

文章编号: 1007-4627(2010)02-0202-04

Survivin 表达在高 LET 射线诱导细胞凋亡中 作用机理的初步研究*

金晓东^{1,2}, 李强^{1,2}, 吴庆丰^{1,2,3}, 李萍^{1,2,3}, 陶家军^{1,3},
巩莉^{1,2}, 戴中颖^{1,2,3}, 刘新国^{1,2,3}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院重离子束辐射生物学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

3 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 先前的研究表明, 肿瘤细胞中 survivin 的高表达与细胞对高传能线密度(LET)射线的辐射抗性相关。研究了 survivin 表达在高 LET 射线诱导的细胞凋亡中的作用, 发现抑制 survivin 表达
对高 LET C 离子辐射诱导的 Bcl-2 和 Bax 表达没有明显的影响。在高 LET 射线辐照中, survivin
可能通过抑制 caspase-3 和-9 活性的途径, 抑制了细胞凋亡。

关键词: 高 LET 射线; 凋亡; survivin

中图分类号: R730; Q691 **文献标识码:** A

1 引言

Survivin 是 1997 年发现的凋亡抑制蛋白家族(IAPs)的成员^[1], 其主要生理功能为促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡^[2]。Survivin 基因几乎在所有的人类肿瘤细胞中表达, 但在正常的末端分化组织中却很少能检测到^[3-5]。因此作为一个肿瘤特异性标记物, 其研究逐渐成为肿瘤治疗相关领域的热点。目前研究发现 survivin 的高表达与肿瘤细胞对低传能线密度(LET)射线(如 X 射线)的辐射抗性密切相关^[6-8]。

高 LET 重离子束在肿瘤放射治疗方面存在着倒转的深度剂量分布, 较高的相对生物学效应(RBE)、较低的氧增比(OER)等物理学和生物学特性上的优势^[9, 10], 因此被誉为是面向 21 世纪最理想的放疗用射线^[11]。在先前的研究中, 我们发现 survivin 的表达也是肿瘤细胞产生对高 LET 射线辐射抗性的原因之一^[12-14], 但是具体的分子机理目前还不清楚。本文从细胞凋亡角度出发, 研究了抑制人肝癌 HepG2 细胞 survivin 表达后, 在高 LET C 离子辐照下细胞中凋亡相关蛋白的表达差

异, 从而初步探讨了高 LET 射线辐照下 survivin 抑制细胞凋亡的分子机理。

2 材料与方法

2.1 细胞培养及转染

实验所用的人肝癌 HepG2 细胞株保存于中国科学院重离子束辐射生物学重点实验室, 培养基为含 10% 胎牛血清(兰州民海公司)的 DMEM(美国 GIBCO)培养液, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

用 RNA 干扰方法抑制 HepG2 细胞中 survivin 的表达。根据人类 survivin mRNA 序列(GenBank Accession No. NM-001168)第 1172—1189 位设计并合成 siRNA 寡核苷酸和错配序列(赛百盛, 北京)。序列如下: 5'-TGT GCTATTCTGTGAATT-3, 错配序列(MS)为 5'-TAAGCTGTTCTATGT-GTT-3'。合成序列均为硫代磷酸化修饰。将细胞分为未转染、错配组和 siRNA 组进行处理, 细胞转染过程和抑制 survivin 表达检测结果见文献^[12]。

* 收稿日期: 2009-06-17; 修改日期: 2009-07-02

* 基金项目: 国家高科技研究发展计划(863 计划, 2006AA02Z499); 中国科学院西部之光人才培养计划(0962030XBO); 中国科学院近代物理研究所博士后基金资助项目(0706130BSO)

作者简介: 金晓东(1976—), 男(汉族), 陕西蓝田人, 博士, 从事放射生物学研究; E-mail: jinxd@impcas.ac.cn

2.2 细胞辐照

辐照前 36 h, 将细胞接种于 $\phi 35$ 的培养皿中, 辐照前 12 h, 对 siRNA 组和错配组细胞进行转染。辐照采用由兰州重离子研究装置浅层肿瘤治疗终端引出的 C 离子, 能量为 80.55 MeV/u。C 离子经真空隔离镍窗、电离室、空气隙后抵达细胞样品时能量为 68 MeV/u (LET 值为 35 keV/ μm)。辐照在室温下进行, 吸收剂量率约为 4 Gy/min, 照射剂量分别为 0, 2 和 5 Gy。

2.3 Western blotting 检测

辐照后 24 h, 细胞用预冷的 PBS 洗两遍, 加入 RIPA 裂解液(碧云天生物有限公司)冰上裂解 30 min, 12000 g 离心 15 min, 上清为总蛋白。Bradford 试剂盒(碧云天生物有限公司)检测蛋白浓度。每泳道 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE, 将蛋白质电转到 PVDF 膜上(密理博公司), 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h, 加入一抗(1:400, V/V, Bcl-2 和 Bax 中杉金桥公司, caspase-9 博士德公司), 4 °C 杂交过夜, 洗膜, 转入偶联辣根过氧化物酶的二抗中(1:3000, V/V, cell signal 公司), 室温杂交 1 h, 洗膜后用 ECL 试剂盒(碧云天生物有限公司)检测。

2.4 Caspase-3 活性分析

采用碧云天生物有限公司 caspase-3 活性检测试剂盒进行检测。方法简述如下: 首先测定 pNA 曲线。辐照后 24 h 细胞消化裂解, 测定蛋白浓度。反应体系为待测样品 10 μl , 缓冲液 80 μl , Ac-DEVD-pNA(2 mM)10 μl , 总体积 100 μl , 37 °C 孵育过夜。用酶标仪在 405 nm 处测定其吸光值, 代入标准曲线可计算出 pNA 含量, 再除以蛋白浓度, 可得出样品单位重量蛋白中所含 caspase-3 的酶活力单位。

3 实验结果

3.1 Survivin 表达抑制后 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的结果

图 1 显示了 survivin 表达抑制之后, 凋亡相关蛋白的表达情况。在本实验中, 5 Gy C 离子辐照后, 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达明显减少, 而凋亡促进蛋白 Bax 明显增加, Bax/Bcl-2 比值增加, 说明 C 离子照射后细胞凋亡能力增加, 这与先前实验中细

胞凋亡的结果相一致^[12]。但在未转染、错配和 siRNA 处理的三组细胞中, Bcl-2 和 Bax 基本变化相同, 说明 survivin 抑制后对于间接调节凋亡的 Bcl-2 家族没有影响。

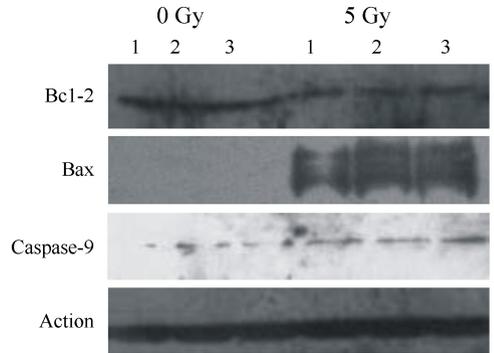


图 1 细胞内凋亡相关蛋白的表达

1 为未转染组, 2 为错配组, 3 为 siRNA 干扰组。

本实验中, 经 5 Gy C 离子照射后, 未转染组和错配组细胞中的 caspase-9 表达有所提高, 但是 siRNA 组与这两组相比细胞中 caspase-9 表达提高更明显, 说明抑制细胞中 survivin 表达后, 提高了 caspase-9 的表达, 促进了细胞凋亡。

3.2 抑制 survivin 表达后细胞内 caspase-3 活性的变化

Caspase-3 处于凋亡调节的下游, 是 caspases 家族中的执行分子, 当信号传递到它时, 它将执行细胞的凋亡程序。图 2 显示了经 0, 2 和 5 Gy C 离子辐照后, 细胞内 caspase-3 的活化情况。可以看出, 随照射剂量增加, 未处理组、错配组和 siRNA

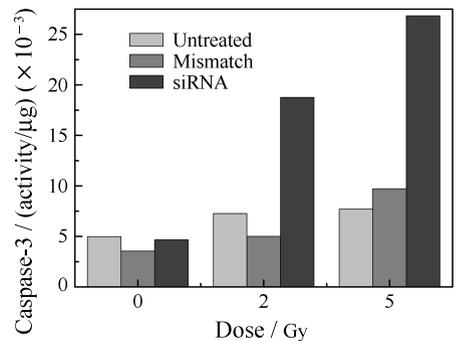


图 2 照射后 24 h, Survivin 表达抑制后细胞内每微克蛋白中 caspase-3 的活化情况

组细胞中的 caspase-3 活性都逐渐提高, 细胞凋亡能力也在提高。而 siRNA 组在 2 和 5 Gy 照射时, caspase-3 活性的提高幅度明显比其余两组大, 说明

survivin 抑制后, caspases 家族中的执行分子 caspase-3 活性也有提高。

4 讨论

细胞凋亡是一个非常复杂的细胞内信号传导的过程, 受多种因素精确地调控。肿瘤细胞中往往细胞凋亡信号通路调控异常, 这是肿瘤细胞对各种治疗手段诱导的凋亡产生耐受性的原因之一^[15]。在细胞内部凋亡过程中, 对于凋亡通路起主要调节作用的是三类蛋白: (1) Bcl-2 蛋白家族, 主要调节细胞线粒体膜的通透性, 从而决定细胞色素 c 的释放, 本研究涉及的 Bcl-2 蛋白主要是通过保持线粒体膜的完整性, 从而抑制细胞色素 c 的释放, 而 Bax 蛋白其作用是扩张线粒体外膜的通透性, 使凋亡相关蛋白如细胞色素 c 可以进入细胞质, Bax/Bcl-2 比值可以代表细胞凋亡能力^[16, 17]; (2) caspases 蛋白, 是细胞凋亡的启动和执行者, 我们所研究的 caspase-9 是启动分子, 主要参与的生理过程是: 凋亡小体中的 Apaf-1 通过其 CARD 区相互作用招募前 caspase-9。Caspase-9 随之发生自身催化, 将 caspase-3 招募到凋亡小体中, 启动 caspases 的级联反应^[18]; (3) IAP 蛋白, 主要作用为调节 caspases 活性。在凋亡信号刺激下, 这三类蛋白相互作用, 决定细胞是否进入凋亡程序^[19]。

本实验研究主要集中在高 LET 射线辐照下, IAP 家族中 survivin 抑制对凋亡通路中 caspases 和 Bcl-2 家族蛋白的影响, 进而是如何促进细胞凋亡的机理方面。首先, 从图 1 和图 2 可以看出, 高 LET 射线辐照后, 对 Bcl-2, Bax, caspase-9 和 caspase-3 的表达都有影响, Bcl-2 的表达降低, 下调了细胞凋亡的阈值。Bax 表达提高, 打开了线粒体外膜上的孔道, 促进了细胞色素 c 的释放。Caspase-9 表达的提高, 利于与凋亡小体形成复合物, 促进 caspase-3 的招募。前面这些蛋白表达的变化, 造成的结果是 caspase-3 活性的提高, 细胞进入凋亡程序。这是由本实验结果勾勒出的一个高 LET 射线辐照后, 细胞凋亡分子机理的一个简图。

那么 survivin 在这一过程中所起到的作用是什么? 由图 1 和图 2 的实验结果可以看出, 不管是否转染 siRNA, 即是否抑制了细胞中 survivin 的表达, 三组细胞中 Bcl-2 和 Bax 表达相同, 只受到 C 离子辐照的影响。而 caspase-9 的表达与上述两种

蛋白有所不同, 同样在 C 离子辐照后, 三组细胞中的 caspase-9 表达都增强, 而且明显可以看到 siRNA 组细胞中 caspase-9 的增强要比其余两组明显(图 1)。说明抑制 survivin 表达后, 促进了细胞中 caspase-9 的表达, 从而促进了细胞的凋亡。在 caspase-3 活性检测中也存在相类似的实验结果。一方面, 对于三组细胞来说 C 离子辐照促进了 caspase-3 的活化; 另一方面, siRNA 组活化程度明显比其余两组高, 从而使得 siRNA 处理的细胞凋亡明显加强。

由以上的实验结果, 在高 LET 射线诱导细胞凋亡过程的分子机理研究上, 可以得到以下两点结论: (1) survivin 表达与 Bcl-2 蛋白家族无关, Bcl-2 家族蛋白只受 C 离子辐照的影响, 是一个间接调节细胞凋亡的蛋白家族; (2) survivin 表达有可能会通过抑制 caspase-3 和-9 活性的途径, 从而抑制了细胞凋亡, 如果抑制 survivin 的表达, 提高 caspases 级联反应的强度, 有可能会促进细胞凋亡。这可能是 survivin 表达抑制高 LET 射线诱导的细胞凋亡的途径之一。Survivin 表达在高 LET 射线诱导的细胞凋亡中有可能是 caspase-3 和-9 的一个内源性抑制物。当然更精确的分子机理还需要进一步深入研究, 例如转染 survivin 真核表达载体进一步验证 caspase-3 和-9 的活性后才能得出。

参考文献 (References):

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. *Nat Med*, 1997, **3**: 917.
- [2] Altieri D C. *Nature Reviews Cancer*, 2008; **8**: 61.
- [3] Li F, Ackermann E J, Bennett C F, *et al.* *Nature Cell Biology*, 1999, **1**: 461.
- [4] Monzo M, Rosell R, Felip E, *et al.* *J Clin Oncol*, 1999, **17**: 2100.
- [5] Meng H, Lu C D, Sun Y L, *et al.* *World J Gastroenterol*, 2004, **10**: 3245.
- [6] Asanuma K, Moriai R, Yajima T, *et al.* *Jpn J Cancer Res*, 2000, **91**: 1204.
- [7] Rodel F, Hoffmann J, Distel L, *et al.* *Cancer Research*, 2005, **65**: 4881.
- [8] Rodel F, Frey B, Leitmann W, *et al.* *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2008, **71**: 247.
- [9] Blakely E A, Kronenberg A, *Radiat Res*, 1998, **150**(5 Suppl.), S126.
- [10] Li Qiang, Furusawa Y, Kanazawa M, *et al.* *Nuclear Physics*

Review, 2007, **24(2)**: 89(in Chinese).

(李强, Furusawa Y, Kanazawa M 等. 原子核物理评论, 2007, **24(2)**: 89.)

[11] Wei Shihua, Liu Qian, Nuclear Physics Review, 2008, **25(4)**: 402(in Chinese).

(魏世华, 刘倩. 原子核物理评论, 2008, **25(4)**: 402.)

[12] Jin Xiaodong, Li Qiang, Li Ping, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2010, **37(1)**: 79(in Chinese).

(金晓东, 李强, 李萍等. 生物化学与生物物理进展, 2010, **37(1)**: 79.)

[13] Jin X D, Gong L, Guo C L, *et al.* Radiation and Environmental Biophysics, 2008, **47**: 399.

[14] Jin Xiaodong, Gong Li, Li Qiang, *et al.* Chin J Radiol Med

Prot, 2009, **29**: 1(in Chinese).

(金晓东, 巩莉, 李强等. 中华放射医学与防护杂志, 2009, **29**: 1.)

[15] Schulze-Bergkamen H, Krammer P. Semin Oncol, 2004, **31**: 90.

[16] Green D R. Cancer Cell, 2006, **9**: 328.

[17] Chipuk J E, Bouchier-Hayes L, Green D R. Cell Death and Differentiation, 2006, **13**: 1396.

[18] Bratton S B, Walker G, Srinivasula S M, *et al.* The EMBO journal, 2001, **20**: 998.

[19] Hunter A M, Eric C, LaCasse E C, *et al.* Apoptosis, 2007, **12**: 1543.

A Preliminary Study on Action Mechanisms of Survivin Expression in Cell Apoptosis Induced by High-LET Radiation^{*}

Jin Xiao-dong^{1, 2, 1)}, LI Qiang^{1, 2}, WU Qing-feng^{1, 2, 3}, LI Ping^{1, 2, 3}, TAO Jia-jun^{1, 3},
GONG Li^{1, 2}, DAI Zhong-ying^{1, 2, 3}, LIU Xin-guo^{1, 2, 3}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

3 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: It has been proven that over-expression of survivin in cancerous cell lines is related to the radioresistance of cells to high-LET radiation in previous work. In this study, action mechanisms of survivin gene in apoptosis induced by high-LET radiation were investigated. We found that inhibiting survivin by siRNA had no notable influence on Bcl-2 and Bax expressions induced by carbon ions. Survivin depressed cell apoptosis through the inhibition of the activities of caspase-3 and -9 possibly in cell apoptosis induced by high-LET radiation.

Key words: high-LET radiation; apoptosis; survivin

* **Received date:** 17 Jan. 2009; **Revised date:** 2 Jul. 2009

* **Foundation item:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z499); Western Light Talents Program of Chinese Academy of Science(O962030XBO); Postdoctoral Foundation of Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences(O706130BSO)

1) E-mail: jinxd@impcas.ac.cn