

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.12.009

肝细胞癌中Survivin mRNA和Survivin- Δ Ex3 mRNA的表达及临床意义

杨黎¹, 姬少绯², 朱振宇³, 张毅¹

Expression and Significance of Survivin and Survivin- Δ Ex3 mRNA in Hepatocellular Carcinoma

YANG Li¹, JI Shaofei², ZHU Zhenyu³, ZHANG Yi¹

1. Biotherapy Center, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Radiology, Orthopaedic Hospital of Zhengzhou City; 3. Department of Biochemistry, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University

Abstract: Objective To evaluate the expression and significance of survivin isomer (survivin- Δ Ex3) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of survivin and survivin- Δ Ex3 in 26 cases of hepatocellular carcinoma, 24 cases of pericarcinomatous liver tissue. The relationship between the expression of survivin- Δ Ex3 mRNA and clinicopathological data was determined. The relationship between survivin- Δ Ex3 and survivin was analyzed.

Results Positive survivin- Δ Ex3 mRNA expression was found in 15 out of the 26 (58%) patients but was completely negative in adjacent normal tissues. The expression of survivin- Δ Ex3 mRNA in HCC was not correlated with gender, HBsAg, cirrhosis, tumor number, tumor size, tumor encapsulation, tumor thrombus and lymph node metastasis ($P > 0.05$), but significantly correlated with histological differentiation and TNM stage ($P < 0.05$). There was no significant correlation between the expression of survivin- Δ Ex3 and survivin ($P > 0.05$). **Conclusion** The high-expression of survivin- Δ Ex3 might evaluate the invasion and progression of HCC, which had no correlation with the expression of survivin.

Key words: Survivin- Δ Ex3; Survivin; Isomer; Hepatocellular carcinoma; Clinicopathology

摘要:目的 探讨凋亡抑制基因Survivin异构体Survivin- Δ Ex3在肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)中的表达及其与临床病理之间的关系。**方法** 采用RT-PCR方法对26例肝细胞癌、24例癌旁组织Survivin及Survivin- Δ Ex3的mRNA进行检测。分析Survivin- Δ Ex3 mRNA表达与临床各项指标(性别、癌组织大小、临床病理分期、TNM分期等)之间的关系,分析Survivin- Δ Ex3与野生型肝细胞癌之间的相关性。**结果** 在26例HCC标本中, Survivin- Δ Ex3 mRNA阳性表达15例,占58%,阴性表达11例,占42%。HCC组织的Survivin- Δ Ex3 mRNA表达与患者性别、HBsAg、肝硬化、病灶单发或多发瘤、肿瘤的大小、包膜、癌栓及淋巴结转移无显著相关性($P > 0.05$),而与病理学分级和TNM分期有显著相关性($P < 0.05$)。癌旁组织中未见Survivin mRNA表达。Survivin- Δ Ex3的表达与Survivin之间无相关性($P > 0.05$)。**结论** Survivin- Δ Ex3与HCC的侵袭性和预后明显相关,且Survivin- Δ Ex3的表达与Survivin之间无明显关系,可以作为判断HCC侵袭性和进展的一个潜在预测指标。

关键词: Survivin- Δ Ex3; Survivin; 异构体; 肝细胞癌; 临床病理

中图分类号: R735.7 文献标识码: A

0 引言

细胞凋亡又称细胞程序性死亡,通过调节细胞增生与死亡的平衡来维持组织的内环境稳定。

Survivin基因又称存活素,是1997年由耶鲁大学的Ambrosini等^[1]克隆的一个抗凋亡基因,因含有细胞凋亡抑制蛋白家族的保守序列而将其归入凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族。研究表明,Survivin在恶性肿瘤组织中高表达,包括乳腺、肺、前列腺、结肠、胰腺、胃等部位的肿瘤以及神经母细胞瘤和淋巴瘤等^[2-3]。Survivin基因的异常高表达与肿瘤的发生、发展以及预后有关。Mahotka等^[4]在肾癌细胞株中发现了Survivin的2个异构体,Survivin- 2β 与Survivin- Δ Ex3。只有Survivin野生型与

收稿日期: 2012-09-17;修回日期: 2013-02-05

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(201303025); 河南省教育厅科学技术研究重点资助项目(13B320366)

作者单位: 1. 郑州大学第一附属医院生物细胞治疗中心, 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室; 2. 郑州市骨科医院放射科; 3. 中山大学中山医学院生化教研室

作者简介: 杨黎(1981-),女,博士,主治医师,主要从事肿瘤分子生物学研究

Survivin-ΔEx3具有抗凋亡的作用, Survivin-2β已经失去了原有的作用^[5]。目前, 尚未见有关Survivin-ΔEx3在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中表达研究, 本文就HCC中Survivin-ΔEx3的表达及其与临床病理特征之间的关系进行研究, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 组织标本

收集2005年8月—2006年5月中山大学附属肿瘤医院手术切除的HCC组织标本26例, 其中男性25例, 女性1例, 年龄35~67岁, 平均46.7岁; 距离肿瘤病灶2 cm的癌旁组织标本24例。标本获取后立即放入液氮中, 再放入-80℃冰箱中保存。

入选患者均签署知情同意书, 符合中山大学附属肿瘤医院伦理委员会规定。

1.2 引物设计

根据NCBI提供的Survivin及Survivin-ΔEx3的序列, 设计PCR引物, 片断长度分别为255 bp和237 bp(Takara公司合成), Survivin-ΔEx3引物上游序列: 5'-TCAAGGACCACCGCATCT-3', 下游序列: 5'-CGCACTTCTCCGCAGTTT-3'。Survivin引物上游序列: 5'-CAAGGACCACCGCATCTC-3', 下游序列: 5'-CCAAGGGTTAATTCTTCAAAC-3'。

1.3 实验方法

取冻存HCC及癌旁组织称重后加入液氮研磨, 加总RNA提取剂(Takara公司), 按照说明书要求, 提取组织总RNA, 放入-80℃冰箱中备用。一步法作RT-PCR(Takara公司试剂盒)检测, 50 μl反应体系包括: 10×一步法 RNA PCR 缓冲液 5 μl、MgCl₂(25 mM)10 μl、dNTP 混合物(各10 mM)5 μl、RNase 抑制剂(40 u/μl)1 μl、AMV RTase XL逆转录酶(5 u/μl)1 μl、AMV-Optimized Taq聚合酶(5 u/μl)1 μl、上游特异性引物(20 μM)1 μl、下游特异性引物(20 μM)1 μl、实验样品(≤1 μg 总RNA)1 μl、RNase Free dH₂O去RNA酶水 24 μl。反应条件见表1。反应结束后, 取PCR反应液5 μl进行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.4 临床资料

查阅每例患者的病历, 收集患者各项临床资

表 1 一步法RT-PCR反应条件

Table 1 The reaction parameters of one step RT-PCR

No.	Steps	Temperature	Time	Cycles
1	RT	50℃	30 min	1
2	Rtase inactivation	94℃	2 min	1
3	PCR	94℃	30 s	30
		52℃	30 s	
		72℃	45 s	

料, 包括: 性别、HBsAg、肝硬化、病灶单/多发、癌组织大小、包膜、癌栓、淋巴结转移、病理组织分级、TNM分期。病理组织学分级采用Edmondson分级, TNM分期采用国际抗癌联盟(UICC)和美国癌症联合委员会(AJCC)的分期方法。

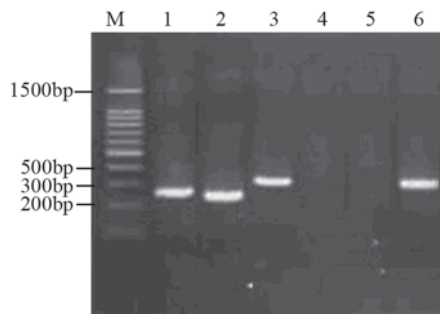
1.5 统计学方法

采用SPSS13.0统计分析软件, 利用卡方检验和精确概率法分析Survivin-ΔEx3在HCC中的mRNA表达情况及其与临床各项指标之间的关系。分析比对Survivin-ΔEx3与Survivin之间的差别与联系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR结果

HCC组织及癌旁组织中Survivin-ΔEx3、Survivin及β-actin的RT-PCR产物, 经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 结果见图1。可见在237 bp处有HCC Survivin-ΔEx3表达, 癌旁组织无Survivin-ΔEx3表达; 在255 bp处有HCC Survivin表达, 而癌旁组织中无Survivin表达; HCC及癌旁组织均有内参照β-actin表达。



M:DNA marker;1:Survivin in HCC tissues;2:Survivin-ΔEx3 in HCC tissues;3:β-actin in HCC tissues;4:Survivin in pericarcinomatous tissues;5:Survivin-ΔEx3 in pericarcinomatous tissues;6:β-actin in pericarcinomatous tissues

图 1 Survivin-ΔEx3及Survivin在HCC及癌旁组织中的RT-PCR产物

Figure 1 The RT-PCR results of Survivin-ΔEx3 and Survivin in HCC and pericarcinomatous tissues

2.2 Survivin-ΔEx3 mRNA的表达及其与临床各指标之间的关系

26例HCC标本中Survivin-ΔEx3 mRNA表达阳性的有15例(占58%), 表达阴性11例(占42%), 癌旁组织中未见Survivin-ΔEx3 mRNA表达, 两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 19.78, P < 0.01$)。Survivin-ΔEx3 mRNA表达与性别、HBsAg、肝硬化、病灶单发或多发瘤、肿瘤的大小、包膜、癌栓及淋巴结转移无显著相关性($P > 0.05$), 而与病理学分级和TNM分期显著

相关($P < 0.05$), 见表2。

2.3 Survivin-ΔEx3与Survivin之间的表达关系

在26例HCC组织中, Survivin-ΔEx3及Survivin mRNA表达均为阳性的有13例, 两者均为阴性的有4例。两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.2452, P > 0.05$), Survivin-ΔEx3及Survivin之间表达没有相关性。

3 讨论

Survivin基因位于17q25, 约15kb, 含有4个外显子和3个内含子。目前已经发现5种由于选择性剪接而产生的mRNA变体, 分别为Survivin、Survivin-2β、Survivin-ΔEx3、Survivin-3β、Survivin-2α。Survivin编码产生142个氨基酸, 而Survivin-ΔEx3被

选择性地剪切掉外显子3, 并引起外显子4区域编码顺序的改变, 终止密码子后移至3'端非翻译区, 编码产生137个氨基酸^[6]。国外有文献报道^[7], Survivin-ΔEx3主要表达于恶性肿瘤, 而Survivin-2β主要表达于良性肿瘤。

凋亡抑制蛋白家族新成员Survivin的发现是细胞凋亡与肿瘤发生关系研究的又一重要进展。尽管细胞凋亡通路的异常在恶性肿瘤中很常见, 但迄今为止, 尚无明确证据表明抗凋亡基因在肿瘤发生中的具体作用; 而Survivin在肿瘤组织中独特的表达特性及其与肿瘤进展和预后的密切联系, 使抗细胞凋亡与细胞恶变的关系更为接近^[8]。同时由于Survivin在促进细胞周期, 加速细胞分裂过程中, 常诱导一些与细胞周期相关的癌基因异常活化, 这使抗凋亡基因与癌基因的划分变得模糊, 迫使人们今后从新的角度认识和界定两类基因在肿瘤分子发病机制上的功能和地位。

研究^[9]发现Survivin基因表达于胚胎和发育的胎儿组织, 而在正常的终末分化的成人组织中没有表达。Survivin在恶性肿瘤组织中高表达, 包括乳腺、肺、前列腺、结肠、胰腺、胃等部位的肿瘤以及神经母细胞瘤和淋巴瘤等^[3-5]。在结直肠癌与乳腺癌中, Survivin阳性的患者比Survivin阴性的患者有着更低的凋亡指数以及更差的生存率^[10]。在膀胱癌的患者中, Survivin的表达与肿瘤的恶性程度成正比。在非小细胞肺癌与食管癌中, Survivin与更差的预后相关。此外, 对于肿瘤组织的微转移病灶也检测到Survivin表达阳性的细胞, 虽然并不是所有的肿瘤微转移病灶都能检测到Survivin, 但是对于存在Survivin阳性表达的微转移病灶, 都非常明显地出现凋亡抑制与促进细胞增殖的情况。多方面研究提示, Survivin可能是一种癌基因, 参与多种肿瘤的发生发展, 是一个有潜在价值的肿瘤标志, 与肿瘤的预后密切相关^[11-12], 可作为肿瘤治疗的新靶点^[13-18]。

本研究中发现, Survivin-ΔEx3在HCC组织中的表达与病理组织分级和TNM分期成正相关, 提示Survivin-ΔEx3与HCC的发生发展及预后密切相关, 可作为HCC治疗的新靶点。同时, 本研究显示Survivin-ΔEx3与Survivin两者之间的表达差异无统计学意义, 提示两者之间表达没有相关性, Survivin-ΔEx3发挥凋亡抑制作用不受Survivin的影响。

尽管人们目前对Survivin-ΔEx3认识还很局限, 但可以预见, 随着今后对Survivin-ΔEx3作用机制的不断揭示和阐明, 其在肿瘤诊治中的潜在价值必将得到全面发掘。

表 2 Survivin-ΔEx3mRNA与临床各项指标之间的关系
Table 2 The relationship between Survivin-ΔEx3 mRNA expression and clinical parameters

Clinical parameters	Survivin- Δ Ex3 mRNA expression		P
	positive (+)	negative (-)	
Gender			
Male	15	10	0.4231
Female	0	1	
HBsAg			
Positive	15	10	0.4231
Negative	0	1	
Cirrhosis			
Yes	14	9	0.5558
No	1	2	
Focus			
Solitary	10	9	0.6576
Multiple	5	2	
Size			
≥5cm	4	4	0.6828
<5cm	11	7	
Capsule			
Yes	6	3	0.6828
No	9	8	
Tumor thrombus			
Yes	5	2	0.6576
No	10	9	
Lymph node metastasis			
Yes	3	1	0.6137
No	12	10	
Histopathological grading			
I, II	3	6	<0.05
III, IV	16	1	
TNM staging			
I, II	2	9	<0.01
III, IV	13	2	

参考文献:

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997,3(8):917-21.
- [2] Kang DW, Choi CH, Park JY, *et al*. Ciglitazone induces caspase-independent apoptosis through down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells[J]. *Neurochem Res*, 2008,33(3):551-61.
- [3] Esh AM, Atfy M, Azizi NA, *et al*. Prognostic significance of survivin in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2011,27(1):18-25.
- [4] Mahotka C, Krieg T, Krieg A, *et al*. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2002,100(1):30-6.
- [5] Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel survivin splice variant expressed in human malignancies[J]. *Mol Cancer*, 2005,4(1):11.
- [6] Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, *et al*. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,314(3):902-7.
- [7] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer[J]. *Cancer Detect Prev*, 2009,32(4):308-13.
- [8] Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors[J]. *Curr Oncol Rep*, 2012,14(2):120-8.
- [9] Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, *et al*. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and dependent pathways[J]. *J Neurochem*, 2001,79(2):426-36.
- [10] O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003,3(2):131-52.
- [11] Kapoor S. Beyond pancreatic carcinoma: The close relationship between survivin levels and prognosis in systemic malignancies[J]. *World J Clin Oncol*, 2012,3(5):80-1.
- [12] Basta-Jovanovic G, Radojevic-Skodric S, Brasanac D, *et al*. Prognostic value of survivin expression in Wilms tumor[J]. *J BUON*, 2012,17(1):168-73.
- [13] Guo LD, Chen XJ, Hu YH, *et al*. Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway[J]. *Phytother Res*, 2012,27(3):422-30.
- [14] Sánchez-Rovira P, Antón A, Barnadas A, *et al*. Classical markers like ER and ki-67, but also survivin and pERK, could be involved in the pathological response to gemcitabine, adriamycin and paclitaxel (GAT) in locally advanced breast cancer patients: results from the GEICAM/2002-01 phase II study[J]. *Clin Transl Oncol*, 2012,14(6):430-6.
- [15] Ryan B, O'Donovan N, Browne B, *et al*. Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(1):120-4.
- [16] Xiong H, Yu S, Zhuang L, *et al*. Changes of survivin mRNA and protein expression during paclitaxel treatment in breast cancer cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007, 27(1):65-7.
- [17] Huang SJ, Tao JS, Cheng ZJ. Expression of survivin and its spliceosome Δ Ex3 in peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer[J]. *Guangdong Yi Yao*, 2011, 32(7):859-62.[黄少军, 陶建蜀, 程正江. Survivin及其剪接变体 Δ Ex3在胃肠道肿瘤患者外周血中的表达[J]. *广东医学*, 2011, 32(7):859-62.]
- [18] Zuo WG, Li YY, Nie YQ, *et al*. Expression of survivin gene and main transcript variants mRNA in colorectal[J]. *Chongqing Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2009, 34(7):852-6.[左文革, 李瑜元, 聂玉强, 等. Survivin基因及其主要剪接变构体mRNA在大肠癌组织中的表达[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(7):852-6.]

[编辑校对:安 凤]