

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.017

大鼠肝部分切除后肝再生组织中 Survivin 基因的表达变化

金玉姬,王德欣,陈晓黎,仇海峰,叶素素,侯青顺

(山东省青岛市传染病医院肝病科,青岛 266033)

【摘要】目的:探讨 Survivin 在大鼠肝部分切除(Partial hepatectomy, PH)后肝再生过程中的作用及其意义。方法:用 70%肝部分切除方法,建立 Wister 大鼠肝再生模型,在肝再生不同时间点,采用免疫组化及 Western blot 方法,检测肝组织中 Survivin 和细胞周期相关蛋白 CyclinD1 的表达。结果:在肝切除术后 12~72 h, Survivin 蛋白表达量明显增高,且在 48 h 达到峰值,细胞周期相关蛋白 CyclinD1 在术后 12、24、48、72 h 均表达上调,与 Survivin 蛋白表达具有高度相关性。结论:Survivin 蛋白的高表达与肝部分切除后肝再生过程密切相关。

【关键词】Survivin; CyclinD1; 肝切除; 肝再生

【中国图书分类法分类号】575.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-10-19

Expression of Survivin gene in hepatic regeneration tissue of rat after partial hepatectomy

JIN Yuji, WANG Dexin, CHEN Xiaoli, ZHANG Haifeng, YE Susu, HOU Qingshun

(Department of Hepatology, Infectious Diseases Hospital of Qingdao in Shandong Province)

【Abstract】Objective: To investigate the effects and its significance of survivin gene in rat liver regeneration after partial hepatectomy. Methods: Wister rat liver regeneration model of 70% partial hepatectomy was established. The expressions of Survivin and cell cycle-related protein cyclinD1 were detected by immunohistochemistry in liver regeneration rat tissues at different time points. Results: The level of Survivin protein expression was significantly increased during 12~72 h after partial hepatectomy and reached its peak at 48 h after partial hepatectomy. The level of cyclinD1 was upregulated at 12, 24, 48 h, and 72 h after partial hepatectomy and highly correlated with survivin protein level. Conclusion: The high expression of Survivin protein is significantly correlated with the liver regeneration after partial hepatectomy.

【Key words】Survivin; CyclinD1; hepatectomy; live regeneration

肝脏是体内重要的代谢器官,具有很强的再生能力。肝再生是涉及细胞增殖和凋亡的复杂过程。目前研究已知多种基因参与肝再生信号机制。Survivin 蛋白是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的最新成员。研究表明 Survivin 具有抑制细胞凋亡和促进细胞分裂双重功能,其与许多肿瘤的发生、发展及预后关系密切^[1-4]。这些研究结果提示 Survivin 可能在肝再生过程中肝细胞增生起重要作用。本实验利用制备 Wister 大鼠 70%肝切除模型,用免疫组化及 Western blot 方法检测肝再生过程中 Survivin 蛋白以及细胞周期相关蛋白 CyclinD1 的表达变化,探讨 Survivin 在肝再生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验设计及动物分组

健康成年雄性 Wistar 大鼠,体重 230~280 g,随机分为肝切除组(PH 组)和假手术组(SO 组)每组大鼠各 30 只;其余 6 只为未处理对照组,根据 Higgins 和 Anderson^[5]介绍的方法行肝部分切除(Partial hepatectomy, PH)术,PH 组和 SO 组术后 12、24、48、72、168 h 5 个时相点(每时相点 6 只)制备肝脏标本,未处理对照组大鼠(Normal)也制备肝脏标本,进行免疫组化和 Western blot 分析。

1.2 实验方法

1.2.1 采用 ABC 法免疫组化染色 试剂为 Survivin (FL-142)兔抗人多克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司产品,1:200 稀释,鼠抗人 CyclinD1 单克隆抗体 HD11,美国 DAKO 公司产品,1:40 稀释,ABC Kit 购自 Vector Laboratories Inc., Burlingame (USA),石蜡包埋的组织块制备 2 μ m 厚的切片,操作按试剂

作者介绍:金玉姬(1964-),女,副主任医师,博士,

研究方向:肝病基础与临床。

通信作者:侯青顺,男,副主任医师,Email:qdliver@163.com。

基金项目:山东省青岛市卫生局科研资助项目(编号:2011-WSZD079)。

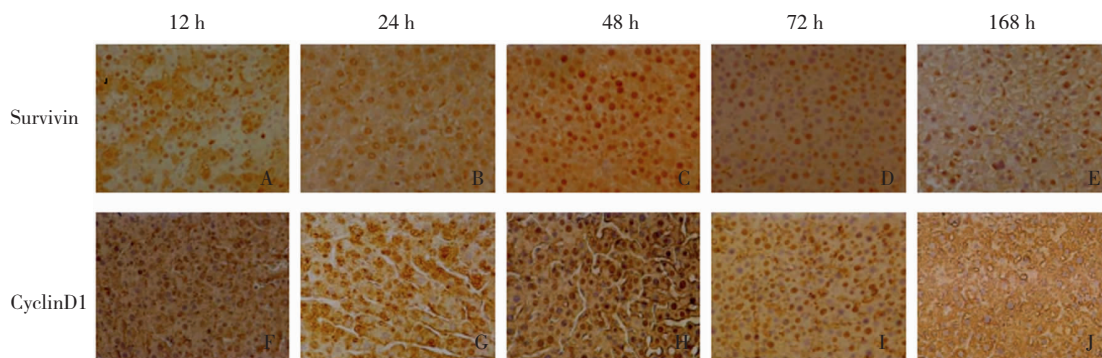


图 1 PH 后不同时间 Survivin 和 Cyclin D1 表达 (400 ×)

Fig.1 Expression of Survivin and Cyclin D1 after PH (400 ×)

盒说明书进行。阳性细胞为浅棕色、棕褐色或棕褐色颗粒状着色位于细胞核,计算 Survivin、CyclinD1 的标记指数(Labeling index, LI),每一切片选取 5 个有代表性的高倍视野(400×),每个视野随机计数 500 个细胞,计算阳性细胞百分率。每个指标的染色结果以其 LI(%)表示。

1.2.2 Western blot 检测再生肝组织中 Survivin、CyclinD1 表达情况 获取不同时间的大鼠再生肝组织,检测 Survivin、CyclinD1 的表达变化。参考《分子克隆实验指南》(第四版),加入组织裂解液超声裂解,提取组织中的蛋白。离心获取细胞上清,BCA法定量检测后,取 30 μg 蛋白样品上样,使用 6% SDS-PAGE 电泳胶进行电泳分离,然后电转移至 PVDF 膜,含 5%脱脂奶粉的 TBS 室温封闭 2 h,加一抗 Survivin、CyclinD1 (1:1 000)室温孵育 1.5~2.5 h,用 TBST 洗去一抗后加入相应二抗(1:2 000),室温孵育 2 h。化学发光法(ECL)显色。用图像分析软件测定所采集图像目的条带的负相光密度。实验重复 3 次,蛋白相对表达定量水平用目的条带的光密度与β-actin 条带密度之比值。

1.3 统计方法

采用 SPSS16.0 统计软件,显著性差异采用单因素方差分析的多重比较,Survivin 和 Cyclin D1 的关系用 Spearman 等级相关进行分析, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

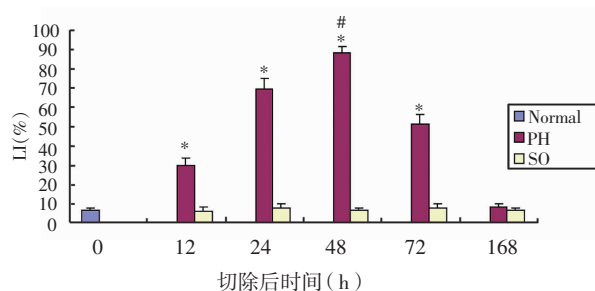
2 结果

2.1 免疫组化方法检测大鼠肝再生过程中 Survivin、Cyclin D1 的表达

2.1.1 Survivin 蛋白的表达 免疫组化结果,PH 能诱导 Survivin 蛋白的表达增高。Survivin 蛋白主要在细胞核中表达,细胞核可见粗大棕黄色颗粒(图 1)。

PH 后 12 h, Survivin 的表达开始明显增强,48 h 达到高峰,随后逐渐下降,至肝部分切除后 7 d 恢复到正常水平。肝部分切除术后 12、24、48、72 h Survivin 阳性的肝细胞核标记指数和相应的 SO 组、未处理组相比差异具有统计学意义($P<0.01$,图 2),PH 后 48 h Survivin 阳性的肝细胞核标记指数达到最高,与 PH 术后其他时相点相比差异具有统计学意义($P<$

0.01,图 2)。

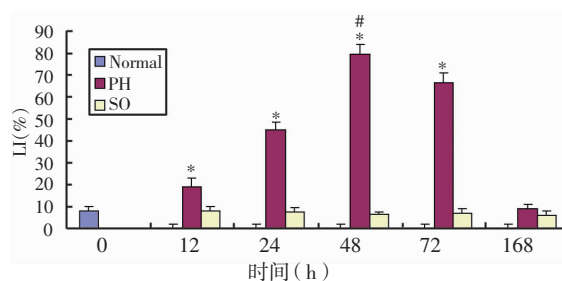


*, $P<0.01$ vs. SO; #, $P<0.01$ vs. after PH 12, 24, 72 h

图 2 Survivin 在 PH 后肝组织的表达

Fig.2 Expression of Survivin in liver tissue after PH

2.1.2 CyclinD1 蛋白表达 未处理组和 SO 组大鼠肝组织中, CyclinD1 仅有少量表达,几乎检测不到,但术后 12 h CyclinD1 在大鼠再生肝组织细胞核中表达量显著增高,至术后 48 h 达高峰,以后逐渐下降,术后 7 d 恢复至术前水平(图 3),肝切除术后肝组织再生过程中 CyclinD1 的表达模式和 Survivin 基本相似。



*, $P<0.01$ vs. SO; #, $P<0.01$ vs. after PH 12, 24, 72 h

图 3 CyclinD1 在 PH 后肝组织的表达

Fig.3 Expression of CyclinD1 in liver tissue after PH

2.2 Western blot 检测大鼠肝再生过程中 Survivin、CyclinD1 蛋白表达变化

Western blot 结果与免疫组织化学结果基本一致,结果显示(图 4),Survivin 在 PH 术后第 24~72 h 有明显增高与相应时间假手术组比较有显著性差异($P<0.05$)。肝部分切除术后第 12、24、48、72 h CyclinD1 均表达上调,与相应的假手术组大鼠比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

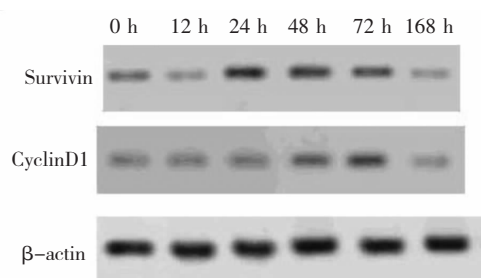


图 4 PH 后不同时间 Survivin 和 CyclinD1 Western blot 结果
Fig.4 Western blot results for the expression of Survivin and CyclinD1 protein after PH in different time points

2.3 大鼠肝再生过程中 Survivin、CyclinD1 相关性分析

综合免疫组化及 Western blot 半定量分析结果,进行 Spearman 等级相关分析表明:Survivin 的表达与 CyclinD1 在整个肝再生过程中表达趋势基本一致,呈高度相关($r=0.921\ 6$, $P<0.01$,图 5)。

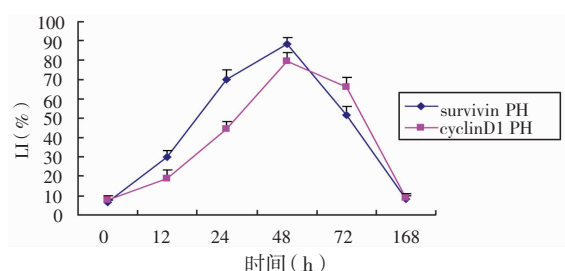


图 5 大鼠肝再生过程中 Survivin、CyclinD1 的变化趋势

Fig.5 Variation tendency of Survivin and CyclinD1 in rat liver tissue after PH

3 讨论

哺乳动物肝脏具有很强的再生能力,肝再生是多种基因调控的复杂过程,因此肝再生时各种增殖调控基因及机制的研究对于指导肝损伤的临床治疗以及术后残留肝的再生修复等都具有很重要的意义。Survivin 为新近发现的 IAP 新的成员^[6-8]。其参与细胞多种重要生物学过程,包括基因转录调控、胚胎发生、细胞分化、肿瘤形成和转移等^[7,9],有研究证明 Survivin 选择性地表达在肿瘤细胞、胚胎组织中而正常分化成熟组织中不表达^[10,11]。提示 Survivin 除了强大的抗凋亡功能外,还具有调节细胞增殖的功能,Kobayashi 等^[12,13]研究报告,有细胞增殖的组织均有 Survivin 的表达,表明 Survivin 的表达与细胞增殖、分裂密切相关。

大鼠 70%PH 是肝再生研究的最好模型^[14],肝切除后,肝脏细胞有丝分裂在 25~48 h 达到到最高峰,剩余肝组织经过约 1 周时间就基本恢复到原来的重量和功能。本研究中我们建立了 PH 后 12、24、48、72、168 h 肝再生模型,通过免疫组化及 Western blot 方法分析了大鼠肝再生过程中 Survivin 的表达情况,结果发现在 PH 后的肝再生过程中,Survivin 的水平迅速升高,且在 PH 后 48 h 达高峰,证明 Survivin 对于肝再

生起着重要的作用。现已发现肝切除后残余肝脏 DNA 合成最活跃的时期是术后第 24 h 到 48 h,本研究结果发现这时也是 Survivin 表达的高峰期,提示 Survivin 对肝细胞增殖过程中的 DNA 合成起重要的调控作用。

也有学者研究发现^[15]用细胞分裂阻断剂分别将 HeLa 细胞阻滞于 G₁ 期、S 期和 G₂/M 期,并检测处于各期时细胞株的 Survivin mRNA 表达情况,结果发现处于 G₁ 期的细胞无 Survivin mRNA 表达,当细胞处于 S 期时 Survivin mRNA 表达增加了 6.2 倍,而到了 G₂/M 期时细胞 Survivin mRNA 则上调了 40 倍。本研究结果也发现,PH 术后 12 h Survivin 的表达量开始增高,到 24 h 其表达量已显著增高,为对照组的 9.2 倍,到 48 h 表达量达到最高峰为对照组的 13.2 倍,之后逐渐下降,PH 后 168 h Survivin 的表达基本恢复到正常,与对照组大鼠无差异。Yang 等人^[16]研究发现人正常细胞系肺成纤维细胞 IMR90 和视网膜色素细胞 RPE 细胞系,如果特异性沉默 Survivin 能使细胞增殖停滞、核分裂异常,通过本研究我们证实了,在 PH 后大鼠肝再生过程中可以检测到 Survivin 蛋白的表达,且 Survivin 在肝细胞核中表达的高峰时间与肝再生时 DNA 合成的高峰时间几乎一致。表明肝再生时 Survivin 蛋白参与细胞的分裂增殖,加速肝细胞 DNA 的复制和加快损伤的肝组织修复。

肝再生时各种复杂的信号通路通过细胞周期而发挥作用,影响细胞的生长。细胞周期蛋白 CyclinD1 是 G₁/S 转换的正性调控因子。CyclinD1 的主要功能是激活 CDK4、CDK6 使细胞由 G₁ 期进入 S 期,它促使细胞越过控制点而完成 G₁/S 转换导致细胞增殖。本研究发现在肝再生模型中,PH 12 h, CyclinD1 的表达量明显升高,48 h 达到高峰,168 h 恢复正常,Spearman 等级相关分析表明:Survivin 的表达与 CyclinD1 在整个肝再生过程中呈高度正相关。朱红霞等^[17,18]的研究结果也证实,突变型 Survivin 可以引起 CyclinD1 蛋白水平下调,影响细胞周期的进行。说明 Survivin 不仅可以诱导细胞凋亡,而且可能通过促使 CyclinD1 的过表达,而加快细胞周期的进程。

综上所述,通过本研究,初步证实了 Survivin 蛋白在肝细胞核内的高表达与肝切除术后肝细胞的增殖密切相关。Survivin 在肝细胞核内的高表达可能将成为检测肝细胞高增殖活性的一个有效指标,这还需要进一步的研究来证实。

参 考 文 献

- [1] Shariat S F, Karakiewicz P I, Godoy G, et al. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22): 7012-7019.
- [2] Bertazza L, Mocellin S, Marchet A, et al. Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer independently predict survival[J]. J Transl Med, 2009, 22(7): 111.
- [3] Jiang Y F, He B, Li N P, et al. The oncogenic role of NS5A of hepatitis C virus is mediated by up-regulation of survivin gene expression

- in the hepatocellular cell through p53 and NF- κ B pathways[J].Cell Biol Int, 2011, 35(12):1225-1232.
- [4] Bongiovanni L, Müller E J, Della Salda L. Survivin in skin pathologies[J].Exp Dermatol, 2011, 20(6):457-463.
- [5] Higgins G M, Anderson R M. Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal[J].Arch Pathol, 1931, 12:186-202.
- [6] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs[J].Cancer Res, 1998, 58(23):5315-5320.
- [7] Lopes R B, Gangeswaran R, McNeish I A, et al. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy[J].Int J Cancer, 2007, 120(11):2344-2352.
- [8] Marioni G, D'Alessandro E, Bertolin A, et al. Survivin multifaceted activity in head and neck carcinoma: current evidence and future therapeutic challenges[J].Acta Otolaryngol, 2010, 130(1):4-9.
- [9] Kleinberg L, Flørenes V A, Silins I, et al. Nuclear expression of survivin is associated with improved survival in metastatic ovarian carcinoma[J].Cancer, 2007, 109(2):228-238.
- [10] Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma[J].Br J Cancer, 2003, 88(1):115-119.
- [11] Zamparese R, Pannone G, Santoro A, et al. Survivin expression in renal cell carcinoma[J].Cancer Invest, 2008, 26(9):929-935.
- [12] Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, et al. Expression of a murine ho-

mologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation[J].Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(4):1457-1462.

- [13] Adida C, Crotty P L, McGrath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene Survivin in human and mouse differentiation[J].Am J Pathol, 1998, 152(1):43-49.
- [14] 陈平, 李昆, 董家鸿, 等. 肝硬变大鼠肝部分切除术动物模型的制作及评价[J].第三军医大学学报, 2002, 24(4):488-490.
- Chen P, Li K, Dong J H, et al. Evaluation on the animal model of cirrhotic rats after partial hepatectomy[J].Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2002, 24(4):488-490.
- [15] Li F, Ambrosini G, Chu E Y, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by Survivin[J].Nature, 1998, 396(6711):580-584.
- [16] Yang D, Welm A, Bishop J M. Cell division and cell survival in the absence of Survivin[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(42):15100-15105.
- [17] 朱红霞, 刘爽, 周翠琦, 等. 抗凋亡基因 Survivin 促进细胞转化的作用机制[J].中华医学杂志, 2002, 82(5):338-340.
- Zhu H X, Liu S, Zhou C Q, et al. Anti-apoptosis gene surviving promotes cell growth and transformation[J].National Medical Journal of China, 2002, 82(5):338-340.
- [18] 朱红霞, 周翠琦, 张果, 等. 突变型 Survivin 逆转 Hela 细胞恶性表型的研究[J].癌症, 2003, 22(5):467-470.
- Zhu H X, Zhou C Q, Zhang G, et al. Survivin mutants reverse the malignancy of Hela cells[J].Chinese Journal of Cancer, 2003, 22(5):467-470.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 20 页)

睡眠差。多导睡眠检测可见慢波睡眠相有部分损害。对全球散在的 186 例病例的回顾性研究发现^[1], KLS 患者中周期性过度睡眠发生率为 100%、认知改变为 96%、进食紊乱为 80%、性欲增强为 43%、强迫症为 29%、情绪低落为 40%。KLS 的具体病因尚不明确。可能与下列因素有关:①下丘脑功能紊乱, 苯基二氢喹啉(Orexin)含量下降;适量的苯基二氢喹啉可以帮助人们保持苏醒状态。有的病例行 SPECT 检查可发现丘脑灌注不足^[2,3];磁共振波谱分析发现脑内代谢降低, 影响了神经传递^[4];②反复感染:KLS 发病前可有困倦、流感样症状,有报道 KLS 患者存在下丘脑的炎性反应,提示反复病毒感染可能与本病有关^[5];③遗传易感性:有报道该病呈现家族聚集性,犹太人中发病率高,推测可能与遗传易感性因素有关^[6]。本病需与以下疾病鉴别:①发作性睡病,本病以不可抵抗的睡眠发作、猝倒、睡眠麻痹和睡眠幻觉四联征为特点,发作持续时间短,一般十几分钟。②癫痫非惊厥性持续状态:该病临床表现为以意识障碍基础上伴或不伴自动症症状,一般持续时间较短,脑电图有癫样放电可鉴别。③器质性复发性嗜睡症:可见于第三脑室肿瘤、脑炎或脑外伤等,神经系统检查和影像学检查可鉴别。KLS 的治疗以支持对症为主,有

研究显示中枢兴奋药或锂对部分病例有效^[3,4],本病预后较好,发病 10 年左右后有自愈倾向。

参 考 文 献

- [1] Arnulf I, Zeitzer J M, File J, et al. Kleine-Levin syndrome: a systematic review of 186 cases in the literature[J].Brain, 2005, 128(pt12):2763-2773.
- [2] Huang Y S, Guilleminault C, Kao P F, et al. SPECT findings in the Kleine-Levin syndrome[J].Sleep, 2005, 28(8):955-960.
- [3] Hong S B, Joo E Y, Tae W S, et al. Episodic diencephalic hypoperfusion in Kleine-Levin syndrome[J].Sleep, 2006, 29(8):1091-1093.
- [4] Poryazova R, Schnepf B, Boesiger P, et al. Magnetic resonance spectroscopy in a patient with Kleine-Levin syndrome[J].Neurol, 2007, 254(10):1445-1446.
- [5] Takrani L B, Cronin D. Kleine-Levin syndrome in a female patient[J].Can Psychiatr Assoc, 1976, 5(21):315-318.
- [6] Arnulf I, Lin L, Gadoth N, et al. Kleine-Levin syndrome: A systematic study of 108 Patients[J].Ann Neurol, 2008, 4(63):482-492.

(责任编辑:关蕴良)