

[文章编号] 1000-1182(2007)02-0173-04

Survivin基因在顺铂诱导Tca8113 舌鳞癌细胞凋亡中的作用

许建辉, 黄洪章, 潘朝斌, 张彬, 张磊涛
(中山大学附属第二医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 体外观察顺铂(DDP)诱导Tca8113舌鳞癌细胞株凋亡的作用, 同时检测在此过程中凋亡蛋白抑制因子Survivin mRNA表达和蛋白表达的变化。方法 将人Tca8113舌鳞癌细胞株进行传代培养, MTT法检测顺铂不同浓度和不同时间对Tca8113舌鳞癌细胞生长的抑制作用, 通过RT-PCR检测凋亡过程中Survivin基因mRNA的表达, 免疫细胞化学观察Survivin基因的蛋白表达, 以及流式细胞术观察顺铂诱导各组Tca8113细胞的凋亡率。结果 顺铂可明显抑制Tca8113舌鳞癌细胞的增殖, 其增殖抑制率呈浓度和时间依赖性, 细胞凋亡率也呈同样的趋势, 最高可达34.1%。1.0 μg/mL DDP处理Tca8113舌鳞癌细胞, Survivin mRNA和蛋白表达水平随时间的增加而降低, 在24 h达到最低, 随后又升高。结论 抗凋亡蛋白Survivin在Tca8113舌鳞癌细胞高表达, 顺铂可有效诱导Tca8113舌鳞癌细胞凋亡, Survivin mRNA表达在化疗早期随作用时间的延长而降低, Survivin基因的抑制在顺铂诱导的Tca8113舌鳞癌细胞的细胞凋亡中起着重要的作用。

[关键词] Survivin; 顺铂; 舌鳞癌; 凋亡

[中图分类号] R782 **[文献标识码]** A

Role of Survivin Gene on the Apoptosis of Tca8113 Cells Induced by Cisplatin XU Jian-hui, HUANG Hong-zhang, PAN Chao-bin, ZHANG Bin, ZHANG Lei-tao. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Objective To observe the induction of apoptosis of cisplatin (DDP) to oral squamous cell carcinoma cell line (Tca8113) in vitro and study the role of Survivin on the apoptosis of Tca8113 cells induced by cisplatin. Methods The inhibitory effects of different doses of DDP on Tca8113 cells were assayed with MTT test. Apoptosis was determined by flow cytometry. The expression of Survivin was detected by RT-PCR and immunocytochemistry. Results Cisplatin obviously inhibited Tca8113 cells growth in a dose and time dependent manner. The apoptotic index showed the similar trend. Survivin gene expression was decreased with increasing of time and reached the lowest level at 24 hours after DDP treatment, then increased after that time. Conclusion Cisplatin gene can effectively induce apoptosis in Tca8113 cells and the inhibition of Survivin gene expression may play a critical role on Tca8113 cell apoptosis induced by cisplatin.

[Key words] Survivin; cisplatin; tongue squamous cell carcinoma; apoptosis

口腔鳞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤, 约占全身恶性肿瘤的2%~3%, 而舌鳞癌的发病率位于首位^[1-2]。近年来, 以手术为主的综合治疗成为舌癌治疗的趋势, 提高了患者的生存率和生存质量。顺铂(cisplatin, DDP)为口腔癌术前和术后化学治疗最

为常用的抗癌药之一, 它可诱导细胞的凋亡^[3], 但顺铂对口腔鳞癌作用机制的研究较少。本研究旨在体外研究顺铂是否具有诱导Tca8113舌鳞癌细胞株凋亡的作用, 同时观察在此过程中凋亡抑制蛋白Survivin的表达变化, 探讨口腔鳞癌的化疗耐药机制, 及其在增强口腔鳞癌细胞化疗敏感性的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小牛血清(杭州四季青公司), DMEM培养基(Gibco公司, 美国), 药物DDP(Sigma公司, 美国),

[收稿日期] 2006-12-06; [修回日期] 2007-01-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271423); 广东省自然科学基金资助项目(21865)

[作者简介] 许建辉(1965-), 男, 江苏人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 黄洪章, Tel: 020-81332319

Survivin一抗(Santa Cruz公司, 美国), SP超敏试剂盒(中国迈新公司), IMS图像分析系统(上海申腾信息技术有限公司)。

1.2 细胞培养

在37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下, 在含有10%小牛血清、100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素的DMEM培养基中培养Tca8113舌鳞癌细胞株, 细胞为贴壁生长, 0.25%胰酶消化传代。

1.3 MTT试验(噻唑蓝比色分析法)

药物DDP分为0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/mL不同剂量组(用培养液稀释)。将4 × 10³个Tca8113舌鳞癌细胞株接种于96孔细胞培养板, 每组设6个复孔, 接种24 h后加入含各种浓度药物的培养液, 阴性对照不加药, 空白对照只加培养液, 于药物作用12、24、36、48 h后加入10 mg/L的MTT 20 μL, 培养4 h后吸出培养液, 加入200 μL DMSO, 振荡溶解10 min, 空白对照调零, 酶标仪检测波长595 nm时各孔的吸光值(A值)。

1.4 流式细胞术分析细胞凋亡

将5 × 10⁶个Tca8113舌鳞癌细胞接种于25 cm培养瓶, DMEM培养24 h, 经浓度为1.0、5.0 μg/mL的顺铂处理0、4、8、12、24、36、48 h后, 常规消化收集细胞(每个浓度均6瓶), 以预冷的PBS洗涤细胞, 用试剂盒提供的结合缓冲液490 μL重悬细胞, 各加入5 μL的AnnexinV-FITC和PI, 混匀, 将试管置于冰浴中, 避光孵育10 min, 立即上流式细胞仪检测。结果判定: FITC-/PI- 为活细胞, FITC+/PI- 为凋亡细胞, FITC+/PI+为坏死细胞。

1.5 RT-PCR反应检测Survivin mRNA表达

Tca8113舌鳞癌细胞经不同浓度(0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/mL)DDP作用2、4、8、12、24、48 h后, 应用Trizol试剂提取细胞内的总RNA。按RT试剂盒说明将5 μL RNA反转录成cDNA。取2 μL cDNA作模板行PCR扩增。Survivin引物上游为: 5'-TACAGCTTCGCTGGAACCT-3', 下游为: 5'-ACAGAGGCTGGATGCATT-3', 扩增片段大小为386 bp。β-actin引物上游为: 5'-GTCCACCTTCCAGCAGATGT-3', 下游为: 5'-AACCGACTGCTGTCACCTTC-3', 扩增片段为257 bp。反应条件为95℃变性4 min, 94℃变性30 s, 57℃退火1 min, 70℃延伸2 min, 30个循环, 最后70℃延伸7 min, 扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 并在凝胶成像系统进行分析。

1.6 免疫细胞化学及形态定量

1.0 μg/mL DDP处理Tca8113舌鳞癌细胞2、4、8、12、24、48 h后, 用免疫细胞化学方法对Survivin蛋白表达进行检测。Survivin一抗为兔抗人多克隆抗

体, 按SP超敏试剂盒的说明进行操作。Survivin染色爬片中, 如有细胞胞浆出现棕黄着色, 即为Survivin阳性。所有样本随机选取5个高倍视野(10 × 20), 以IMS图像分析系统对阳性细胞进行图像分析定量, 根据公式: 积分光密度=强度 × 面积 × K来计算积分光密度值, 其中K为面系数, 以平均值作为该例样本Survivin蛋白的表达强度。

2 结果

2.1 不同浓度的DDP对Tca8113舌鳞癌细胞的生长抑制

浓度为0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/mL的DDP作用于细胞12、24、36、48 h后的光吸收值见图1。从图1可见DDP对Tca8113舌鳞癌细胞生长的抑制作用具有时间和浓度依赖性, 且24、36、48 h各浓度与对照组比较均有统计学差异(P<0.05)。在0.5、1.0、2.5 μg/mL浓度组, Tca8113舌鳞癌细胞抑制率随时间延长增加不明显(P>0.05)。

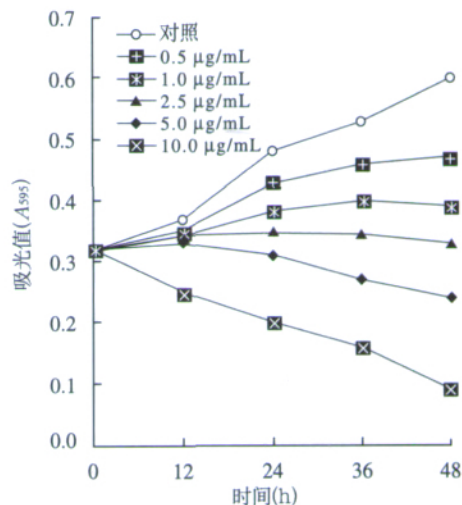


图1 不同浓度DDP对Tca8113舌鳞癌细胞生长抑制的影响
Fig 1 The relationship of growth inhibition and DDP concentration in Tca8113 cells

2.2 不同浓度DDP对细胞凋亡的影响

不同浓度(1.0 μg/mL、5.0 μg/mL)DDP作用于细胞后, 随着时间的延长, 凋亡率增加。用低浓度(1.0 μg/mL)DDP处理细胞, 随着时间的延长, 凋亡率的增幅不大; 用高浓度(5.0 μg/mL)DDP处理后, 细胞凋亡率在12 h急剧增加, 48 h可达34.1%(图2), 在12、24、36、48 h, 两种浓度DDP作用后细胞凋亡率比较有统计学差异(P<0.05)。

2.3 DDP作用后Survivin mRNA表达的变化结果

0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/mL的DDP作用12 h后, Survivin mRNA表达在各实验组间无统计学差异, 但是都比对照组低。1.0 μg/mL DDP处理Tca8113舌鳞癌细胞0、2、4、8、12、24、48 h后, Survivin

mRNA水平都比对照组有不同程度的降低,在24 h 时为最低,随后又升高(图3)。

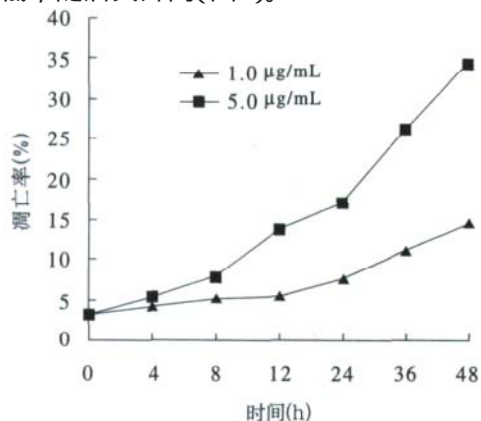


图2 不同浓度DDP对Tca8113舌鳞癌细胞凋亡的影响

Fig 2 Treatment of Tca8113 cells with DDP in a time and dose dependent increase in apoptotic cells

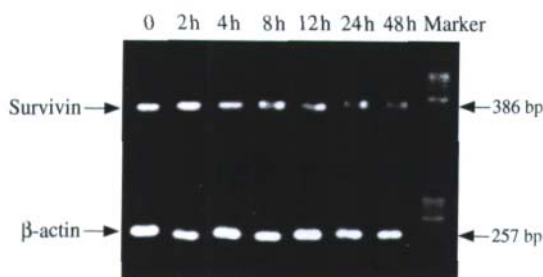


图3 1.0 µg/mL DDP处理Tca8113舌鳞癌细胞后不同时间的Survivin mRNA表达

Fig 3 The expression of Survivin mRNA after treatment with 1.0 µg/mL DDP

2.4 DDP处理Tca8113舌鳞癌细胞后Survivin蛋白表达的变化结果

1.0 µg/mL DDP处理Tca8113舌鳞癌细胞2、4、8、12、24、48 h,通过免疫细胞化学观察结果分析可见,DDP处理细胞Survivin蛋白表达水平比对照组有不同程度地减少,在24 h时达到最低,随后又升高(表1)。DDP处理后12、24、48 h, Survivin蛋白表达均比对照组明显下降($P < 0.05$)。

表1 1.0 µg/mL DDP处理后Survivin蛋白的表达 $n=6, \bar{x} \pm s$

Tab 1 The expression of Survivin by immunohistochemistry at different times after treatment with 1.0 µg/mL DDP $n=6, \bar{x} \pm s$

处理时间(h)	Survivin蛋白	
	对照组	顺铂处理组
2	80.52 ± 0.34	78.79 ± 0.56
4	84.63 ± 0.42	77.58 ± 0.65
8	83.48 ± 0.31	61.23 ± 0.49
12	82.69 ± 0.46	54.68 ± 0.57
24	86.54 ± 0.57	38.86 ± 0.41
48	83.37 ± 0.36	56.10 ± 0.43

3 讨论

Survivin是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族的一个新成员,可抑制细胞的凋亡和调节细胞的分裂。Survivin通常在绝大多数正常的成熟组织中不表达,但广泛表达于胚胎组织,并在大多数肿瘤组织有过表达,其中包括口腔鳞癌^[4]。Survivin的表达和许多肿瘤的生存率下降相关,有研究显示Survivin可作为口腔鳞癌预后的一个指标^[5]。同时Survivin的表达高低也涉及肿瘤细胞对放化疗的抗性问题,研究表明, Survivin通过抑制caspase-3和caspase-7而起到抑制凋亡的作用^[6]。

DDP是口腔鳞癌化疗的一线药物,临床上常用于口腔鳞癌术前或术后辅助治疗。提高口腔鳞癌细胞对化疗药物的敏感性、克服耐药无疑将提高舌癌5年生存率。DDP的抗肿瘤机制是通过和DNA结合,从而抑制DNA的合成^[7],人们发现一些肿瘤细胞对DDP产生耐药性。但是,人们对化疗药物下游事件即启动凋亡级联反应的认识远不及化疗药物的生化机制清楚,在细胞凋亡过程中存在多种基因的调控作用,与凋亡密切相关的基因有Survivin、p53、bcl-2等,这些基因在化疗药物诱导肿瘤凋亡过程中的变化及如何影响肿瘤细胞耐药性的产生目前尚无一致结论。

本研究通过化疗药物顺铂对细胞凋亡的作用及其引起Survivin表达的变化,探讨了细胞凋亡与化疗耐药的关系。免疫细胞化学检测Tca8113舌鳞癌细胞株有较高的Survivin表达,因此笔者用DDP诱导Tca8113舌鳞癌细胞凋亡来观察凋亡前后Survivin基因表达改变。研究发现Tca8113舌鳞癌细胞经DDP处理后,不论是高浓度还是低浓度均有不同程度的生长抑制。同时发现DDP诱导的细胞凋亡,随着时间的延长,凋亡细胞逐渐增加,且高浓度比低浓度在12~48 h凋亡率的增加更明显,说明凋亡发生和药物浓度、作用时间呈依赖关系,而药物浓度的依赖性更明显。低浓度的DDP作用48 h后,虽然细胞生长抑制率和细胞凋亡率均增加, Survivin表达又回升,可能有其他因素参与了细胞凋亡,例如p53、bcl-2途径。由此表明,化疗药物顺铂通过下调凋亡抑制蛋白Survivin基因的表达而达到促进凋亡的作用,从而抑制细胞的生长。

诱导细胞凋亡是化疗药物治疗舌鳞癌的重要机制之一, Survivin是调节舌鳞癌细胞凋亡率的重要因素,细胞凋亡率和Survivin表达可作为临床上对口腔鳞癌患者进行化疗方案药物选择、预后评价的参考指标。Ambrosini等^[8]研究表明Survivin反义核苷酸可

降低内源性Survivin mRNA表达,能够诱导肿瘤细胞的凋亡,并增强肿瘤细胞对化学药物的敏感性。有研究表明以Survivin基因为靶点的反义核苷酸和RNA干扰能显著提高膀胱癌细胞对化疗药物的敏感性,而RNA干扰显示出其强大的基因沉默功能^[9]。这些研究结果显示,化疗辅以Survivin为靶点的基因治疗可增加细胞凋亡,抑制细胞增殖,降低细胞凋亡的阈值,可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,为口腔鳞癌的治疗提供一条新的思路。

[参考文献]

[1] Jatin PS. Cancer of the head and neck(American cancer society atlas of oncology)[M]. London : Bc Decker Inc, 2001 :1- 4.
[2] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 3版. 北京 :人民卫生出版社, 2000 : 266- 267.
(QIU Wei-liu. Oral and maxillofacial surgery[M]. 3rd ed. Beijing : People s Medical Publishing House, 2000 266- 267.)
[3] Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, et al. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2000, 60(16) :4386-

4390.
[4] Tanaka C, Uzawa K, Shibahara T, et al. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis[J]. J Dent Res, 2003, 82(8) :607- 611.
[5] Lo-Muzio L, Farina A, Rubini C, et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Cancer Lett, 2005, 225(1) 27- 33.
[6] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7[J]. Biochemistry, 2001, 40(4) :1117- 1123.
[7] Johnsson A, Olsson C, Anderson H, et al. Evaluation of a method for quantitative immunohistochemical analysis of cisplatin-DNA adducts in tissues from nude mice[J]. Cytometry, 1994, 17(2) : 142- 150.
[8] Ambrosini G, Adida C, Srugo G, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting[J]. J Biol Chem, 1998, 273(18) :11177- 11182.
[9] Fuessel S, Herrmann J, Ning S, et al. Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA[J]. Cancer Lett, 2006, 232(2) 243- 254.

(本文编辑 王 晴)

开封市卫生学校招生简章

开封市卫生学校创建于1959年,是国家级重点中等职业学校、省级文明单位,师资力量雄厚,教学、实验、实习设施先进完善,学习生活环境优美,是新乡医学院开封分院。2007年招生情况如下:

层次	专业	学制	名额	学费	招生对象	备注
3+2大专	口腔医学(3+2)	5年	200名	前3年口腔医学2 300元/年,其他专业1 900元/年;后2年按当年大专标准收费。	参加07年河南省中招考的应、往届初中毕业生,达到当地录取分数线。外省学生5月20号前到我校学生科办理报名考试手续。	与漯河医专联办,毕业颁发漯河医学高等专科学校普通大专毕业证书。口腔双学籍另发中专口腔工艺技术毕业证书。
	临床医学(3+2)		100名			
	高级护理(3+2)		200名			
	中西医结合(3+2)		100名			
	口腔双学籍(3+2)		60名	另收与德国联办学费		
普通中专	口腔医学	4年	200名	2 300元/年	具有初中文化程度者,无论是否参加中招考,均可到学生科直接报名。	毕业颁发河南省教育厅验印的开封市卫生学校普通中专毕业证书;口腔双学籍发口腔医学证和口腔工艺技术证。
	口腔工艺技术	3年	200名	1 900元/年		
	卫生保健		200名			
	护理专业		300名			
	助产专业		150名			
	护理(英语护理方向)		50名			
	护理(口腔护理方向)	50名				
口腔双学籍	4年	60名	另收与德国联办学费			
成人本科	口腔医学(半脱产)	3年	200名	2 500元/年	参加07年成人高考(8月份报名,10月份考试),达到相应录取分数线的考生。外省学生8月10日前到学生科办理报名考试手续。	毕业分别颁发新乡医学院成人本科、专科毕业证书。
成人专科	口腔医学(半脱产)	3年	200名	2 300元/年		
	临床医学(半脱产)		200名			
	高级护理(半脱产)		200名			

地址:河南省开封市滨河路中段28号(从火车站、长途汽车总站、西站、东站乘17路公交车到卫校站下车)。电话:0378-2954447,2636016,2636006,13839963613(安老师),13937805375(厉老师),13839964586(杜老师),13707610831(马老师)。德国牙科技师项目部咨询热线:13803788789(席老师),13603782563(张老师)。学校网址: <http://www.kfwx.cn>;电子邮箱: kfwsxx@126.com;邮编:475003。