

NS-398 联合表阿霉素对肝癌 HepG2 细胞增殖及 survivin 表达的影响

The Effect of NS-398 Combined with Epirubicin on Cell Proliferation and Survivin Expression in Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2

LIU Zhi, YAN De-hui, CHEN Hui

刘 志, 严德辉, 陈 辉 (川北医学院附属医院, 四川 南充 637000)

摘 要: [目的] 探讨表阿霉素联合 COX-2 抑制剂 NS-398 对 HepG2 细胞增殖及 survivin 表达的影响。[方法] 不同浓度表阿霉素单药或联合不同浓度 NS-398 分别作用于肝癌 HepG2 细胞株, MTT 法测定表阿霉素联合 NS-398 对细胞生长的抑制率, RT-PCR 和免疫荧光法分别检测 HepG2 细胞中 survivin mRNA 与 survivin 蛋白表达量的变化。[结果] 单药表阿霉素对 HepG2 细胞有显著的抑制作用, 且与 NS-398 联合应用后抑制作用更明显。正常无药对照组 HepG2 细胞中 survivin 蛋白和 mRNA 均呈强表达, 表达水平分别为 68.970 ± 1.156 和 0.919 ± 0.021 ; 且在胞浆中 survivin 蛋白表达强于胞核。表阿霉素组 HepG2 细胞中 survivin 蛋白 (47.630 ± 0.863) 和 mRNA (0.749 ± 0.014) 水平均明显降低, 联合组 survivin 蛋白 (27.544 ± 0.748) 和 mRNA (0.481 ± 0.012) 水平降低更显著 ($F=1065.233, P<0.05; F=304.553, P<0.05$)。[结论] NS-398 联合表阿霉素可明显抑制 HepG2 细胞生长, NS-398 可显著增强表阿霉素的抗癌作用; 两者联合可明显下调 HepG2 细胞株中 survivin 蛋白和 mRNA 的表达。

关键词: 肝癌; survivin; COX-2 抑制剂; NS-398; 表阿霉素

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)08-0619-05

肝癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤, 其死亡率在恶性肿瘤中列第 2 位。目前研究表明细胞凋亡抑制在恶性肿瘤的发生和生长中有重要的作用, 而 survivin 基因是目前发现克隆出的最小凋亡抑制蛋白。Survivin 能抑制细胞凋亡并能调节细胞有丝分裂, 在大部分人类肿瘤中呈阳性表达, 并且与细胞的恶性程度和肿瘤细胞的耐药性密切相关^[1]。COX-2 在肝癌细胞中呈阳性表达, 它能改变肝癌细胞生长周期, 促进血管内皮细胞生长, 抑制肿瘤细胞凋亡^[2]。

本研究使用不同浓度的表阿霉素和联合不同浓度的选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 分别作用于肝癌细胞 HepG2, 探讨表阿霉素与 NS-398 促进 HepG2 细胞凋亡与 survivin 表达间的关系, 以寻求新的治疗方案提高肝癌的疗效。

1 材料与方法

1.1 实验材料、仪器

肝癌细胞株 HepG2。兔抗人 Survivin 抗体

收稿日期: 2011-11-15; 收稿日期: 2012-06-15

通讯作者: 刘志, E-mail: liuzhi6661@126.com

(Santa Cruz 公司), AMV cDNA 第一条链合成试剂盒、Trizol RNA 提取试剂及 PCR 试剂盒 (上海生工), 表阿霉素 (辉瑞无锡制药有限公司), NS-398 (Cayman 公司), FITC 鼠抗兔 IgG 抗体 (中杉金桥生物技术公司)。RPMI 1640 培养液。德国激光共聚焦扫描显微镜: Leica TCS-SP2, 奥地利自动酶标仪: TECAN sunrise remote, 德国 PCR 仪: Master cycler PCR EPPENDORF, 美国凝胶成像仪: Gel doc 100 BIO-RAD, 美国紫外分光光度计: Bio-Rad Smart Spec3000。

1.2 实验方法

HepG2 肝癌细胞株在 5%CO₂, 37℃条件下, 培养于含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液内, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.1 MTT 法测定表阿霉素与 NS-398 对 HepG2 细胞生长的抑制率

实验共分 12 组, 每组设 6 个复孔, 对照组: ①溶剂对照组, ②无药细胞对照组; 表阿霉素组: ③2.40μg/ml, ④1.20μg/ml, ⑤0.60μg/ml, ⑥0.30μg/ml, ⑦0.15μg/ml; 联合组: ⑧表阿霉素 2.40μg/ml, NS-398 100.0μmol/L, ⑨表阿霉素 1.20μg/ml, NS-398 50.0μmol/L, ⑩表阿霉

素 0.60μg/ml,NS-398 25.0μmol/L,⑪表阿霉素 0.30μg/ml,NS-398 12.5μmol/L,⑫表阿霉素 0.15μg/ml,NS-398 6.30μmol/L。各组分别作用 24h、48h、72h。

取对数生长期细胞,以 5.0×10^4 个/ml 密度接种于 96 孔板,每孔接种体积为 200μl,在 37℃,5% CO₂ 条件下培养。24h 后,换含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液,并每孔加入 20μl 药物(终浓度见实验分组)培养,分别在 24h、48h、72h 后换 RPMI 1640 (不含血清)培养液,并加入 MTT(5.0g/L)20μl 继续培养 4h。弃上清液,每孔加入 DMSO 200μl 震荡 15min,使结晶物完全溶解,用自动酶标仪测定各孔的 OD 值 A(波长 570 nm)。细胞生长抑制率=(1-实验组 A/对照组 A)×100%。

1.2.2 免疫荧光测定 survivin 蛋白表达

实验分组:无药细胞对照组,表阿霉素组(1.20μg/ml)和联合组(表阿霉素 1.20μg/ml 和 NS-398 50.0μmol/L)。取对数生长期细胞,以 5.0×10^4 个/ml 密度接种于培养板,每孔接种体积为 1 000μl。24h 细胞贴壁后,换含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液,并每孔加入 100μl 药物。48h 后取出贴有细胞的盖玻片,4.0%的多聚甲醛固定 30min,经兔抗人 survivin 多克隆 IgG 抗体(浓度 1:100)及鼠标记的 FITC 抗兔 IgG 抗体(浓度 1:50)荧光染色后每组细胞在激光共聚焦高倍镜下取 6 个视野,测定全视野光度积分荧光平均值。

1.2.3 RT-PCR 测定 survivin mRNA 表达

实验分组:无药细胞对照组、表阿霉素组(1.20μg/ml)和联合组(表阿霉素 1.20μg/ml 和 NS-398 50.0μmol/L)。取对数生长期细胞以 5.0×10^4 个/ml 密度接种 5ml 于培养瓶中,在 37℃,5%CO₂ 条件下培养。24h 后,换含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液,每组加入 500μl 药物(终浓度见实验分组),在 37℃,5%CO₂ 条件下培养,48h 后 Trizol 法提取细胞总 RNA(经鉴定纯度符合要求)。Survivin 引物序列:上游引物:5'GGACTACCGCATCTCTACA'3,下游引物:5'CGCACTTTCTTTGCAGTTT'3,扩增片段为 350bp;内参照 GAPDH:上游引物:5'AATCTCATCACCATCTTCCA'3,下游引物:5'CCTGCTTCACCACCTT GTTG'3,扩增片段为 580bp。扩增条件:预变性 95℃

4min;变性 94℃ 30s;复性 55℃ 30s;延伸 72℃ 50s;35 个循环;延伸 72℃ 8min 补齐末端。

电泳染色后凝胶成像仪成像,350bp 和 580bp 处分别看到目的基因 survivin 片段和内参 GAPDH 片段,计算 survivin mRNA/GAPDH mRNA 的比值。

1.3 统计学处理

数据分析应用 SPSS10.1 统计软件分析,数据以实验平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SNK-q 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 表阿霉素联合 NS-398 对 HepG2 细胞生长的抑制作用

不同浓度表阿霉素及表阿霉素联合 NS-398 作用 HepG2 细胞的抑制率见表 1。由表中数据可见,单药表阿霉素对 HepG2 细胞增殖的抑制作用表现为时间剂量依赖性。表阿霉素与 NS-398 联合应用组也表现为时间剂量依赖性,且与相同浓度的单药表阿霉素组比较,联合用药组的抑制作用明显增强。

2.2 表阿霉素联合 NS-398 对 survivin 蛋白表达的影响

各组免疫荧光染色结果见图 1~3。胞浆中 survivin 蛋白的荧光较强,胞核中较弱;荧光在细胞核周围较强,在细胞周边较弱。说明 HepG2 细胞中 survivin 蛋白的表达主要位于胞浆中,而在细胞核中表达较少,并且在胞浆中核周围表达较细胞周边胞浆强。无药细胞对照组、单用表阿霉素组和联合组的 survivin 蛋白表达水平分别为 68.970 ± 1.156 , 47.630 ± 0.863 和 27.544 ± 0.748 , 差异有统计学意义 ($F =$

表 1 表阿霉素及表阿霉素联合 NS-398 对 HepG2 细胞的抑制率

组别	表阿霉素浓度 (μg/ml)	NS-398 浓度 (μmol/L)	抑制率(%)		
			24h	48h	72h
1	0	0			
2	0	0	0	0	0
3	2.40	0	55.67	75.07	87.70
4	1.20	0	52.68	66.92	75.32
5	0.60	0	35.73	46.00	56.43
6	0.30	0	8.46	20.02	33.42
7	0.15	0	4.51	7.97	15.93
8	2.40	100.0	62.94	81.46	89.77
9	1.20	50.0	45.23	66.55	74.77
10	0.60	25.0	23.57	41.94	51.19
11	0.30	12.5	7.42	14.57	29.05
12	0.15	6.30	1.62	4.71	9.18

1065.233, $P < 0.05$)。HepG2 细胞在经表阿霉素作用后 survivin 蛋白的表达明显降低, 表阿霉素与 NS-398 联合使用后 survivin 的表达量降低更显著。

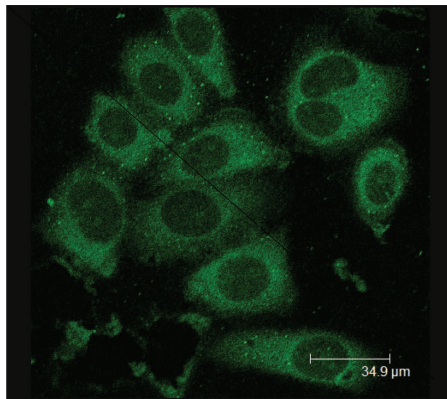


图 1 对照组荧光扫描图 ($\times 7163$)

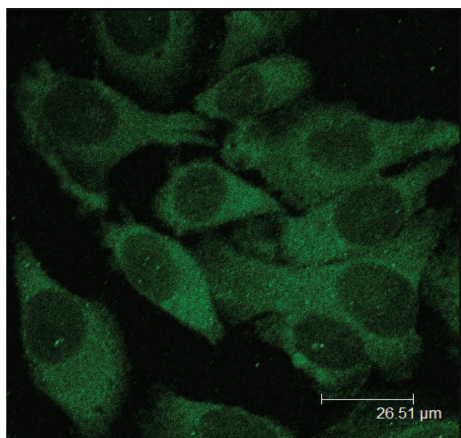


图 2 表阿霉素组荧光扫描图 ($\times 9430$)

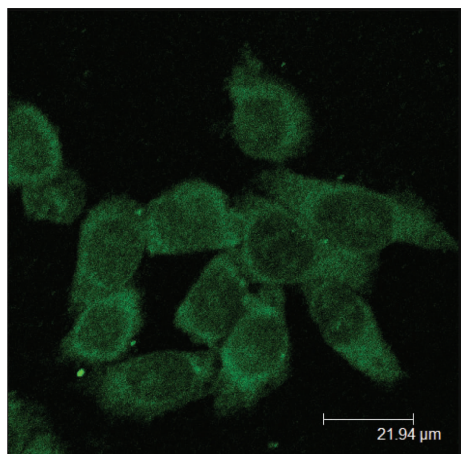
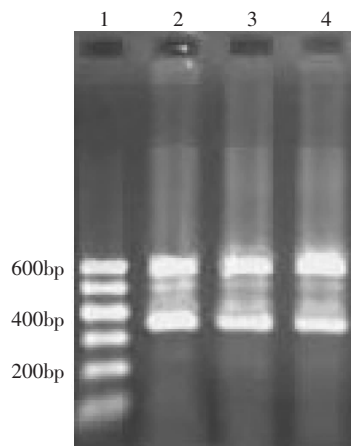


图 3 联合组荧光扫描图 ($\times 11395$)

2.3 表阿霉素联合 NS-398 对 survivin mRNA 表达的影响

用紫外分光光度仪测定所得纯化 RNA 的 A260 和 A280 比值, 结果在 1.8~2.0, 证明无污染。2%琼脂糖电泳后见 5s、18s、28s 三条特征带, 表明所得 RNA 符合要求。

RT-PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳, 经溴化乙锭染色, 凝胶成像后结果见图 4。580bp 为 GAPDH mRNA 扩增产物, 350bp 为 survivin mRNA 扩增产物。在无药细胞对照组中 survivin mRNA 表达较高 (0.919 ± 0.021), 经表阿霉素作用后 survivin mRNA 表达量 (0.749 ± 0.014) 降低, 联合组 survivin mRNA 表达量 (0.481 ± 0.012) 降低更显著, 3 组间 survivin mRNA 表达水平有显著性差异 ($F = 304.553$, $P < 0.05$), 与 survivin 蛋白表达量改变一致。



1:DNA Marker, 2:无药细胞对照组, 3:表阿霉素组, 4:联合组

图 4 RT-PCR 扩增产物电泳图

3 讨 论

目前共发现了 8 种凋亡抑制蛋白, 其结构共同特点是含有 1~3 个相串联的半胱氨酸/组氨酸杆状病毒 IAP 重复序列 (baculovirus IAP repeat, BIR) [3]。Survivin 是肿瘤凋亡抑制蛋白家族的重要成员, 为最小的凋亡抑制蛋白, 分子量为 16.5kD, 由 142 个氨基酸组成, 定位于 17q25, 基因长约 15kb, 含有 3 个内含子和 4 个外显子, 其 N 端只含有一个 BIR, C 端是由 40 个氨基酸构成的 α 螺旋结构, 并缺少其它

抑制蛋白所特有的指环结构, α 螺旋结构包含作为蛋白质之间相互作用的疏水区,能与纺锤体的微管作用^[4,5]。

肝癌组织中 survivin 蛋白和 mRNA 的表达水平和肝癌细胞的增殖能力密切相关。Mamori 等^[6]用免疫组化法研究发现 22 例肝癌组织中 survivin 的阳性表达率为 62.36%。本实验中我们检测到 HepG2 细胞中 survivin 蛋白和 mRNA 均强表达,且在胞浆中 survivin 蛋白表达明显强于胞核,在胞浆中的核周围表达量强于胞浆周边。这与 Fortugno 等^[7]的研究 survivin 蛋白在细胞中浆核比为 6:1 相近;但与 Nourae 等^[8]研究发现在胞核中 survivin 表达强于胞浆不同,这可能是由于 survivin 4 种剪切体(survivin- Δ Ex3、survivin-2B、survivin-3B 和 survivin-2 α) 在细胞中的定位不同^[1]。Survivin-2B 是在 survivin 基础上增加了外显子 B2 含有 165 个氨基酸,survivin- Δ Ex3 由 survivin 外显子 3 剪切后产生含有 137 个氨基酸,而 survivin-3B 增加了外显子 3 同时缺失部分内显子 3 为 122 个氨基酸;survivin-2 α 由外显子 1 和 2 构成含有 128 个氨基酸^[9,10]。Survivin- Δ Ex3 增强了抗凋亡作用,而 survivin-2B 抗凋亡活性显著下降,survivin 和 survivin-2B 主要定位于胞浆,survivin- Δ Ex3 主要定位于胞核^[11,12]。

本实验中发现 HepG2 细胞经药物作用后,胞浆中的 survivin 表达明显降低,说明胞浆中 survivin 蛋白表达的强弱与细胞凋亡具有相关性。但 survivin 4 种剪切体在经药物作用后表达量的改变,细胞定位的变化以及与细胞分裂周期的关系还需要进一步研究。

本实验中我们发现表阿霉素能明显抑制 HepG2 细胞生长,并呈时间剂量依赖性,表阿霉素可能通过抑制 HepG2 细胞中 survivin 蛋白和 mRNA 的表达发挥其抗肿瘤作用,提示表阿霉素治疗作用与 survivin 表达量减低密切相关,我们可以通过小分子的 survivin 抑制剂 YM115 增强表阿霉素的抗癌作用^[13]。

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是合成前列腺素(prostaglandins, PGs)的关键酶,又称为前列腺素内源性过氧化物酶,目前已知其至少存在三种亚型: COX-1、COX-2 和 COX-3^[14]。在肝癌组织中 COX-2 表达明显高于癌旁肝组织,并与肿瘤细胞的分化程

度及侵袭力密切相关^[15,16]。研究表明选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 能通过下调 survivin 的表达抑制肝癌细胞的生长使肝癌细胞停滞在 G₀/G₁ 期,S 期细胞减少,促进肿瘤细胞凋亡^[17],同时 NS-398 可抑制肿瘤血管内皮细胞和血管祖细胞的生长,但 NS-398 对正常组织的血管内皮细胞生长并无抑制作用^[18]。

本实验中表阿霉素与 NS-398 联合应用后,能明显增强表阿霉素的抗肿瘤作用,减少表阿霉素的用量,提高肝癌的治疗效果。与相同浓度的单药表阿霉素组比较,联合组 HepG2 细胞中 survivin 蛋白和 mRNA 表达降低更显著,细胞凋亡率更高。表明 NS-398 增强表阿霉素的抗肿瘤作用与降低 survivin 表达量密切相关,NS-398 能通过下调 survivin 的表达,促进细胞凋亡。

综上,本研究表明表阿霉素与 NS-398 诱导 HepG2 细胞凋亡与 survivin 蛋白和 mRNA 表达量降低密切相关,联合用药能增强阿霉素的抗癌作用,减少表阿霉素的使用剂量。而对于 survivin 及其剪切体在有丝分裂中的亚细胞定位以及在凋亡中的具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Kelly RJ, Lopez-Chavez A, Citrin D, et al. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin[J]. Mol Cancer, 2011, 10:35-46.
- [2] Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5):1325-1332.
- [3] Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(1):61-70.
- [4] Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, et al. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16):5000-5005.
- [5] Vader G, Kauw JJ, Medema RH, et al. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody[J]. EMBO Rep, 2006, 7(1):85-92.
- [6] Mamori S, Matsushima M, Matsuura T, et al. Survivin is expressed in early hepatocellular carcinoma and surrounding hepatitis tissue [J]. Mol Med Report, 2009, 2(6):

- 911-915.
- [7] Fortugno P, Wall NR, Giodini A, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 3):575-585.
 - [8] Nouraei N, Mowla SJ, Ozhand A, et al. Expression of survivin and its spliced variants in bladder tumors as a potential prognostic marker[J]. *Urol J*, 2009, 6(2):101-108.
 - [9] Antonacopoulou AG, Floratou K, Bravou V, et al. The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival[J]. *Anal Cell Pathol*, 2010, 33(5):177-189.
 - [10] Noton EA, Colnaghi R, Tate S, et al. Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(2):1286-1295.
 - [11] Pavlidou A, Dalamaga M, Kroupis C, et al. Survivin isoforms and clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinomas using real-time qPCR [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(12):1614-1621.
 - [12] 何雪峰, 温端改, 侯建全, 等. Survivin 及其异构体 survivin-2B 和 survivin-ΔEx3 在膀胱癌中的表达及临床意义[J]. *癌症*, 2009, 28(11):1209-1231.
 - [13] Satoh T, Okamoto I, Miyazaki M, et al. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(11):3872-3880.
 - [14] Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315(1):1-7.
 - [15] Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, et al. Cyclo-oxygenase-2 overexpression is a feature of early and well-differentiated hepatocellular carcinoma with a favourable prognosis[J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(8):690-693.
 - [16] Cheng J, Imanishi H, Liu W, et al. Involvement of cell cycle regulatory proteins and MAP kinase signaling pathway in growth inhibition and cell cycle arrest by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, in human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(8):666-673.
 - [17] Song IH, Kim DW, Shin KC, et al. Down-regulation of survivin in growth inhibition of hepatoma cells induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor[J]. *Korean J Hepatol*, 2008, 14(3):351-359.
 - [18] Muraki C, Ohga N, Hida Y, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(1):59-70.