文章编号:1000-5404(2008)23-2215-04

论著

K562细胞survivin基因表达对淋巴细胞增殖和功能的影响

罗 颖,温贤浩,徐酉华 (重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨K562细胞中survivin基因的表达对淋巴细胞增殖和功能的影响。**方法** 将融合重组质粒pEGFP-C1-survivin和靶向survivin基因的RNAi的重组质粒pTZU6+1-survivin分别转染K562细胞,得到K562/survivin+和K562/survivin-2种细胞,用G418筛选K562/survivin+细胞,用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法及免疫细胞化学法检测K562/survivin+和K562/survivin-2种细胞中survivin mRNA及蛋白水平的表达,并与K562细胞作对照。将这3种细胞与健康人外周血单个核细胞(PBMC)混合培养(MLTC),检测混合培养体系中淋巴细胞增殖能力、NK细胞活性及培养上清中IFN-γ水平。**结果** K562/survivin+组的淋巴细胞增殖指数明显低于其余两组。survivin基因的表达水平与NK细胞活性呈负相关。混合培养上清中分泌的IFN-γ,K562/survivin+组是K562组的1/4.5,是K562/survivin-组的1/8。**结论** 高表达的survivin可以抑制淋巴细胞的增殖、NK细胞活性及IFN-γ的分泌。

关键词: survivin;淋巴细胞增殖;K562细胞;RNA干扰
中图法分类号: R331.144; R73-362; R733.7 **文献标识码:** A

Effect of enhanced survivin expression on lymphocyte proliferation and function in K562 cells

LUO Ying, WEN Xian-hao, XU You-hua (Department of Hematology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the effect of survivin gene expression on the lymphocyte's proliferation and function in cultured K562 cells. **Methods** The constructed recombinant vector pEGFP-C1-survivin and the plasmid pTZU6+1-survivin encoding short hairpin RNA of survivin were transfected into K562 cells respectively to generate K562/survivin+ cells and K562/survivin- cells. K562/survivin+ cells were selected by G418. The survivin mRNA and protein levels in the 3 kinds of cells (K562/survivin+, K562 and K562/survivin-) were detected by semi-quantitative RT-PCR and immunohistochemistry methods. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy subjects were co-cultured with these 3 cells respectively in mixed lymphocyte-tumor cell culture (MLTC). Lymphocyte proliferation in the supernatant was evaluated by MTT assay. Nature killer activity was detected by flow cytometry and IFN-γ level was measured by ELISA assay. **Results** Proliferation index in K562/survivin+ group was much lower than that in the other 2 groups ($P<0.05$). Survivin expression level was of negative correlation with NK activity. IFN-γ content in the MLTC of K562/survivin+ group was lower than that in K562 group (1/4.5) and K562/survivin- group (1/8). **Conclusion** Enhanced expression of survivin may inhibit the proliferation of lymphocyte, activity of nature killer and the secretion of IFN-γ.

Key words: survivin; lymphocyte proliferation; K562 cells; RNA interference

随着近代肿瘤免疫学的深入研究和分子生物学技术的迅速发展,人们已开始应用基因免疫疗法治疗肿瘤。凋亡抑制基因survivin是凋亡抑制蛋白因子(inhibitors of apoptosis proteins, IAPs)家族的成员之一。该基因表达具有高度的肿瘤特异性,且广泛表达于多种肿瘤组织,成为肿瘤发病机制、基因治疗等方面研究的热点。研究表明survivin在血液恶性肿瘤中都呈高度表达。血液恶性肿瘤在高度增殖的阶段,survivin的表达水平显著上调。这提示以survivin为基础治疗血液恶性肿瘤的免疫疗法具有很大的潜力[1]。

本研究以人白血病细胞株K562为对象,通过增强和抑制survivin基因在该细胞株中的表达,观察survivin基因的表达对淋巴细胞增殖和功能的影响,为

作者简介:罗 颖,女,四川省绵阳市人,硕士,主要从事血液肿瘤基础和临床方面的研究。电话:(023)63610742,E-mail:wingwing_1983@163.com
通信作者:徐酉华,E-mail:xuyouhua54@163.com
收稿日期:2008-01-18;修回日期:2008-03-07

进一步研究白血病发生的免疫机制及免疫基因治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 K562细胞(本院儿研所基因调控实验室保存)在含10% 胎牛血清的RPMI1640中,于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中培养。根据细胞生长状况,每2~3天进行传代培养。

1.1.2 主要试剂和仪器 融合重组质粒pEGFP$^-$C1$^-$survivin和靶向survivin基因的RNAi重组质粒pTZU6$^+$1$^-$survivin由重庆医科大学感染分子实验室惠赠。RPMI1640培养基及胎牛血清为Gibco公司产品,Trizol及RT-PCR其他相关试剂购自TaKaRa公司,脂质体Lipofectamine™购自美国Invitrogen公司,MTT试剂购自美国Sigma公司,人IFN-γ ELISA检查试剂盒购自尚柏生物医学技术有限公司,FACS colibur型流式细胞仪(B-D公司,美国)。肝素抗凝人外周新鲜血来自6例健康献血者(男女各3例)。

1.2 试验方法

分离健康人外周血淋巴细胞(PBMC),采用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法,PBS离心洗涤2次后,悬于完全RPMI1640中,在37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中孵育1 h后,收集悬浮细胞,显微镜下计数,得到细胞浓度。

1.2.1 获取增强和抑制survivin基因表达的K562细胞 获取增强survivin基因的表达同时稳定表达绿色荧光蛋白的K562细胞(K562/survivin$^+$)。取对数期K562细胞悬浮于无血清无抗培养基,接种于50 ml培养瓶中,将抽提纯化的融合重组质粒pEGFP$^-$C1$^-$survivin 20 μg与脂质体20 μl,稀释后混合孵育5 min,加入到K562细胞中6 h后,加入10%胎牛血清终止反应,继续37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中孵育至24 h后,进行常规细胞培养。72 h后加入G418筛选,2周后获得高纯度稳定表达绿色荧光蛋白同时survivin表达增强的K562细胞。

通过RNAi技术获取抑制survivin基因表达的K562细胞(K562/survivin$^-$)。取对数期K562细胞悬浮于无血清无抗培养基,接种于50 ml培养瓶中,将抽提纯化的重组质粒pTZU6$^+$1$^-$survivin 20 μg与脂质体20 μl,稀释后混合孵育5 min,加入到K562细胞中6 h后,加入10%胎牛血清终止反应,继续37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中孵育至24 h后,收集细胞进行下一步实验。

1.2.2 RT-PCR法检测survivin mRNA的表达 提取各组细胞总RNA,取1 μg进行逆转录,PCR扩增目的片段survivin和内参照β-actin。survivin引物序列:正义链为5′-CCACTTCCA-GGGTTTATTCC-3′,反义链为5′-CCACACGCTTCCTATCACTC-3′,扩增片段长度为697 bp。反应条件:94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min,30个循环。

1.2.3 免疫细胞化学法检测survivin蛋白的表达 采用S-P法进行免疫细胞化学染色。PBS作阴性对照。阳性结果的判断采用染色强度及阳性细胞数进行评分。染色强度分为4级:阴性(0分)、淡黄色(1分)、黄色(2分)、棕黄色(3分);阳性细胞数分为5级:<5% (0分)、6%~25% (1分)、26%~50% (2分)、51%~75% (3分)、>75% (4分)。随机计数5个视野,每个视野计数200个细胞,计算阳性细胞率。两者的乘积作为最终的结果判断:0分(-)、1~4分(+)、5~8分(++)、9~12分(+++)。

1.2.4 混合淋巴细胞肿瘤细胞培养(mixed lymphocyte-tumor cell culture, MLTC)

1.2.4.1 淋巴细胞增殖指数(proliferation Indices, PI)的测定

将3种细胞(K562/survivin$^+$, K562, K562/survivin$^-$)灭活(用80 μg/ml丝裂霉素,37 ℃处理1 h)后,分别与淋巴细胞混合培养(每孔0.2 ml培养液,含10^6淋巴细胞和10^4肿瘤细胞,对照组只含淋巴细胞或肿瘤细胞。各设3复孔)。置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中孵育5 d后,用MTT法测定淋巴细胞增殖指数[2]。

$$PI值=[D(450)_{混合培养孔}-D(450)_{肿瘤细胞孔}]/D(450)_{淋巴细胞孔}$$

1.2.4.2 NK细胞活性的检测 用完全RPMI1640调节3种靶细胞(K562/survivin$^+$、K562、K562/survivin$^-$)数为5×10^5 ml^{-1},调节效应细胞淋巴细胞(PBMC)数为5×10^6 ml^{-1},将不同的肿瘤细胞和淋巴细胞各取500 μl混合,同时设靶细胞对照孔,各设2复孔。1 000 r/min,离心30 s后,37 ℃,5% CO_2饱和湿度的培养箱中孵育2 h。加入10 μl(100 μg/ml)碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)进行标记,上流式细胞仪进行分析[3]。

1.2.4.3 IFN-γ的测定 将3种细胞(K562/survivin$^+$、K562、K562/survivin$^-$)灭活(用80 μg/ml丝裂霉素,37 ℃处理1 h)后,调节这3种肿瘤细胞和淋巴细胞的细胞数为1×10^6 ml^{-1}。分别取1种肿瘤细胞和淋巴细胞各500 μl混合培养(均设2复孔)5 d后,收集细胞培养上清进行IFN-γ检测,按ELISA检测试剂盒说明进行。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 10.0统计软件进行秩和检验,组内采取两独立样本均数的t检验。

2 结果

2.1 高表达survivin基因的K562/survivin$^+$细胞

融合重组质粒pEGFP$^-$C1$^-$survivin经脂质体介导转染K562细胞24 h,再经G418稳定筛选,在荧光显微镜下观察GFP的表达。结果显示:约有85%以上的K562细胞有绿色荧光蛋白的表达,在200 μg/ml的G418维持培养2周后,荧光强度无明显减弱,获得高纯度稳定高表达survivin基因的K562/survivin$^+$细胞(图1)。

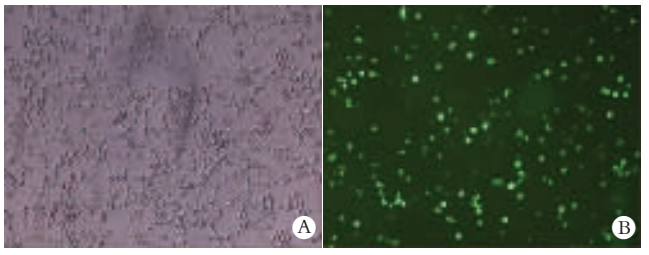
2.2 survivin mRNA表达

RT-PCR产物电泳结果显示,转染融合重组质粒pEGFP$^-$C1$^-$survivin K562细胞的survivin PCR产物电泳带较单纯K562细胞组明显增强;转染重组质粒pTZU6$^+$1$^-$survivin K562细胞的PCR产物电泳带较单纯K562细胞组明显减弱。而β-actin的表达无明显差异(图2)。

2.3 survivin蛋白表达

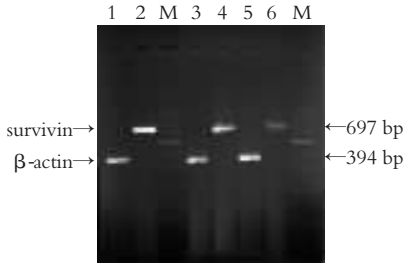
survivin表达阳性细胞可见细胞质或细胞核被染成棕黄色(图3)。K562/survivin$^+$细胞中survivin蛋白表达增强,K562/

survivin⁻细胞中 survivin 蛋白表达降低(表 1)。3 组之间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。



A:普通显微镜;B:荧光显微镜

图 1　显微镜下观察 200 μg/ml G418 维持培养 2 周后 K562/survivin⁺细胞情况　(×100)



M:标准;1,2:K562/survivin⁺组; 3,4:K562 组; 5,6:K562/survivin⁻组

图 2　survivin mRNA 在各组的表达情况

2.4　淋巴细胞增殖效应

K562/survivin⁺组的淋巴细胞增殖指数(PI 值)明显低于其他两组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。而 K562/survivin⁻组的 PI 值虽高于其他两组,但与 K562 组比较,差异没有统计学意义($P>0.05$)(表 2)。

2.5　NK 细胞活性

流式细胞仪分析结果显示,在 K562/survivin⁺组的 NK 细胞活性最低,K562 细胞组较低,K562/survivin⁻组最高,且 3 组之间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

2.6　细胞因子 IFN-γ 分泌的情况

在 K562/survivin⁺组刺激 IFN-γ 分泌较 K562 组降低。而 K562/survivin⁻组的 IFN-γ 分泌却明显增加,是 K562 组的 1.7 倍。差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1　survivin 蛋白的表达

组别	survivin 蛋白表达例数			
	−	+	++	+++
K562/survivin⁺	0	2	6	12[a]
K562	1	4	9	6
K562/survivin⁻	5	9	5	1[a]

a:$P<0.05$, 与 K562 组比较

表 2　survivin 对 PI、NK 细胞活性及 IFN-γ 分泌的影响

组别	PI	NK 细胞活性(%)	IFN-γ(pg/ml)
K562/survivin⁺	0.41±0.13[a]	3.80±3.09[a]	8.29±3.29[a]
K562	0.64±0.21	10.75±6.00	36.77±16.79
K562/survivin⁻	0.71±0.21	20.83±8.98[a]	65.24±10.39[a]

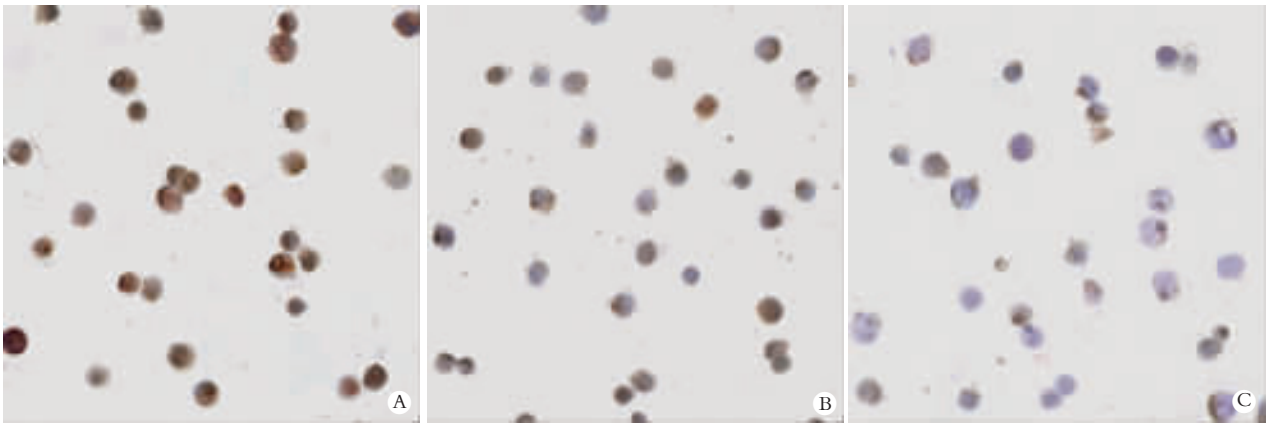
a: $P<0.05$,与 K562 组比较

3　讨论

肿瘤的发生是细胞凋亡受抑、增殖过度或分化受阻的结果,而这些又与癌基因的过度表达、抑癌基因的失活、细胞凋亡基因及凋亡抑制基因等的表达异常有着密切的关系。同时,机体免疫监视功能的缺陷也参与了肿瘤的形成,肿瘤细胞可以通过某些机制逃脱机体对肿瘤的免疫控制,致使肿瘤产生。那么这些基因的表达异常是否可通过影响机体的免疫功能而参与肿瘤的发生和发展?探寻这两者之间的关系将有助于更深入地了解肿瘤的发生发展机制,并为肿瘤的免疫基因治疗开辟新的途径。

在肿瘤特异性表达基因中,凋亡抑制基因 survivin 以其表达强,并广泛表达于多种肿瘤组织中而备受关注。研究已证实,survivin 基因在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用。它可以使细胞凋亡受抑、增殖过度及分化受阻,还能引起肿瘤多药耐药,降低肿瘤细胞对放、化疗的敏感性,参与血管的形成,并且其表达与肿瘤恶性程度是呈正相关。因而该基因成为肿瘤基因治疗的研究热点[4,5]。

目前,文献[6]报道抑制 survivin 基因的表达,可以使肿瘤更容易被 B7-1 介导的免疫反应消灭。



A: K562/survivin⁺细胞; B: K562 细胞;C: K562/survivin⁻细胞

图 3　survivin 蛋白在各组中的表达　(S-P×400)

Asanuma 等[7]指出,survivin 能够通过抑制 Fas 介导的凋亡信号阻止免疫细胞对肿瘤细胞的攻击,并能通过上调 FasL 的表达对免疫细胞进行回击,从而逃脱免疫监视。但 Shon 等[8]却认为,激活诱导细胞死亡(activation-induced cell death,AICD)是维持外周 T 细胞耐受的主要机制,而在 G_1 期高表达的 survivin 基因能够抑制 AICD 的发生。这是否提示该基因还能通过影响机体的免疫功能来参与肿瘤的发生和发展?

因此我们从淋巴细胞增殖情况、NK 细胞活性、细胞因子 IFN-γ 水平 3 个方面,探讨 survivin 基因对机体免疫功能的影响。淋巴细胞是机体的重要免疫细胞,它受抗原刺激后发生一系列分子生物学反应,其最终表现是淋巴细胞增殖活性升高,这是细胞和体液免疫反应的细胞学基础。NK 细胞是细胞免疫中的非特异性成分,在天然免疫监视功能中发挥着重要的作用,是具有直接杀伤靶细胞效应的一类淋巴细胞。它无须抗原致敏即可直接杀伤敏感的肿瘤细胞,且不受 MHC 限制,对白血病细胞和淋巴瘤尤为有效,是机体抗肿瘤的第一道防线。检测 NK 细胞的活性可以反映机体固有免疫功能。细胞因子 IFN-γ 主要由活化的 T 细胞(包括 $CD4^+$ Th 细胞和 $CD8^+$ T 细胞)和 NK 细胞产生。该因子具有对机体免疫功能进行正性调节的作用,它能够增强机体免疫监视和免疫杀伤功能,如促进 CTL 和 NK 细胞成熟扩增,增强 TNF 的抑瘤作用,促进 Th 细胞、APC 以及 CTL 对靶细胞的识别和作用。近来有研究表明,IFN-γ 可通过调控 Fas/FasL 系统阻止肿瘤细胞的免疫逃避[9]。

我们研究发现,3 组混合培养体系中,survivin 基因的表达水平与淋巴细胞增殖指数呈相反关系,增强 survivin 表达的 K562/$survivin^+$ 组,其淋巴细胞增殖指数明显低于其余 2 组,这提示 survivin 的高表达可以抑制机体的淋巴细胞增殖。流式细胞仪分析结果显示,NK 细胞的活性与 survivin 基因的表达水平呈相反关系。survivin 的表达越高,NK 细胞的活性越低;survivin 的表达越低,NK 细胞的活性越高。这提示 survivin 基因的高表达可以抑制 NK 细胞活性;survivin 基因的低表达可以上调 NK 细胞活性。这也提示在肿瘤细胞中 survivin 基因的高表达可以抑制机体的固有免疫功能。而 NK 细胞杀死靶细胞主要是通过两个不同的途径:一个是释放穿孔素和颗粒酶;另一个是高表达 FasL,与靶细胞表面 Fas 结合,诱导靶细胞凋亡。而 survivin 基因可以通过抑制 caspase3 和 caspase7,阻断 Fas 介导的凋亡[10]。该基因可能就是通过这个途径来抑制 NK 细胞的活性。对混合培养上清中 IFN-γ 分泌水平的检测显示,survivin 的表达越高,IFN-γ 分泌越少;survivin 的表达越低,IFN-γ 分泌越高。这提示 survivin基因的高表达可以抑制 IFN-γ 的分泌,而 survivin 基因的低表达可以促进 IFN-γ 的分泌。笔者推测survivin基因调控 Fas/FasL 系统凋亡信号的机制之一,就是通过抑制 IFN-γ 的分泌,来帮助肿瘤细胞逃脱机体的免疫攻击,产生免疫逃避。

由此可见,survivin 基因的高表达可以抑制淋巴细胞增殖,淋巴细胞的非特异性免疫功能及其正性免疫调控功能。该基因能够抑制机体的免疫功能,帮助肿瘤细胞逃脱机体的免疫监视和免疫杀伤,导致肿瘤的出现。这就提示 survivin 基因可能参与诱导白血病细胞产生免疫逃避,抑制该基因的表达有可能成为肿瘤免疫治疗的调控靶点。所以,以 survivin 为基础的基因免疫治疗可看作目前治疗白血病最有希望的手段之一。

参考文献:

[1] 罗 颖,徐酉华. survivin 多肽疫苗治疗血液系统恶性肿瘤的研究进展[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(10):1118-1120.

[2] 王 斌,刘 磊,张丽辉. 重组腺病毒载体介导共刺激分子 B7.1 基因对儿童肝母细胞瘤体外淋巴细胞增值的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007,15(11):24-27.

[3] 张 俊,钱亚云,龚卫娟,等. 利用流式细胞仪检测人外周血 NK 细胞毒性方法的建立[J]. 实用临床医药杂志,2006,10(4):28-31,35.

[4] Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, *et al*. High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res,2004,10(11):3737-3744.

[5] Giannopoulos K, Schmitt M. Targets and strategies for T-cell based vaccines in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia[J]. Leuk Lymphoma,2006,47(10):2028-2036.

[6] Kanwar J R, Shen W P, Kanwar R K, *et al*. Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7-1 immunogene therapy [J]. J Natl Cancer Inst,2001,93(20):1541-1552.

[7] Asanuma K, Tsuji N, Endoh T, *et al*. survivin enhances Fas ligand expression *via* up-regulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells[J]. J Immunol, 2004,172(6): 3922-3929.

[8] Shon H K, Cho K J, Chung A S. survivin reduces activation-induced T cell death in G1 phase[J]. Mol Cells, 2003,16(2):147-153.

[9] 卢 琳,李绪彤,张 婷,等. γ-干扰素对白血病细胞 Fas/FasL 系统的调控及凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2006,13(4):277-280.

[10] Wang J X, Zheng S. Caspase-3 and survivin expression in pediatric neuroblastoma and their roles in apoptosis[J]. Chin Med J (Engl), 2004,117(12):1821-1824.

(编辑 吴培红)