DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.009
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
1350 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1350-04

Survivin对辐射损伤的影响及与caspase-9/6、3的关系

高 洋[1],罗成基[1],黎海蒂[2],郑业华[3] (第三军医大学:[1]预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]基础医学部生理学教研室,[3]基础医学部细胞生物学教研室 重庆 400038)

提 要:目的 观察survivin对辐射损伤的影响及与caspase-9/6、3的关系。方法 ①将IEC-6细胞放置于2%O_2环境中低氧8 h后,复氧24、48 h,采用Western-blot检测胞内survivin;②给予不同实验组IEC-6细胞35 Gy ^{60}Co辐射照射,采用细胞流式PI法检测细胞凋亡率,并使用荧光免疫检测试剂盒检测各组caspase-9/6、3活性。结果 低氧预处理方法可诱导IEC-6细胞表达survivin,Survivin可明显降低辐射诱导的细胞凋亡率($P<0.01$),其对caspase-9/6活性无明显影响($P>0.05$),可使caspase-3活性有明显下降($P<0.01$)。结论 低氧预处理方法诱导的抗凋亡蛋白survivin是通过抑制caspase-3的活性,达到抑制辐射诱导的细胞凋亡的目的。

关键词:survivin;辐射;细胞凋亡;caspase;抗凋亡蛋白
中图法分类号:Q557.9;R394.2;R818.74 文献标识码:A

Effects of survivin on radiation injury and its relation to Caspase-9/6, 3 activity

GAO Yang[1], LUO Cheng-ji[1], LI Hai-di[2], ZHENG Ye-hua[3] ([1]Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, [2]Department of Physiology, [3]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of survivin on radiation injury and its relation to caspase-9/6, 3 activity. Methods ① IEC-6 cells were treated under hypoxic environment for 8 h and followed by reoxygenation for 24 and 48 h, and then the expression of survivin was identified by Western-blotting. ② After treatment with 35 Gy ^{60}Co, the apoptosis rate in different groups was detected with FACS and the caspase-9/6, 3 activity was tested using the caspase-9/6, 3 assay kit. Results Hypoxic preconditioning could induce the expression of survivin in IEC-6 cells and survivin could decrease the caspase-3 activity, resulting in reduced apoptosis rate induced by radiation. Conclusion Survivin induced by hypoxic preconditioning can inhibit the apoptosis induced by radiation by reducing the caspase-3 activity.

Key words: surivivin; radiation; apoptosis; caspase; antiapoptosis protein

广谱抗凋亡蛋白存活素(survivin)是一种新近发现的16.5×10^3细胞内蛋白,属于抗细胞凋亡蛋白家族。作为抗凋亡能力最强的抗凋亡蛋白,对辐射诱导的细胞凋亡表现出很强的抑制作用。探索简便易行的诱导内源性survivin的方法,及深入研究survivin抑制辐射诱导的细胞凋亡作用机制,可为放射病的防护提供新的方法和实验依据,为寻找特异性强、毒性低、符合机体内在生理机制,并可通过生物工程大量获取的辐射防护剂开辟新的途径。本研究拟采用低氧预处理方法,以达到诱导IEC-6细胞表达符合生理特征的抗凋亡蛋白的目的,观察survivin对辐射诱导的细胞凋亡的抑制凋亡作用,并探索caspase-9/6、3的改变与其的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

IEC-6正常肠上皮细胞株由第三军医大学全军复合伤研究所提供,用10%小牛血清的DMEM(H)(购于Gibco公司)培养,每2天半量换液,稳定传代后用于本实验。

1.2 实验分组

分为4组:①空白组:为不接受任何处理的IEC-6细胞;②低氧+放射组:为低氧预处理,并接受35 Gy ^{60}Co照射的IEC-6细胞;③单纯放射组:为单纯35 Gy ^{60}Co照射的IEC-6细胞;④拮抗组:为事先给予survivin拮抗剂(SURV11A),并接受同低氧+放射组相同处理的IEC-6细胞。

1.3 Western-blot检测survivin表达

将IEC-6细胞置于2%O_2 8 h,分别于复氧24、48 h后收集1

作者简介:高 洋(1976—),男,北京市人,硕士研究生,讲师,主要从事辐射损伤与防护方面的研究。电话:(023)68752355

收稿日期:2004-03-09;修回日期:2004-06-05

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

$\times 10^6$ 细胞，重悬于细胞裂解液中，形成单细胞悬液，冰浴，离心取上清。将上述样品与等体积的上样缓冲液混合上样于 13% 的分离胶。电泳后取下凝胶，与 PVDF 膜重叠于转移膜板中，转印。取下 PVDF 膜，1% 脱脂奶粉封闭，4 ℃过夜；1∶500 一抗，4 ℃过夜后 PBS 溶液洗膜；1∶1 000 二抗，37 ℃，1 h 后 PBS 溶液洗膜；使用化学发光法试剂盒检测结果。

1.4　细胞凋亡率的检测

35 Gy ^{60}Co 照射各实验组后，收集 1×10^6 细胞样品，1 100 r/min 离心 8 min，弃上清；用 PBS 洗涤次后；重悬于 PBS 中，形成单细胞悬液；边振荡边加入冰无水乙醇，后冰浴，制成单细胞悬液，浓度调整为 1×10^5/ml。加 RNA 酶 37 ℃反应 30 min，冰浴终止反应，碘化丙啶 4 ℃闭光染色 30 min，在 300 目尼龙网过滤后用流式细胞仪以 480 nmol/L 的红光荧光测定凋亡细胞的数量。

1.5　Caspase-9/6、3 活性荧光检测

用分光法测定 caspase-9/6、3 活性，具体操作步骤按 Sigma-Aldrich 公司 caspase-9/6、3 Assay Kit 中的操作说明书进行。

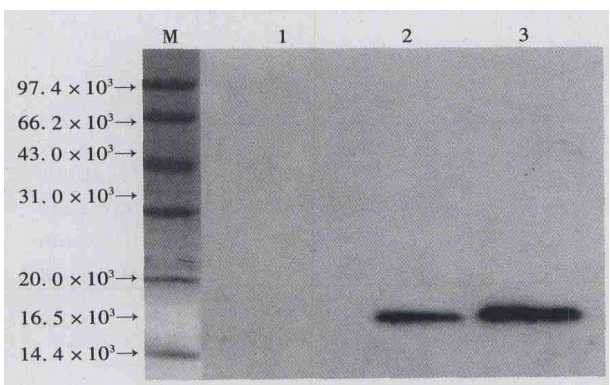
1.6　统计学处理

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用医学统计软件 SPSS11.0 进行多因素方差分析。

2　结果

2.1　Western-blot 检测 survivin 表达

IEC-6 细胞经 2% O_2 低氧 8 h，复氧 24、48 h。可见，复氧 24、48 h 后均表达 survivin 蛋白，且 48 h 组蛋白表达最强(图 1)。



M: Marker; 1: Normal IEC-6 cells; 2: After hypoxia for 8 h and reoxygeration for 24 h; 3: After hypoxia for 8 h and reoxygenation for 24 h

图 1　**Western blotting 检测 survivin 表达**

Fig 1　Detection of survivin expression by Western blotting

2.2　辐射所致不同组细胞形态学改变

以照射后 6 h 为观察时相点，倒置显微镜下观察，正常培养的 IEC-6 细胞可见形态较规则，呈鹅卵状，细胞边缘无突起，细胞与细胞间呈现融合状态，偶可见正处分裂期的双核细胞，整个视野清晰，细胞表面以及细胞间均未见有颗粒状物质(图 2)；可见单纯放射组、拮抗组细胞胞体变圆，细胞胞浆中出现细颗粒状物质，部分细胞胞体变小呈现明显收缩状态，可见部分细胞死亡，出现细胞碎片(图 3、4)；而低氧＋放射组细胞形态学改变明显比上述两组轻(图 5)。

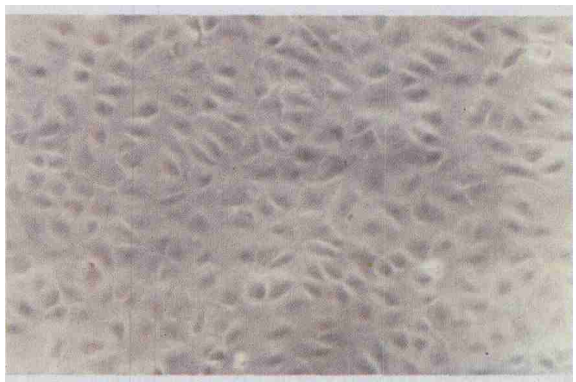


图 2　正常培养的肠上皮细胞 **IEC-6**　(倒置显微镜×200)

Fig 2　Morphology of normal IEC-6 cells　(Inverted microscope × 200)

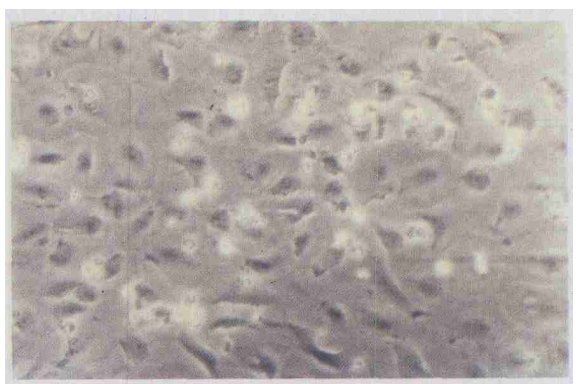


图 3　单纯放射组辐射后 **6 h** 肠上皮细胞 **IEC-6** 形态学变化　(倒置显微镜×200)

Fig 3　Morphology of IEC-6 cells in radiation group 6 h after radiation　(Inverted microscope × 200)

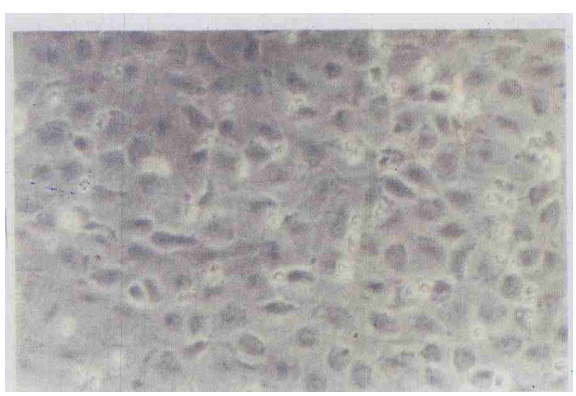


图 4　拮抗组辐射后 **6 h** 肠上皮细胞 **IEC-6** 形态学变化　(倒置显微镜×200)

Fig 4　Morphology of IEC-6 cells in survivin (-) group 6 h after treatment　(Inverted microscope × 200)

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

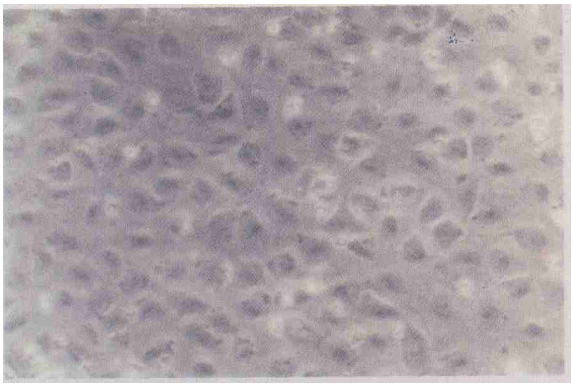


图5 低氧+放射组辐射后6 h肠上皮细胞IEC-6形态学变化（倒置显微镜×200）

Fig 5 Morphology of IEC-6 cells in hypoxia+radiation group at 6 h after treatment (Inverted microscope×200)

2.3 35 Gy ^{60}Co照射诱发不同组细胞凋亡率变化

单纯放射组细胞凋亡率在3 h开始明显升高；6 h达到凋亡高峰；12、24 h凋亡率有所下降。低氧+放射组凋亡率在3 h开始显示下降；6、12、24 h凋亡率明显低于单纯放射组（$P<0.01$）。加入survivin拮抗剂（Anti-survivin 1）后，拮抗组凋亡率明显高于低氧+放射组（$P<0.01$），但低于单纯放射组（$P<0.01$）（表1）。

2.4 Caspase-9/6活性荧光检测

单纯放射组细胞3 h caspase-9/6活性开始升高，6 h达到高峰，12、24 h活性有所下降。低氧+放射组活性变化明显低于单纯放射组（$P<0.05$）。加入survivin拮抗剂（Anti-survivin 1）后，caspase-9/6的活性变化与低氧+放射组基本相同（$P>0.05$）（表2）。

2.5 Caspase-3活性荧光检测

单纯放射组caspase-3活性在3 h开始升高，6 h达到高峰，12、24 h活性显示有所下降。低氧+放射组caspase-3活性明显低于单纯放射组（$P<0.01$）。加入survivin拮抗剂（Anti-survivin 1）后，caspase-3活性与低氧+放射组对比增高（$P<0.05$），但明显低于单纯放射组（$P<0.01$）（表3）。

表1 细胞凋亡率分析

Tab 1 Analysis of cell apoptosis ($n=3$, $\bar{x}\pm s$, %)

Group	Time after radiation(h)				
	0	3	6	12	24
Hypoxia/Radiation	2.21±0.049	6.33±0.190 *	10.87±0.677 **	12.88±0.072 **	5.44±0.289 **
Inhibition	2.02±0.550	7.14±0.265	15.20±0.259 ##	18.28±0.199 ##	10.26±0.576 ##
Radiation	1.44±0.075	8.57±0.273 #*	24.44±0.317 ##**	23.79±0.075 ##**	17.21±0.217 ##**

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* hypoxia/radiation group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* inhibition group

表2 Caspase-9/6活性分析

Tab 2 Analysis of Caspase-9/6 activity ($n=3$, $\bar{x}\pm s$, pmol·μg^{-1}·min^{-1})

Group	Time after radiation(h)				
	0	3	6	12	24
Hypoxia/Radiation	59.98±2.90	131.93±4.18	165.01±3.31	120.06±1.87	108.71±2.09
Inhibition	60.24±1.94	136.14±2.56	167.90±3.10	125.96±4.19	111.97±4.07
Radiation	60.15±0.58	167.07±1.36 #*	219.38±2.12 ##*	173.86±1.95 ##**	148.16±1.61 #*

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* hypoxia/radiation group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* inhibition group

表3 Caspase-3活性分析

Tab 3 Analysis of Caspase-3 activity ($n=3$, $\bar{x}\pm s$, pmol·μg^{-1}·min^{-1})

Group	Time after radiation(h)				
	0	3	6	12	24
Hypoxia/Radiation	11.66±0.84	77.79±3.61 **	93.40±1.05 *	77.23±1.13 *	58.43±5.64 **
Inhibition	10.00±0.35	102.49±2.80 ##	119.72±2.18 #	101.71±1.87 #	83.89±4.05 ##
Radiation	10.17±0.21	114.80±0.68 #*	145.57±1.25 #*	133.89±4.09 #*	100.54±3.00 #*

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* hypoxia/radiation group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* inhibition group

3 讨论

3.1 低氧预处理诱导IEC-6细胞表达抗凋亡蛋白survivin的表达

Survivin属于抗细胞凋亡蛋白（inhibitor of apoptosis，IAPs）家族。其在抑制细胞凋亡和促进细胞增生都起着重要的作用[1]。本研究结果显示，采用2% O_2 8 h处理方法，复氧24、48 h可有效的诱导正常细胞表达内源性保护蛋白survivin，且48 h组蛋白表达效果最好。这与国外关于人冠状动脉内皮细胞在低氧预处理

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

条件下细胞的存活等方面的研究结果相符[2]。说明对正常组织细胞进行低氧预处理，可诱发机体抗凋亡蛋白 survivin 的表达。

3.2　Survivin 对辐射诱导的 IEC-6 细胞凋亡抑制作用

作为迄今发现最强的凋亡抑制因子，survivin 能够抑制由各种凋亡诱导因子诱导的细胞凋亡[3]。本研究结果显示，以照射后 6 h 为观察时相点，光镜下观察，正常培养的 IEC-6 细胞可见形态较规则，呈鹅卵状，细胞边缘无突起，细胞与细胞间呈现融合状态，偶可见正处分裂期的双核细胞，整个视野清晰，细胞表面以及细胞间均未见有颗粒状物质；但可见单纯放射组、拮抗组细胞胞体变圆，细胞胞浆中出现细颗粒状物质，部分细胞胞体变小呈现明显收缩状态，可见部分细胞死亡，出现细胞碎片；而低氧＋放射组细胞形态学改变明显比上述两组轻。同时，细胞凋亡率检测显示，单纯放射组凋亡率在 3 h 开始明显升高，6 h 达到凋亡高峰，12、24 h 凋亡率有所下降，这是由于细胞在接受大剂量的辐射后大量裂解，造成细胞凋亡的相对下降。低氧＋放射组表现出相同的变化规律，且凋亡率明显低于单纯放射组（$P<0.01$）。说明，低氧预处理启动了 IEC-6 细胞内源性保护机制，使其产生了对辐射损伤的抗性。在事先给予 survivin 拮抗剂的实验研究中显示，拮抗组的凋亡率在各时相点均低于单纯放射组（$P<0.01$），但明显高于低氧＋放射组（$P<0.01$），证明低氧诱导的 survivin 对辐射诱导的细胞凋亡具有抑制作用，可使组织细胞获得对辐射损伤的抗性。这与国外在关于人多形性胶质母细胞瘤(GBM)射线损伤的研究[4]结果是相符的。同时，提示低氧预处理对机体的保护作用不仅有氧效应作用，也存在 survivin 抑制有害的细胞凋亡的作用。

3.3　Survivin 对辐射诱导的 IEC-6 细胞内 caspase-9/6、3 的影响

IAPs 是通过直接抑制 caspase-3，7 和干扰 caspase-9 的活化、阻断细胞色素 C(cyt c)的释放，达到抑制细胞凋亡的目的。Survivin 对 caspase 的抑制可能存在不同于其他 IAPs 的作用机制[5,6]。本研究结果显示，辐射诱导的细胞凋亡过程中，caspase-9/6、3 活性表现出其活性在 3 h 开始明显升高，6 h 达到高峰，12、24 h 活性显示有所下降，这可能是由于细胞在接受大剂量的辐射后大量裂解死亡，造成其活性的相对下降，这与 Soengas 等[7]研究的辐射诱导细胞凋亡通路的实验结果是相一致的。在低氧预处理诱导 survivin 表达后，发现 caspase-9/6 活性与单纯放射组对比下降明显（$P<0.05$）。但在加入 survivin 拮抗剂后，其活性与低氧＋放射组对比无显著性差异（$P>0.05$），表明 caspase-9/6 活性不受 survivin 的影响，而 caspase-9/6 活性的相对降低很可能是由于低氧预处理保护作用中其他机制所造成的。但低氧＋放射组 caspase-3 活性明显低于拮抗组、单纯放射组（$P<0.01$），说明，survivin 是通过抑制 caspase-3 活性，达到抑制辐射诱导的细胞凋亡，减轻辐射对正常组织细胞损伤的目的。这与 Brown 等[8]在有关抑制肿瘤细胞生长的因素等方面的研究，以及 Tanaka 等[9]在乳腺癌 survivin 蛋白转基因的研究结果相符的。

目前，有关诱发 survivin 在正常组织细胞中的内源性表达，以抗辐射诱导的凋亡和促细胞在辐射损伤时的存活方面的研究，国内外文献报道很少。本研究在此方面进行初步的尝试，证实诱发 survivin 蛋白在正常组织细胞中表达，可有效的阻断辐射诱导的细胞凋亡中的 caspase 通路，抑制凋亡和促进细胞存活。但 survivin 蛋白是采用何种方式抑制 caspase-3，7 和干扰 caspase-9 的活化过程，最终达到抑制细胞凋亡的目的的，有待进一步研究证实。

参考文献：

[1] Tamm I, Wang Y, Sausville E, *et al*. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95) Bax, caspases and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5315－5320.

[2] Li Z, Shoji Fukuda, Gerald Cordis, *et al*. Anti-apoptotic protein survivin plays a significant role in tubular morphogenesis of human coronary arteriolar endothelial cells by hypoxic preconditioning[J]. FEBS Lett, 2001, 508(3): 369－374.

[3] Uren A G, Beilharz T, O'Connell M J, *et al*. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(18): 10170－10175.

[4] O'Connor D S, Grossman D, Plescia J, *et al*. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(24): 13103－13107.

[5] Chantalat L, Skoufias D A, Kleman J P, *et al*. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual α-helical extensions[J]. Mol Cell, 2000, 6(1): 183－189.

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

[7] Soengas M S, Alarcon R M, Yoshida H, *et al*. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition[J]. Science, 1999, 284(5411): 156－159.

[8] Brown J M, Wouters B G. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents[J]. Cancer Res, 1999, 59(7): 1391－1399.

[9] 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.

（编辑　王　红）

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