

· 临床研究 ·

survivin 在儿童急性白血病细胞中的 定位表达及与化疗的关系

侯燕¹, 胡群¹, 刘爱国¹, 张柳清¹, 刘双又²

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 儿科; 2. 分子医学中心, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨 survivin 在急性白血病中的表达、细胞中的定位及与临床疗效的关系, 并从细胞水平说明 survivin 定位表达与化疗疗效的关系。方法 应用免疫组织化学链霉亲和素、生物素、过氧化物酶复合物方法, 检测 62 例急性白血病患者和 40 例同期住院患儿(排除急性白血病)骨髓细胞 survivin 的表达, survivin 在细胞中的定位。同时用 SABC 法检测不同浓度柔红霉素作用的 Molt-4 细胞中 survivin 定位表达的变化, 用流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 在 62 例急性白血病患者中, survivin 蛋白表达阳性率为 41.9% (26/62), 明显高于非急性白血病骨髓 5.0% (2/40) ($\chi^2 = 16.66, P < 0.01$); survivin 在胞浆中的表达为 46.2% (12/26), 在胞核中的表达为 53.9% (14/26), 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.3077, P > 0.05$), 但二者第 19 天缓解率差异有显著性 ($P < 0.05$), survivin 胞核表达阳性者缓解率高于胞浆阳性表达者。DNR 处理的 Molt-4 细胞 survivin 表达降低, 呈时间和剂量依赖性, 而且 survivin 从胞浆移位到胞核, 流式细胞术显示细胞凋亡率也呈剂量和时间依赖性。结论 ①survivin 在儿童急性白血病中表达率为 41.9%, 提示其在儿童急性白血病发生、发展和预后中的意义; ②survivin 在胞浆和胞核的不同表达与临床化疗疗效有关, 可作为判断预后的指标; ③DNR 可以降低白血病细胞中 survivin 表达, 并使其从胞浆移位到胞核, 诱导细胞凋亡。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(2):101-104]

[关键词] survivin; 急性白血病; 定位表达; 柔红霉素; 儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0101-04

Expression of survivin and its location in bone marrow cells of childhood acute leukemia: relationship to therapeutic efficacy

HOU Yan, HU Qun, LIU Ai-Guo, ZHANG Liu-Qing, LIU Shuang-You. Research Laboratory of Pediatric Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Hu Q, Email: qunhu0464@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective Survivin, a unique member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family, plays an important role in regulating both apoptosis and cell division. Overexpression of survivin is associated with increased risk of recurrence and poor outcome in cancer patients. This study aimed to investigate the expression of survivin and its location as well as the relationship between cellular location and expression of survivin and the therapeutic efficacy at the cellular level. **Methods** The expression of survivin protein was detected by immunohistochemical assay in bone marrow cells from 62 children with acute leukemia and 40 hospitalized children did not have leukemia (Control group), and in a human acute T lymphocytic leukemia cell line (Molt-4 cells) treated *in vitro* with daunorubicin (DNR). Cell apoptosis was detected using flow cytometry. **Results** Survivin protein was expressed in 41.9% of the 62 children with acute leukemia but in only 5.0% of the Control group ($\chi^2 = 16.66; P < 0.01$). The expression rate of survivin was 46.2% in cytoplasm and 53.9% in nucleus in the children with acute leukemia ($\chi^2 = 0.3077; P > 0.05$). However, the remission rate of patients in whom survivin expression was seen in the nucleus was significantly higher than that in patients in whom survivin was expressed in cytoplasm after chemotherapy. The survivin expression in Molt-4 cells decreased remarkably by DNR treatment in a time and dosage-dependent manner. DNR treatment also induced survivin translocation from cytoplasm to nucleus and cell apoptosis in a time and dosage-dependent manner. **Conclusions** Survivin may play an important role in the development and prognosis of childhood acute leukemia. The different expression pattern of survivin in the cytoplasm and the nucleus may be associated with therapeutic efficacy and prognosis in acute leukemia. DNR may reduce the survivin expression in leukemic cells and induce cell apoptosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2):101-104]

Key words: Survivin; Acute leukemia; Location expression; Daunorubicin; Child

[收稿日期] 2005-09-30; [修回日期] 2005-11-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(基金编号 39970778)

[作者简介] 侯燕, 女, 硕士研究生, 医师。主攻方向: 儿科血液和肿瘤。

[通讯作者] 胡群, 教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科。邮编: 430030。

survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白家族成员之一,其结构只含有单一的杆状病毒 IAP 重复序列,分布具有明显的组织特异性。它不仅具有抑制细胞凋亡的功能,而且参与了细胞增殖分化的调控,与一些肿瘤的预后相关^[1]。survivin 在实体瘤中的报道较多,而在儿童急性白血病方面,目前国内报道甚少。我们采用免疫组化方法检测 survivin 在 62 例初诊急性白血病患儿的表达及定位,并在细胞水平检测了 DNR 对 survivin 在 Molt-4 细胞中定位表达的影响及其与细胞凋亡的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

骨髓涂片取自我科 2004 年 1 月至 2005 年 4 月收治的急性白血病患者(急性淋巴细胞白血病 ALL,急性髓性细胞白血病 AML)和发热但非急性白血病(主要为上呼吸道感染、支气管肺炎和结缔组织病)的患儿。62 例急性白血病患者经临床及实验室检查确诊,符合 MIC 分型诊断标准,且骨髓幼稚细胞比例 $\geq 90\%$,其中男 41 例,女 21 例,年龄 7 个月~15 岁,平均年龄 6.3 岁,其中 ALL 48 例(L_1 38 例, L_2 5 例, L_3 5 例),AML 14 例(M_1 1 例, M_2 7 例, M_3 3 例, M_5 3 例),经治疗的 26 例 ALL 患儿中高危 9 例,中危 6 例,低危 11 例;非急性白血病的患儿 40 例(上呼吸道感染 23 例、支气管肺炎 12 例和结缔组织病 5 例),其中男 26 例,女 14 例,平均年龄 7.2 岁。ALL 诱导缓解方案为全国小儿白血病协作组推荐 VDLD 方案^[2](即长春新碱、柔红霉素、左旋门冬酰胺酶、地塞米松联合化疗)。接受治疗的患儿于第 19 天做骨髓穿刺检查了解缓解与否。

1.2 检测 survivin 蛋白的表达

survivin 多抗、SABC 试剂盒均购于武汉博士德生物制品有限公司, DAB 试剂盒购自北京中杉生物公司。免疫组化步骤参照试剂盒说明书进行,苏木素复染,磷酸氢二钠返蓝,中性树胶封片。油镜下观察 500 个细胞,以恶性细胞被染成棕黄色而红细胞及背景不着色为佳,其中阳性细胞数 $< 10\%$ 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性。用已知阳性切片做阳性对照,用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.3 细胞培养

①细胞株:人急性 T 淋巴细胞白血病细胞系 Molt-4 细胞由本院分子医学中心惠赠;②细胞培养:在 $5\% \text{ CO}_2$, 37°C 条件下,于含 10% 胎牛血清、 100 U/mL 青霉素、 $100 \mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI 1640

培养液中培养传代,实验用细胞均处于对数生长期。

1.4 检测 Molt-4 细胞中 survivin 蛋白的表达

调整细胞密度相同,不同浓度 DNR ($0.1 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$) 分别作用 Molt-4 细胞 12, 24 h 后,收集到离心管中, $2\,000 \text{ r/min}$, 离心 10 min, 去上清,取底层细胞做细胞涂片,用免疫组化的方法检测 Molt-4 细胞的 survivin 表达情况,免疫组化步骤同上。

1.5 细胞凋亡的检测

细胞接种于 24 孔板,不同浓度的 DNR ($0.1 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$) 分别作用于细胞 12, 24 h 后,收集 2×10^5 细胞经 PBS 洗涤后用 PI 和 RNaseA 染色,避光作用 30 min 后,在流式细胞仪上检测凋亡细胞,实验均设 3 复孔。

1.6 统计学处理

数据中的计数资料应用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法,计量资料用单因素方差分析,所有统计数据用 SAS 软件分析,以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 survivin 在急性白血病中的表达

survivin 阳性表达定位于胞浆和胞核,为淡黄至黄棕色颗粒状(见图 1)。survivin 在急性白血病中的阳性表达率为 41.9% ,在非急性白血病中的阳性表达率为 5% ,二者比较,差异有显著性($\chi^2 = 16.66$, $P < 0.01$)。

2.2 survivin 在白血病细胞中的定位与疗效的关系

62 例患儿中 survivin 胞浆表达阳性率为 46.2% ,胞核表达阳性率为 53.9% ,二者差异无显著性($\chi^2 = 0.3077$, $P > 0.05$)。ALL 中 survivin 在胞浆中的阳性率为 37.5% ,胞核中的阳性率为 62.5% ,二者差异无显著性($\chi^2 = 3.23$, $P > 0.05$) (见表 1)。但患儿化疗第 19 天,9 例 survivin 胞核表达者有 7 例缓解,6 例 survivin 胞浆表达者无 1 例缓解, survivin 胞核表达者的缓解率高于胞浆表达者,差别有显著性(Fisher 精确检验, $P < 0.01$)。

2.3 DNR 处理后 Molt-4 细胞的凋亡率

$0.1 \mu\text{g/mL}$ DNR 处理 12 h 的细胞凋亡率分别为 8.68% , 21.57% , $10 \mu\text{g/mL}$ DNR 处理 24 h 的细胞凋亡率分别为 18.52% , 54.26% , 4 组细胞凋亡率显示,随 DNR 浓度增大, Molt-4 细胞凋亡率增加,且在同一浓度下,随作用时间延长, Molt-4 细胞凋亡率增加,它们之间的差异有显著性意义($\chi^2 = 57.48$,

$P < 0.01$)。

表 1 survivin 在急性白血病细胞中的
定位表达与疗效的关系

类别	例数	survivin 阳性表达	
		+	阳性率(%)
非急性白血病	40	2	5
急性白血病	62	26	41.94
急性白血病细胞中的定位			
胞核	26	14	53.85
胞浆	26	12	46.15
ALL 细胞中的定位			
胞核	16	10	62.5
胞浆	16	6	6/16 ^b

a 与非急性白血病比较 $\chi^2 = 16.66, P < 0.01$; b 阳性例数小于 10, 不计算阳性率

2.4 DNR 处理后 Molt-4 细胞 survivin 的表达

在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ DNR 处理 12 h 的细胞, survivin 主要在胞浆表达, 随着药物浓度加大到 10 $\mu\text{g/mL}$, survivin 表达以胞核表达为主。在 DNR 处理 24 h 的 3 组细胞, survivin 均以胞核表达为主, 但 10 $\mu\text{g/mL}$ 组比 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组 survivin 染色减低。经扫描分析, 6 组吸光密度值有差异, ($F = 6.14, P < 0.01$), 结果表明 DNR 作用促使 survivin 由胞浆向胞核的转运, survivin 蛋白表达随着 DNR 剂量加大和作用时间延长而减低, 与上述细胞凋亡率测定的结果一致, 显示出 DNR 作用后, 不仅促使 Molt-4 细胞 survivin 由胞浆向胞核的转运, 而且与化疗诱导细胞凋亡有关(见图 2)。

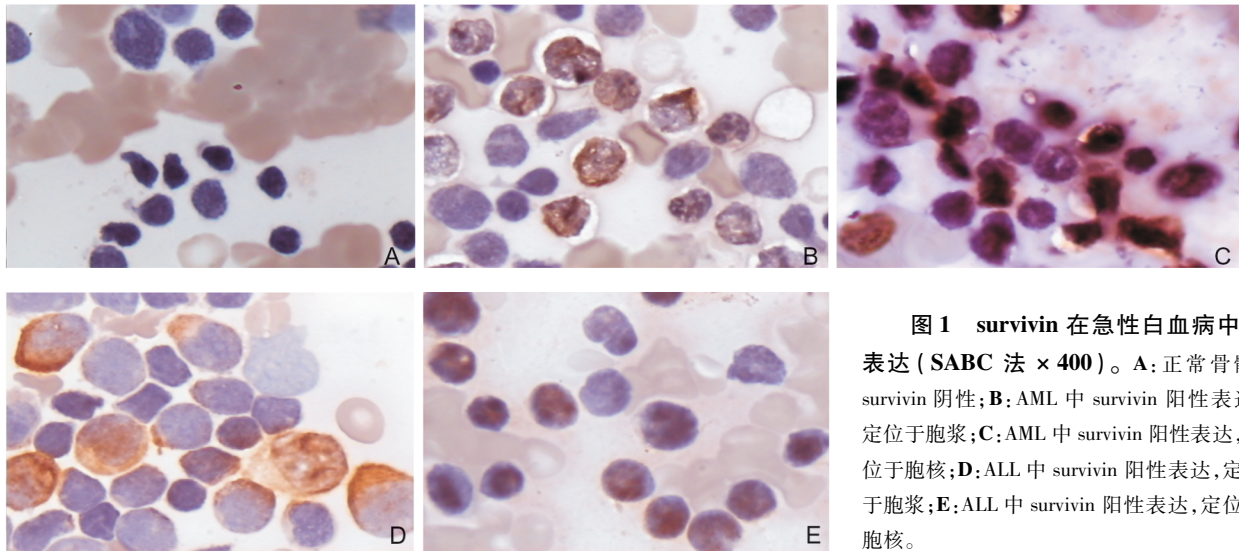


图 1 survivin 在急性白血病中的
表达 (SABC 法 $\times 400$)。A: 正常骨髓,
survivin 阴性; B: AML 中 survivin 阳性表达,
定位于胞浆; C: AML 中 survivin 阳性表达,
定位于胞核; D: ALL 中 survivin 阳性表达, 定
位于胞浆; E: ALL 中 survivin 阳性表达, 定
位于胞核。

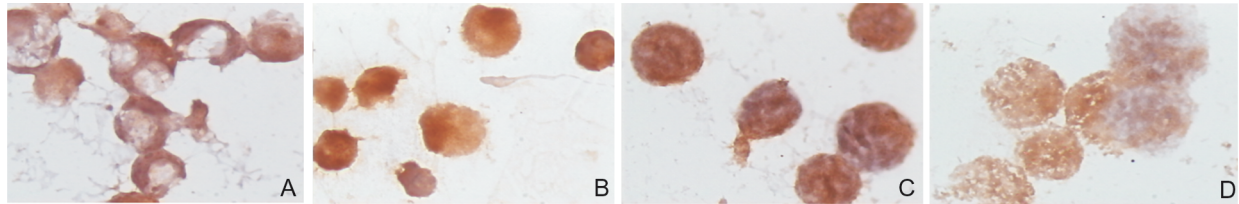


图 2 DNR 处理后 Molt-4 细胞 survivin 的表达。A: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ DNR 12 h, survivin 主要表达在胞浆, 着色为深棕色; B: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ DNR 24 h, survivin 主要表达在胞核, 着色为浅棕色; C: 10 $\mu\text{g/mL}$ DNR 12 h, survivin 主要表达在胞核, 着色为深棕色; D: 10 $\mu\text{g/mL}$ DNR 24 h, survivin 主要表达在胞核, 着色为浅棕色。

3 讨论

survivin 是近来发现的 IAP 家族新成员, 1997 年由 Aabrosini 等^[3]用效应细胞蛋白酶受体 1 cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中首先分离出来。研究表明^[4], survivin 是迄今发现最强的凋亡抑制因子, 即直接作用于级联反应的最终效应蛋白 caspase3 和

caspase7, 也可通过 P21 间接抑制 caspase, 从而阻断细胞的凋亡过程。Ikehara^[4]认为, survivin 与肿瘤的浸润、转移及治疗和预后有关。高红等^[5]研究发现 survivin 在儿童肾母细胞瘤中的表达对肾母细胞瘤的发生发展起了重要作用。我们的研究也表明, survivin 在急性白血病细胞中表达, 而在非急性白血病的骨髓细胞中很少表达, 这与 survivin 的细胞选择性表达一致。survivin 的异常表达有利于细胞逃

离生长监控,从而促进细胞的异常增殖和恶性转化,因此 survivin 在急性白血病细胞中的异常表达提示 survivin 可能参与了急性白血病的发生与发展。survivin 在细胞的胞核和胞浆均有表达,其临床意义目前还没有统一的定论。Nakagawa 等^[6]发现,在 ALL 中 survivin 在胞核和胞浆中表达相近,而在慢性淋巴细胞白血病中 survivin 主要在胞浆中表达,儿童白血病主要是 ALL,故 survivin 在胞核和胞浆中均有表达,本文 survivin 在胞浆中的阳性率为 37.5%,胞核中的阳性率为 62.5%,虽然 survivin 胞核表达者阳性率比胞浆表达者高,但二者差异无统计学意义,与 Nakagawa 报道一致。survivin 表达在胞核者比在胞浆者缓解率高,这与 O'Driscoll 等^[7]报道一致,可能因为在胞核者对化疗更为敏感有关。有研究表明,survivin 胞核表达与细胞增殖有关,胞浆表达与细胞生存期长短有关^[8],而化疗药物主要作用于增殖期细胞,故 survivin 胞核表达者比胞浆表达者对化疗更敏感,缓解率也高。

DNR 是儿童 ALL 化疗的主要药物,对 DNR 耐药的患者临床完全缓解率低。我们在体外实验中观察到 DNR 可以促使白血病细胞 survivin 由胞浆向胞核转移,同时 survivin 蛋白的表达减低,FCM 显示细胞凋亡率随着 DNR 浓度增大和作用时间延长而增加,这和临床化疗的效果一致。survivin 作为一种核穿梭蛋白,由多种机制决定其在胞核和胞浆的表达,比如核定位信号和 CRM1 调节的核运输^[9],其具体机制尚有待进一步研究。

综上所述,survivin 在儿童急性白血病中异常表

达,其在细胞中的定位表达与化疗的疗效有关,提示 survivin 可能作为白血病判断预后的一个指标,而且为儿童白血病化疗耐药机制的研究提供新的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2001, 97(9):2784-2790.
- [2] 全国小儿白血病协作组. 小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第二次修订草案)[J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(5):305-307.
- [3] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3(8):917-921.
- [4] Ikehara M, Oshita F, Kaneda Y, Ito H, Ohgane N, Suzuki R, et al. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung[J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(4):835-838.
- [5] 高红,王常林,蔡炜嵩,朱贝贝. Survivin, Caspase-3 mRNA 在肾母细胞瘤中的表达及意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(5):381-384.
- [6] Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, et al. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia[J]. *Leuk Res*, 2004, 28(5):487-494.
- [7] O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003, 3(2):131-152.
- [8] Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 and Cdk2/cyclin E complex activation[J]. *Oncogene*, 2000, 19(29):3225-3234.
- [9] Rodriguez JA, Span SW, Ferreira CG, Krut FA, Giaccone G. CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein survivin[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 275(1):44-53.

(本文编辑:吉耕中)