

· 综 述 ·

Survivin 基因与骨肉瘤关系的研究进展

黎承军, 流小舟 综述, 赵建宁, 吴苏稼, 施 鑫 审校

【摘要】骨肉瘤的发生发展与细胞异常增殖和凋亡调节紊乱有着密切的关系, 而作为凋亡抑制蛋白(IAP)家族新成员的 Survivin 是联系细胞周期和细胞凋亡界面的重要因子, 其为骨肉瘤的靶向治疗提供了新的途径和良好的前景。

【关键词】Survivin 基因; 骨肉瘤; 治疗与预后

【中图分类号】R738.1 【文献标志码】A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.03.022

骨肉瘤是最常见的原发于骨组织的成骨性恶性肿瘤, 好发于青少年, 恶性程度高, 侵袭性强, 早期易发生肺转移, 预后较差^[1], 以往单一治疗疗效差, 虽然随着新辅助化疗和保肢手术研究的逐渐深入, 患者 5 年生存率已有所提高, 但仍低于 60%^[2]。因此深入研究骨肉瘤的发生机制对提高其疗效具有重要意义, 研究表明^[3]骨肉瘤的发生发展与细胞异常增殖和凋亡调节紊乱有密切关系。Survivin 是凋亡抑制蛋白(IAP)家族中的一个新成员。与 IAP 在正常人体的分布不同的是, Survivin 除在胎盘和胸腺微弱表达外, 其他组织均无表达, 但几乎所有恶性肿瘤组织都检测到了 Survivin 的存在^[4]。Survivin 是联系细胞周期和细胞凋亡界面的重要因子, 其为骨肉瘤的靶向治疗提供了良好的前景。

1 Survivin 的结构和功能

Survivin 基因由 Ambrosini 等利用效应细胞蛋白酶受体 1 (effector cell protease receptor 1, ECPRI) 的 cDNA 从人类基因文库中筛选出来, 基因全长 15 kb, 位于染色体 17q25, 含有 4 个外显子和 3 个内含子, 编码产生一个 142 个氨基酸的 Survivin 蛋白, 是迄今为止发现的一种分子量最小的 IAP 蛋白^[5]。其不仅具有抑制细胞凋亡的功能, 还参与细胞有丝分裂、胞质分裂、细胞周期的调控和肿瘤转移的血管形成^[6]。

1.1 抑制细胞凋亡 ①Survivin 通过凋亡抑制蛋白重复序列 (baculovirus IAP repeat, BIR) 功能区的抑制凋亡相关的氨基酸残基 Trp67、Pro33 和 Cys84 直接作用于 Caspase-3、Caspase-7, 抑制其活性, 阻断细胞的凋亡过程^[7]; ②Survivin 通过与细胞周期调控因子 CDK4 形成 survivin-CDK4 复合物, 使得 P21

从 CDK4 复合物中释放出来并与 Caspase-3 结合, 从而间接抑制 Caspase, 阻止细胞凋亡^[8]; ③最近发现 Survivin 是周期蛋白激酶 p34cdc-cyclinB1 的有丝分裂期底物, Survivin Thr34 位点磷酸化后与 Caspase-9 结合并抑制其活性, 阻断 Caspase-9 依赖性的细胞凋亡信号传导^[9]。

1.2 调控细胞周期 Survivin 与 CDK4 结合后, 竞争性地抑制 CDK4/p16 (INK4a) 复合物的形成, 进一步导致 CDK2/cyclin E 活化和 Rb 磷酸化, 从而加快 G1 期向 S 期的转换^[10]。Survivin 在 G2/M 期特异性表达, 因其羧基末端无锌指结构, 代之以一个长度为 6.5nm、由 40 个氨基酸组成的 α 螺旋结构, 在有丝分裂早期, Survivin 凭借该结构与有丝分裂纺锤体的微管有特异性的可饱和反应, 从而可抵抗因 DNA 损伤或突变自身诱导的细胞凋亡, 通过有丝分裂促进转化细胞的异常增殖^[11]。

1.3 参与血管生成 Survivin 是血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导血管形成中的保护性基因, 在血管内皮细胞和新生血管的形成中发挥重要作用。O'Connor 等^[12]证实 VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 可诱使血管内皮细胞 Survivin 表达 (表达量升高 16 倍), 而炎症因子如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1 (interleukin, IL-1) 无此作用。Tran 等^[13]研究发现, Survivin 可有效地维持微小血管网的结构, 促进 VEGF 的内皮细胞保护功能, 抵抗化疗药物对血管内皮细胞的致凋亡作用。Coma 等^[14]研究发现, Survivin 的反义核苷酸可清除 VEGF 对抗肿瘤坏死因子或神经酰胺诱导的细胞死亡的抗凋亡作用, 导致内皮细胞凋亡和毛细胞血管迅速退化, 表明 VEGF 对内皮细胞的抗凋亡作用主要是通过诱导 Survivin 的表达来实现的。而 Survivin 的表达与 VEGF 的表达呈正相关,

提示二者在骨肉瘤的血管生成过程中发挥协同作用。

2 Survivin 与骨肉瘤诊断及判断预后

Survivin 通过抑制细胞内凋亡因子的活性,引起细胞增殖和凋亡平衡被打乱,一方面机体不能及时消除衰老和损伤的细胞,导致细胞生存期异常延长,使转化突变的细胞积累。另一方面,凋亡指数明显下降,瘤细胞寿命长且数量多,肿瘤生长迅速。Zhang 等^[15]报道 Survivin 蛋白表达与骨肉瘤分期分化相关结果一致,提示 Survivin 蛋白表达上调与骨肉瘤组织发生发展密切相关。林任等^[5]发现人骨肉瘤组织中的 Survivin 蛋白的染色强度明显比骨软骨瘤强, Survivin 蛋白在骨肉瘤、骨软骨瘤和正常骨组织相互之间均有显著性差异,提示 Survivin 蛋白的表达与骨肿瘤的恶性程度相关。并且组织学发现在骨肉瘤的 Enneking 外科分期中,ⅡA、ⅡB 期的 Survivin 蛋白表达低于Ⅲ期,提示 Survivin 蛋白的过度表达与骨肉瘤患者的浸润、转移相关。Osaka 等^[16]发现应用 Cox 多变量回归模型分析表明 Survivin 可以单独作为骨肉瘤诊断和判断预后的一个标志物,检测骨肉瘤患者的 Survivin 表达水平有助于辅助化疗前化疗敏感性的预测。

3 Survivin 与骨肉瘤治疗

抑制细胞凋亡从而促进肿瘤细胞的存活力增强是肿瘤细胞的共同特征,故细胞凋亡是化疗和放疗介导杀伤肿瘤细胞的主要机制。由于凋亡抑制蛋白 Survivin 在肿瘤组织中选择性高表达,抑制 Survivin 足以诱导肿瘤细胞自发性凋亡,目前以 Survivin 为靶点探索治疗骨肉瘤的方法主要集中在沉默或抑制 Survivin 的表达及作用上。

3.1 Survivin 反义治疗 自 1978 年 Zamecnik 首先设计了由 13 个碱基构成的寡核苷酸来抑制 Rous 肉瘤病毒的复制以来,反义寡核苷酸技术逐渐成为公认的具有高度特异性和低潜在毒性的治疗手段。其原理是通过特异封闭靶基因的表达而产生作用的。由于寡核苷酸具有易降解、细胞通透性差的特点,现多采用硫代修饰以增加其稳定性和用脂质体包埋以增加细胞通透性,来增加其在靶细胞内的有效药物浓度。Liang 等^[17]将反义引物 pEGFP-C1-Survivin 转染骨肉瘤细胞 MG63 中,结果随着 pEGFP-C1-Survivin 的表达, MG63 细胞增殖受到抑制、Survivin mRNA 和蛋白水平下调、aspase-3 活性增强、骨肉瘤 MG63 细胞凋亡率增加,远处侵袭转移的能力明显

受到抑制。Wu 等^[18]同样也用反义寡核苷酸技术阻滞骨肉瘤细胞 MG63 中 Survivin 的表达,他们将反义寡核苷酸以 200、400 和 600 nmol/L 三种不同浓度转染 MG63 细胞,发现 MG63 细胞的增殖均受到抑制,凋亡均明显增加。当药物浓度为 600 nmol/L 时, MG63 细胞的凋亡率达到顶峰,表明用反义寡核苷酸技术治疗骨肉瘤时具有剂量依赖性,同时在实验中观察到随着反义寡核苷酸浓度的增加, Fas 蛋白表达逐步增加从而激活了 Fas 介导的细胞凋亡机制。总结其作用机制可能是 mRNA-DNA 复合物激活核糖核酸酶 H 而导致 mRNA 降解, mRNA-DNA 复合物抑制 mRNA 转录而抑制蛋白质的表达。

3.2 核糖核酸(ribonucleic acid RNA)干扰 Survivin 治疗 RNA 干扰(RNAi)是指在生物体细胞内,外源性或内源性的双链 RNA(dsRNA)引起与其同源的 mRNA 特异性的降解,目前应用的 siRNA 有两类:体外合成 RNA 干涉片段和 DNA 干涉载体。因前者转染效率以及 RNAi 作用的瞬时性的缺陷,现在多采用 DNA 载体在细胞内表达 siRNA 的技术^[19]。杨彤涛等^[20]合成了 Survivin 基因的 RNA 干涉(RRNA interference, RNAi)特异性片段,通过骨肉瘤细胞体外生长和体内移植成瘤实验,进一步证实 Survivin 特异性 siRNA 可明显促进骨肉瘤细胞的凋亡。提示在骨肉瘤的实验性治疗中, RNAi 不仅可以抑制癌基因的表达、敲除点突变激活的癌基因、抑制基因扩增,还可以抑制融合基因表达、抑制其他肿瘤相关基因的表达。

3.3 联合治疗 饶耀剑等^[21]将 Survivin 反义寡核苷酸和细胞周期非特异性化疗药物多柔比星联合应用,可显著抑制 MG63 细胞的生长,增加化疗的敏感性,实验表明 Survivin 反义寡核苷酸可以增强化疗疗效,从而可减少化疗药物剂量,减少药物不良反应。Zou 等^[22]构建了 Survivin 基因 shRNA 真核表达载体 pSUPER-sh,运用干扰 RNA 技术和依泊托苷、顺铂、阿霉素等化疗药物,显示出 survivin 基因抑制联合化疗治疗骨肉瘤的优越性。同时低分子量肝素干预后骨肉瘤细胞 Survivin 的表达明显下降,提示低分子量肝素可能通过抑制 Survivin 的表达进而影响细胞有丝分裂过程,实现对骨肉瘤细胞生长的有效抑制^[23]。

4 展望

综上所述, Survivin 的发现为骨肉瘤的诊断、治疗敏感度及预后判断提供了一个崭新的靶点,但其作用机制、针对治疗的效率及安全性、可行性,仍

尚待研究。目前一种名为 flavopiridol 的 cdc2 激酶抑制剂已用于临床肿瘤治疗,它主要是通过阻断 cdc2 对 Survivin 的磷酸化作用,达到抑制肿瘤生长、诱导凋亡的目的。这将会为以 Survivin 为治疗靶点的靶向治疗领域提供新的策略,有望在临床骨肉瘤患者中获得广阔的应用前景。

【参考文献】

- [1] 高 瞻. 核素骨显像在肿瘤临床中的应用[J]. 东南国防医药, 2009, 12(6): 523-526.
- [2] Smith BR, Stabile BE. Extreme aggressiveness and lethality of gastric adenocarcinoma in the very young[J]. Arch Surg, 2009, 144(2): 506-510.
- [3] Nedelcu T, Kubista B, Koller A, et al. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(2): 237-244.
- [4] Roshdy N, Mostafa T. Seminal plasma survivin in fertile and infertile males[J]. J Urol, 2009, 181(3): 1269-1272.
- [5] 林 任, 廖前德, 吕红斌. Survivin 蛋白在人骨肉瘤、骨软骨瘤和正常骨组织中表达的初步研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(21): 3263-3266.
- [6] Karam JA, Lotan Y, Ashfaq R, et al. Survivin expression in patients with non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder[J]. Urology, 2007, 70(3): 482-486.
- [7] Nikolovska-Coleska Z, Mengher JL, Liang S, et al. Interaction of a cyclic, bivalent smac mimetic with the x-linked inhibitor of apoptosis protein[J]. Biochemistry, 2008, 47(37): 9811-9882.
- [8] Kappler M, Rot S, Taubert H, et al. The effects of knockdown of wild-type surviving, survivin-2B or survivin-delta3 on the radiosensitization in a soft tissue sarcoma cells in vitro under different oxygen conditions[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(2): 994-1001.
- [9] Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V. Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing sarcoma family tumor cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9320-9327.
- [10] Wolanin K, Piwocka K. Role of survivin in mitosis[J]. Postepy Biochem, 2007, 53(1): 10-18.
- [11] Knauer SK, Bier C, Habtemichael N, et al. The Survivin-crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function[J]. EMBO Rep, 2006, 7(1): 1259-1265.
- [12] O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. Am Pathol, 2000, 156(2): 393-398.
- [13] Tran J, Master Z, Yu JL, et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(7): 4349-4354.
- [14] Coma S, Noe V, Lavarino C, et al. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumor angiogenesis[J]. Oligonucleotides, 2004, 14(2): 100-113.
- [15] Zhang HZ, Wang Y, Gao P, et al. Silencing stathmin gene expression by survivin promoter-driven siRNA vector to reverse malignant phenotype of tumor cells[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(11): 1457-1461.
- [16] Osaka E, Suzuki T, Osaka S, et al. Survivin expression levels as independent predictors of survival for osteosarcoma patients[J]. J Orthop Res, 2007, 25(1): 116-121.
- [17] Liang X, Da M, Zhuang Z, et al. Effects of Survivin on cell proliferation and apoptosis in MG-63 cells in vitro[J]. Cell Biol Int, 2009, 33(1): 119-124.
- [18] Wu YF, Liang XJ, Liu YY, et al. Antisense oligonucleotide targeting survivin inhibits growth by inducing apoptosis in human osteosarcoma cells MG-63[J]. Neoplasia, 2010, 57(6): 501-506.
- [19] Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs[J]. J Biotech, 2006, 124(1): 12-25.
- [20] 杨彤涛, 李存孝, 张 勇, 等. 靶向 survivin 的 siRNA 对骨肉瘤细胞 MG63 的抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(2): 125-128.
- [21] 饶耀剑, 刘慧娟, 夏仁云. survivin 反义寡核苷酸抑制骨肉瘤细胞增殖及增加化疗敏感性的作用[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(2): 132-135.
- [22] Zou J, Gan M, Mao N, et al. Sensitization of osteosarcoma cell line SaOS-2 to chemotherapy by downregulating surviving[J]. Arch Med Res, 2010, 41(3): 162-169.
- [23] 易 磊, 郭风劲, 陈安民, 等. 低分子量肝素对骨肉瘤细胞增殖和 survivin 表达的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2007, 13(4): 277-279.

(收稿日期: 2012-08-03; 修回日期: 2012-09-17)

(本文编辑: 黄攸生)