

# Survivin、Cyclin-B<sub>1</sub> 基因在胃癌组织中的表达及其相互关系

文亚渊, 刘宝华

文亚渊, 刘宝华, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042

重庆市科学技术委员会基金资助, No. 6832

项目负责人: 文亚渊, 400042, 重庆市大坪长江支路10号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科. wenyayuan@163.com  
电话: 023-68757248

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-11-04

## 摘要

**目的:** 观察凋亡相关基因Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>在胃癌组织中的表达, 探讨Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>的关系。

**方法:** 采用RT-PCR方法检测Survivin mRNA和Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在30例胃癌组织、10例正常胃组织标本中的表达。

**结果:** 30例胃癌组织中20例Survivin mRNA表达阳性, 10例正常胃组织无Survivin mRNA表达; 30例胃癌组织和10例正常胃组织均有Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达, 20例Survivin mRNA表达阳性的胃癌组织Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达水平明显低于10例Survivin mRNA表达阴性的胃癌组织和正常胃组织( $0.18 \pm 0.02$  vs  $0.52 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ), 10例Survivin mRNA表达阴性的胃癌组织Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达水平明显低于10例正常胃组织( $0.52 \pm 0.04$  vs  $0.90 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$  vs 正常胃组织)。

**结论:** Survivin在胃癌组织中的表达与Cyclin-B<sub>1</sub>表达水平呈负相关。

文亚渊, 刘宝华. Survivin、Cyclin-B<sub>1</sub> 基因在胃癌组织中的表达及其相互关系. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2860-2862  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2860.asp>

## 0 引言

Survivin是新近被克隆出的一种凋亡抑制蛋白<sup>[1]</sup>, 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中的一员. 但其与IAP家族其他成员不同, Survivin分子在正常组织中不表达, 而在胚胎发育组织及多数人类肿瘤组织中都有不同程度的表达<sup>[2]</sup>. 这为肿瘤治疗提供了一个新靶点. Cyclin-B是一类调节细胞周期的蛋白质, 他与细胞是否能够顺利地通过有丝分裂有关. 我们对Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>在胃癌组织中的表达及其相互关系进行了研究, 现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究对象 来自本院2001-2002年手术切除、病理证实的胃癌患者30例. 其中男性22例, 女性8例; 平均年龄57.6岁(21-70岁), 大于50岁者18例, 小于

或等于50岁者12例。

1.1.2 组织来源和分组 正常对照组: 30例胃癌患者手术时, 随机选择10例来自不同患者的距癌组织边缘10 cm以上的正常胃组织标本. 实验组: 30例来自不同患者的胃癌组织。

1.1.3 标本处理 所有标本取出后作好标记, 立即置入液氮中保存。

1.1.4 酶和试剂 Tripure 试剂盒、Oligo(dT)15 为美国Sigma公司产品, RNA酶抑制剂、M-Mulv 逆转录酶为美国MBI公司产品, dNTP为加拿大Sagon公司产品, Taq DNA聚合酶为美国Promega公司产品, PCR-Markers由中国华美生物工程公司提供, 其十条降解产物长度分别为1 200 bp、950 bp、815 bp、708 bp、657 bp、595 bp、515 bp、432 bp、298 bp、110 bp。

1.1.5 PCR 扩增引物 Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>以及PCR内参照GAPDH引物均由上海生物工程公司合成. Survivin引物序列: A: 5' -ATGCGCCGAGGCTGGCTTCATCCAC-3', B: 5' -TTGTAGTTTGTGCTATTCTGTGAATTA-3', 扩增片段长度963 bp. Cyclin-B<sub>1</sub>引物序列: A: 5' -CAGTCAGACCAAAATACCTACTGGGT-3', B: 5' -ACACC AACCAGCTGCAGCATCTTCTT-3', 扩增片段长度191 bp. GAPDH引物序列: A: 5' -CAC CATCTTCCAGGAGCGAG-3', B: 5' -TCACGCCACA GTTTCCCGGA-3', 扩增片段长度372 bp。

1.2 方法 采用RT-PCR方法测定正常胃组织、胃癌组织Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>的mRNA表达。

1.2.1 组织RNA提取 按1 mL Tripure加入100 mg组织的比例加入组织, 磨碎组织、制成匀浆, 液体倒入用DEPC处理过的EP管中, 依次加入氯仿、异丙醇、750 mL/L乙醇提取组织RNA, 取小部分样品, 在紫外分光光度计上测A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub>及A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值, 计算RNA浓度, 其余样品放入-70℃保存。

1.2.2 mRNA逆转录为cDNA 取样品RNA 4 μg用DEPC处理过的双蒸馏水补至10.5 μL, 依次分别加入RNase抑制剂0.5 μL、dNTP 2.0 μL、Oligo(dT)15 2.0 μL、5 × Buffer 4.0 μL、DEPC-DW 0.5 μL、逆转录酶1.0 μL, 合成的cDNA。

1.2.3 PCR反应体系 Survivin、Cyclin-B<sub>1</sub>、GAPDH均依次加入dNTP(0.5 μL)、MgCl<sub>2</sub>(1.5 μL)、10 × Buffer(2.5 μL)、cDNA(除GAPDH为1.0 μL外, 其余均为2.0 μL)、Taq酶(0.5 μL)、引物A(0.5 μL)、引物B(0.5 μL)、ddH<sub>2</sub>O(除GAPDH为18.0 μL外, 其余均为17.0 μL)。

1.2.4 PCR反应条件 Survivin: 94℃恒温5 min置于PCR

仪(94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s)30个循环后, 再72 °C恒温5 min, 放入4 °C冰箱保存; Cyclin-B1: 94 °C恒温5 min 置于PCR仪(94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s)30个循环后, 再72 °C恒温5 min, 放入4 °C冰箱保存。

1.2.5 电泳 取PCR产物与DNA上样Buffer混匀后按照4:1比例上样, 同时在另一点样孔中加PCR Marker 1  $\mu$ L. 60V电压进行电泳, 紫外灯下观察并拍照。将电泳凝胶置于Gel Doc 2000凝胶图像分析系统, 进行图像分析。

**统计学处理** 数据均以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 采用SPSS10.0软件进行 $\chi^2$ 检验、方差分析和 $t$ 检验分析。  $P<0.05$ 表明差异有显著性。

## 2 结果

2.1 Survivin mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达 10例正常胃组织中均无Survivin mRNA表达, 30例胃癌组织中有20例Survivin mRNA表达阳性, 阳性率为66.7%。(图1)

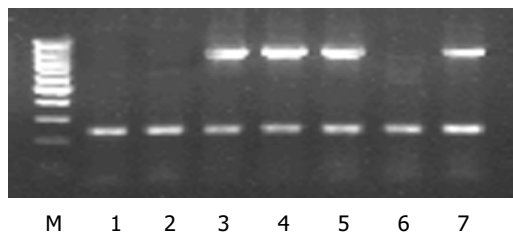


图1 Survivin mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达。M: PCR-Marker; 1: Survivin在正常胃组织中的表达; 2-7: Survivin在胃癌组织中的表达。Survivin在正常胃组织中及第2、6泳道的胃癌组织中无表达, 而在第3-7泳道的胃癌组织中可见阳性表达。

2.2 Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达 Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织均有表达, 在191 bp处可见一透亮带条。(图2)

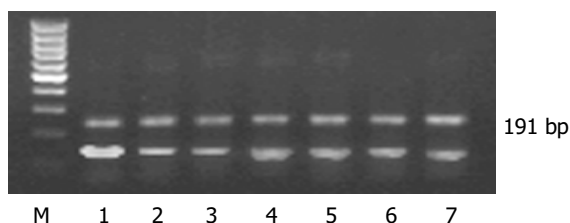


图2 Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达。M: PCR-Marker; 1: Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织中的表达; 2-7: Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在胃癌组织中的表达。Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中均有表达。

2.3 Survivin mRNA与Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中表达的关系 Survivin mRNA表达阳性胃癌组织的Cyclin-B<sub>1</sub>mRNA水平均较正常胃组织及Survivin mRNA表达阴性的胃癌组织显著下降( $P<0.01$ )。Survivin mRNA表达阴性胃癌组织的Cyclin-B<sub>1</sub>mRNA较正常胃组织显著下降( $P<0.01$ , 表1)。

表1 Survivin mRNA与Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达的关系(mean $\pm$ SD)

分组	n	Cyclin-B <sub>1</sub>
Survivin (+)	20	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>bd</sup>
Survivin (-)	10	0.52 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
正常胃组织	10	0.90 $\pm$ 0.04

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常胃组织; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs Survivin (-)。

## 3 讨论

肿瘤生物学认为肿瘤是一类细胞增生周期紊乱性疾病, 表现为细胞增生旺盛而凋亡发生障碍。细胞周期的调控在肿瘤的发生和治疗中有着重要作用<sup>[1]</sup>。研究发现在细胞周期的G<sub>1</sub>期及G<sub>2</sub>/M期存在检验点调控(check point control), 其功能是在细胞进行有丝分裂时控制有丝分裂器的装配, 维持细胞倍性, 保持细胞分裂的同步, 从而保证细胞周期在上游事件正确完成的前提下启动下游事件<sup>[4]</sup>。其中对G<sub>2</sub>/M检验点的存在控制遗传的忠实性和有丝分裂的完整性早有论述, 并已鉴定出参与其功能的一些基因家族如ATM-毛细血管扩张性共济失调症基因、辐射停滞缺陷基因9、21、24、27、p53等<sup>[5]</sup>。由于Survivin仅特异地表达于细胞周期的G<sub>2</sub>/M期, 因此可以推测Survivin基因对于细胞顺利地通过G<sub>2</sub>/M检验点, 并强迫细胞完成有丝分裂以维持细胞增殖活性具有重要作用。从这个意义上也可以认为Survivin是一种G<sub>2</sub>/M检验点调控相关基因。以往的一些研究发现干扰C.elegans和酵母中Survivin类似物的表达可以引起致死性的细胞分裂缺陷<sup>[6]</sup>。这说明Survivin基因在细胞有丝分裂中具有重要的调控作用。细胞周期检验点的调控除了修复损伤之外, 还可以通过诱导细胞凋亡来清除损伤的细胞。阻断细胞增生周期进程可以引起凋亡, 而凋亡也常伴有细胞生长阻滞, 细胞增生周期与凋亡密切相关<sup>[7]</sup>。Chen *et al*<sup>[8]</sup>研究发现, Survivin主要定位于有丝分裂末期的中体, Survivin表达的下调使细胞纺锤体能够延长但不能完成有丝分裂, 从而导致多核细胞纺锤体蓄积。相反地, Survivin表达升高, 则使细胞顺利地完成有丝分裂。我们的研究结果发现30例胃癌患者中有20例Survivin表达阳性, 而正常对照组10例中无1例有Survivin表达, 表明Survivin在胃癌组织中表达升高, 这已经为胃癌细胞顺利地完成有丝分裂而出现异常增生创造了先决条件。这也与Survivin特异地表达于细胞周期的G<sub>2</sub>/M期及其在纺锤体的定位等特性是一致的。另外, Survivin过表达除为细胞顺利地完成有丝分裂, 使其增殖活性升高外, 他还可以诱导肿瘤细胞发生抗凋亡作用。因此, 我们认为Survivin的作用就是联系细胞周期与凋亡的进展, 决定细胞进入G<sub>2</sub>/M期后的走向。当Survivin在细胞中过表达时, 可以促进细胞顺利地通过G<sub>2</sub>/M期, 完成有丝分裂, 使细胞异常增生, 导致肿瘤发生。所以, Survivin在肿瘤中的表达可能是在肿瘤细胞中产生一种防御机制, 使得肿瘤细胞由于G<sub>2</sub>/M期检验

点功能的丢失以及细胞凋亡阈值的增加而受益。

细胞周期素(Cyclin)是一类随着细胞周期的不同而发生变化的蛋白质,在G<sub>2</sub>期主要是CyclinB的表达增加<sup>[9]</sup>,有丝分裂结束时降低<sup>[10]</sup>。由于真核细胞M期的诱导由M期促进因子(M-phase promoting factor, MPF)来完成<sup>[11]</sup>,而MPF主要是由催化亚基P<sub>34cdc2</sub>和调节亚基CyclinB组成的激酶复合体(P<sub>34cdc2</sub>-cyclinB),即CyclinB是MPF的组成成分<sup>[12]</sup>。有人<sup>[13]</sup>研究发现CyclinB与细胞周期依赖性激酶P<sub>34cdc2</sub>结合组成的激酶复合体控制着有丝分裂期的进入与离开。CyclinB与P<sub>34cdc2</sub>结合, P<sub>34cdc2</sub>激酶的15-酪氨酸和14-苏氨酸脱磷酸而激活,使细胞进入M期进行有丝分裂,当进入有丝分裂后期, CyclinB的迅速降解,导致复合物释放出无活性的亚单位P<sub>34cdc2</sub>。P<sub>34cdc2</sub>失去活性,细胞才能退出M期,如果CyclinB降解受阻,细胞将无法退出,因而停滞于M期。本实验中,胃癌组织CyclinB<sub>i</sub>较正常胃组织水平低, Survivin表达阳性胃癌组织CyclinB<sub>i</sub>较Survivin表达阴性胃癌组织低,说明CyclinB<sub>i</sub>较低时,使进入M期的胃癌细胞完成有丝分裂后迅速退出M期,使细胞得以增生发展。因此, Survivin对细胞分裂周期的调控可能是通过CyclinB<sub>i</sub>表达来实现的。Survivin在肿瘤细胞进入G<sub>2</sub>/M期表达增加,引起CyclinB<sub>i</sub>表达降低,从而有利于细胞完成有丝分裂后退出G<sub>2</sub>/M期,而细胞有丝分裂的顺利完成为细胞异常增生及肿瘤发生、发展创造了先决条件。

#### 4 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-11182
- 2 Bao R, Connolly DC, Murphy M, Green J, Weinstein JK, Pisarcik DA, Hamilton TC. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:522-528
- 3 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828
- 4 Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629-634
- 5 Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664-1672
- 6 Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, Van-Driel R, Vaux DL, Lithgow T. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10170-10175
- 7 Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, Basi G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:603-612
- 8 Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowser LM, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, Reed JC, Ng SC. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia* 2000;2:235-241
- 9 Dynlacht BD. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 1997;389:149-152
- 10 Muschel RJ, Zhang HB, McKenna WG. Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Res* 1993;53:1128-1135
- 11 Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988;85:3009-3013
- 12 Gerhart J, Wu M, Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 1984;98:1247-1255
- 13 King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell* 1994;79:563-571

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 人胰腺癌组织中Th2类细胞因子的优势表达及其临床意义

张圣林,邱法波,吴力群,卢云

张圣林,邱法波,吴力群,卢云,青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科 山东省青岛市 266003

项目负责人:邱法波,266003,山东省青岛市江苏路16号,青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科, phulin@sohu.com

电话:0532-2911369

收稿日期:2004-09-13 接受日期:2004-10-20

### 摘要

目的:观察Th1/Th2类细胞因子在胰腺癌组织中的表达模式及临床意义。

方法:以IFN- $\gamma$ 和IL-2代表Th1类细胞因子,IL-4和IL-10代表Th2类细胞因子。收集45例胰腺癌患者的手术切除组织蜡块,以免疫组织化学PV-9000通用型二步法染色,

DAB显色试剂盒显色,检测胰腺癌组织中Th1/Th2类细胞因子的表达。

结果:IFN- $\gamma$ 和IL-2在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异( $P>0.05$ ),说明Th1类细胞因子在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异;IL-4和IL-10在胰腺癌组织中的表达明显高于正常胰腺组织( $P=0.022<0.05$ ;  $P=0.023<0.05$ ),说明Th2类细胞因子在胰腺癌组织中的表达明显高于正常胰腺组织。

结论:胰腺癌组织中Th2类细胞因子呈优势表达状态,这可能是肿瘤免疫逃逸的机制。