

转染 survivin 对 HLF 细胞增殖及凋亡的影响

顾 霞, 林汉良, 朱有凯, 张 萌, 梁惠珍, 沈 艳
(中山大学基础医学院病理教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨 survivin 基因表达对人肺纤维母细胞(human lung fibroblast, HLF)增殖、凋亡的影响。【方法】构建 survivin 基因真核表达质粒 pcDNA3.1/SVN; 利用脂质体转染法将其转入不表达 survivin mRNA 的 HLF 细胞系。连续培养 10 周, 筛选出稳定表达的阳性克隆(HLF/SVN)及转空质粒对照(HLF/K)。用 RT-PCR、免疫组化、Western blot 检测细胞中 survivin、bcl-2 和 caspase3 mRNA 表达; 通过观察细胞生长曲线、细胞凋亡指数, 探讨转染 survivin 基因对 HLF 细胞生长、凋亡的影响。【结果】转染 pcDNA3.1/SVN 后, 在 4、6、8 和 10 周 HLF/SVN 细胞查见 survivin mRNA 表达; 免疫组化和 Western blot 见 HLF/SVN 细胞 survivin 阳性表达; 转染后 caspase3 mRNA 受到抑制, 表达减弱或消失。HLF/SVN 细胞凋亡指数(0.3%、1.0%、1.5%)皆低于 HLF(0.9%、4.3%、2.1%)及 HLF/K(0.8%、1.4%、2.8%)。细胞生长曲线示 HLF/SVN 细胞生长快于 HLF 和 HLF/K, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】survivin 基因能促进 HLF 细胞生长, 可能通过抑制凋亡和促进细胞分裂而发挥作用。

关键词: survivin 蛋白; 人肺纤维母细胞; 转染; pcDNA3.1

中图分类号: R733.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0063-04

Effect of Transfected Survivin on Amplification and Apoptosis of HLF

GU Xia, LIN Han-liang, ZHU You-kai, ZHANG Meng, LIANG Hui-zhen, SHEN Yan
(Department of Pathology, Basic Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of survivin expression on the amplification and apoptosis of human lung fibroblast (HLF) cells. 【Methods】Eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/SVN was constructed and transfected into the HLF cell line without expression of survivin mRNA by lipofection technique. After cultured 10 weeks, the positive cells (HLF/SVN) of transfected plasmid pcDNA3.1/SVN and control cells(HLF/K) of transfected empty plasmid were selected. Expression of survivin, bcl-2 and caspase3 mRNA in the HLF cells were detected by RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blot. The effects of survivin mRNA on the amplification and apoptosis of HLF cell were monitored by the growth curve and apoptotic indexes (AI). 【Results】After transfecting pcDNA3.1/SVN, the cells of expression survivin mRNA in HLF/SVN were detected at 4 week, 6 week, 8 week, and 10 week. Expression of survivin protein was detected by immunohistochemistry and Western blot. Expression of caspase3 was reduced or no expression. Apoptosis index was lower in HLF cells of transfected pcDNA3.1/SVN (0.3%, 1.0%, 1.5%) than untransfection ones (0.9%, 4.3%, 2.1%) or transfected empty plasmid (0.8%, 1.4%, 2.8%). The amplification of HLF/SVN was increased than HLF and HLF/K cells by growth curve. There exist a significant difference in HLF/SVN and HLF, HLF/K cells ($P < 0.05$). 【Conclusion】Survivin gene maybe play an important role in amplification of HLF cells. This change might be attributed to inhibit apoptosis and increas mitosis of cells.

Key words: survivin protein; human lung fibroblast; transfection, pcDNA3.1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):63-66, 71]

Survivin 是一个新近发现的抗凋亡因子, 是凋亡抑制蛋白(inhibitor apoptosis protein, IAP)家族成员之一^[1]。尽管近几年对 survivin 基因进行了较

多的研究, 但对于 survivin 基因在细胞增殖、凋亡过程中的影响, 直接证据并不多。本实验构建 survivin mRNA 真核表达载体, 将其转入不表达

收稿日期: 2005-08-05

作者简介: 顾 霞(1963-), 女, 浙江杭州人, 博士, 副教授, 现在新疆医科大学基础医学院病理教研室, 乌鲁木齐 830054; 林汉良, 教授, 博士生导师, E-mail: guxia1373@schu.com

survivin mRNA 的人肺纤维母细胞 (human lung fibroblast, HLF), 使其表达 survivin mRNA, 观察细胞增殖、凋亡的影响, 这将有助于我们进一步探讨 survivin 在肿瘤发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

试剂: 质粒 pcDNA3.1 (美国 Invitrogen 公司), 脂质体 DMR1E-C (美国 Invitrogen 公司); Trizol 试剂 (上海生工); 转录试剂盒 (立陶宛 MBI); 引物 (上海生工); Taq 酶 (日本 TaKaRa 公司)。限制性内切酶 BamH1、EcoR1 (日本 TaKaRa 公司); T_4 DNAIidase (英国 NEB 公司), Qiaquick gel extraction kit、QIAquick PCR purification kit、QIAGEN plasmid midi kit (德国 Qiagen 公司), G418 sulfate (美国 Callbiochem 公司); survivin 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司)。菌株和细胞系: 大肠杆菌 JM109、细胞系 K562、HLF 为本教研室保存

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 PCR 扩增 培养至对数生长期 K562 细胞系, 离心换液 24 h 后, 取 1×10^8 细胞, PBS 洗 2 次, 离心沉淀。用 Trizol 试剂提取总 RNA, 紫外分光光度仪测纯度及浓度, 取 2 μ g RNA, 进行 RNA 逆转录及 cDNA 合成。PCR 扩增 survivin 1 上游引物: 5'-GTGAATCCGTTGG CAGAGGTGGCGGC-3', 下游引物: 5'-ATGGATCCCCTGGAAGTGGTG CAGCCA-3', 扩增片段为 520 bp; 内参 -actin: 上游引物: 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3', 下游引物: 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3' (扩增片段为 587 bp)。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 32 个循环。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果; 回收目的条带。

1.2.2 质粒构建 用 EcoR 和 BamH 双酶切空质粒及 survivin 基因凝胶回收 PCR 产物; 双酶切产物用 PCR 纯化试剂盒纯化后, 质粒与 PCR 产物在连接酶作用下进行连接反应。转入感受态大肠杆菌 JM109, 在含有氨苄西林的 LB 琼脂平板上筛选阳性克隆。提取重组质粒 DNA 经电泳、PCR、序列测定证实含有 survivin mRNA 真核表达质粒 pcDNA3.1/SVN 构建成功。

1.2.3 质粒转染 HLF 细胞系用含有体积分数

15%胎牛血清的 RPMI1640 完全培养液于 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱内培养至细胞面积密度为 30%~50%。QIAGEN plasmid midi kit 提取质粒 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1/SVN, 分别取 2 μ g 质粒 DNA 于 1 mL opti-MEM1 培养液中, 4 μ L 脂质体 DMR1E-C 于 1 mL opti-MEM1 培养液中混匀, 将质粒 DNA 溶液与脂质体溶液混合 30 min, 形成脂质体-DNA 复合物; 用不含抗生素无血清培养液洗细胞 2 次, 将 lipid-DNA 复合物加入到培养板中, 温柔混匀; 在 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱中, 孵育 24 h, 加入含有体积分数 15%胎牛血清培养液。培养 48 h, 消化细胞, 按 1:5 的比例稀释培养, 加入 G418 筛选抗生素, 培养 10~14 d 后, 改维持量继续培养 10 周筛选出稳定表达 survivin mRNA 阳性克隆 HLF/SVN 和转染空质粒 HLF/K。

1.2.4 稳定表达 pcDNA3.1/SVN 阳性克隆的检测 采用 RT-PCR 扩增 survivin 2: 上游引物 5'-TTCTTGGAGGGCTGCGCCT-3', 下游引物 5'-CCTGGTAGTGGTGACAGCCA-3' (扩增片段为 401 bp), bcl-2: 上游引物 5'-TGTGGCCTTCTTTGAGTT CG-3', 下游引物 5'-TCACTTGTGGCCAGATAGG-3' (扩增产物为 278 bp); caspase3: 上游引物: 5'-TTTGTGGTGTGCTTCTGAGCC-3', 上游引物: 5'-ATTCTGTTGCCA CCTTTCGG-3' (扩增产物为 400 bp), 免疫组化、Western blot、细胞生长曲线和流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 RT-PCR 结果判断标准 将电泳条带用全自动图像分析系统 (德国 KONTRON IBAS 2.0) 分析, 测出每 1 条带的面积 (AREA) 乘以平均光密度 (mean optical density of the object, OPTDM), 得出结合光密度 (integrated optical density of the object, OPTDI), 根据 survivin 与 -actin OPTDI 的比值, 对目的基因的表达进行半定量分析。

1.3 统计学方法

统计学分析采用 SPSS 统计软件中 χ^2 检验和重复测量方差分析, 检验水准, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1/SVN 的构建、鉴定及转染

本实验从高表达 survivin 基因的髓性白血病细胞系 K562, 提取 RNA, RT-PCR 扩增片断转入

质粒 pcDNA3.1, 重组质粒 pcDNA3.1/SVN 双酶切产物电泳得到 5 kb 和 500 bp 左右 2 个片段; 用引物 survivin 1 进行 PCR 扩增, 扩出 520 bp 片段(图 1); 重组质粒测序证实, 插入序列与 NCBI 基因库 survivin mRNA 序列的同源性为 100%, 表明重组质粒构建成功。通过脂质体转染法将 pcDNA3.1/SVN 转染 HLF 细胞系, 经 G418 抗性筛选, 连续 10 周传代培养, 获得稳定表达克隆(HLF/SVN)。

2.2 HLF 细胞转染后 survivin、bcl-2 和 caspase3 mRNA 表达

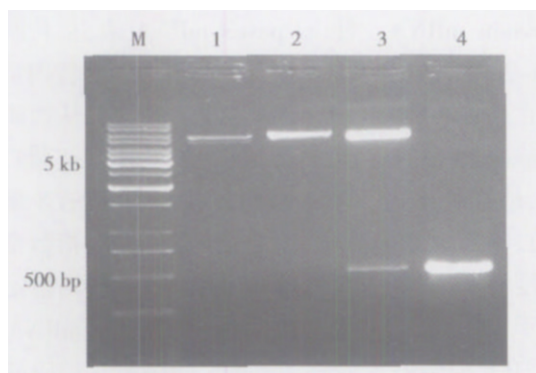


图 1 重组质粒 pcDNA3.1/SVN 酶切分析及 PCR 鉴定
Fig.1 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1/SVN by restriction analysis and PCR

Lane 1: empty plasmid pcDNA3.1 digested with EcoR1; Lane 2: recombinant plasmid pcDNA3.1/SVN digested with EcoR1; Lane 3: recombinant plasmid pcDNA3.1/SVN digested with EcoR 1 and BamH1; Lane 4: RT-PCR amplification of survivin using recombinant plasmid pcDNA3.1/SVN as template

在 G418 筛选过程中, 转染外源基因的 HLF 细胞, 分别在 4、6、8、10 周提取 mRNA 检测 survivin mRNA 的表达情况。4 次 RT-PCR 皆在 400 bp 处查见清晰的条带, 而 HLF 和转染空质粒者, 未查见相应的条带。同时检测 bcl-2 和 caspase3 mRNA, 发现 bcl-2 mRNA 表达在 HLF/K 与 HLF/SVN 无明显变化 (图像分析 bcl-2 mRNA OPTDI 值: 转染空质粒为 0.9437, 转染重组质粒 8、10 周分别为 1.0827、0.7705); 但是 caspase3 mRNA 在转染后受到明显抑制, 表达减弱或消失(图像分析 caspase3 mRNA OPTDI 值: 转染空质粒为 0.9862, 转染重组质粒 8、10 周分别为 0.1625 和 0) (图 2)。

2.3 Survivin 蛋白的检测

HLF 细胞不表达 survivin, 未转染和转空质粒者免疫组化 survivin 蛋白阴性 (图 3); 而转入

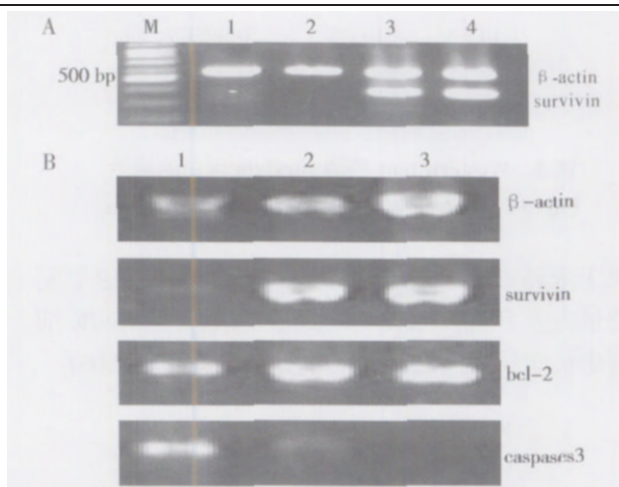


图 2 重组质粒 pcDNA3.1/SVN 转染 HLF 细胞 RT-PCR 扩增 survivin、bcl-2 和 caspase3 电泳图

Fig. 2 RT-PCR amplification of survivin, bcl-2, and caspase3 mRNA in HLF cells transfected with pcDNA3.1/SVN

(A) Lane 1: HLF; Lane 2: HLF/K; Lane 3: HLF/SVN (4 weeks); Lane 4: HLF/SVN (6 weeks). (B) Lane 1: HLF/K; Lane 2: HLF/SVN (8 weeks); Lane 3: HLF/SVN (10 weeks)

survivin mRNA 后, 在 HLF/SVN 细胞核可见 survivin 蛋白阳性表达 (图 4), Western blot 检测 survivin 蛋白, 可见 16.5×10^3 的蛋白条带, 而 HLF 和 HLF/K 细胞未见条带 (图 5)。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡指数

分别在 4、6、10 周 3 次收集细胞检测凋亡。结果显示转染 pcDNA3.1/SVN 后细胞凋亡率 (0.3%、1.0%、1.5%) 皆低于未转染细胞 (0.9%、4.3%、

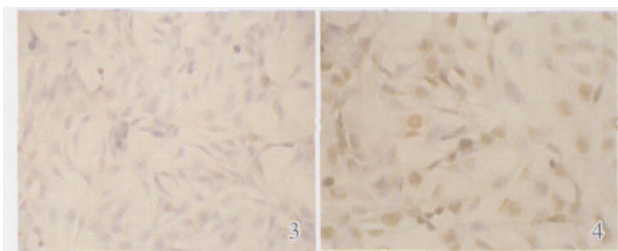


图 3 HLF 细胞 survivin 蛋白阴性

Fig.3 Negative expression of survivin protein in HLF cell (immunohistochemistry, $\times 200$)

图 4 HLF/SVN 细胞 survivin 蛋白阳性

Fig.4 Expression of survivin protein in HLF/SVN (immunohistochemistry, $\times 200$)

2.1%) 及转染空质粒者 (0.8%、1.4%、2.8%) (图 6)。² 检验各组间差异无统计学意义 (> 0.05)。

2.5 生长曲线

HLF 细胞转染 pcDNA3.1/SVN 后, 细胞生长

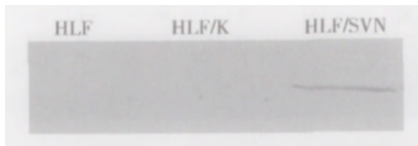


图 5 Western blot 检测 survivin 蛋白的表达
Fig. 5 Western blot analysis survivin protein

快于未转染者(图 6); 采用 SPSS 统计软件中重复测量方差分析, HLF/SVN 细胞与 HLF 及 HLF/K 细胞生长曲线之间的差异有统计学意义(< 0.05)。

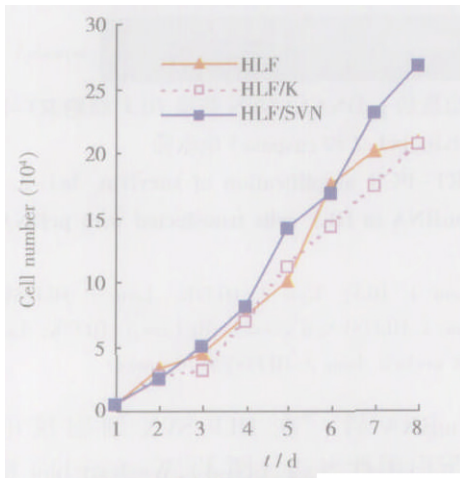


图 6 HLF 和 HLF/SVN 生长曲线

Fig. 6 Growth curves of HFL and HLF/SVN

3 讨论

细胞凋亡对细胞生长和肿瘤发生起着重要的作用, 许多研究表明凋亡调节功能的异常与肿瘤的发生有关, 其中多个癌基因、抑癌基因在细胞凋亡途径中起作用。survivin 基因是一个结构独特的凋亡抑制基因^[2]。作用于细胞凋亡途径的下游, 直接抑制效应 caspases 3, 7, 而发挥抗凋亡作用。survivin 是目前发现的功能最强的凋亡抑制因子之一。survivin 的组织分布具有明显的细胞选择性, 仅在胚胎及胎儿组织表达, 而在成人分化组织多不表达, 但在多种肿瘤组织则表达^[1]。多方面的研究提示 survivin 可能是一种癌基因, 参与肿瘤的发生、发展^[3], 而抑制 survivin 表达, 则能抑制细胞的增生和诱导细胞凋亡^[4]。

质粒 pcDNA3.1 是一个能在真核细胞稳定表达的载体。此筛选系统具有在短时间内获得稳定表达目的基因细胞系的特性, 一般经过 3~4 周的筛选, 可以获得稳定表达的克隆。HLF 细胞系不表

达 survivin 基因^[1]。HLF 细胞转染 pcDNA3.1/SVN 后, 不同时期(4、6、8、10 周) RT-PCR 检测均查见 survivin mRNA 条带; 未转染及转染空质粒对照组, 未见相应条带。证明 survivin mRNA 成功地导入 HLF 细胞, 稳定地表达 survivin mRNA, 并表达相应的蛋白质。Survivin 的功能是抗凋亡和调节细胞有丝分裂。survivin 直接作用于凋亡途径下游 caspase-3、7; 一方面阻断其活化, 另一方面通过泛素蛋白酶途径, 促进效应 caspase 降解, 从而抑制细胞凋亡^[5]。本实验 HLF/SVN 细胞表达 survivin mRNA, 使 caspase3 mRNA 表达下调而 bcl-2 与 survivin 凋亡途径不同; bcl-2 干扰内源性凋亡途径中细胞色素 C 自线粒体释放, 从而阻断 caspase 蛋白酶连锁激活反应, 以发挥其抗凋亡作用, 故变化不大。流式细胞仪检测 HLF/SVN 细胞凋亡指数低于 HLF 和 HLF/K。尽管凋亡指数变化幅度并不大, 但是前后检测 3 次, 转染组均稳定地低于未转染者。因此, 可以认为 survivin mRNA 导入 HLF 细胞后, 表达 survivin mRNA 及相应的蛋白质, 作用于凋亡途径中 caspases 蛋白酶, 阻断 caspase 蛋白酶的连锁激活, 结果抑制凋亡^[5], 使凋亡指数下降。Survivin 另一个功能是作用于细胞周期 G₂/M 期, 调节细胞有丝分裂与纺锤体的形成^[6], 促进细胞顺利通过 G₂/M 期调控点。转染 survivin mRNA 后凋亡细胞相对减少, 细胞生长曲线 HLF/SVN 快于 HLF 及 HLF/K 细胞, 差异有统计学意义。Song 等^[7]发现 Survivin 表达可以加速 T 细胞克隆的扩增。表明 survivin mRNA 表达能促进 HLF 细胞增生, 使细胞生长加快, 凋亡率下降。Kania 等^[8]报道, 在胃癌癌旁组织中 survivin mRNA 和蛋白表达升高, caspase 3 mRNA 和蛋白表达水平下降或消失, 认为形态学正常的组织 survivin mRNA 和蛋白表达升高, caspase 3 mRNA 和蛋白表达水平下降或消失, 存在癌变的可能。Salz 等^[9]在膀胱上皮细胞转染 survivin 基因出现了同样的变化, 认为 survivin 基因表达水平的变化, 出现在组织学异常之前, 有可能是肿瘤发生的早期标记。本实验 HLF 细胞转染 survivin mRNA 后细胞培养 10 周, 尽管未见细胞出现恶性转化的表型, 但是 survivin mRNA 和蛋白表达升高, caspase 3 表达水平降低, 此变化类似于癌旁组织的变化, 是否是肿瘤发生的早期变化, 有待于进一步研究。

(下转第 71 页 to page 71)

生长密切相关, 是骨生成的强刺激因子, 而 IGFBP-3 可加强 IGF-1 的作用。芪归合剂治疗的 NS 鼠和激素芪归合剂治疗的 NS 鼠的 BMD 均有升高, 分别与 NS 鼠和激素治疗的 NS 鼠相比, 虽未达统计学意义, 考虑可能与治疗、观察时间短有关。有作者提出, 用 BMD 测量的方法来确定某种药物是否有效, 至少要用两年的时间, 而检测血或尿中的一些骨生化标志, 如果药物有效, 在 3-6 个月内、甚至几周内这些指标就会发生变化^[9]。本试验用芪归合剂后血 OC、PINP 的变化比 BMD 的改变更明显, 提示我们如果在临床上应用此合剂, 可通过检测这些骨生化标志而早期了解药物的疗效并指导剂量的调整。

参考文献:

- [1] 蒋小云, 陈述枚, 林穗珍, 等. 芪归合剂促进肾病综合征鼠肝 IGF-1、IGFBP-3 表达的研究[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(9):550-553.
- [2] 蒋小云, 陈述枚, 黄绍良, 等. 芪归合剂对体外培养的大鼠成骨细胞生物学特性的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(2):117-120, 135.
- [3] BERTANI T, POGGI A, POZZONI R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rat: sequence of pathologic events[J]. Lab Invest, 1982, 46(1):16-23.
- [4] NISHIOKA T, KURAYAMA H, YASUDA T, et al. Nasal administration of salmon calcitonin for prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis in children with nephrosis[J]. J Pediatr, 1991, 118(5):703-707.
- [5] SIERRA R I, SPECKER B L, JIMENEZ F, et al. Biochemical bone markers, bone mineral content, and bone mineral density in rats with experimental nephrotic syndrome[J]. Ren Fail, 1997, 19(3):409-424.
- [6] 窦志艳, 张会丰, 田秀巧, 等. 用尿脱氧吡啶啉及羟脯氨酸排泄率评价肾病综合征患儿骨吸收功能状况[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(1):28-30.
- [7] LETTGEN B, JEKEN C, REINERS C. Influence of steroid medication on bone mineral density in children with nephrotic syndrome [J]. Pediatr Nephrol, 1994, 8(6):667-670.
- [8] KIM C H, CHENG S L, KIM G S, et al. Effect of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoids-induced bone loss[J]. J Endocrinol, 1999, 162(2):371-379.
- [9] 葛雪琳. 骨转换生化标志与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(2):85-88.

(编辑 张恩健)

(上接第 66 页 from page 66)

参考文献:

- [1] AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI D. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8):917-921.
- [2] RATHMELL J C, THOMPSON C B. Pathway of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease [J]. Cell, 2002, 109, Suppl: S97-107.
- [3] TEMME A, DIESTELKOETTER-BACHERT P, SCHMITZ M, et al. Increased p21 (ras) activity in human fibroblasts transduced with survivin enhances cell proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(3):765-773.
- [4] MA X, WANG S, ZHOU J, et al. Induction of apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells by antisurvivin oligonucleotides[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1):275-279.
- [5] STUCKI J W, SIMON H U. Mathematical modeling of the regulation of caspase-3 activation and degradation [J]. J Theor Biol, 2005, 234(1):123-131.
- [6] YANG D, WELM A, BISHOP J M. Cell division and cell survival in the absence of surviving[J]. PNAS, 2004, 101(42):15100-15105.
- [7] SONG J, SO T, CHENG M, et al. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion[J]. Immunity, 2005, 22(5):621-631.
- [8] KANIA J, KONTUREK S J, MARLICZ K, et al. Expression of survivin and caspase 3 in gastric cancer [J]. Disge Dise and Sci, 2003, 48(2):266-271.
- [9] SALZ W, EISENBERG D, PLESCIA J, et al. A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior [J]. Cancer Res, 2005, 65(9):3531-3534.

(编辑 黄小延)