基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0040-03

Survivin 在肾透明细胞癌 786-O 细胞株中表达的实验研究

李 戈,王 明
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测抗凋亡基因 survivin 在肾透明细胞癌 786-O 细胞株中的表达并探讨其临床意义。方法:运用 MTT(四唑盐比色)法检测细胞生长状态并绘制生长曲线,运用 RT-PCR(逆转录聚合酶链反应)法和免疫组化法检测 786-O 细胞株中 survivin mRNA 及 survivin 蛋白的表达情况。结果:检测出 786-O 细胞株中有 survivin mRNA 的表达,survivin 蛋白的表达亦呈阳性,而正常肾细胞无阳性表达。结论:survivin mRNA 及 survivin 蛋白在肾透明细胞癌中均有明显的表达,利用这一表达特异性,为以 survivin 基因为靶点的肾癌基因治疗研究提供了实验依据。

【关键词】survivin;肾透明细胞癌;786-O;RT-PCR;免疫组化
【中国图书分类法分类号】R737.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-28

Experimental study on the expression of survivin in renal clear cell carcinoma 786-O

LI Ge, et al
(*Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and the clinical significance of survivin in renal clear cell carcinoma 786-O. *Methods*: The expression of survivin mRNA and protein were detected by RT-PCR and immunohistochemisty, The growth curve of renal clear cell carcinoma 786-O were detected by MTT. *Results*: The survivin mRNA and protein were detected in 786-O cells. In contrast, no expression of survivin was found in normal renal cells. *Conclusion*: The survivin gene and protein were significantly expressed in renal clear cell carcinoma 786-O. This may provide the experimental evidence for the survivin gene as a target of gene therapy in renal cancer.

【Key words】Survivin; Renal cell carcinoma; 786-O; RT-PCR; Immunohistochemisty

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一。国内肾癌的发病率仅次于膀胱癌居泌尿系肿瘤第二位,肾透明细胞癌是肾癌最常见的病理类型,其发生发展受多个基因的调控,不仅与肿瘤细胞的增殖相关,而且与其凋亡也是密切相关的。作为凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中的作用最强的凋亡抑制因子,在常见的恶性肿瘤组织中,如肝癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌等均呈高度表达[1],而在正常分化成熟的组织中几乎不表达。我们通过检测 survivin 基因的 mRNA 及蛋白在肾透明细胞癌 786-O 细胞中的表达情况,探讨其在肾癌基因治疗方面的意义。

1 材料与方法

1.1 材料来源

肾癌 786-O 细胞由重庆医科大学超声研究所提供;四氮甲基唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基、Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 购自大连宝生物工程有限公司;RT-PCR 扩增引物由上海生工公司合成;一抗兔抗人 survivin 多克隆抗体购自美国 ABZOOM 公司;兔二步法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞生长状态并绘制生长曲线 收集对数生长期细胞,按 1×10^4 个/ml 的密度接种于培养板,共接种 9 组,每组 5 复孔,将培养板置于 5%CO_2 的 37℃培养箱中孵育。为保证细胞生长环境的相对稳定,每 48 h 更换孔内培养液。每天取出 1 组细胞,在每孔培养液里加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl 后继续培养,4 h 后将孔内培养液吸出,每孔加入 150 μl DMSO,于摇床上低速振荡 10 min 后,于酶标仪(ELX 800)490 nm 波长处测量各孔的吸光值。根据测得的数据,以时间为横轴,光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.2 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达情况 收集生长状态良好的肾癌 786-O 细胞与人正常肾近曲小管上皮细胞,

作者介绍:李 戈(1980-),男,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤基因治疗。
通讯作者:王 明,男,副教授,E-mail:wangmxr@sohu.com。

参照 Trizol 试剂的说明书提取细胞的总 RNA 并定量。RT-PCR 二步法参照试剂盒的说明书进行,取 0.5 μg 总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, 然后用 survivin 的引物和内参照 β-actin 的引物进行 PCR 扩增。survivin PCR 引物:正义链:5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3',反义链:5'-TCTCCGCAGTTTCCTCAAAT-3', 扩增产物长度 344bp;β-actin PCR引物:正义链:5'-GGCATGGACGAGCTGTACAA-3',反义链:5'-CTCTAGATCAACCACTTTGT-3',产物长度 587 bp。PCR 的扩增条件为:94℃变性 2 min;94℃30 s,54℃30 s,72℃30 s,循环 30 次;72℃延伸 5 min。PCR 反应结束后,取 10 μl 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,电泳条带通过凝胶成像系统观察。

1.2.3 免疫组织化学检测 survivin 蛋白的表达情况 将对数生长期的细胞消化计数后接种于玻片上,于培养箱中培养至细胞汇合度约 80%左右后终止培养,采用 Envision 二步法进行免疫组化染色。实验步骤参照试剂盒说明书进行。冰丙酮固定 15 min 后,PBS 洗 3 次 × 3 min,用 0.2%TritonX-100 孵育 20 min,PBS 洗 3 次 × 2 min,然后 3%H_2O_2 孵育 15 min 后,PBS 洗 3 次 × 2 min, 滴加 1:100 稀释的一抗兔抗人 survivin 多克隆抗体,37℃孵育 1 h,PBS 洗 3 次 × 2 min,滴加二抗,37℃孵育 30 min,PBS 洗 3 次 × 2 min,DAB 染色后,脱水、透明、固定。用人正常肾近曲小管上皮细胞作为对照组,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。在荧光显微镜(Olympus. AX70)下观察照相。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS14.0 统计软件对实验数据进行方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 结果

测得的第 1~9 d 细胞的吸光度值见表 1 所示,根据所得数据绘制的生长曲线如图 1 所示。

由图 1 和表 1 可见,传代接种后的第 2 d 细胞数稍有减少,可能与部分细胞消化后死亡有关。到第 6 d 时,细胞已铺满板底,但由于肿瘤细胞无接触抑制现象,能继续移动和增殖,导致细胞向三维空间扩展,使细胞发生堆积,只要营养充分,细胞仍然能够进行增殖分裂,因此细胞生长的趋势为数量仍在不断增多。

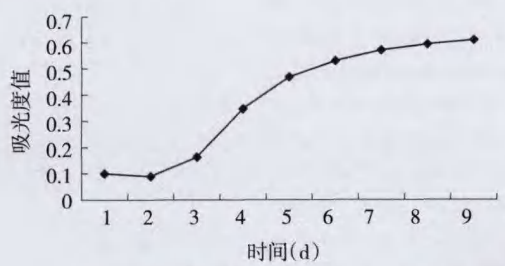


图 1 肾透明细胞癌 786-O 细胞生长曲线

表 1 第 1~9 d 细胞的吸光度值($\bar{x} \pm s$)

天数	吸光度值
第 1 d	0.1080 ± 0.0038
第 2 d	0.0904 ± 0.0045
第 3 d	0.1832 ± 0.0055
第 4 d	0.3474 ± 0.0102
第 5 d	0.4268 ± 0.0096
第 6 d	0.5072 ± 0.0117
第 7 d	0.5474 ± 0.0120
第 8 d	0.5812 ± 0.0134
第 9 d	0.6188 ± 0.0146

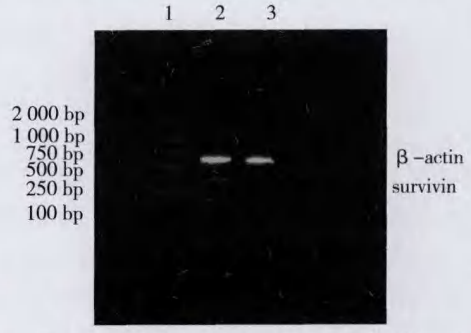
2.2 RT-PCR 结果

从细胞提取的总 RNA 均可见清晰的 28S、18S、5S 3 条带,核酸蛋白仪测得的 A_{260}/A_{280} 的 OD(光密度,optical density)值 >1.9, 说明所提取的总 RNA 完整性好、纯度高。经过 RT-PCR 扩增得到的产物的凝胶电泳结果见图 2

实验结果显示,在 587 bp 和 344 bp 大小区域有清晰的内参照 β-actin 与 survivin 扩增条带出现,证明 survivin 基因在肾透明细胞癌 786-O 细胞中有明确的表达。而人正常肾近曲小管上皮细胞泳道的 survivin 扩增区域未见扩增条带。

2.3 免疫组化结果

细胞爬片的免疫组化染色结果见图 3,survivin 蛋白阳性染色呈棕黄色,以胞质伴或不伴有细胞核染色为阳性细胞。图中癌细胞大小、形态不一,核质比增大,显著高于正常细胞。而正常肾小管上皮细胞中未见明显的阳性染色细胞。

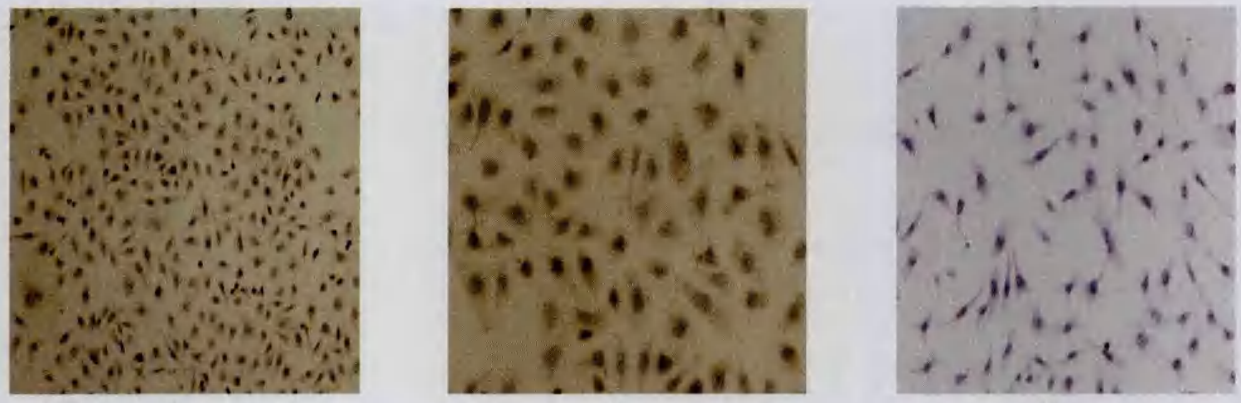


1. DNA Marker;2. 肾癌 786-O 细胞; 3. 肾近曲小管上皮细胞

图 2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

3 讨 论

凋亡的调控对维持人体组织的自身稳定和形态发育具有至关重要的作用。凋亡障碍使细胞生存延长,突变的细胞积累而导致肿瘤形成。生存素(survivin)是 1997 年由耶鲁大学 Ambrosini 等[2]利用效应细胞蛋白酶受体 1(Effector cell protease receptor-1,EPR-1)cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中首先分离出来的一个新基因。人类 survivin 基因定位于染色体 17q25,全长 14.7 kb,由 3 个内含子和 4 个外显子组成,编码 142 个氨基酸[3],survivin 是分子量最小的 IAP 分子,



A　　B　　C

A、B：肾癌 786-O 细胞 survivin 表达情况（IHC A：×200 B：×400）C：肾近曲小管上皮细胞（IHC×400）

图 3　survivin 在肾癌 786-O 细胞及肾近曲小管上皮细胞的表达

分子量约为 16.5 kD。作为凋亡抑制蛋白家族中的作用最强的凋亡抑制因子，survivin 也是目前发现的 IAP 家族中唯一与细胞凋亡和细胞周期调控都相关的因子，并且具有促进血管形成的功能[4]，其表达有严格的细胞周期依赖性，于 G_2/M 期的表达量达到最大，G_1/M 期的表达量最小。目前认为，survivin 可能通过两条途径来抑制细胞凋亡：① 通过作用于各个凋亡途径的交合点直接或间接抑制凋亡终末效应器半胱氨酸蛋白酶 caspase-3、caspase-7 的活性来阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程。② survivin 与周期依赖性蛋白激酶 cdk4、p34cdc-2 相互作用阻断凋亡信号传导通路[5,6]。有研究报道，在胚胎以及发育的胎儿组织，survivin 有微弱的表达，而在成人组织中仅增殖活跃的睾丸、胸腺和分泌期的子宫内膜有不同程度的表达。在常见的恶性肿瘤组织中，如肝癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌等均呈高度表达，在癌前细胞向癌细胞转化过程中，survivin 表达逐渐升高，并且 survivin 基因的表达与肿瘤的恶性程度、侵袭性及预后密切相关。Lehner[7]等报道 45 例不同期膀胱癌中有 26 例 Survivin 染色阳性，14 例原位癌中有 2 例 survivin 染色阳性，而正常膀胱标本的 Survivin 染色为阴性，后两者与膀胱癌组差异显著；高分化组膀胱移行细胞癌中 Survivin 的表达低于低分化组。Smith S D 等[8]发现 47 例初发或复发性膀胱癌患者的尿液中均有 Survivin 表达，而且低分级膀胱癌 Survivin 的表达水平明显低于膀胱原位癌。近期的研究证实，在全球近 400 万的基因转录表达分析中，survivin 基因是肿瘤组织中表达上调最为普遍的基因，可使肿瘤细胞对治疗的敏感性降低。

由于肾癌绝大多数为先天多药耐药，大多数中晚期肾癌缺乏特异性的疗法。多方面研究提示 survivin 参与肿瘤的发生发展，是一个具有潜在价值的肿瘤标志物。研究表明，与凋亡相关的 P16、RB、C-myc 等因子与肾癌的发生关系密切，而作为 IAP 家族中作用最强的凋亡抑制因子，survivin 在肿瘤的诊断、治疗等中的作用与地位日趋重要，虽然 survivin 对于肾癌不具有组织特异性，但有着肿瘤特异性。焉杰克等[9]报道 survivin 蛋白的表达在肾癌发生的各个时期皆可出现，而且它的持续高表达可能进一步参与恶性肿瘤的临床进展，监测 survivin 蛋白的表达对于肾脏恶性肿瘤的诊断和预后的判断具有一定的价值。Zamparese R 等[10]也证明了 survivin 在肾癌组织中的高表达，且其高表达与肾癌的低分化、高恶性和高侵袭性密切相关。我们的实验也证明，无论是 survivin 基因还是 survivin 蛋白，在肾透明细胞癌细胞中都有较高的表达，其表达可能是肾癌发生的重要因素之一，因此，可以预测其在肾癌的诊断和治疗上可能产生积极的作用，Survivin 的肿瘤组织特异性使其可望成为理想的肿瘤标记物，有助于早期正确诊断恶性肿瘤，并且，利用基因阻断技术调控 Survivin 基因表达，阻滞细胞增殖，促进细胞凋亡，可能发挥抑制肾透明细胞癌生长的作用，从而达到治疗肾癌的目的，为肾癌的基因治疗提供了可能的突破口。

参 考 文 献

[1] Altieri D C.Validating survivin as a cancer therapeutic target[J].Nat Rev Cancer, 2003,3(1):46-54.

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

[3] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, et al.Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting[J].J Biol Chem, 1998,273(18):11177-11182.

[4] O'Connor D S, Schechner J S, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2):393-398.

[5] Shin S, Sung B J, Cho Y S, et al.An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7[J].Biochemistry, 2001,40(4):1117-1123.

[6] Liu T, Brouha B, Grossman D.Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in survivin-targeted melanoma cells[J].Oncogene, 2004,23(1):39-48.

[7] Lehner R, Lucia M S, Jarboe EA, et al. Immunohistochemical localization of the lAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma[J].Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002,10(2):134-138.

[8] Smith S D, Wheeler M A, Plescia J, et al. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer[J]. JAMA, 2001,285(3):324-328.

[9] 焉杰克，徐忠华.凋亡抑制因子 survivin 在肾癌中的表达及意义[J].现代泌尿外科杂志，2007,12(5):284-286.

[10] Zamparese R, Pannone G, Santoro A, et al. Survivin expression in renal cell carcinoma[J]. Cancer Invest, 2008,26(9):929-935.

（责任编辑：冉明会）