DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.003
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1423-03

论著

Survivin在人乳腺癌裸鼠移植瘤中的表达及As_2O_3处理后表达变化

马银斌,吴诚义,陈 鑫 (重庆医科大学第一附属医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨Survivin在人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤中的表达及As_2O_3的抑制作用。方法 复制人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤模型,抽签法随机分为阴性对照(生理盐水)组、阳性对照(DDP 1.5 mg/kg)、实验1组(As_2O_3 1.5 mg/kg)、实验2组(As_2O_3 3.0 mg/kg),用原位杂交、免疫组化法分别检测瘤组织中survivin mRNA及survivin、caspase-3蛋白的表达。结果 阴性(生理盐水)对照组中,survivin mRNA、survivin蛋白均主要呈中度阳性表达,其阳性表达分别为82.42%、78.85%;实验组1、实验组2中度阳性表达随着As_2O_3剂量的增加而下降($P<0.01$),二组的survivin mRNA、survivin蛋白阳性表达分别为25.96%、6.90%和18.00%、5.85%,与阳性和阴性对照组的表达比较呈明显下降趋势。原位杂交、免疫组化法检测结果一致。而caspase-3蛋白的阳性表达与survivin相反。结论 Survivin在人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤中高表达,而As_2O_3有显著抑制其高表达的作用,且呈剂量依赖性。

关键词:三氧化二砷;乳腺癌;裸鼠;survivin
中图法分类号:R394.2;R730.2;R737.9 文献标识码:A

Inhibitory effect of arsenic trioxide on survivin expression in heterologous graft model of human breast infiltrating duct carcinoma in nude mice

MA Yin-bin, WU Cheng-yi, CHEN Xin (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on the survivin expression in heterologous graft model of human breast infiltrating duct carcinoma in nude mice. **Methods** Nude mice bearing the transplanted tumor were randomly divided into four groups: negative control (saline), positive control (cisplatin at the dose of 1.5 mg/kg), and two experimental groups (arsenic trioxide at the doses of 1.5 mg/kg and 3.0 mg/kg). The expression of survivin mRNA and protein expressions of surviving and Caspase-3 in neoplastic tissues were detected by *in situ* hybridization and immunohistochemical method, respectively. **Results** In negative control group, the expressions of survivin mRNA and survivin protein were in moderate degree with positive rates of 82.42% and 78.85%, respectively. The positive rates of moderate degree in experimental groups 1 and 2 were gradually decreased with the increasing dose of arsenic trioxide ($P<0.001$), which were 25.96%, 6.90%, 18.0%, and 5.85%, respectively, showing a descending tendency compared with those in the negative and positive control groups. The results by *in situ* hybridization were consistent with those by immunohistochemical method, but the expression of caspase-3 in the four groups was reversely correlated with that of survivin. **Conclusion** Arsenic trioxide can inhibit the high expression of survivin in heterologous graft cells of human breast infiltrating duct carcinoma in a dose-dependent manner in nude mice.

Key words: arsenic trioxide; breast neoplasm; nude mouse; survivin

Survivin是新近发现的凋亡抑制蛋白IAP(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员之一。其在大多数肿瘤中有表达,而在成人组织中一般不表达或低表达[1],这一特点为肿瘤的诊断和治疗提供了新的靶点。As_2O_3对人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤有抑瘤作用[2]。本研究旨在探讨survivin在人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤中的表达及As_2O_3对survivin的抑制作用。

基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(2001-2047)
Supported by the Bureau of Public Health of Chongqing (2001-2047)
作者简介:马银斌(1968-),男,四川省绵阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事内分泌外科基础与临床方面的研究,现在四川省绵阳市第一人民医院普通外科。电话:(023)68733645
通信作者:吴诚义,电话:(023)68897897
收稿日期:2003-08-14;修回日期:2003-10-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 实验动物

BALB/c-nu/nu 雌性裸鼠22只，鼠龄6~8周，体质量16.9~22.8 g/只，由四川大学实验动物中心提供(合格证号：川实动管质第72号)。

1.2 瘤株

人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤瘤株第36代，由四川大学实验动物中心提供。

1.3 药物及试剂

As_2O_3(1 g/L)、DDP(5 g/L)购于Sigma公司。survivin原位杂交检测试剂盒以及survivin、caspase-3免疫组化一抗浓缩液购于武汉博士德生物公司，survivin、caspase-3免疫组化二抗购于北京中山生物公司。

1.4 移植瘤模型复制及分组

按白绍槐等[3]描述的方法复制人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤模型，共22只，继续饲养于SPF环境，待移植瘤长至长经>0.5 cm后，用抽签法随机分为阴性对照组(生理盐水)、阳性对照组(DDP 1.5 mg/kg)、每组5只裸鼠；实验组1(As_2O_3 1.5 mg/kg)和实验组2(As_2O_3 3.0 mg/kg)，每组6只，每组均经尾静脉注射用药，0.1 ml·次$^{-1}$·d^{-1}，连续7 d。停药后第2天处死动物，取瘤组织作常规甲醛固定，石蜡包埋。

1.5 Survivin mRNA和survivin、caspase-3蛋白检测

用原位杂交法、免疫组化法分别检测瘤组织中survivin mRNA和survivin、caspase-3蛋白的表达，切片厚度分别为7 μm、5 μm。操作按试剂说明进行。免疫组化采用S-P法。

1.6 结果判定

Survivin mRNA和survivin、caspase-3蛋白：细胞胞浆染为棕黄至棕褐色为阳性细胞标志。在高倍镜下随机选取10个视野，计数1 000个细胞，取单个视野阳性细胞占总数的百分比作为阳性细胞密度。据survivin mRNA和survivin显色强度分为4级：表达阴性(-)，无阳性细胞染色；弱阳性(+)，显色强度为淡黄色；中度阳性(++)，显色强度为黄色至棕黄色；表达强阳性(+++)，显色强度为棕褐色。

1.7 统计学方法

采用SPSS10.0软件行单因素方差LSD法和S-N-K法分析。

2 结果

2.1 Survivin mRNA原位杂交和survivin免疫组化染色

Survivin mRNA和survivin蛋白表达分级情况见表1。

表1 人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤**Survivin mRNA**和**Survivin**蛋白表达细胞密度分极[($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 1 Density of expressions of Survivin mRNA and Survivin protein in heterogous graft model for human breast infiltrating duct carcinoma in nude mice [($\bar{x}\pm s$)%]

Group	Survivin mRNA						Survivin protein					
	−	+	++	+++	*F*	*P*	−	+	++	+++	*F*	*P*
Negative control	13.20±2.8	4.60±1.51	77.00±3.74	5.00±1.58	984.978	<0.01	20.20±3.19	0.80±0.83	75.40±3.64	4.00±1.41	913.435	<0.01
Positive control	20.20±20.94	12.40±1.81	67.40±4.82	2.20±1.09	446.892	<0.01	31.80±2.28	9.60±1.81	54.60±3.20	3.20±1.78	499.345	<0.01
Experimental group 1	60.33±2.65	13.83±2.31	24.83±2.48	1.16±0.98	773.266	<0.01	65.83±2.99	16.66±1.63	16.66±2.25	0.83±0.75	1069.974	<0.01
Experimental group 2	82.16±2.56	10.63±3.92	6.83±1.32	0.16±0.40	2759.197	<0.01	87.00±3.16	6.83±1.32	5.83±1.32	0.16±0.48	3012.015	<0.01
F	809.781	24.657	588.751	20.384			590.722	112.826	802.333	13.577		
P	0.000	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.000	0.000		

从阴性对照组可见，survivin mRNA、survivin蛋白均主要呈中度阳性表达，与弱阳性及强阳性表达比较，差异有显著性($P<0.01$)；阳性对照组中，上二指标仍主要呈中度阳性表达，与弱阳性及强阳性表达差异仍具有显著性($P<0.01$)，但阴性与弱阳性表达已有增加；实验组1、实验组2 survivin mRNA、survivin蛋白中度阳性表达率随着As_2O_3剂量的增加而下降，差异有显著性($P<0.01$)，而与阳性对照组和阴性对照组的表达比较呈明显下降趋势，虽与其同组强阳性表达比较差异仍显著($P<0.01$)，但其与弱阳性比较，随着As_2O_3剂量的增加，差异已不显著，而其阴性表达率增加显著。

2.2 Survivin及caspase-3染色比较

从表2可见caspase-3蛋白阳性表达随着As_2O_3剂量的增加而上升，差异有显著性($P<0.01$)，与阳性对照组和阴性对照组的表达比较呈明显上升趋势；survivin的表达情况相反。

表2 人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤各组**Survivin mRNA**和**Survivin**、**Caspase-3**蛋白表达细胞密度[($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 2 Density of expressions of Survivin mRNA and Survivin mRNA and Survivin and Caspase-3 protein in heterogous graft model of human breast infiltrating duct carcinoma in nude mice [($\bar{x}\pm s$)%]

Group	*n*	Survivin mRNA	Survivin protein	Caspase-3 protein
Negative control	5	82.42±3.89	78.85±4.60	35.21±6.08
Positive control	5	68.12±5.81**	58.61±7.22**	50.82±9.10**
Experimental group 1	6	25.96±3.31**##	18.00±5.82**##	57.88±7.77**##
Experimental group 2	6	6.90±3.38**##△△	5.85±7.14**##△△	71.68±8.40**##△△
F		7735.58	4737.168	15.337
P		0.000	0.000	0.000

**: $P<0.01$, *vs* negative control; ##: $P<0.01$, POS; △△: $P<0.01$, *vs* EXP1

3 讨论

1997年耶鲁大学的Altieri等利用效应细胞蛋白酶

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

受体-1(EPR-1)cDNA 在人类基因组文库中杂交筛选并克隆产生了 survivin 基因, 因其可延长细胞的生成, 故又名生存素。实验证实, survivin 在胚胎及胚胎发育中表达, 有利于促进组织自稳定及分化, 且不依赖 bcl-2[4]。而在大多数肿瘤中 survivin 过度表达, 通过抑制 caspase-3 和 caspase-7 而起到抑制凋亡的作用[5]; 目前认为, 大多数促凋亡信号所诱发的细胞凋亡都是通过效应性蛋白酶, 即 caspase 实现的。Caspase-3 是一个 Fas 基因介导细胞死亡的基本死亡因子, 为关键效应性蛋白酶。由于 survivin 抑制细胞凋亡的作用远远大于 bcl-2[6], 从而有利于细胞的异常增殖和恶性转化。Tanaka 等[7] 用免疫组化显示在Ⅰ、Ⅱ期乳腺癌中 survivin 的表达率为 70.7%(107/118), 而在临近正常乳腺组织中未见表达, 使用 RT-PCR 技术显示 survivin mRNA 的表达率与临床和组织类型相关, 在乳腺癌中表达率为 90.2%(31/41), 而在临近乳腺组织中的表达率为 23%(3/13)[8]。本实验中, 原位杂交以及免疫组化检测显示, 阴性对照组(生理盐水)survivin mRNA 和 survivin 蛋白主要呈中度阳性表达, 而总的阳性表达率分别为 82%和 79%, 可见 survivin 基因在肿瘤的发生和发展中起重要作用。本研究表明, 人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤经 As_2O_3 处理后, survivin 表达受显著抑制, 与 DDP 相比, As_2O_3 抑制 survivin 作用更强, 其差异有非常显著性($P<0.01$), 主要表现为中度阳性表达率下降, 而弱阳性和阴性表达率增加, 且有显著浓度依赖性。而受 survivin 抑制的 caspase-3 阳性表达与 survivin mRNA 和 survivin 蛋白呈显著负相关, 表明 As_2O_3 可通过抑制抗凋亡基因 survivin 的表达而达到促进凋亡基因 caspase-3 的作用, 从而抑制人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤的生长。

参考文献:

[1] 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.

[2] 陈　鑫, 吴诚义. 三氧化二砷对人乳腺癌裸鼠移植瘤的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(8): 722-723.

[3] 白绍槐, 赵扬冰, 张旋波, 等. 人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植模型的建立[J]. 华西医科大学学报, 1999, 30(2): 220-221.

[4] Adida C, Crotty P L, McGrath J, *et al*. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 43-49.

[5] Yang J, Liu F X, Yan X C. Research advances on inhibitor of apoptosis, survivin[J]. Ai Zheng, 2003, 22(7): 771-774.

[6] LaCasse E C, Baird S, Korneluk R G, *et al*. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer[J]. Oncogene, 1998, 17(25): 3247-3259.

[7] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, *et al*. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127-134.

[8] Nasu S, Yagihashi A, Izawa A, *et al*. Survivin mRNA expression in patients with breast cancer[J]. Anticancer Res, 2002, 22(3): 1839-1843.

(编辑　陈聪连)

(上接 1422 页)

经化学物质振荡相一致的信息, 这些信息能够充分反应脑内神经递质的变化, 脑电信号中的超慢频率中隐藏着与神经化学物质振荡相一致的信息, 这些信息能够充分反应脑内神经递质的变化[1]。目前国内有关于老年痴呆及癫痫 ET 变化的研究[3,4]。对于神经精神疾病, 尤其是一些目前人们尚认为是功能性疾病的脑内神经递质的临床研究目前尚少见报道。

目前对抑郁、焦虑的病理生理机制人们了解的甚少。神经生化的研究提示抑郁、焦虑障碍的发生与脑内单胺类神经递质的活性低下有关, 尤其是 5-HT 及 NE, 近年来, DA 的活性在抑郁、焦虑的发病中的作用也渐渐受到人们的重视[5,6]。

我们观察了 40 例抑郁、焦虑患者脑内神经递质的变化, 结果显示抑郁、焦虑患者有相同的递质变化(这是否能解释抑郁和焦虑有很高的共病率), 既表现为脑内 5-HT 及 NE 均低于期望值, 经 SSRIs 类药物治疗以后, 患者的临床表现缓解, 心理量表也提示症状的好转, 伴有脑内 5-HT 及 NE 升高。与抑郁障碍组不同的是, 焦虑组的患者尚有脑内 GABA 的降低, 经治疗以后 GABA 恢复到正常, 提示脑内 5-HT 及 NE 的活性变化(低下)参与了抑郁焦虑的病理生理过程, 在焦虑的发病中 GABA 可能也起重要的作用, 这与 Kent[7] 的观念是观念是一致的。目前的抗抑郁、焦虑的药物, 主要的靶点也是主要干预脑内以上 3 种神经递质的活性, 从而达到临床治疗。

抑郁、焦虑障碍的发病机制及识别是困惑医学界一大难题。深入的研究发病机制及客观的临床诊断方法, 将有助于提高人们的心理健康水平。

关键词: 焦虑障碍; 抑郁障碍; γ-氨基丁酸; 5-羟色胺; 去甲肾上腺素; 选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂

中图法分类号: R741.044　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 梅　磊. ET-脑功能检测新技术[M]. 北京: 国防工业出版社, 1995. 1-98.

[2] Arthurk Kleinman M D. 精神障碍: 全球性的发现, 本土化难题[J]. 中国神经精神科杂志, 2000, 26(1): 1-5.

[3] 王春梅, 韩连堂, 李秀艳. 老年痴呆患者的脑功能与脑涨落图分析[J]. 中国康复医学杂志, 2002, 17(4): 249-250.

[4] 李秀艳, 王玉良, 唐可欣, 等. 血 Ca^{2+} 和脑内神经递质与癫痫发作的关系[J]. 潍坊医学院学报, 1999, 21(2): 87-89.

[5] Pardon M C, Ma S, Morilak D A. Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and noradrenergic facilitation of the HPA stress response in Wistar Kyoto rats[J]. Brain Res, 2003, 971(1): 55-65.

[6] Jentsch J D, Roth R H, Taylor J R. Role for dopamine in the behavioral functions of the prefrontal corticostriatal system: implications for mental disorders and psychotropic drug action[J]. Prog Brain Res, 2000, 126: 433-453.

[7] Kent J M, Mathew S J, Gorman J M. Molecular targets in the treatment of anxiety[J]. Biol Psychiatry, 2002, 52(10): 1008-1030.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net