

Survivin 基因在肝癌细胞增殖、凋亡过程中的表达及意义

陈科谚,何海洪,柯娟玉,余蕙君,张立俊,王静,周义文

南方医科大学深圳医院临床检验医学中心,广东 深圳 518110

【摘要】 目的 探索 Survivin 基因在肝癌细胞增殖和凋亡过程中的表达及其临床意义。方法 将肝癌细胞分为空白组(A组)、载体病毒组(B组)、shRNA-Survivin 慢病毒组(C组),使用 MTT 法分别检测三组肝癌细胞转染后 HepG2 肝癌细胞增殖率、使用 AV-PI 凋亡试剂盒分别检测三组肝癌细胞凋亡抑制率、使用 RT-qPCR 检测 Survivin 基因相对表达量以及凋亡因子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)的表达量。结果 A组、B组和C组肝癌细胞转染后 HepG2 肝癌细胞增殖率分别为(7.38±0.422)%、(8.99±0.382)%和(14.09±0.291)%,A组、B组的 HepG2 肝癌细胞增殖率明显低于C组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);A组、B组和C组肝癌细胞凋亡抑制率分别为(4.56±1.37)%、(3.05±1.08)%和(39.45±12.88)%,A组、B组肝癌细胞凋亡抑制率明显低于C组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);经荧光定量 PCR 检测,A组、B组和C组中 Survivin 基因相对表达量分别为 0.938±0.049、0.979±0.068 和 0.488±0.085,A组、B组的 Survivin 基因相对表达量明显多于C组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);A组、B组和C组在 Caspase-3 中的 Survivin mRNA 表达量分别为 0.938±0.041、0.983±0.057 和 0.388±0.076,A组、B组在 Caspase-3 中的 Survivin mRNA 表达量亦明显多于C组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 Survivin 基因对肝癌细胞具有促进增殖和凋亡抑制的调节作用。

【关键词】 肝癌;Survivin;细胞增殖;细胞转染;凋亡;凋亡因子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2021)04—0409—04

Expression of survivin gene in proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. CHEN Ke-yan, HE Hai-hong, KE Juan-yu, YU Hui-jun, ZHANG Li-jun, WANG Jing, ZHOU Yi-wen. Clinical Laboratory Medicine Center, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen 518110, Guangdong, CHINA

【Abstract】 **Objective** To explore the expression and clinical significance of survivin gene in the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** HCC cells were divided into three groups: blank group (A group), vector virus group (B group) and survivin-siRNA lentivirus group (C group). MTT method was used to detect the proliferation inhibition rate of HepG2 cells; AV-PI apoptosis kit was used to detect the apoptosis rate of three groups of hepatoma cells; RT-qPCR was used to detect the relative expression of survivin and caspase-3. **Results** The proliferation rate of HepG2 cells in group A, B, and C were (7.38±0.422)%, (8.99±0.382)%, and (14.09±0.291)%, respectively, and the rates in group A and B were significantly lower than those in group C ($P<0.05$); the inhibition rates of apoptosis in group A, B, and C were (4.56±1.37)%, (3.05±1.08)%, and (39.45±12.88)%, respectively, and the rates in group A and B were significantly lower than that in group C ($P<0.05$); the relative expression of survivin gene detected by real-time PCR was 0.938±0.049, 0.979±0.068 and 0.488±0.085 in group A, group B and group C, respectively, and the relative expression of survivin gene in group A and group B was significantly higher than that in group C ($P<0.05$); the expression of survivin mRNA in caspase-3 in group A, B, and C was 0.938±0.041, 0.983±0.057, and 0.388±0.076, which was significantly higher in group A and B than in group C ($P<0.05$). **Conclusion** Survivin gene can promote the proliferation and inhibit the apoptosis of hepatoma cells.

【Key words】 Liver cancer; Survivin; Cell proliferation; Cell transfection; Apoptosis; Caspase-3

在死亡的相关原因中,癌症是四大原因之一,而肝癌在全球中致死率位列第三,它严重危害着人类的身心健康^[1-2]。更为突出的是,肝癌患者五年存活率不到10%,一年存活率低于50%^[3]。近年来,肝癌的发病率呈现上升趋势,不仅预后差,而且容易发生癌症的转移^[4-5]。有研究通过基因治疗精准靶向定位杀伤肿瘤细胞,以及修正和替代病变基因,从而达到治疗的效果^[6-7]。

Survivin 基因是一种存在于恶性肿瘤及胚胎组织中的独特标记物^[8],Survivin 是一种凋亡抑制蛋白,基因位于常染色体 17q25,大小约 14.7 kb,含有 4 个外显子和 3 个内显子。Survivin 可抑制肿瘤细胞的凋亡、促进肿瘤细胞增殖分化和肿瘤血管生成。近年来,国内外多项研究均发现 Survivin 基因的过度表达与多种肿瘤相关,包括胃癌、肝细胞癌以及头颈部肿瘤,提示其可能作为一种新的肿瘤标志物而成为检测

基金项目:广东省深圳市宝安区科技创新局基金资助项目(编号:2020JD434)

通讯作者:周义文,博士,硕士研究生导师,E-mail:yiwenzhou21@aliyun.com

恶性肿瘤的指标。而 Survivin 的表达在很大程度上是从转录水平上来控制的,其主要通过位于 Survivin 启动子邻近区域的细胞周期依赖性元件(cell cycle-dependent elements, CDEs)和细胞周期同源区域(cell cycle homology regions, CHRs)来调节。它在正常组织中不存在,但在调节细胞凋亡及细胞分裂中发挥着重要的作用,具有一定的安全选择性,且在肿瘤基因的靶向治疗中,起着很强的促进作用^[9]。目前已有关于 Survivin 信号通路诱导肝癌细胞的相关报道,但是 Survivin 基因在肝癌发生发展中的作用及其机制并没有明确。由于 Survivin 基因是目前发现的作用较强的凋亡抑制基因,而 Survivin 基因与肝癌的发病及临床病理特征具有一定的相关性,因此探讨 Survivin 基因在肝癌发生发展中的作用及其机制具有重要的意义。Survivin 不同于凋亡抑制蛋白家族的其他成员,其基因结构中含有很多个细胞凋亡的氨基酸残基,这种结构能与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶直接或间接相结合,进而影响半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶活性,而半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶与细胞凋亡存在着直接关系。因此, Survivin 基因可作为靶向选择的安全且特异肿瘤靶向治疗基因,通过介导病毒载体携带基因导入靶细胞而达到抗肿瘤的治疗效果^[10]。

1 材料与方法

1.1 材料 Caspase-3 染色试剂盒(BioVision)、肝癌 HepG2 细胞(中科院上海细胞库)、AV-PI 细胞凋亡检测试剂盒(Invitrogen)、胎牛血清(Gibco)、MTT 细胞增殖试剂盒(Solarbio)、蛋白定量试剂盒(BOSTER)、转染试剂盒(Invitrogen)、DMEM 培养基(Thermo Fisher)。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞的培养 肝癌 HepG2 细胞种植

于细胞培养瓶中,加入胎牛血清的 DMEM 培养基,进行细胞培养,用显微镜观察,细胞生长达 80% 时,收集细胞。

1.2.2 慢病毒 shRNA-Survivin 载体构建 吉凯基因有限公司合成提供了 shRNA-Survivin 慢病毒载体以及表达的质粒,元件顺序为 pHBLV-U6-ZsGreen-PGK-Pu-ro,克隆位点为 XhoI/BamHI。

1.2.3 肝癌细胞的分组 将肝癌 HepG2 细胞分 A 组、B 组、C 组三个组。A 组作为对照组,此组未经任何处理。B 组为经过空白载体慢病毒转染;C 组为经过 shRNA-Survivin 载体慢病毒转染。用荧光显微镜观察经过 ZsGreen 荧光探针标记后,细胞慢病毒转染率。

1.2.4 检测肝癌细胞增殖情况 将空白组、载体病毒组、shRNA-Survivin 慢病毒组三个组的细胞按照说明书要求接种,37℃ 孵育箱培养,4 d 后加 MTT 溶液 20 μL,摇床上晃动 15 min 后通过酶标仪检测吸光度值。

1.2.5 检测肝癌细胞 AV-PI 凋亡情况 将 A 组、B 组、C 组三个组的细胞按照 AV-PI 操作说明书进行检测,通过流式细胞分析仪器来检测三组细胞的凋亡变化情况。

1.2.6 检测 Caspase-3 的表达量 根据荧光定量 PCR 试剂盒的说明书要求三组细胞融合率达 80% 后再经 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化,离心后,进行 PCR 检测预变性→变性→退火→延伸→终延伸,分别是 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 72℃ 5 min, 25 个循环后计算目的基因的表达量。其中 Survivin、Caspase-3、内参基因(GAPDH)引物由上海生物工程有限公司生产,见表 1。

表 1 目的引物序列

名称	序列长度(bp)
内参基因(GAPDH)	正链:(5'→3')-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-反链:(3'→5')-TGGTGAAGACGCCAGTGG-37
Survivin	正链:(5'→3')-TAACATTTCTGCTTCAGAGCG-反链:(3'→5')-ATTGTAACCGTTTCTGGTTTGC-27
Caspase-3	正链:(5'→3')-CAAGAGGCTGCTTCAGATGA-反链:(3'→5')-TCTGTTCCGTTTCTGGTTC-32

1.3 统计学方法 应用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养 肝癌 HepG2 细胞在 37℃ 孵育箱内进行细胞培养,培养的细胞显微镜下观察,待细胞生长达 80% 时,可见到 HepG2 肝癌细胞生长良好,见图 1。

2.2 慢病毒 shRNA-Survivin 载体构建及转染结果 ShRNA-Survivin 载体慢病毒转染率为 87%,以

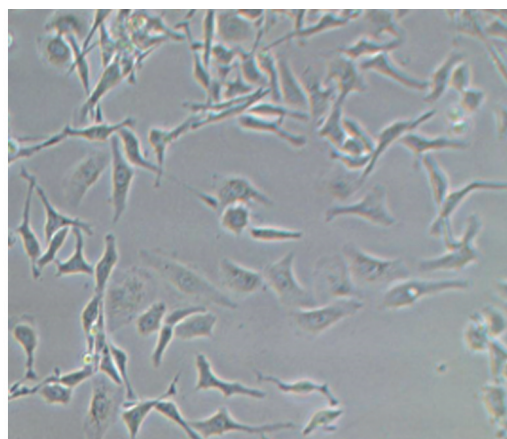


图 1 肝癌 HepG2 细胞形态图(100×)

HepG2 肝癌细胞为靶点种子细胞转染,成功构建了以荧光蛋白为荧光探针进行转染,见图2。

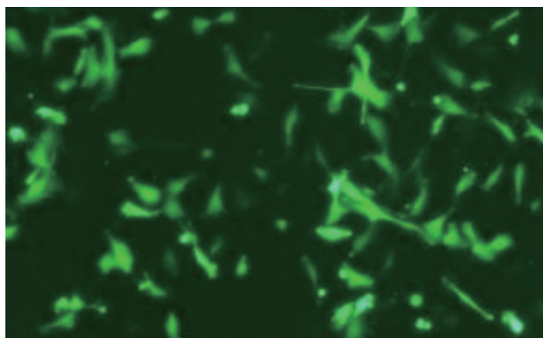


图2 荧光蛋白构建的慢病毒shRNA-Survivin载体(200×)

2.3 各组细胞增殖能力比较 经吸光度测定结果显示,A组、B组和C组肝癌细胞转染后,HepG2 肝癌细胞增殖率分别为 $(7.38\pm 0.422)\%$ 、 $(8.99\pm 0.382)\%$ 和 $(14.09\pm 0.291)\%$,A组、B组的HepG2 肝癌细胞增殖率明显低于C组,差异均具有统计学意义($F=76.85$, $P<0.05$)。

2.4 各组细胞凋亡抑制率比较 各组数据显示,A组、B组和C组肝癌细胞凋亡抑制率分别为 $(4.56\pm 1.37)\%$ 、 $(3.05\pm 1.08)\%$ 和 $(39.45\pm 12.88)\%$,A组、B组肝癌细胞凋亡抑制率明显低于C组,差异均具有统计学意义($F=21.59$, $P<0.05$)。

2.5 各组肝癌 HepG2 细胞 Survivin、Caspase-3 的 mRNA 相对表达量比较 经荧光定量 PCR 检测,A组、B组和C组中 Survivin 基因相对表达量分别为 0.938 ± 0.049 、 0.979 ± 0.068 和 0.488 ± 0.085 ,A组、B组的 Survivin 基因相对表达量明显多于C组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);A组、B组和C组在 Caspase-3 中的 Survivin mRNA 表达量分别为 0.938 ± 0.041 、 0.983 ± 0.057 和 0.388 ± 0.076 ,A组、B组在 Caspase-3 中的 Survivin mRNA 表达量亦明显多于C组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,然而其发病隐匿,早期症状不明显,但进展却十分迅速,确诊时大多数患者已属于晚期或已发生了远处转移。同时原发性肝癌的治疗也十分困难,预后也不是很好,自然生存时间很短,严重地威胁着人们的身体健康和生命安全。快速增殖是肝癌重要的生物学特点之一,肝癌的快速增殖是导致许多癌患者预后较差,5年生存率低的重要因素之一。因此,在我国研究肝癌的发病机制、生物学行为、诊疗、预后等显得更为重要和迫切。

目前研究发现,细胞凋亡失衡与肿瘤发病有关,而参与细胞凋亡调控的凋亡相关基因与肿瘤有显著的相关性。Survivin 参与疾病的发生与发展,是目前发现作用较强的凋亡抑制基因。在凋亡抑制蛋白家族中,

它是分子量最小同时也是最强的凋亡抑制因子^[11-12]。Survivin 在大多数肿瘤组织中都有一定的表达,并且与肿瘤的复发以及转移等都有一定的关系^[13]。近年来,研究发现 Survivin 基因与肝癌也有很密切的相互关系^[14-17]。因此,本研究旨在通过研究构建 shRNA-Survivin 慢病毒载体,来探索 Survivin 基因对肝癌细胞增殖、凋亡过程中的表达分析。原发性肝癌的 Survivin 基因发病机理尚不明确,且十分复杂,它的发生、发展和转移与基因的多态性、信号转导通路以及新生血管增生异常等有关,且存在多个关键性环节。因此,进行 Survivin 基因在肝癌细胞增殖、凋亡过程中的表达及意义的研究非常重要。

之前研究主要集中在癌基因、抑癌基因方面。目前研究发现,细胞凋亡失衡与包括肿瘤在内的多种人类疾病有关。细胞凋亡又称为程序性细胞死亡,是多细胞生物维持生长发育和组织形态所特有的,由多种基因参与表达、精密调控的细胞主动死亡过程,在维护多细胞生物的组织内稳定性方面有着重要作用。凋亡的发生主要有两条途径:死亡受体介导的外部凋亡途径和线粒体介导的内部凋亡途径。细胞凋亡可分为两大类:一是凋亡促进基因,起着促进凋亡作用。二是凋亡抑制基因,起着抑制凋亡的作用。这两种凋亡涉及一系列相关基因的激活、表达以及调控,同时也存在一定的关联。通常情况下细胞在没有受到凋亡信号的刺激时,凋亡蛋白表达量是不会增加的,促凋亡与促生存蛋白之间的蛋白表达量处于相对的稳态,只有细胞受到凋亡信号的刺激,两种蛋白的表达平衡被打破,细胞才会走向凋亡。如果对凋亡机制得以进一步了解,将为肿瘤的治疗开辟一个新的方向。因此,对于凋亡相关基因的研究具有很重要的意义。

Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,在细胞凋亡中起着不可替代的作用。Survivin 基因是通过与 Caspase-3 直接结合后,使抑癌基因磷酸化周期蛋白依赖性激酶4活化,从而阻止 Procaspase-3 的激活,进而参与调控细胞的病理生理过程。Survivin 也可以对线粒体和死亡受体介导内源性细胞凋亡途径产生强大的抑制作用,其作用方式主要是通过蛋白直接结合和抑制上下游 Caspases 分子而发挥作用。Survivin 基因是迄今为止发现的最强的凋亡抑制基因,主要是通过直接抑制 Caspase 级联反应下游的终末子 Caspase-3 的活性,从而发挥抗凋亡作用。Survivin 基因可通过加快肿瘤细胞由 G1→S 期的转换以及使肿瘤细胞在 G2/M 期逃避对凋亡的识别,进而促进肿瘤细胞增殖、分化。Survivin 基因能通过血管形成因子(VEGF、bFGF、Ang-1 和 COX-2)在血管形成的中间环节发挥重要作用。

因为 Survivin 可抑制肿瘤细胞的凋亡、促进肿瘤细胞增殖分化和肿瘤血管生成,提示其可能作为一种新的肿瘤标志物,成为检测恶性肿瘤的指标。通过 Survivin 基因与中国人肿瘤易感性的分析,进而研究 Survivin 基因与中国人肝癌细胞的关系。

半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)与 ICE/CED-3 具有同源活性中心的序列,它是存在于胞质溶胶结构中的一种酶。Caspases 的共同特点是都含有半胱氨酸。本研究通过荧光定量 PCR (RT-qPCR)方法检测空白组、载体病毒组、shRNA-Survivin 慢病毒组 Survivin mRNA 的相对表达水平以及这三个组在 Caspase-3 的 Survivin mRNA 的相对表达水平,发现当 Caspase-3 活性升高时, Survivin 蛋白及 mRNA 的表达会明显降低,并且细胞的凋亡比率上升同时结构发生典型凋亡改变,与此同时微丝形态结构在细胞内也遭到了破坏。这就证明了转染后的肝癌细胞降低了细胞内 Survivin 基因的表达并激活了 Caspase-3,进一步通过活化的 Caspase-3,从而破坏细胞骨架和微丝系统结构,导致细胞的凋亡,可见 shRNA-Survivin 对肝癌细胞具有抑制增殖和促进凋亡的调节作用,可以抑制 Survivin 基因的表达。因此, Survivin 基因在肝癌组织中的表达含量与该肿瘤的发生发展、预后评估和治疗效果密切相关。

本研究结果有助于指导原发性肝癌的早期筛查和预防,提前预知可能发生肝癌的预先评估和诊断时机。所以在未患肝癌时,提前筛查 Survivin 基因对肝癌易感人群的诊断开辟了一个令人兴奋的新途径。传统肝癌的筛查主要结合临床症状、生化指标 AFP、B 超等手段进行检测,但常常发现肝癌时已经是晚期,而 Survivin 基因的研究对于未患肝癌的易感人群来说,却可能起到提前预知、提前预测肝癌的发病概率,提前筛查出可能会有肝癌的风险系数的作用。由于肝癌与遗传因素、环境因素、生活习惯、饮食习惯有很大关系,因此通过早期筛查 Survivin 基因可能对提前制定预防原发性肝癌的个体化相关方案、提前采取相应的预防措施起到重要作用。

参考文献

- [1] RAHBARI NN, MEHRABI A, MOLLBERG NM, et al. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future [J]. *Ann Surg*, 2011, 253(3): 453-469.
- [2] BOSCH FX, RIBES J, DIAZ M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 Suppl 1): S5-S16.
- [3] MCGLYNN KA, LONDON WT. The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future [J]. *Clin Liver Dis*, 2011, 15: 223-243.
- [4] RIBES J, CLENES R, ESTEBAN L, et al. The influence of alcohol consumption and hepatitis B and C infections on the risk of liver cancer in Europe [J]. *J Hepatol*, 2008, 49(2): 233-242.
- [5] CHENG AL, KANG YK, CHEN Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(1): 25-34.
- [6] MICHAEL GROSS. New hopes for gene therapy [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(20): R983-6.
- [7] POURZADEGAN F, SHARIATI L, TAGHIZADEH R, et al. Using intron splicing trick for preferential gene expression in transduced cells: an approach for suicide gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(1): 7-12.
- [8] BAYRAM S, AKKIZ H, BEKARA, et al. The association between the Survivin -31G/C promoter polymorphism and hepatocellular carcinoma risk in a Turkish population [J]. *Cancer Epidemiol*, 2001, 35(6): 555-559.
- [9] NIMMANAPALLI R, BHALLA K. Targets in apoptosis signaling: promise of selective anticancer therapy [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 223: 465-483.
- [10] NIMMANAPALLI R, BHALLA K. Targets in apoptosis signaling: promise of selective anticancer therapy [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 223: 465-483.
- [11] ERRIDGE S, PUCHER PH, MARKAR SR, et al. Meta-analysis of determinants of survival following treatment of recurrent hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Surg*, 2017, 104(11): 1433-1442.
- [12] WIEDEMUTH R, KLINK B, TOPFER K, et al. Survivin safeguards chromosome numbers and protects from aneuploidy independently from p53 [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 107.
- [13] 田忠成, 邵飞飞, 党雪菲, 等. Survivin 在甲状腺癌中的表达及临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(3): 390-393.
- [14] GU YJ, JIN SD, WANG F, et al. Clinicopathological significance of PI3K/Akt and Survivin expression in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(4): 471-475.
- [15] BOIDOT R, VEGRAN F, LIZARD-NACOL S. Transcriptional regulation of the Survivin gene [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(1): 233-240.
- [16] 郑国文. 大肠癌中 Livin 和 Survivin 的表达及相关性研究 [J]. *实用医院临床杂志*, 2014, 11(2): 86-87.
- [17] 常玉珍, 李秀梅, 封敏, 等. Survivin、NF- κ B 和 STAT3 mRNA 在宫颈癌中的表达及其临床意义 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2014, 26(3): 189-192.

(收稿日期: 2020-09-08)