肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0849-03

Livin,Survivin 在肝癌细胞的表达及 5-Fu 对其的诱导作用

吴桂新[1],王洪林[1],邓 开[1],郑 科[1],董蒲江[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院肝胆外科;2.重庆医科大学附属第一医院外科实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究凋亡抑制蛋白 Livin,Survivin 在肝癌细胞株 $HepG_2$ 的表达及 5-Fu 对肝癌细胞内凋亡抑制蛋白 Livin,Survivin 的诱导作用,探讨 Livin,Survivin 在肝癌化疗抵抗中的作用机制。方法:培养人肝癌细胞株 HepG2,加入低浓度的化疗药物 5-Fu,分别在加药前、加药后 24 h 和 48 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 livin,Survivin mRNA 和蛋白的表达。结果:给予低浓度的 5-Fu 可诱导 Livin,Survivin mRNA 和蛋白的表达发生变化,其中 Livin mRNA 在加药后 24 h 和 48 h 分别较加药前提高了 0.6 倍和 1.1 倍,Livin 蛋白在加药后 24 h 和 48 h 分别较加药前提高了 1.3 倍和 2.7 倍,Survivin mRNA 在加药后 24 h 和 48 h 分别较未加药提高了 1.5 倍和 2.2 倍,Survivin 蛋白在加药后 24 h 和 48 h 分别较未加药提高了 0.9 倍和 1.9 倍。结论:Livin,Survivin 在 $HepG_2$ 中有表达。5-Fu 可诱导肝癌细胞内 livin ,Survivin 的表达增加,抵抗化疗药物诱导的细胞凋亡。值得进一步研究以评价 5-Fu 对肝癌治疗的实用价值。

【关键词】肝癌细胞株 HepG2;Livin;Survivin

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-22

The expression of Inhibitor of apoptosis protein of Livin and Survivin induced by 5-Fu in hepatocelluar carcinoma(HCC)

WU Gui-xin, et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the expression of livin and survivin induced by 5-Fu agent,and determine the role of livin and survivin in anti-chemotherapy of hepatocellular carcinoma (HCC). *Methods*:Low concentration of 5-Fu was added in cultured HepG2 cells. The expression of livin and survivin was detected by RT-PCR and western-blot on 24h and 48h after 5-Fu treatment.*Results*:Livin and survivin mRNA 1evel was increased by 0.6 ,1.1 and 1.5,2.2 times,respectively.and thant of the protein expression was increased by 1.3 ,2.7 and 0.9,1.9 times,respectively.*Conclusion*:livin and survivin was expression in HepG2.A high expression level of livin and survivin was induced in HepG2 by 5-Fu,which reduced to apoptosis by 5-Fu. It's valuable to study the curative effect of 5-Fu to hepatocelluar carcinoma further.

【Key words】Hepatocarcinoma cell line HepG2;Livin;Survivin

化疗是肿瘤治疗的一项重要的措施,化疗药物能诱导肿瘤细胞的凋亡,达到治疗肿瘤的目的。然而临床化疗效果却不近人意,其原因在于肿瘤细胞具有耐药性。研究发现,肿瘤细胞高表达凋亡抑制蛋白家族(Inhibitors of apoptosis proteins,IAPs)能拮抗化疗药物诱发的细胞凋亡。Livin 是最新发现的 IAPs 成员。而 Survivin 则是 IAPs 中分子量最小的成员。他们都能与介导细胞凋亡的下游效应 Caspase,即激活形式的 Caspase-3 和 Caspase-7 结合,抑制其活性,从而抑制细胞的凋亡。研究发现 Livin,Survivin 在多数实体瘤及瘤细胞株中皆高表达,而在正常组织细胞中不表达或者仅低表达。故一部分学者认为检测 Livin,Survivin 可以帮助肿瘤疾病的诊断。现在研究发现 livin 在黑色素瘤,非小细胞肺癌,胃癌细胞系,胰腺癌细胞系等肿瘤组织细胞中表达明显增高,而 Livin 在肝癌组织细胞中的表达却鲜有报道。本文即对 Livin 和 Survivin 在肝癌细胞株 $HepG_2$ 的表达情况及检测化疗药物对二者表达的影响。

作者介绍:吴桂新(1979-),男,硕士,研究方向:肝胆肿瘤。

通讯作者:王洪林,男,教授,E-mail:whl7534@yahoo.cn。

1 材料与方法

1.1 试剂及细胞株

M-MLV 逆转录酶、Trizol RNA 提取试剂、引物合成、Taq 聚合酶购自大连 TAKARA 生物科技公司，免疫 Livin 多克隆抗体购自 ebioscence 公司。免疫 Survivin 多克隆抗体购自北京博奥森公司。HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司。细胞株 $HepG_2$ 由重庆医科大学附属第一医院外科实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 培养人肝癌细胞株 HepG2 加入 5-Fu（5-Fu 浓为 0.1 mg/ml）分别在 24 h 和 48 h 检测Livin，Survivin 的表达。

1.2.2 细胞总 RNA 抽提 用 Trizol 试剂提取总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 有无降解，并测 RNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 比值和浓度。收集 HepG2 细胞 2×10^6 个，弃去培养液，用 0.1 mol/L PBS(pH7.4)洗细胞 2 次，加入 1.0 ml Trizol 试剂充分裂解细胞，然后转移至 1.5 ml 离心管，反复吹打混匀至细胞完全溶解。加入 0.2 ml 氯仿，剧振，室温孵育 2～3 min。12 000×g 40℃离心 15 min。将上层水相移至另一离心管中，加入 0.5 ml 异丙醇，混合后室温沉淀 10 min。12 000 g，离心 10 min。弃上清，加入 1 ml 75%乙醇，7 500 g，离心 5 min。重复上一步骤后弃上清，室温空气蒸发残存的乙醇，DEPC（Diephyl pyrocarbonate，焦碳酸二乙酯）水溶解 RNA 待用。用 1%琼脂糖电泳见 28 s 比 18 s 明亮。OD_{260}/OD_{280}=1.7。

1.2.3 逆转录反应条件 总 RNA 3 μl、DEPC 8 μl、oligo dT（18）1 μl、70℃ 5 min 后冰上冷却 5 min 加 5×buffer 4 μl、（10 mmol/L）dNTP 2 μl、抑制剂 1 μl。37℃ 10 min。然后加逆转录酶 1 μl。42℃ 60 min，99℃ 5 min，40℃ 10 min 后进行 PCR 反应（大量扩增目的片段）。

1.2.4 PCR 反应体系 50 μl 反应体积内含 10×PCR 缓冲液 5 μl，2 mmol/L dNTPs 5 μl，5 μmol/L 引物 4 μl，2.5 μl Taq DNA 聚合酶 5 μl 和 6 μl 逆转录产物，加灭菌去离子水至 50 μl。95℃ 5 min，94℃ 1 min，58℃ 1 min 退火、72℃延伸 2 min 共 30 循环。72℃ 10 min 延长（Livin）。94℃变性 45 s，56℃退火 45 s，72℃延伸 1 min，30 个循环，最后 72℃延伸 10 min（Survivin）引物序列和扩增长度见表 1。

1.2.5 免疫印迹检测 Survivin livin 蛋白的表达 WIP 组织细胞裂解液提取 $HepG_2$ 细胞内总蛋白，凝胶电泳，100 V，5 h，电转移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭，加入稀释兔抗多克隆抗体，室温孵育过夜，加入碱性磷酶酶羊抗兔二抗，室温孵育 2 h，洗涤，加入 ECL 显色，凝胶成像分析。

2 结 果

2.1 survivin mRNA 的表达情况

加入 5-Fu 后，分别在 24 h 和 48 h 采用 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达。如图 1 所示。

2.2 survivin 蛋白的表达情况

加入 5-Fu 后，分别在 24 h 和 48 h 采用 Western-blot 检测 Survivin 蛋白的表达。在 11~17 kD 之间测得图形，结果如图 2 所示。

2.3 livin mRNA 的表达情况

加入 5-Fu 后，分别在 24 h 和 48 h 采用 RT-PCR 检测 Livin mRNA 的表达，结果如图 3 所示。

2.4 livin 蛋白的表达情况

加入 5-Fu 后，分别在 24 h 和 48 h 采用 Western-blot 检测，在 34 kD 与 26 kD 之间测得以下图形，结果如图 4 所示。

2.5 Livin、Survivin mRNA 和蛋白在加药后 24、48 h 与加 5-Fu 前的比较

运用凝胶成像分析系统测定加药前后其 mRNA 和蛋白灰度值，根据其平均灰度值比较加药前后 Livin、Survivin mRNA 和蛋白表达的变化。结果发现 Livin、Survivin mRNA 和蛋白的表达皆增加。如表 2、表 3 所示。

3 讨 论

Livin 是最近发现的凋亡抑制蛋白。它于 2000 年由 lin 等[1]根据 IAP 同源序列，用含有 BIR 序列的 EST 克隆在人的胎肾 cDNA 库中发现并被命名为 KIAP(Kidney inhibitor of apoptosis protein)。Vucic 等[2]发现该基因在人黑色素瘤细胞中高表达，故称 ML-lAP(Melanoma inhibi-tor of apoptosis protein)。Kasof 等根据同源检索发现该基因并将之命名为 Livin[3]。Livin 能抑制效应 Caspase，即激活形式的 Caspase-3 和 Caspase-7[2,3]，Livin 还能激活 TAK1/JNK1 信号传导途径[4]并通过上述途径抑制细胞的凋亡。研究发现 Livin 在黑色素瘤、膀胱癌、非小细胞肺癌、鼻咽

表 1 Livin、Survivin 和 Actin 引物序列和扩增长度

基因	位置	引物序列	扩增产物长度
Livin	上游	5'-TCAGTTCCTGCTCCGGTCAA-3'	350 bp
	下游	5'-CGCACGGCACAAAGACGAT-3'	
Survivin	上游	5'-GGGAATTCATGGGTGCCCCACGTTGCC-3'	434 bp
	下游	5'-CTCTCGAGTCAATCCATGGCAGCCAGCT-3'	
Actin	上游	5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3'	250 bp
	下游	5'-GGATAGCACAGCCTGGATAG-3'	

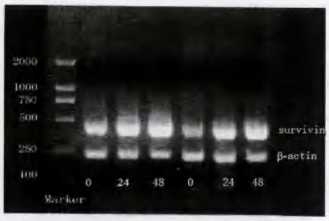
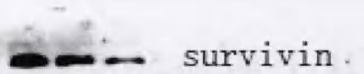


图 1 Survivin mRNA 的表达



48 h 24 h 加药前

图 2 Survivin 蛋白的表达

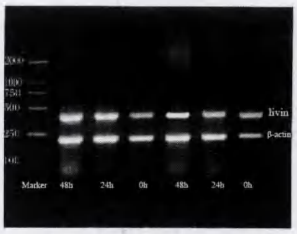
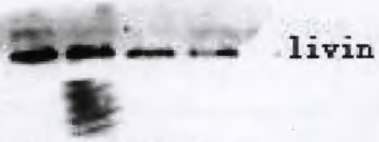


图 3 Livin mRNA 的表达



48 h 48 h 24 h 加药前

图 4 Livin 蛋白的表达

表 2 Livin、Survivin mRNA 和蛋白的表达平均灰度值(INT/mm²)

	加药前	24 h	48 h
Livin mRNA	2 846.81	4 554.89	5 978.29
Livin 蛋白	4 669.8	10 740.56	17 278.26
Survivin mRNA	5 263.51	13 158.78	16 843.23
Survivin 蛋白	9 754.84	18 534.19	28 289.04

表 3 Livin、Survivin mRNA 和蛋白的表达在加药前后的变化

	24 h	48 h
LivinmRNA	增加 0.6 倍	增加 1.1 倍
Livin 蛋白	增加 1.3 倍	增加 2.7 倍
SurvivinmRNA	增加 1.5 倍	增加 2.2 倍
Survivin 蛋白	增加 0.9 倍	增加 1.9 倍

癌、喉癌、胃癌、神经系统肿瘤中表达明显增高。对肿瘤的发生，发展及转移起重要的作用。

Survivin 是 IAPs 家簇的另一成员，位于染色体 17q25，编码 142 个氨基酸组成的蛋白质，它仅含有单一杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列(Baculovirus IAP repeat，BIR)功能区，无环指结构[5]。BIR 分子中含有对抑制凋亡有重要作用的氨基酸残基 Trp67、Pro33 和 Cys84。通过这些残基与 caspase-3 和 caspase-7 结合而抑制 caspase 的活性；在羟基端有一由 40 个氨基酸组成的双螺旋结构，通过双螺旋结构和细胞的分裂微管(Microtube)结合，抑制细胞凋亡[6,7]。研究发现 Survivin 可广泛表达于人类各种肿瘤组织，与肿瘤的发生、发展起重要作用。其对肝癌的发生、发展及复发、预后也具有相关性[8]。

本文即研究凋亡抑制蛋白 Livin，Survivin 在肝癌细胞 $HepG_2$ 表达以及化疗药物作用对其的影响。研究发现 Livin，Survivin 在肝癌细胞 $HepG_2$ 表达，经加用化疗药物后 Livin，Survivin 的表达明显的增高。从而抵抗了化疗药物导致的癌细胞的凋亡。故化疗药物诱导 Livin，Survivin 的表达可能是肿瘤细胞逃避化疗药物毒性的机制之一。

本研究发现 5-Fu 对凋亡抑制蛋白 Livin，Survivin 有诱导作用，可进一步检测奥沙利铂，表阿霉素，丝裂霉素等肝癌常用化疗药物对凋亡抑制蛋白 Livin、Survivin 是否有诱导作用。以评价 5-Fu 在肝癌治疗中的实用价值。

目前研究发现运用反义技术，RNAi 技术及 Livin，Survivin 拮抗剂均能降低 Livin 或者 Survivin 的表达，抑制癌细胞株的生长，诱导癌细胞株的凋亡[9-11]。可进一步研究是否抑制 Livin、Survivin 等凋亡抑制蛋白能增强肝癌对化疗的敏感性。

参 考 文 献

[1] Lin J H, Deng G, Huang Q, et al. A novel member of the inhibitor apoptosis protein family[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(3): 820-831.

[2] Vucic D, Stennicke H R, Pisabarro, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas[J]. Curr-Biol, 2000, 10(21): 1359-1366.

[3] Kasof, Gomes. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J-Biol-Chem, 2001, 276(5): 3238-3246.

[4] Sanna M G, da Silva Correia J, Ducrey O, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(6): 1754-1766.

[5] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel ant-apoptis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. New Med, 1997, 3(8): 917-921.

[6] Hauser H P, Bardrof M, Pyrowolakis G, et al. A giant ubiqitin conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitor[J]. J Cell Biol, 1998, 141(6): 1415-1422.

[7] Li F, Ambrosini G, Chu E Y, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 1998, 396(6711): 580-588.

[8] 叶超平，邱成志，黄种心，等.肝癌术后复发及预后与 Survivin 表达的关系[J].中华实验外科杂志，2006，23(7)：829-830.

[9] 陈 涛，贾玉容，赵铁军，等.反义寡核苷酸抑制 survivin 基因表达及肝癌细胞生长的研究[J].中国肿瘤生物治疗杂志，2004，11(3)：187-190.

[10] 张华东，袁守军，陈惠鹏，等.Livin mRNA 的反义核酸诱导 MCF-7 乳癌细胞凋亡作用[J].中国临床药理学与治疗学，2004，9(12)：1353-1356.

[11] Zobel K, Wang L, Varfolomeev E, et al. Design, synthesis, and biological activity of a potent Smac mimetic that sensitizes cancer cells to apoptosis by antagonizing IAPs[J]. ACS Chem Biol, 2006, 1(8): 525-533.

（责任编辑：冉明会）