

Survivin 及其异变体、P53 和 MDM2 在柔红霉素诱导 Jurkat 细胞凋亡中的变化

侯燕^{1△} 胡群² 熊昊³ 刘坚¹

【摘要】 目的:探讨 Survivin 及其异变体(Survivin-2B 和 Survivin-△Ex3)、P53 和 MDM2 在柔红霉素(DNR)诱导白血病 Jurkat 细胞凋亡中的变化。**方法:**DNR 设 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L 3 个浓度,作用 Jurkat 细胞 12 h、24 h 后,用 RT-PCR 方法检测 Survivin、Survivin-2B、Survivin-△Ex3、P53 及 MDM2 基因的 mRNA 表达变化,用 Western-blot 方法检测同样条件下 Survivin、P53 及 MDM2 蛋白表达的变化。**结果:**在 mRNA 水平,DNR 抑制 Survivin、Survivin-△Ex3 表达,促进 Survivin-2B、P53 表达,具有时间与浓度依赖性($P < 0.05$);DNR 抑制 MDM2 表达表现出时间依赖性和不完全浓度依赖性($P < 0.05$)。在蛋白水平,DNR 以时间和浓度依赖方式抑制 Survivin、MDM2 表达,促进 P53 表达($P < 0.05$)。**结论:**DNR 通过下调 Survivin、Survivin-△Ex3、MDM2 表达,上调 Survivin-2B、P53 表达,从而诱导 Jurkat 细胞凋亡,且呈时间和浓度依赖性。通过干扰 Survivin、Survivin-△Ex3 及 MDM2 的表达,有望提高白血病细胞对 DNR 的敏感性,从而提高临床缓解率及预后。

【关键词】 Survivin 及其异变体;MDM2;P53;Jurkat 细胞;柔红霉素

【中图分类号】 R733.7 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2013)07-0482-04

Change of Survivin and its splice variants, P53, MDM2 in the apoptosis of Jurkat cell induced by Daunorubicin

HOU Yan¹ HU Qun² XIONG Hao³ LIU Jian¹

(¹Department of Pediatrics, Center Hospital, Xiangyang, 441021, China; ²Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; ³Department of Hematology, Women and Children Health Care Hospital in Wuhan)

Corresponding author: HOU Yan, E-mail: julishi@163.com

Abstract Objective: To investigate the change of Survivin and its splice variants (Survivin-2B and Survivin-△Ex3), P53, MDM2 in the apoptosis of Jurkat cell induced by Daunorubicin (DNR). **Method:** Jurkat cell was treated by DNR with different concentrations (0.1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L) for 12 h and 24 h. Survivin, Survivin-2B, Survivin-△Ex3, P53 and MDM2 mRNA were measured by RT-PCR. The expression of Survivin, P53, MDM2 proteins were detected by Western-blot. **Result:** The mRNA expressions of Survivin and Survivin-△Ex3 were inhibited by DNR in time- and dose-dependent manners, but the mRNA expressions of Survivin-2B and P53 were improved ($P < 0.05$). The mRNA expression of MDM2 was inhibited by DNR in time-dependent manner and not all dose-dependent manner ($P < 0.05$). Survivin and MDM2 proteins decreased by DNR in time- and dose-dependent manners, but P53 protein increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** DNR induces the apoptosis of Jurkat cell not only through inhibiting the expressions of Survivin, Survivin-△Ex3 and MDM2 but also improving the expressions of Survivin-2B and P53 in time- and dose-dependent manners. Leukemia cells may become susceptible to DNR via disturbing the expressions of Survivin, Survivin-△Ex3 and MDM2, thereby improving clinical remission rate and prognosis.

Key words Survivin and splice variants; MDM2; P53; Jurkat cell; Daunorubicin

Survivin 是 1997 年发现的凋亡抑制蛋白 (IAP) 家族中的一个特殊成员, 具有调控细胞增殖和抑制细胞凋亡的双重生物学效应。它广泛表达于胚胎组织及大部分的人类肿瘤细胞, 而不表达于正常已分化的组织。柔红霉素(DNR) 是儿童急性淋巴细胞白血病主要化疗药物之一, 对其不敏感提

示缓解率低及预后差。Survivin 有 3 个异变体, Survivin-2B、Survivin-3B 和 Survivin-△Ex3, 它们经常与 Survivin 同时表达于肿瘤细胞, 提示这些异变体可能参与了 Survivin 功能的调节, 但其作用不尽相同。对于 Survivin 及其异变体在儿童白血病方面的报道较少, 且 Survivin 及其异变体与 MDM2、P53 之间的相互作用尚不清楚。本文通过检测 Survivin、Survivin-2B、Survivin-△Ex3、P53 及 MDM2 在 DNR 诱导白血病细胞凋亡中表达的变化来阐明其相互关系, 为进一步探讨 DNR 耐药机制及临床治疗和判断预后提供指导。

¹襄阳市中心医院儿科(湖北襄阳, 441021)

²华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科

³武汉市妇女儿童保健医院血液内科

△现为武汉大学中南医院儿科在读博士(武汉, 441021)

通信作者: 侯燕, E-mail: julishi@163.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DNR 购于美国法玛西亚普强公司,引物扩增由上海 Invitrogen 公司合成, RNA 提取试剂盒为天根公司产品, M-MLV 逆转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒均为 Invitrogen 公司产品, BCA 试剂盒为北京碧云天公司产品, Survivin 抗体购于美国 Millipore 公司, P53、MDM2 抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 细胞培养及实验分组

Jurkat 细胞由武汉同济医院儿科血液实验室提供, 使用 10% FBS RPMI 1640 培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。DNR 经无菌 0.9% 氯化钠稀释, 设 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L 3 个浓度, 作用于 Jurkat 细胞 12 h、24 h 后行相关实验。

1.3 RT-PCR 检测 Survivin、Survivin-2B、Survivin-ΔEx3、P53 及 MDM2 基因的表达

①总 RNA 制备:按天根公司提供的试剂盒上建议的步骤操作, Unico-UV-2000 型分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度, 同时进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 的完整性。②逆转录反应体系及条件:20 μl 逆转录体系含有 RNA 模板 10 μl, 随机引物 (100 μmol/L) 1 μl, dNTP (10 mmol/L) 1 μl, 5×RT Buffer 4 μl, 0.1 mol/L DTT 2 μl, RNasin (40 U/μl) 1 μl, M-MLV RTase (200 U/μl) 1 μl。反应条件如下:25℃ 10 min; 37℃ 50 min; 72℃ 15 min, 待反应完毕于一 20℃ 保存备用。③ RT-PCR 反应体系及条件:25 μl 的 PCR 反应体系含有上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, cDNA 模板 2 μl, 2×RT SYBR Green SuperMix 12.5 μl, 反应在 MXP3000 实时定量 PCR 扩增仪上进行。反应条件如下:95℃, 3 min 退火; 95℃ 30 s, 62℃ 40 s, 40 个循环, 4℃ 保存。各目的基因引物序列如下: Survivin (206 bp) 的上游为 5'-GCCTGGCAGC-CCTTTCTC-3', 下游为 5'-ATGTTCTCTAT-GGGGTCGTCA-3'; Survivin-2B (108 bp) 的上游为 5'-GCCCAGTGTTTCTTCTGCTTC-3', 下游为 5'-GCCTCCCAAAGTGCTGGTATT-3'; Survivin-ΔEx3 (206 bp) 的上游为 5'-GCCTGGCAGC-CCTTTCTC-3', 下游为 5'-TTCCTTTGCAT-GGGGTCGT-3'; P53 (286 bp) 的上游为 5'-GCT-GCTCAGATAGCGATGGTC-3', 下游为 5'-GCA-CAAACACGCACCTCAA-3'; MDM2 (296 bp) 的上游为 5'-ATTGGTTGGATCAGGAT-TCAGTT-3', 下游为 5'-TTCAGGAAGCCAAT-TCTCACG-3'; GAPDH (113 bp) 的上游为 5'-CAT-GAGAAGTATGACAACAGCCT-3', 下游为 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'。④反应结

束计算机显示出样本的扩增曲线和 GAPDH 内参的标准曲线, 在扩增效率一致的情况下, 根据标本与内参的 Ct 值之差 ΔCt 计算出扩增产物的相对量 $2^{-\Delta Ct}$ 。 $\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{对照组}$, 对照组均为 0 h 未加药组。⑤琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 产物 15 μl 加入 2% 琼脂糖凝胶加样孔中, 恒压 110 V, 电泳 40 min 左右后, 用 GDS-8000 凝胶成像系统对扩增产物条带进行扫描观察并数字化储存。

1.4 Western-blot 检测蛋白表达

①细胞总蛋白样品制备, 使用 BCA 试剂盒测定各样品蛋白浓度, -20℃ 保存备用。②99℃ 煮沸 5 min 使蛋白变性, 配制 12% 分离胶及 5% 积层胶, 每孔上样 40 μg 进行垂直电泳约 3 h。以电压 30 V, 4 C 过夜转膜 (约 15 h)。③进行一抗、二抗孵育, ECL 化学发光法经曝光、显影、定影后, 显示蛋白条带。经 GDS-8000 型凝胶成像系统灰度扫描, 以目的条带与 β-actin 条带灰度比值为目的条带的相对含量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用方差分析, 方差齐时用 *F* 检验, 方差不齐时则用秩和检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNR 作用于 Jurkat 细胞后 Survivin、Survivin-2B、Survivin-ΔEx3、P53 及 MDM2 基因 mRNA 表达的变化

DNR 作用于 Jurkat 细胞 12 h、24 h 后, Survivin、Survivin-2B、Survivin-ΔEx3、P53 及 MDM2 基因 mRNA 表达的变化, 见表 1。

2.2 Western-blot 检测 Survivin、P53 及 MDM2 蛋白表达

DNR 作用于 Jurkat 细胞后, Survivin 蛋白表达呈现出明显的浓度与时间依赖性下调; 而 P53 蛋白表达呈现出明显的浓度与时间依赖性上调; MDM2 蛋白表达呈现出明显的时间依赖性, 但作用 12 h 无浓度依赖性, 作用 24 h 呈现出浓度依赖性下调 (图 1)。

3 讨论

Survivin 是近年来发现的 IAP 家族新成员, 1997 年由 Aaten 等应用效应细胞蛋白酶受体 1 (EPR1) cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中首先分离出来。在恶性肿瘤患者, Survivin 过度表达常伴随病情恶化、耐药、疾病复发和存活率低, 抑制 Survivin 表达可以降低肿瘤生长潜能, 并使肿瘤细胞对化疗药物敏感性增加。随着对 Survivin 研究的深入, 其异变体逐渐被发现, 现已发现有 3 个异变体, Survivin-2B、Survivin-3B 和 Survivin-ΔEx3。Survivin-2B 缺少 N 端

表 1 DNR 作用于 Jurkat 细胞 12 h、24 h 后, Survivin、Survivin-2B、Survivin-△Ex3、P53 及 MDM2 基因 mRNA 表达

组别	12 h				
	Survivin	Survivin-2B	Survivin-△Ex3	P53	MDM2
对照组	1.92±0.16	0.19±0.05	1.37±0.12	0.41±0.03	0.88±0.10
DNR 组					
0.1 mg/L	1.68±0.27	0.31±0.08	1.18±0.08	0.63±0.04	0.84±0.03
1 mg/L	1.10±0.24	1.61±0.34	1.02±0.13	1.18±0.08	0.70±0.07
10 mg/L	1.09±0.10 ¹⁾	5.29±0.94 ¹⁾	0.89±0.10 ¹⁾	1.59±0.07 ¹⁾	0.65±0.07
组别	24 h				
	Survivin	Survivin-2B	Survivin-△Ex3	P53	MDM2
对照组	1.92±0.16	0.19±0.05	1.37±0.12	0.41±0.03	0.88±0.10
DNR 组					
0.1 mg/L	0.67±0.06 ³⁾	5.44±1.11 ³⁾	0.48±0.08 ³⁾	2.22±0.22 ³⁾	0.79±0.09
1 mg/L	0.58±0.10 ²⁾³⁾	6.05±1.04 ²⁾³⁾	0.45±0.05 ³⁾	5.46±1.31 ²⁾³⁾	0.40±0.06 ²⁾³⁾
10 mg/L	0.38±0.03 ¹⁾³⁾	7.82±1.37 ²⁾	0.51±0.02 ²⁾³⁾	5.97±0.19 ¹⁾³⁾	0.23±0.02 ¹⁾³⁾

与本组内 1 mg/L 比较, ¹⁾ P<0.05; 与本组内 0.1 mg/L 比较, ²⁾ P<0.05; 与本组内 12 h 比较, ³⁾ P<0.05。

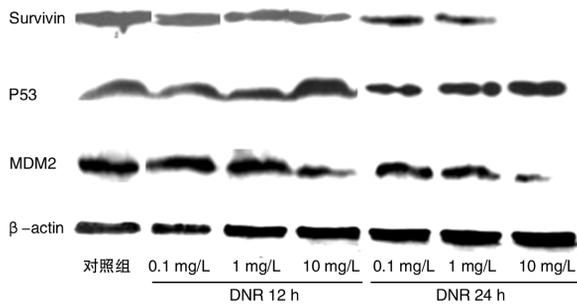


图 1 Western-blot 检测 Survivin、P53 及 MDM2 蛋白表达

杆状病毒 IAP 重复序列(BIR)结构,使其在抗凋亡中的作用明显下降,有可能是 Survivin 的天然拮抗因子。Survivin-3B 仅含有一段单一的 BIR,但它没有羧基末端螺旋结构,因此不具有 Survivin 的 G₂/M 期特异性表达的特点,其确切功能目前尚不清楚。Survivin-△Ex3 缺乏外显子 3,发生移码突变,产生一个 BH2 区域,并使其具有一个独特的特点——产生线粒体定位信号,线粒体定位信号和 BH2 区域的产生可能与 Bcl-2 有关,保护细胞免受凋亡,与 Survivin 功能相似。这些异变体经常与 Survivin 同时表达于肿瘤细胞,提示这些异变体可能参与了 Survivin 功能的调节。目前发现, Survivin 及其异变体在乳腺癌、肾癌、肝癌、胃癌、软组织肉瘤、脑肿瘤和白血病中均有表达,且均以 Survivin 为主。P53 是与肿瘤发生发展密切相关的凋亡相关基因,主要促进细胞凋亡和 DNA 修复而产生抑制细胞分化和增殖的作用。P53 基因诱导 MDM2 表达,而 MDM2 通过介导 P53 降解和抑制其转录水平而抑制其活性,从而使二者间形成负反馈调节。P53 和 Survivin 在功能上也存在类似于 MDM2 的联系,P53 可以结合到 Survivin 启动子上

抑制其表达^[1]。我们曾报道 Survivin 异变体在白血病患者中的表达及其与化疗缓解率的关系,并在细胞水平探讨 Survivin 在 DNR 诱导白血病细胞中的作用^[2-3],但其异变体与 P53 及 MDM2 的作用尚不清楚,本文对此做深入探讨。

我们检测到 DNR 作用于 Jurkat 细胞后,在 mRNA 水平,抗凋亡基因 Survivin、Survivin-△Ex3、MDM2 表达下调,促凋亡基因 Survivin-2B、P53 表达上调,说明 Jurkat 细胞发生凋亡改变。我们既往观察到 DNR 通过下调 Survivin,诱导 Caspase-9,3 表达诱导白血病细胞凋亡,此次研究从 Survivin 及其异变体方面再次证实 DNR 诱导白血病细胞凋亡是通过 Survivin 发挥作用, Survivin-△Ex3 抗凋亡, Survivin-2B 促凋亡。在乳腺癌细胞中通过 Survivin 及其异变体的反义核苷酸抑制其功能,观察到阻断 Survivin 及 Survivin-△Ex3 能抑制乳腺癌细胞生长,阻断 Survivin-2B 促进细胞生长^[4],从反面说明了 Survivin、Survivin-△Ex3 抗凋亡作用, Survivin-2B 促凋亡作用。甲状腺乳头状癌中 Survivin 及 Survivin-△Ex3 高表达可作为肿瘤生物学标志^[5],说明其在促进肿瘤发生中发挥重要作用,从侧面说明了其抗凋亡作用。结肠直肠癌中 Survivin-2B 低表达与肿瘤进展有关, P53 高表达伴随着 Survivin 低表达,与 Survivin-2B 表达一致,说明 Survivin-2B 具有抑制 Survivin 功能^[6]。Mario-ni 等^[7]观察到在喉癌中 Survivin 的高表达与高复发、无瘤生存期短有关,与我们在白血病患者中观察到的 Survivin 的不同定位与对化疗敏感性、预后均有关一致。在蛋白水平 Survivin、MDM2 表达下调, P53 表达上调,与 mRNA 水平一致,说明 Sur-

(下转第 487 页)

患者的预后存在相关性,并可以根据免疫表型情况进行预后判断并指导治疗。多数文献报道 CD34 为 AML 患者预后不良的因素之一^[5-6],但也有研究认为 CD34 的表达与预后无关。本研究结果表明,CD34 表达与 AML 患者的 CR 率无明显相关($P=0.709$)。造成研究结果不一致的原因可能是单一抗原表达情况尚不能得到可靠一致的预后意义,抗原结合或建立预后评分系统或许更准确的对 AL 进行预后判断。目前已有关于这方面的文献报道,有研究认为 CD34/CD11b、CD34/HLA-DR 共表达的 AML 患者与难治性 AML 相关,预后较非共表达组差^[7]。

综上,CD117 和 CD34 检测对于 AML 的诊断及鉴别诊断有重要意义。有关 CD34 抗原对 AML 患者预后的影响,由于本组患者例数较少,尚需更大样本观察才能有更准确的结果。

参考文献

[1] 庞文正,滕淑萍,侯丽君. 急性髓系白血病细胞血管细胞黏附分子 1、CD34 和 CD117 的表达[J]. 中国组织工程研究,2012,16(36):6748-6752.

[2] 马丽丽,陈骞,戴海滨. 成人急性髓细胞白血病异常免疫表型特点及临床意义[J]. 哈尔滨医科大学学报,2012,46(3):253-256.

[3] 李庆,翟志敏,徐静玮,等. CD117 在急性白血病中的表达及其临床意义[J]. 白血病. 淋巴瘤,2006,15(3):176-178.

[4] 田文洪,莫志芳,王晓燕,等. CD34,CD38,CD117 抗原在急非淋白血病细胞中的表达[J]. 医学信息,2011,24(6):121-121.

[5] WEBBER B A,CUSHING M M,LI S. Prognostic significance of flow cytometric immunophenotyping in acute myeloid leukemia[J]. Int J Clin Exp Pathol,2008,1:124-133.

[6] JUNGHANSS C,WAAK M,KLOPP A,et al. Multivariate analyses of prognostic factors in acute myeloid leukemia: relevance of cytogenetic abnormalities and CD34 expression[J]. Neoplasma,2005,52:402-410.

[7] 赵玥,徐娟,孙雪静,等. 白血病相关免疫表型与难治性急性髓细胞白血病的关系[J]. 标记免疫分析与临床,2010,17(4):238-241.

(收稿日期:2013-01-14)

(上接第 484 页)

vivin、MDM2 发挥抗凋亡作用,P53 发挥促凋亡作用。

综上所述,Survivin 不同变异体的具体生物作用和调控凋亡机制不同,其与 P53、MDM2 的相互作用亦不同,通过反义核苷酸可阻断其相应功能。通过研究 Survivin 不同变异体相应的临床抑制药物,将为白血病治疗提供一个新的途径。

参考文献

[1] SAH N K,KHAN Z,KHAN G J,et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. Cancer Lett,2006,244:164-171.

[2] 侯燕,胡群,何学琴. Survivin 在柔红霉素与长春新碱诱导白血病细胞凋亡中的作用[J]. 中国实用儿科杂志,2007,22(10):767-769.

[3] 胡群,侯燕,刘爱国,等. Survivin 在柔红霉素诱导白血病细胞凋亡作用机制中的研究[J]. 临床血液学杂志,

2008,21(6):597-599.

[4] ZHENG W Y,KANG Y Y,LI L F,et al. Levels of effectiveness of gene therapies targeting survivin and its splice variants in human breast cancer cells[J]. Drug Discov Ther,2011,5:293-298.

[5] VANDGHANOONI S,ESKANDANI M,MONTAZERI V,et al. Survivin-deltaEx3: a novel biomarker for diagnosis of papillary thyroid carcinoma[J]. J Cancer Res Ther,2011,7:325-330.

[6] CHO G S,AHN T S,JEONG D,et al. Expression of the Survivin-2B splice variant related to the progression of colorectal carcinoma[J]. J Korean Surg Soc,2011,80:404-411.

[7] MARIONI G,AGOSTINI M,BEDIN C,et al. Survivin and laryngeal carcinoma prognosis: nuclear localization and expression of splice variants[J]. Histopathology,2012,61:247-256.

(收稿日期:2013-01-30)