肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0852-05

Survivin 基因及其主要剪接变构体 mRNA 在大肠癌组织中的表达

左文革,李瑜元,聂玉强,沙卫红,王 红,林 泳
(广州医学院附属广州市第一人民医院消化内科,广州 510180)

【摘 要】目的:探讨大肠癌组织中 Survivin 基因及其主要剪接变构体与癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen,CEA)CAM5 mRNA 表达的临床意义。方法:39 例大肠癌切除标本,采集肿瘤组织、癌旁 2.5 cm 组织和距离肿瘤 10 cm 以上的正常大肠组织各 1 块,采用 RT-PCR 方法检测总 survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B、survivin 2α 和 CEA CAM5 mRNA 的表达。用凝胶图像分析系统或 SYBR Green Ⅰ 实时荧光定量 PCR 检测上述基因 mRNA 的表达水平。结果:总 survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B、survivin 2α 和 CEA CAM5 mRNA 在大肠癌组织中的阳性表达率分别为 100.0%、92.3%、92.3%、79.5%、87.2%和 97.4%,均高于癌旁 2.5 cm 组织中的 38.5%、25.6%、28.2%、7.7%、12.8%和 12.8%,差异均有统计学意义($P<0.01$)。正常肠壁组织中上述 mRNA 的阳性表达率分别为 17.9%、5.1%、7.7%、0.0%、2.6%和 10.3%,与癌旁 2.5 cm 组织比较,总 survivin、survivin-△Ex3 和 survivin-2B 差异有统计学意义($P<0.05$)。总 survivin 及其剪接变构体和 CEA CAM5 mRNA 的表达水平,大肠癌组织高于癌旁 2.5 cm 组织($P<0.01$);癌旁 2.5 cm 组织与正常组织的差异均无统计学意义($P>0.05$)。survivin 剪接变构体 mRNA 的表达水平与一些临床病理参数有关($P<0.05$)。结论:Survivin 和其剪接变构体 mRNA 在大肠癌组织中呈高表达,表达水平与恶性临床病理参数有关。检测 Survivin 和其剪接变构体 mRNA 表达对大肠癌前预报与早期诊断比 CEA mRNA 更有价值。

【关键词】Survivin 剪接变构体;癌胚抗原 CAM5;大肠癌;表达;凋亡
【中国图书分类法分类号】R735.3+4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-17

Expression of survivin gene and main transcript variants mRNA in colorectal carcinomas

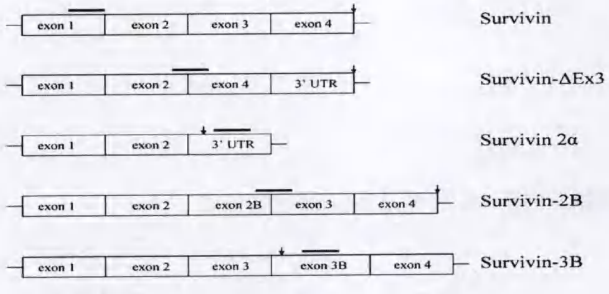
ZUO Wen-ge, et al
(*Deptment of Gastroenterology, the First Affiliated People's Hospital, Guangzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the clinical significance of the expressions of survivin gene and its main transcript variants mRNA in colorectal carcinoma. *Methods*: The expression of total survivin, survivin-△Ex3, survivin-2B, survivin-3B, survivin 2α, and CEA CAM 5 mRNA in 39 cases colorectal cancer, adjacent tissues (2.5 cm from the cancer margin) and normal colorectal tissue (10 cm from the cancer margin) were detected by RT-PCR technique and semi-quantitative methods use gel imaging analytical system or SYBR Green Ⅰ real-time fluorescent PCR. *Results*: The positive rates of total survivin, survivin-△Ex3, survivin-2B, survivin-3B, survivin2α, and CEA CAM5 mRNA in colorectal carcinoma and adjacent tissue were 100.0%, 92.3%, 92.3%, 79.5%, 87.2%, 97.4%, and 38.5%, 25.6%, 28.2%, 7.7%, 12.8%, 12.8%, showing significant difference in two tissues ($P<0.01$); The positive rates were 17.9%, 5.1%, 7.7%, 0.0%, 2.6% and 10.3% in normal colorectal tissues, respectively, showing significant difference in total survivin, survivin-△Ex3 and survivin-2B from adjacent tissues ($P<0.05$). Total survivin, four transcript variants and CEA CAM5 mRNA levels were higher in colorectal carcinoma than in adjacent tissue ($P<0.01$); but no significant difference was found between adjacent carcinoma and normal colorectal tissues ($P>0.05$). Several transcript variants mRNA levels were associated with some clinicopathologic parameters ($P<0.05$). *Conclusion*: The survivin and its transcript variants mRNA were highly expressed in colorectal carcinomas, several transcript variants mRNA levels were associated with clinicopathologic parameters. Detection of Survivin transcript variants mRNA expression may be more valuable than the CEA mRNA in early prediction of colorectal carcinoma.

【Key words】Survivin transcript variant; Carcinoembryomic antigen (CAM5); Colorectal carcinoma; Expression; Apoptosis

作者介绍:左文革(1967-),男,副主任医师,硕士,
研究方向:消化系统疾病诊断与治疗。
通讯作者:李瑜元,男,教授,E-mail:liyyliyy@tom.com。

人类 survivin 基因位于染色体 17q25，有 4 个显性外显子和数个隐性外显子，因前体 mRNA 剪接方式差异产生不同的变构体，包括 survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B 和 survivin 2αmRNA 等（图1）。研究显示，Survivin 在几乎所有恶性肿瘤组织内均有表达，而在成人正常终末分化组织（除胸腺、生殖腺及胎盘）罕见表达或仅微量表达，具有抑制细胞凋亡、调节细胞分裂、增强微血管生成和促进肿瘤细胞耐药性产生等作用[1]。本研究通过检测大肠癌组织 Survivin 基因和其主要剪接变构体，以及癌胚抗原（Carcinoembryomic antigen，CEA）CAM5 mRNA 的表达，并与癌旁组织和正常组织比较，探讨其对大肠癌诊断的意义。



横线下方为引物的位置，箭头指向为终止密码子

图 1 Survivin 和其剪接变构体 mRNA

1 材料与方法

1.1 材料

我院 2007 年 11 月 ~2008 年 4 月间因大肠癌接受外科手术切除的 39 例患者标本，其中男 21 例，女 18 例，年龄 36 ~ 82 岁（中位 65 岁）；组织学分型：腺癌 29 例，粘液腺癌 9 例，印戒细胞癌 1 例。采集肿瘤组织、癌旁组织（距离癌肿 2.5 cm）和距离肿瘤 10 cm 以上部位的正常大肠组织各 1 块，置于液氮预冷的冻存管，并尽快放入 -80℃冰箱中备用。病理学证实所得肿瘤组织均为癌变组织，癌旁组织和正常组织均未见癌变发生。所有病例术前未行抗肿瘤治疗，入选患者均知情同意。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

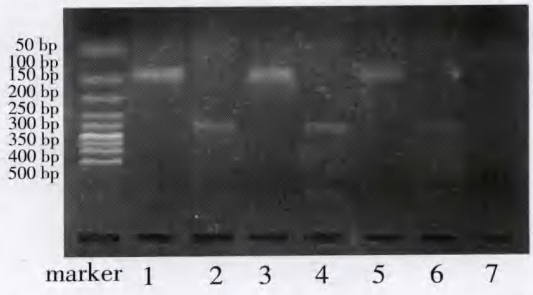
按照 Trizol 试剂说明书提取组织 RNA，以比色法测定 RNA 浓度 A_{260}/A_{280} 比值，均在 1.8~2.0 间，以甲醛变性凝胶电泳验证 RNA 完整性，置 -80℃保存。取 2μg 总 RNA，按照 M-MLV 逆转录酶说明书合成 cDNA，-20℃保存。

1.3 PCR 扩增和 mRNA 表达水平测定

参照人类 GenBank mRNA 序列和文献[2-4]运用 primer 5 软件设计引物（表 1），GAPDH 为阳性参照和标准品，在 Bio-Rad 梯度 PCR 仪上完成后，经凝胶图像分析系统，以目的产物 DNA 与 GAPDH 吸光度的比值作为总 survivin 和 survivin-△Ex3 mRNA 的半定量值。PCR 产物试剂盒纯化 GAPDH 产物作为标准品，将纯化的 DNA 模板用紫外分光光度仪定量，初浓度为 2 ng，20 × 梯度稀释，得到 6 个不同浓度的标准模板，在 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 仪上对 survivin-2B、survivin-3B、survivin 2α 和 CEA CAM5 cDNA 与标准模板同时进行扩增。将模板不同已知浓度的对数和相应达到荧光阈值的循环数（Ct 值）作图，得内参基因 GAPDH mRNA 表达实时 PCR 检测的标准曲线，由荧光定量 PCR 仪支持软件收集数据，以目的基因拷贝值 /GAPDH 拷贝值作为目的基因的半定量值。

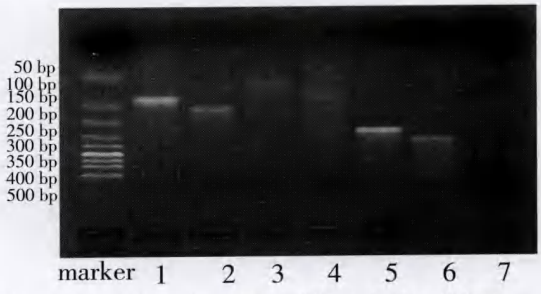
1.4 PCR 产物的确定

将 PCR 仪所扩增的 DNA 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳（图 2、3）及融解曲线分析。经琼脂糖凝胶电泳后所得为单一产物的目的条带，融解曲线分析显示，各标本 GAPDH 和目的基因 PCR 产物的融解曲线峰形状锐利，融解温度均一，说明实验中未出现污染、引物二聚体和假阳性。



1、3、5. 分别为 total survivin 在大肠癌、癌旁和正常组织的表达；2、4、6. 分别为 GAPDH 对照；7. 空白对照

图 2 总 Survivin mRNA 在大肠癌、癌旁和正常组织的表达



1. survivin-△Ex3；2. survivin-2B；3. survivin-3B；4. survivin 2α；5. CEA CAM5；6. GAPDH；7. 空白对照

图 3 Survivin 剪接变构体以及 CEA CAM5 mRNA 在大肠癌组织的表达

1.5 统计方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析，计数资料采用卡方检验，T<1 时，用四格表资料的 Fisher 确切概率法。计量资料采用（$\bar{x} \pm s$）与中位数（M）表示，两组间比较采用 t 检验和 Wilcoxon 秩和检验，多组间比较采用秩变换后方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列与扩增

基因	引物序列	产物长度(bp)与位置	退火温度(℃)	产物融解温度(℃)	循环次数
survivin	F: 5'-CTTTCTCAAGGACCACCGCA-3' R: 5'-GCCTCGGCCATCCGCT-3'	87(157~243)	53	-	31
survivin-△Ex3	F: 5'-GATGACGACCCCATGCAAA-3' R: 5'-AGG CCTCAATCCATGGCAG-3'	109(329~437)	55	-	33
survivin-2B	F: 5'-GCACGGTGGCTTACGCCTG-3' R:5'-AACCGGACGAATGCTTTTTATGTTCC-3'	90(351~440)	57	84.8	40
survivin-3B	F: 5'-CAGATTCAGGGA GGGACTGG-3' R: 5'-CAAACATCAGGCTCTTCCTCG-3'	60(377~436)	51	78.2	40
survivin 2α	F: 5'-GCTTTGTTTTGAACTGAGTTGTCAA-3' R: 5'-GCAATGAGGGTGGAAAGCA-3'	81(293~373)	51	78.4	40
CEA CAM5	F: 5'-AACTTCTCCTGGTCTCTCAGCT-3' R: 5'-GCAAATGCTTTAAGGAAGAAG-3'	145 (2155~2279)	53	83.7	40
GAPDH	F: 5'-TGGTCTCCTCTGACTTCAAC-3' R: 5'-GTGAGGGTCTCTCTCTTCCT-3'	222	*	84.0	**

注:* GAPDH 退火温度同目的基因; ** GAPDH 循环次数同目的基因; - 无数据

表 2 39 例大肠癌、癌旁和正常组织 Survivin 剪接变构体 mRNA 表达比较 $n(\%)$;$(\bar{x}\pm s)$

项目	totalsurvivin	survivin-△Ex3	survivin-2B	survivin-3B	survivin2α	CEACAM5
癌组织	39(100.0)	36(92.3)	36(92.3)	31(79.5)	34(87.2)	38(97.4)
	2.36±1.41	0.76±0.35	0.49±0.27	0.08±0.03	0.07±0.03	23.72±10.38
癌旁组织	15(38.5)	10(25.6)	11(28.2)	3(7.7)	5(12.8)	5(12.8)
	0.88±0.54	0.32±0.17	0.09±0.05	0.02±0.01	0.01±0.01	1.05±0.67
正常组织	7(17.9)	2(5.1)	3(7.7)	0(0.0)	1(2.6)	4(10.3)
	0.57±0.11	-	0.05±0.02	-	-	0.77±0.45
χ^2_1(P值)	-(<0.01)	33.1(<0.01)	30.8(<0.01)	38.0(<0.01)	43.2(<0.01)	53.1(<0.01)
t_1(P值)	3.9(<0.01)	3.8(<0.01)	4.9(<0.01)	3.4(<0.01)	2.8(<0.01)	4.8(<0.01)
χ^2_2(P值)	4.1(<0.05)	4.8(<0.05)	4.3(<0.05)	-	1.6(>0.05)	0.1(>0.05)
t_2(P值)	1.5(>0.05)	-	1.3(>0.05)	-	-	0.7(>0.05)

χ^2_1,t_1 大肠癌与癌旁组织比较;χ^2_2,t_2 癌旁组织与正常组织比较;- 无数据

2 结 果

2.1 标准曲线

内参基因 GAPDH 定量标准曲线的回归系数 r^2 均大于 0.995,表明 Ct 值和起始模板浓度对数呈现高度的线性关系,可用于对样本中目的基因的表达量进行定量分析。

2.2 大肠癌、癌旁和正常组织相应 mRNA 的表达(见表 2)

总 survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B、survivin 2α 和 CEA CAM5 mRNA 在 39 例大肠癌组织中均有较高的阳性表达,均显著高于癌旁组织(P<0.01);总 survivin、survivin-△Ex3 和 survivin-2B mRNA 在癌旁组织的阳性表达率均显著高于正常组织(P<0.05)。在大肠癌与癌旁组织阳性表达标本中,survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B、survivin 2α 和 CEA CAM5 mRNA 的半定量值,癌组织高于癌旁组织(P<0.01);而癌旁组织与正常组织半定量值的差异均未发现有统计学意义。

2.3 大肠癌组织中相应 mRNA 表达水平与临床资料的关系(见表 3)

总 survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B、survivin 2α 和 CEA CAM5 mRNA 的表达

表 3 39 例大肠癌组织 Survivin 剪接变构体 mRNA 表达水平与临床资料的关系

分组		n	total survivin		survivin-△Ex3		survivin-2B		survivin-3B		Survivin2α		CEACAM5	
			M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
性别	男	21	2.47	0.571	0.77	0.683	0.51	0.752	0.08	0.934	0.08	0.547	25.12	0.428
	女	18	2.23		0.74		0.47		0.08		0.07		21.87	
年龄	<65	19	2.08	0.322	0.73	0.149	0.48	0.891	0.09	0.236	0.07	0.175	20.93	0.269
	≥65	20	2.53		0.79		0.50		0.07		0.08		26.36	
部位	结肠	24	2.54	0.197	0.79	0.116	0.51	0.463	0.08	0.325	0.07	0.479	25.12	0.125
	直肠	15	1.93		0.71		0.45		0.07		0.06		20.38	
分化程度	中分化	29	2.15	0.078	0.73	0.069	0.44	0.218	0.07	0.14	0.06	0.136	21.53	0.037*
	低分化	10	2.67		0.86		0.57		0.10		0.09		30.34	
浸润深度	T_1+T_2	8	1.91	0.294	0.61	0.043*	0.40	0.136	0.05	0.068	0.05	0.153	18.75	0.081
	T_3+T_4	31	2.47		0.82		0.52		0.08		0.07		25.64	
淋巴结转移	N_0	20	1.96	0.136	0.65	0.032*	0.43	0.267	0.06	0.028*	0.06	0.063	20.17	0.041*
	N_1+N_2	19	2.53		0.87		0.54		0.09		0.08		7.59	
Dukes 分期	Ⅰ期	6	1.74	0.068	0.47	0.047*	0.41	0.316	0.04	0.021*	0.05	0.094	15.87	0.032*
	Ⅱ期	13	2.06		0.65		0.44		0.06		0.06		21.26	
	Ⅲ期	16	2.73		0.86		0.51		0.08		0.08		25.15	
	Ⅳ期	4	2.85		1.02		0.52		0.11		0.07		27.54	

注：* $P<0.05$

水平与性别、年龄、肿瘤发生部位均无关（$P>0.05$）；CEA CAM5 mRNA 与肿瘤分化程度有关（$P<0.05$），survivin-△Ex3 mRNA 与肿瘤浸润深度有关（$P<0.05$），survivin-△Ex3、survivin-3B 和 CEA CAM5 mRNA 的表达水平均与淋巴结转移和 Dukes 分期有关（$P<0.05$）。

3 讨 论

Survivin 是凋亡抑制蛋白（Inihibitor of apoptosis protein，IAP）家族的新成员，被认为是很强的凋亡抑制因子，由于其在肿瘤组织中重新表达，并在肿瘤的发生和演变过程中发挥作用。目前，作为一个潜在的肿瘤标记物和治疗靶点日益受到重视。初步的研究显示[3,5-8]，在各种剪接变构体中 Survivin mRNA 的表达占绝对优势，不同的剪接变构体在不同的亚细胞定位分别编码不同的蛋白质，发挥特有的作用。survivin-△Ex3 仍具有很强的抗凋亡特性，survivin-2B 被视为凋亡前体蛋白，其短暂表达可抑制肿瘤细胞生长并诱导凋亡，survivin 2α 可能充当天然对抗 survivin 抑制凋亡作用的角色，survivin-3B 可能有抗凋亡、细胞保护和调节 survivin 表达的作用。Survivin 同时通过促进同胞染色单体分离等途径调控细胞的有丝分裂，通过增加血管内皮细胞生长因子等途径促进微血管的生成[1,5]。

目前，临床上 CEA 检测经常用于大肠癌患者疗效观察、预后判断以及复发和转移的监测。大约 95% 的大肠癌组织表达 CEA，Guadagni[9]应用 RT-PCR 检测结直肠癌病人外周血 CEA mRNA 的表达，在所有不同分期的病人中 CEA mRNA 阳性占 69%，而血清 CEA 阳性率为 35%。本研究用 RT-PCR 方法对 39 例大肠癌组织、癌旁 2.5 cm 组织和距离肿瘤 10 cm 以上的正常肠壁组织分别检测总 survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B、survivin 2α 和 CEA CAM5 mRNA 的表达。发现总 survivin mRNA 在 3 种组织中的阳性表达率分别为 100%、38.5%和 17.5%，差异均有统计学意义，癌组织的 PCR 产物量显著高于癌旁组织。CEA CAM5 mRNA 在 3 种组织中的阳性率分别为 97.4%、12.8%和 10.3%，癌与癌旁组织表达率和表达水平的差异均有统计学意义，癌旁与正常组织间表达率和表达水平的差异无统计学意义。survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B 和 survivin 2α 在大肠癌组织中也有较高的阳性表达，与癌旁组织的差异均有统计学意义，在正常大肠组织这些剪接变构体较少表达。本研究还发现，在未检测到总 survivin 的组织中，亦未检测出它的剪接变构体。

本组 39 例大肠癌旁 2.5 cm 处和距离肿瘤 10 cm 以上组织标本,均经组织病理学证实未见癌细胞浸润。然而,二者间总 survivin、survivin-△Ex3 和 survivin-2B mRNA 的表达率差异有统计学意义,推测在癌旁 2.5 cm 处有部分组织出现了分子水平的异常改变,但检测 CEA CAM5 mRNA 尚不能反映出这种改变。这一结果提示:总 survivin mRNA 表达可能还代表细胞生物学转化的中间环节,在大肠癌前预报与早期诊断中可能比 CEA mRNA 更有价值。

Gianani[10]用免疫组化方法首先检出 survivin 蛋白在正常的结肠黏膜、增生性息肉和不同分化程度的结肠腺癌均有表达,在正常的结肠黏膜表达仅局限在基底隐窝的上皮细胞,显现均匀强度的弱染色。但在腺瘤和腺癌 survivin 蛋白显现高强度广泛的胞浆染色,不同细胞、腺体和区域之间染色不均匀,大批 survivin 强阳性染色细胞出现在网眼的表面,该研究未发现邻近腺癌形态学上正常的黏膜与结肠正常黏膜的染色式样有差异性。我们检测 survivin、survivin-△Ex3、survivin-2B、survivin-3B 和 survivin 2α mRNA 的半定量表达水平,发现在大肠癌组织中上述基因 mRNA 的表达水平与性别、年龄、肿瘤发生部位均无关,CEA CAM5 mRNA 与肿瘤分化程度有关,survivin-△Ex3 mRNA 与肿瘤浸润深度有关,survivin-△Ex3、survivin-3B 和 CEA CAM5 mRNA 的表达水平均与淋巴结转移和 Dukes 分期有关。在距离肿瘤 10 cm 以上的正常大肠组织中,我们仅检测到 17.9%的组织有总 survivin 表达,可能由于正常的结肠黏膜基底隐窝上皮细胞表达 survivin mRNA 量极低或只是阶段性表达。其它剪接变构体 mRNA 在正常大肠组织中表达更少,故检测 survivin 剪接变构体 mRNA 可能对提高大肠癌诊断的准确性有益。

存在抗凋亡基因表达的细胞可获得更多的生存和分裂增殖的机会,导致其恶性增殖,增强其侵袭能力并促使肿瘤转移。研究发现用 RT-PCR 检测其表达水平的差异对预测乳腺癌患者术后复发[3]、软组织肉瘤[11]和急性髓细胞样白血病[12]患者生存期有一定意义,我们也将追踪评估本研究组患者的预后。目前,研究初步认为 survivin 亚型间具有不同的功能[13],它们在肿瘤演进过程中的相互关系与确切的生物学功能尚不清楚,这一热点研究若能取得突破,将有助于对以 Survivin 和其亚型为靶点治疗和预防肿瘤以及其他疾病。

参 考 文 献

[1] Duffy M J, O'Donovan N, Brennan D J, et al. Survivin: a promising tumor biomarker[J]. Cancer Lett, 2007, 249(1):49-60.

[2] Schultz I J, Kiemeney L A, Witjes J A, et al. Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence[J]. Anticancer Res, 2003, 23 (4):3327-3331.

[3] Span P N, Tjan-Heijnen V C, Heuvel J J, et al. Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer [J]? Clin Chem, 2006, 52(9):1693-1670.

[4] Zhang Y S, Xu J, Luo G H, et al. Detection of carcinoembryonic antigen mRNA in peritoneal washes from gastric cancer patients and its clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(9):1408-1411.

[5] Li F, Ling X. Survivin study: an update of "what is the next wave"[J]? J Cell Physiol, 2006, 208(3):476-486.

[6] Noton E A, Colnaghi R, Tate S, et al. Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis[J]. J Biol Chem, 2006, 281(2): 1286 -1295.

[7] Caldas H, Honsey L E, Altura R A. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies[J]. Mol Cancer, 2005, 4(1): 11.

[8] Knauer S K, Bier C, Schlag P, et al. The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein[J]. Cell Cycle, 2007, 6(12):1502-1509.

[9] Guadagni F, Kantor J, Aloe S, et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA[J]. Cancer Res, 2001, 61(6):2523-2532.

[10] Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa[J]. Hum Pathol, 2001, 32 (1):119-125.

[11] Taubert H, Kappler M, Bache M, et al. Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients[J]. Oncogene, 2005, 24(33): 5258- 5261.

[12] Wagner M, Schmelz K, Wuchter C, et al. In vivo expression of survivin and its splice variant survivin-2B: impact on clinical outcome in acute myeloid leukemia[J]. Int J Cancer, 2006, 119(6): 1291-1297.

[13] 郑清友,靳风烁,李增鹏,等.凋亡抑制因子 survivin 在膀胱移行细胞癌中的表达意义[J].第三军医大学学报,2005,27(10):1030-1032.

(责任编辑:冉明会)