基础研究 文章编号：0253-3626(2009)01-0049-03

烟草悬凝物诱导永生化人支气管上皮细胞恶性转化过程中 survivin 基因及蛋白表达的研究

谢俊豪[1]，吴庆琛[1]，张 诚[1]，李 强[1]，朱茂祥[2]，杨陟华[2]，潘秀颉[2]
（1. 重庆医科大学附属第一医院胸心外科，重庆 400016；2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所，北京 100850）

【摘 要】目的：探讨人支气管上皮细胞（BEP-2D）恶性转化过程中 survivin 基因及蛋白表达的变化。方法：选取正常 BEP-2D 细胞及经烟草悬凝物处理后的第 15 代（P-15）、25 代（P-25）、38 代（P-38）BEP-2D 细胞共 4 组细胞株作为研究对象，采用半定量反转录 PCR（Retro-translation PCR，RT-PCR）检测各组细胞株中 survivin 基因变化，免疫组织化检测各组中 survivin 蛋白的表达。结果：1. survivin mRNA 在正常细胞 BEP-2D 中的表达强度为 0.08，在转化的肺癌细胞 P-15、P-25 和 P-38 中分别为 0.56、0.80 和 0.81。2. survivin 蛋白在正常 BEP-2D 细胞株中表达阴性，在转化的 3 组细胞中表达阳性，且 survivin 蛋白在正常细胞与转化细胞株中的表达存在明显差异，其中在 P-15 具有明显差异（$P<0.05$）。结论：survivin 基因及蛋白的表达水平可作为早期肺癌的一个检测指标。

【关键词】烟草悬凝物；永生化人支气管上皮细胞；survivin 基因及蛋白；免疫组化；半定量反转录 PCR
【中国图书分类法分类号】R733 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-17

Study on survivin mRNA and protein of BEP-2D cells during its malignant transformation by cigarette smoke condensate

XIE Jun-hao, et al
(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the change of the survivin mRNA and protein of BEP-2D cells during its malignant transformation. *Methods*: Normal BEP-2D cell and BEP-2D cells treated by cigarette smoke condensate(CSC) for 15 weeks(P-15), 25 weeks(P-25) and 38 weeks (P-38) were respectively chosen to study the survivin gene and protein by RT-PCR(retro-translation PCR, RT-PCR)and immunohistochemical method. *Results*:The survivin mRNA was found in BEP-2D cells of P-15, P-25 and P-38, respectively with 0.56, 0.80, and 0.81, but not in the normal BEP-2D cell. The survivin protein was found in the normal BEP-2D cell, but not in BEP-2D cells of P-15, P-25 and P-38. The levels of survivin protein expressian were different between BEP-2D cells of P-15, P-25 and P-38 and normal BEP-2D cell, with significant difference between P-15 BEP-2D cell and normal BEP-2D cell($P<0.05$). *Conclusion*: The survivin mRNA and protein may be consider of a kind of biology-marker for the early diagnosis of lung cancer because the survivin mRNA and protein occur in the earlier period of lung cancer.

【Key words】 Cigarette smoke condensate(CSC); Immortalized human bronchial epithelial cells(BEP-2D); survivin mRNA and protein; Immunohistochemical; Retro-translation PCR(RT-PCR)

细胞凋亡是机体维持正常组织、器官细胞数量稳定的重要机制，凋亡不足与肿瘤的发生发展密切相关。凋亡抑制蛋白（Inhibitor of apoptosis protein，IAP）是抑制细胞凋亡的一组蛋白，而 survivin 是 IAP 家族中作用最强的一种[1]，其抑制凋亡的作用远大于 bcl-2 家族的作用。研究表明 survivin 表达于大多数常见的肿瘤组织，但其在肺癌发生发展中的早期诊断作用的相关报道较少，为了寻找较形态学更为敏感的肺癌早期诊断的分子生物学指标，我们用 RT-PCR 和免疫组化检测永生化人支气管上皮细胞的正常细胞株和恶性转化的细胞株中 survivin 蛋白及 mRNA 的表达，探讨其在 NSCLC 的早期诊断中的意义。

作者介绍：谢俊豪（1979- ），男，硕士，
研究方向：肺癌病因学与分子生物学。
通讯作者：吴庆琛，男，副教授，E-mail：wuqc6@Hotmail.com。
基金项目：重庆市科委课题（CSTC，2008BB5215）。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器与细胞

人乳头状瘤病毒 HPV-18 诱导的永生化人支气管上皮细胞系（BEP-2D），由军事医学科学院放射与辐射医学研究所朱茂祥教授馈赠。LHC-8 无血清培养为 Invotrigion 公司产品，小牛血清为杭州四季青公司产品，胰蛋白酶及 EDTA-Na_2 为 Gibco 公司产品，100 bp 梯度 DNA 分子量标准参照物为

TIANGEN 公司。survivin 蛋白一抗（为兔抗人多克隆抗体浓缩液，按 1∶100 稀释，武汉博士德公司），survivin 蛋白荧光二抗（为 FITC 标记的山羊抗兔 IgG，按 1∶100 稀释，北京鼎国公司）survivin 上游引物 5'-GGCATFFFTFCCCCGACGTT-3'，下游引物 5'-AGAGGCCTCAATCCATGGCA-3'，扩增产物大小为 439 bp。内参照 β-actin 引物由北京赛百盛公司设计合成，序列为：上游 5'-GGCGGCACCACCTGTACCCT-3'，下游 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'，扩增产物大小为 202 bp，低熔点琼脂糖粉为 Simga 公司产品，PCR 反应试剂盒购买于 taqkala。重庆市某品牌香烟。电泳仪为 Bio-Rad，美国，图像分析仪为北航 CM2000B 型生物医学图像分析系统，紫外透射反射仪为上海 WFH-210B，PCR 仪为 Themohybaid，高速低温离心机为 SIGMA1-15k，微量加样器：（10 μl、200 μl、1 000 μl）。实验细胞为正常 BEP-2D 细胞、烟草悬凝物处理后 P-15、P-25、P-38 细胞。

1.2 survivin 蛋白的表达

采用免疫荧光细胞化学染色技术：LHC-8 无血清培养基在 37℃、5%CO_2、饱和湿度的培养箱中培养，待细胞长满后传代至 60 mm 细胞培养皿中，并放入无菌盖玻片。待盖玻片上细胞生长融合至 80%时，终止培养。常规冰丙酮固定后，PBS 冲洗，滴加一抗，37℃孵育 40 min，PBS 冲洗，滴加荧光二抗，37℃孵育 40 min，PBS 冲洗，待其自然干燥后用缓冲甘油封片，荧光显微镜观察并摄片。

1.3 RNA 提取及 PCR 反应

1.3.1 RNA 提取 取 BEP-2D、P-15、P-25、P-38 组细胞各 3×10^6 个，离心，吸净培养液，加 Trizol 细胞裂解液 1 500 μl，充分吹打，室温静置 5 min。加入氯仿 200 μl，用力颠倒混匀 2 min，室温静置 10 min 后，12 000 r/min 4℃低温离心 15 min。将上层水相转移至新离心管，加入异丙醇等体积 200 μl，上下颠倒混匀，静置 5 min，4℃，12 000 r/min 低温离心 5 min；弃上清，加入 70%乙醇 1 ml，摇动以清洗 RNA 沉淀，混匀片刻，沉淀浮起，低温离心，4℃，10 000 r/min 瞬时离心；吸弃上清，静置 5 min，使 RNA 沉淀恰好干燥，加入 50 μl 灭菌 DEPC 水，-20℃保存。

1.3.2 逆转录反应 反应体系为 10×RT Buffer 2 μl、Rnase free H_2O 2.5 μl、dNTP 2 μl、Rnase inhibitor 0.5 μl、AMV 逆转录酶 1 μl、Random Primer 2 μl、RNA 2 μl，总体积 10 μl。反应参数 30℃，10 min，1 循环；42℃，30 min，1 循环；99℃，5 min，1 循环；5℃，5 min，1 循环。

1.3.3 PCR 反应参数 94℃预变性，5 min，1 循环；94℃变性 40 s，54℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，共 30 个循环；72℃下充分延伸 5 min 后终止反应。以目的条带和内参条带的浓度比值（灰比度）反应表达强度。反应总体积为 50 μl，体系为：

10×RT Buffer 2.5 μl，$Mgcl_2$ 2.5 μl，dNTP 2.5 μl，P_1 1.25 μl，P_2 1.25 μl，TAP 酶 0.25 μl，cDNA 模板 10 μl，ddH_2O 29.75 μl。

1.3.4 凝胶电泳分析 取 5 μl PCR 扩增产物，用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳，glodview 染色，80～100 V，45 min。用凝胶成像分析系统对电泳条带进行密度扫描分析，survivin mRNA 表达的相对强度为 survivin/β-actin 条带灰度值。

1.4 统计学分析

采用国际通用 SPSS11.1 统计软件分析，以配对样本 t 检验计算 survivin 蛋白在各组细胞中表达差异，检验标准 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 为差异性明显，$P<0.01$ 为差异性显著。

2 结 果

2.1 survivin 蛋白表达情况

survivin 蛋白颗粒主要位于细胞浆，少量位于细胞核（见图 1～4），survivin 蛋白表达强度（光密度值）：正常 DEP-2D 细胞株为 0.29，P-15 为 2.71，P-25 为 6.07，P-38 为 4.93。正常组细胞与各转化组细胞 survivin 蛋白表达有明显差异（$P<0.05$），其中正常组与 P-15 组细胞 survivin 蛋白表达比较 $P<0.05$，差异有统计学意义。

2.2 survivin mRNA 表达

PCR 产物在凝胶成像分析系统中，可见 439 bp 处的目的条带和 202 bp 处的内参条带；survivin mRNA 在 BEP-2D 中的表达强度为 0.08，在转化的肺癌细胞 P-15、P-25、P-38 中分别为 0.56、0.80 和 0.81。survivin mRNA 在正常细胞中的表达明显低于转化细胞（见表 1）。

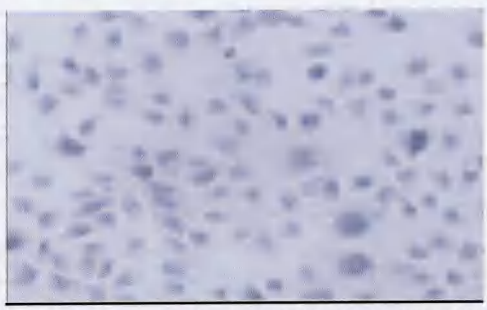


图 1 正常细胞中 suvivin 蛋白表达弱阳性（苏木素复染×200）

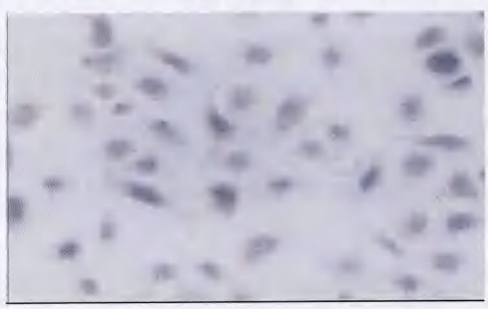


图 2 P-15 细胞中 suvivin 蛋白表达弱阳性（苏木素复染×200）

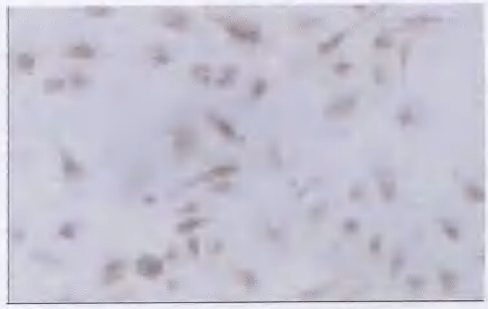


图 3 P-25 细胞中 suvivin 蛋白表达弱阳性（苏木素复染×200）



图 4 P-38 细胞中 suvivin 蛋白表达弱阳性(苏木素复染×200)



图 5 各组细胞中 survivin mRNA 表达

表 1 Survivin 灰比度值

BEP-2D 细胞	survivin 灰比度值	β-actin 灰比度值	比值(survivin/β-actin)
正常	886.151 07	10 634.691 11	0.083 32
P-15	6 004.530 63	10 553.171 10	0.568 98
P-25	8 278.790 86	10 625.831 11	0.801 72
P-38	8 518.940 89	10 579.591 10	0.805 22

3 讨 论

肺癌已经成为十大癌症死亡原因之一，其 5 年生存率低于 15%，是我国常见的肿瘤，且近年来其发病率有逐步上升的趋势，其中大部分患者在确诊时已丧失最佳手术机会，50%的肺癌临床诊断已属晚期[2]。所以寻求肺癌的早期诊断指标和方法是提高 5 年生存率的关键。现代分子生物学研究证明，肺癌的发生发展是多基因、多阶段、多步骤的复杂演进过程，其中细胞凋亡(Apoptosis)是维持正常组织和器官细胞数量稳定的重要保护机制。细胞凋亡不足为发生基因改变的异常细胞提供生存之机，最终导致肿瘤的发生、发展和演进。survivin 是最近发现的凋亡抑制蛋白家族成员，正常成人组织中的表达仅见于胸腺、睾丸和分泌期子宫内膜，而几乎所有的恶性肿瘤，如肺癌、食管癌、乳腺癌、膀胱癌、黑色素瘤、白血病都能检测到 survivin mRNA 和蛋白的表达。该基因位于染色体 17 q25，长度范围在 75 ~ 130 kb，含 3 个内含子和 4 个外显子，其编码产生一个由 142 个氨基酸组成的胞浆蛋白，含有 1 个 N 末端的杆状病毒凋亡抑制蛋白重复区序列，通过作用于凋亡路径中的终末效应子 Caspase3 和 Caspase7发挥其抗凋亡功能[3]，也可通过 p21 间接抑制 Caspase 从而阻断细胞的凋亡，其抑制凋亡的作用远大于 bcl-2 家族[4]。

survivin 在肿瘤的早期诊断中的作用国内外已有学者报道，SHARP 等[5]大标本病例中尿液细胞 survivin 检测诊断膀胱癌的敏感性为 100%，特异性 95%，提示检测细胞中 survivin 基因的表达可用作膀胱癌诊断的首选。郑超球等[6]应用免疫组化 SABC 法检测12 例正常大肠黏膜、6 例增生性息肉、22 例腺瘤和 32 例腺癌的石蜡标本中 survivin 表达情况，发现 survivin的过度表达是大肠上皮癌变过程的早期事件之一。Akyurek 等[7]应用免疫组化技术检测 survivin 在早期非小细胞肺癌组织中的表达情况，也发现其在肺癌发生的早期阶段即有表达。本研究发现：(1)survivin 蛋白颗粒主要位于细胞浆，少量位于细胞核；(2)正常细胞 survivin 表达阴性，而染毒至 15 代后即可检测到 survivin 的阳性表达，两者 survivin 蛋白表达水平具有明显差异(P=0.011)；3.survivin mRNA 在正常细胞 BEP-2D 中低表达(强度为 0.08)，在转化的肺癌细胞 P-15、P-25 和 P-38 中高表达(强度分别为 0.56、0.80 和 0.81)。以上结果表明 survivin 在 BEP-2D 细胞转化过程早期就有表达，提示其可通过抑制细胞凋亡在烟草悬凝物诱导 BEP-2D 转化为肺癌细胞过程中发挥重要作用。

综上所述，survivin 可能在烟草悬凝物诱导人支气管上皮细胞恶性转化过程中起重要作用。survivin 在非小细胞肺癌早期过度表达，可作为此阶段的分子标记物，检测 survivin 蛋白及基因的表达变化可作为非小细胞肺癌早期诊断的辅助指标之一。

参 考 文 献

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

[2] 王 俊.肺癌早期基因诊断的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2004, 9(4): 431.

[3] Hauser H P, Bardoff M, Pyrowolakis G, et al. A giant ubiquitin-conjuga-ting enzyme related to IAP apoptosis inhibitors[J]. J Cell Biol, 1998, 141(6): 1415.

[4] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death[J]. Oncogene, 2000, 19(10): 1346-1353.

[5] Sharp J D, Hausladen D A, Maher M G, et al. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis[J]. Front Biosci, 2002, 7: 36-41.

[6] 郑超球, 张阳德, 彭 健.大肠腺瘤 - 癌序列中抗凋亡基因 Survivin 的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(4): 12-14.

[7] Akyurek N, Memis L, Ekinci O, et al. Survivin expression in pre-invasive lesions and non-small cell lung carcinoma[J]. Virchows Arch, 2006, 449(2): 164-170.

(责任编辑：关蕴良)