

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.046.html

ICG-001 在肝癌中对凋亡抑制蛋白 Survivin 的影响

唐恩奇, 汪丽燕, 李滨, 蒋欢欢

摘要 目的 探讨 β -catenin 抑制剂 ICG-001 对 SD 大鼠肝癌组织中凋亡抑制蛋白 Survivin 的影响。方法 予二乙基亚硝胺喂养 SD 大鼠, 随后将已成瘤的大鼠分成对照组、DM-SO 组和给药组。用 ICG-001 抑制 β -catenin 的表达, Western blot 法检测 ICG-001 对大鼠肝癌组织中 Survivin 蛋白表达的影响; 实时定量 PCR 法检测 ICG-001 对肝癌组织中 Survivin mRNA 的影响。结果 用 ICG-001 抑制 β -catenin 的表达后, Western blot 结果显示, ICG-001 给药后 Survivin 的蛋白表达量降低。实时定量 PCR 结果显示, ICG-001 给药后 Survivin mRNA 表达量降低。结论 β -catenin 抑制剂 ICG-001 明显抑制 Survivin 的蛋白表达及 mRNA 表达。

关键词 肝癌; β -catenin; ICG-001; Survivin

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)02-0211-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.013

β -catenin 是经典 Wnt/ β -catenin 信号传导通路中的核心调控因子。在正常细胞中 Wnt 信号通路处于无激活的状态, 且 β -catenin 仅是作为一种细胞骨架蛋白在细胞的黏附中发挥作用^[1]。但当 β -catenin 在细胞质中累积到一定浓度的时候, 则会向细胞核转移。由此激活 Wnt 信号通路, 导致多种癌症如乳腺癌、结直肠癌、膀胱癌、肝癌的发生^[2-4]。Survivin 是细胞凋亡抑制蛋白家族中的最小成员^[5], 在分化成熟的正常组织中一般不表达, 但是在恶性肿瘤中呈高表达^[6], 是目前最强的细胞凋亡抑制因子。Survivin 目前被认为在恶性肿瘤细胞凋亡过程中起关键调控作用, 从而影响恶性肿瘤的发生发展, 因此可以作为肿瘤治疗与预后的一项检测指标。该研究通过使用 β -catenin 抑制剂 ICG-001 抑制大鼠肝癌细胞中 β -catenin 的表达, 观察对 Survivin 表达含量的影响, 探讨抑制 β -catenin 在肝癌中

的过表达对肿瘤细胞凋亡的影响作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只雄性 SD 大鼠, 约 250 g, 购自桂林医学院实验动物房。将成瘤后的 SD 大鼠随机分为对照组、DMSO 组和给药组, 每组 15 只。

1.2 主要试剂和仪器 二乙基亚硝胺 (美国 Sigma 公司); ICG-001 (美国 Selleck 生物科技有限公司); Survivin 兔抗鼠抗体 (美国 Abcam 公司); β -actin 兔抗鼠抗体 (沈阳万类生物科技有限公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 逆转录试剂盒、PCR 引物 (美国 Invitrogen 公司); 总 RNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂盒、DNA Marker (北京天根生化科技有限公司)。仪器包括冰冻高速离心机、超低温冰箱、电泳仪、转膜仪、PCR 仪等。

1.3 方法

1.3.1 肝癌动物模型的构造 本课题组前期已采用二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 喂养 SD 大鼠构造肝癌模型的方法构造大鼠肝癌模型^[7]。60 只雄性 SD 大鼠 (桂林医学院动物实验中心) 给予实验组含 DEN (76 μ g/ml) 的饮用水自由饮用, 连续饮用 6 周后, 改为自由饮水 3 周, 再继续给予含 DEN (76 μ g/ml) 的饮用水自由饮用至 20 周。在造模第 18 周随机抽取 6 只大鼠, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 暴露肝脏并观察拍照。再取肝脏标本, 用 10% 福尔马林固定 24 h 后常规石蜡包埋, 切片, 做 HE 染色, 并于光学显微镜下观察。

1.3.2 β -catenin 抑制剂 ICG-001 干预动物肝癌模型 实验组 60 只 SD 大鼠在第 20 周存活 48 只。于第 20 周开始, 选取 15 只大鼠继续不做任何特殊处理作为对照组; 选取 15 只大鼠作为 DMSO 组, 该组大鼠给予腹腔注射 DMSO 10 mg/(kg·d), 连续注射 10 d; 选取 15 只大鼠作为给药组, 该组大鼠腹腔注射 ICG-001 10 mg/(kg·d), 连续注射 10 d。10 d 后用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉各组大鼠, 暴露肝脏并观察拍照。剩余肝脏取肿瘤部分放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存以做后续研究。

2016-11-28 接收

基金项目: 广西壮族自治区教育厅科研基金资助项目 (编号: 2013YB155)

作者单位: 桂林医学院附属医院消化内科 桂林 541001

作者简介: 唐恩奇, 女, 硕士研究生;

汪丽燕, 女, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: 168wangliyan@163.com

1.3.3 Western blot 法检测 Survivin 蛋白表达 分别取 3 组肝脏肿瘤组织, 研磨后用 BCA 法进行蛋白定量, 后进行 Western blot 法检测。将提取的蛋白经 SDS-PAGE(15% 分离胶 + 5% 浓缩胶) 电泳后转移至 PVDF 膜(0.2 μmol/L) 上, 5% 脱脂奶粉加 TBST 室温下封闭 2 h, Survivin 一抗(1 : 1 000 稀释)与 β-actin 一抗(1 : 1 000 稀释)4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤, 二抗(1 : 5 000 稀释)孵育 2 h, TBST 洗涤, 与免疫印迹化学发光试剂(ECL 高灵敏)反应, 采用 Image J 软件检测目的蛋白 Survivin 与内参 β-actin 的灰度值。

1.3.4 半定量 RT-PCR 法检测 Survivin mRNA 表达

取各组肝脏肿瘤组织, 进行细胞总 RNA 提取以及 cDNA 的合成。引物序列设计如下: Survivin (110 bp) F: 5'-AGAACAAAATTGCAAAGGAGACC-3'; R: 5'-AGCAAAGGCTCAGCGTAAGG-3'。β-actin (183 bp) F: 5'-CCCTGAAGTACCCCATGAAC; R: 5'-TGGGTCATCTTTTCACGGTTG-3'。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环后, 72 °C 完整延伸 5 min。用含 2% 琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳, 并用凝胶成像分析系统拍照并计算灰度值, 以

β-actin 为内参, 半定量计算 Survivin 的 mRNA 表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异性比较采用独立样本 *t* 检验 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般生长及成瘤结果 60 只 SD 大鼠在第 18 周死亡 5 只, 存活 55 只中随机抽取 6 只进行肝脏解剖, 显示成瘤率为 83.3% (5 只成瘤, 1 只未成瘤) 后进行 HE 染色, 病理结果证实为肝癌。见图 1。

2.2 分组给药结果 20 周开始给予 DMSO 和 ICG-001 处理, 此时大鼠存活 48 只, 分 3 组, 每组 15 只。给药 10 d 后, 解剖所有大鼠。对照组大鼠死亡 3 只, 未成瘤 1 只; DMSO 组大鼠死亡 2 只, 未成瘤 2 只; 给药组大鼠死亡 2 只, 未成瘤 2 只。观察 3 组大鼠肝脏大体标本, 显示给药组肝脏肿瘤略小于其他 2 组(图 2)。

2.3 Western blot 法检测 ICG-001 对各组大鼠肝脏 Survivin 蛋白表达的影响 研磨各组大鼠肝脏组织并经过 BCA 蛋白定量后, Western blot 法检测

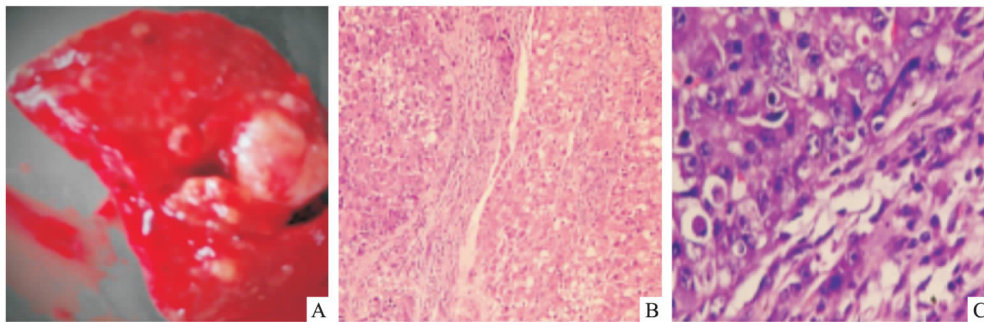


图 1 大鼠肝脏成瘤结果
A: 解剖后成瘤肝脏; B: 肝癌组织 HE × 100; C: 肝癌组织 HE × 400

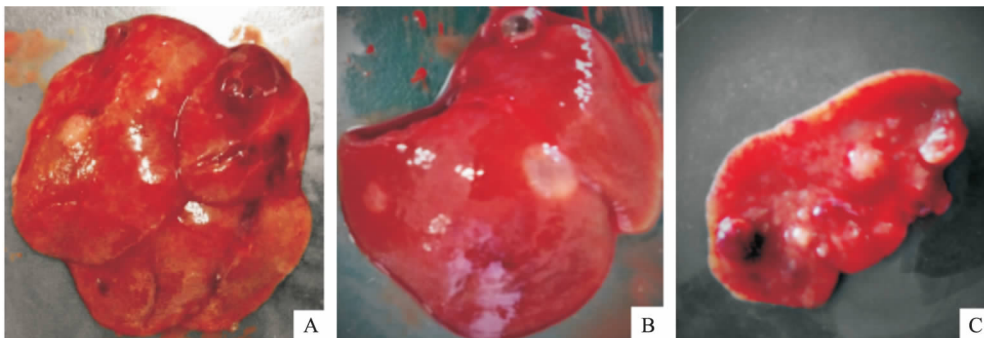


图 2 给予 ICG-001 后各组大鼠肝脏成瘤结果
A: 对照组; B: DMSO 组; C: 给药组

结果显示给药组 Survivin 的表达明显低于对照组,且差异有统计学意义($t=8.123, P=0.001$),而对照组和 DMSO 组差异无统计学意义。见图 3。

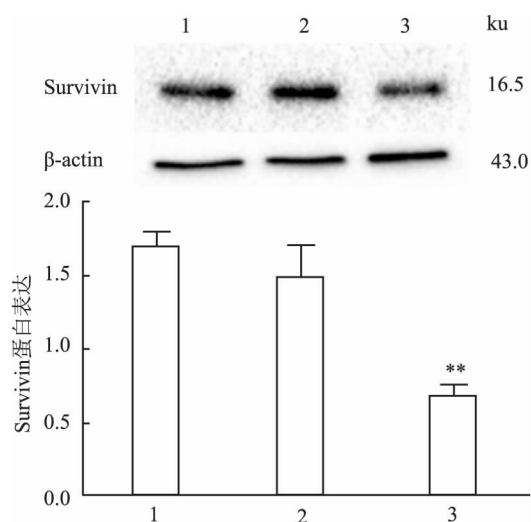


图3 各组大鼠 Survivin 蛋白的表达水平

1:对照组;2:DMSO 组;3:给药组;与对照组比较:** $P < 0.01$

2.4 半定量 PCR 法检测 ICG-001 对各组大鼠肝脏 Survivin mRNA 表达的影响 提取各组大鼠肝脏 RNA 后进行逆转录、PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳后,结果显示给药组 Survivin mRNA 表达较对照组明显降低,且差异有统计学意义($t=3.105, P=0.036$),而对照组和 DMSO 组差异无统计学意义。见图 4。

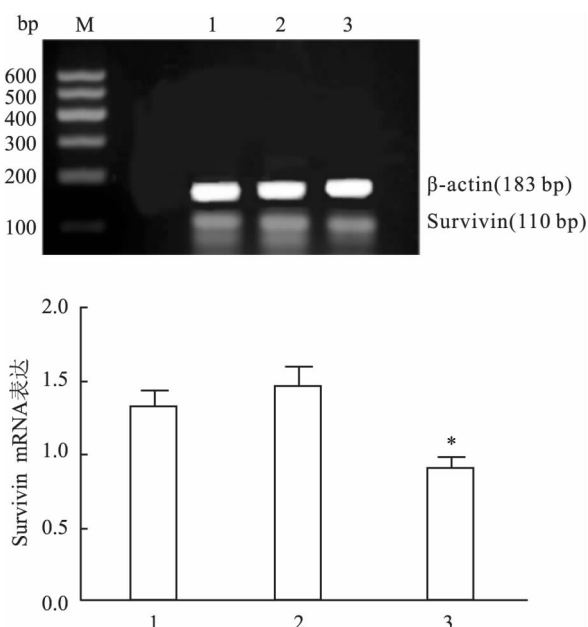


图4 各组大鼠 Survivin mRNA 的表达水平

M:DNA Marker; 1:对照组;2:DMSO 组;3:给药组;与对照组比较:* $P < 0.05$

3 讨论

肝癌的发生发展是一个动态的过程,涉及到至少 3 种信号通路的变化:p53、Rb 和 Wnt/ β -catenin 信号通路^[8]。其中,Wnt/ β -catenin 信号通路与大多数肝癌的发生均有联系^[9]。在肿瘤的发生发展过程中, β -catenin 起到至关重要的作用,在人类多种肿瘤的发生过程中均可显示 β -catenin 的活化作用^[10],肝癌就是其中一种。因此针对 β -catenin 信号通路的抑制剂可以为抑制肝癌细胞的增殖和分化在分子生物水平上提供有效的思路。目前已被显示或合成的 β -catenin 抑制剂有很多种,研究^[11]表明,FH535 是 Wnt/ β -catenin 信号通路一种有效的抑制剂,可以通过抑制 Survivin 和 cyclin D1 的表达从而抑制肝癌细胞的生长。XAV939 是通过抑制 TNKS1 和 TNKS2 而选择性抑制 Wnt/ β -catenin 介导的转录过程^[12]。本研究使用的 β -catenin 抑制剂是 ICG-001,是一种小分子抑制剂,对不同癌组织的发生和发展均起到重要作用。Emami et al^[13]发现,ICG-001 可以选择性诱导细胞凋亡,抑制结肠癌细胞的生长,并且证明对小鼠和裸鼠结肠癌移植瘤模型同样有效。Henderson et al^[14]实验证明 ICG-001 能显著抑制 β -catenin 表达,减轻 Bleomycin 诱导的小鼠肺纤维化。 β -catenin 的转录作用同时活化了诸多下游靶基因,包括 c-myc、cyclin D1 以及 Survivin^[13]。Survivin 的表达是由 CBP/catenin 介导的,并且 ICG-001 能有效抑制 Survivin 的转录和表达^[15]。本研究中对 ICG-001 的体内研究是基于肝癌动物模型之上,得出的结论能够证明 ICG-001 对 β -catenin 高表达的抑制作用,但是与其他信号通路之间的联系需要进一步研究。此外,本研究中通过运用 ICG-001 达到抑制 Survivin 在肿瘤中的表达,但实验结果只能表明 ICG-001 对 Survivin 的单向作用,关于其他可能引起 Survivin 表达量变化的因素还有待进一步研究。同时,在后续实验中可以检测 β -catenin 下游的其他靶基因,进一步研究 ICG-001 作为 β -catenin 抑制剂的生物学意义,希望能为肝癌的临床靶向治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Moon R T, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin [J]. Science, 2002, 296 (5573):1644-6.

- [2] Youssef N S ,Osman W M. Relationship between osteopontin and β -catenin immunohistochemical expression and prognostic parameters of colorectal carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol* ,2015 ,8 (2) :1503 – 14.
- [3] Suarez M I ,Uribe D ,Jaramillo C M ,et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinomas cases from Colombia [J]. *Ann Hepatol* 2015 ,14(1) :64 – 74.
- [4] Li Y ,Zheng Y ,Jzumi K ,et al. Androgen activates β -catenin signaling in bladder cancer cells [J]. *Endocr Relat Cancer* ,2013 ,20 (3) :293 – 304.
- [5] Pu F ,Shao Z ,Yang S ,et al. Association between functional variants in BIRC5/survivin gene 3' untranslated region and mRNA expression in lymphoblastoid celllines [J]. *Oncol Lett* ,2015 ,10 (4) :2319 – 22.
- [6] Ambrosini G ,Adida C ,Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene , survivin ,expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med* ,1997 ,3 (8) :917 – 21.
- [7] 柴红涛 ,唐恩奇 ,李 滨 ,等. N-亚硝基二乙胺 (DEN) 诱导 SD 大鼠肝癌模型的研究 [J]. *安徽医学* 2016 ,37(4) :383 – 5.
- [8] Laurent-Puig P ,Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors [J]. *Oncogene* 2006 ,25 (27) :3778 – 86.
- [9] Zucman-Rossi J ,Benhamouche S ,Godard C ,et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas [J]. *Oncogene* ,2007 ,26 (5) :774 – 80.
- [10] Giles R H ,van Es J H ,Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2003 ,1653 (1) :1 – 24.
- [11] Gedaly R ,Galuppo R ,Daily M F ,et al. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in liver cancer stem cells and hepatocellular carcinoma cell lines with FH535 [J]. *PLoS One* ,2014 ,9 (6) :e99272.
- [12] Huang S M ,Mishina Y M ,Liu S ,et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signaling [J]. *Nature* ,2009 ,461 (7264) :614 – 20.
- [13] Emami K H ,Nguyen C ,Ma H ,et al. A small molecule inhibitor of β -catenin/cyclic AMP response element-binding protein transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ,101 (34) :12682 – 7.
- [14] Henderson W R Jr ,Chi E Y ,Ye X ,et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ,107 (32) :14309 – 14.
- [15] Ma H ,Nguyen C ,Lee K S ,et al. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/ β -catenin-mediated survivin gene expression [J]. *Oncogene* 2005 ,24 (22) :3619 – 31.

Effect of ICG-001 on the apoptosis inhibitor protein Survivin in hepatocellular carcinoma

Tang Enqi ,Wang Liyan ,Li Bin ,et al

(¹Dept of Gastroenterology ,Affiliated Hospital of Guilin Medical College ,Guilin 541001)

Abstract Objective To investigate the effect of β -catenin inhibitor ICG-001 on the expression of apoptosis inhibitor protein Survivin in liver cancer tissues of SD rats. **Methods** SD rats were fed with diethylnitrosamine (DEN) , and then the rats which had tumor were divided into control group , DMSO group and administration group. ICG-001 was used to inhibit the expression of β -catenin. Western blot was used to detect the effect of ICG-001 on the protein expression of Survivin . The real-time quantitative PCR was used to detect the effect of ICG-001 on the mRNA of Survivin. **Results** ICG-001 inhibited the expression of β -catenin. Western blot results showed that the protein expression of Survivin decreased after administration of ICG-001. The real-time quantitative PCR results showed that the mRNA expression of Survivin decreased after administration of ICG-001. **Conclusion** β -catenin inhibitor ICG-001 significantly inhibit the protein expression and mRNA expression of Survivin.

Key words hepatocellular carcinoma; β -catenin; ICG-001; Survivin