*-9
survivin(+)	20	0.10 ± 0.03 *△	0.44 ± 0.03 *
survivin(−)	10	0.51 ± 0.03 *	0.46 ± 0.07 *
正常胃组织	10	0.91 ± 0.04	0.93 ± 0.02

*: $P<0.01$,与正常胃组织比较; △: $P<0.01$, 与 survivin(−)比较

2.5　胃癌组织中 *survivin*、*caspase*-3 和 *caspase*-9 表达与胃癌组织学分型的关系

如表 2 所示:各类型之间胃癌组织的 *survivin*、*caspase*-3 和 *caspase*-9 表达没有显著差别($P>0.05$)。

表 2　胃癌组织中 *survivin*、*daspase*-3 和 *daspase*-9 表达与组织学分型的关系

组织学分型	*n*	*survivin* 表达			*caspase*-3 表达			*caspase*-9 表达		
		阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)
高分化腺癌	9	6	3	67	9	0	100	9	0	100
黏液腺癌	9	6	3	67	9	0	100	9	0	100
低分化腺癌	9	6	3	67	9	0	100	9	0	100
印戒细胞癌	3	2	1	67	3	0	100	3	0	100

3　讨论

IAP 家族是近几年来发现的一类新的细胞内凋亡抑制蛋白,其抑制凋亡的多样性高于已发现的其他凋亡抑制因子家族[1]。*survivin* 是 IAP 家族成员之一,是迄今为止被克隆出的最小的 IAP 家族成员,它表达于细胞周期的 G_2/M 期[2],定位于细胞有丝分裂的纺锤体[3],其结构与 IAP 家族其他蛋白不同,IAP 家族蛋白一般包含 2 或 3 个串联的含有半胱氨酸/组氨酸的杆状病毒重复区序列(BIR)及与此相邻的羧基末端含有一个环指结构。而 *survivin* 只含有一个 BIR 分子,其羧基末端无环指结构,代之以交织 α-螺旋结构[4]。*survivin* 的主要作用是抗细胞凋亡。*caspase* 是指一群促细胞凋亡的含有半胱氨酸的蛋白酶,其酶解底物包括 *caspase* 自身及其他因子。通过对其底物的水解,*caspase* 转导凋亡信号或直接作为凋亡的效应分子,促进细胞骨架降解和 DNA 片段化。多数 *caspase* 正常以非活性的前体即 *caspase* 酶原形式存在。*caspase* 酶原的激活通常由上一级 *caspase* 剪切所致,故这类酶自身催化,产生级联效应。*caspase* 引起细胞凋亡的途径通常为死亡受体接受死亡信号,引起上游 procaspase-8 的激活,导致 procaspase-9 激活,最终导致 *caspase*-3、*caspase*-7 激活[5]。*caspase*-3 和 *caspase*-7 通过破坏细胞核纤层,直接导致细胞结构的破坏。

本研究表明,30 例胃癌患者有 20 例 *survivin* 表达阳性,而正常胃组织 10 例无 1 例有 *survivin* 表达;表明胃癌组织 *survivin* 高表达。且胃癌组织无论 *survivin* 是否表达,其 *caspase*-3、*caspase*-9 水平均较正常胃组织显著下降($P<0.01$),说明胃癌发生过程中,*caspase*-3、*caspase*-9 表达受到抑制。胃癌组织 *survivin* 表达阳性组 *caspase*-3 水平(0.10 ± 0.03)较 *survivin* 表达阴性组(0.51 ± 0.03)显著下降($P<0.01$),说明 *survivin* 对 *caspase*-3 有直接较强的抑制作用,而胃癌组织 *survivin* 表达阳性组及阴性组 *caspase*-9 表达水平变化不大($P>0.05$),说明 *survivin* 对其抑制作用较弱。这一结果表明 *survivin*、*caspase*-3、*caspase*-9 同时参与胃癌的发生、发展,同时亦表明 *survivin* 抗细胞凋亡作用可能是通过抑制 *caspase*-3 的活性来实现的。4 种不同类型胃癌组织 *survivin*、*caspase*-3、*caspase*-9 的表达没有显著差别,表明各种类型胃癌的发生均有 *survivin*、*caspase*-3、*caspase*-9 基因参与。

关键词: 胃癌; *survivin*; *caspase*

中图法分类号: R735.2　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] LaCasse E C, Baird S, Korneluk R G, *et al*. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer[J]. Oncogene, 1998, 17(25): 3247 - 3259.

[2] Rodriguez J A, Span S W, Ferreira C G, *et al*. CRM1-Mediated Nuclear Export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein survivin[J]. Exp Cell Res, 2002, 275(1): 44 - 53.

[3] Fortugno P, Wall N R, Giodini A, *et al*. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 3): 575 - 585.

[4] Verdecia M A, Huang H, Dutil E, *et al*. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7(7): 602 - 608.

[5] Altieri D C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(12): 542 - 547.

(编辑　周　芳)