

# 视网膜母细胞瘤细胞株 SO-RB<sub>50</sub> 中生存素的表达

聂莉 李永平 张波 张卉颖 张文忻

## Expression of survivin in SO-RB<sub>50</sub> cells

Nie Li, Li Yongping, Zhang Bo, Zhang Huiying, Zhang Wenxin. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

**Abstract Objective** Survivin is thought to be the most powerful apoptosis inhibiting factor, which could suppress apoptosis and promote proliferation of cells. Study has proved that the overexpression of survivin might lead to neoplasm. Present study was to investigate the expression of survivin in human retinoblastoma cell line, SO-RB<sub>50</sub>. **Methods** Human retinoblastoma cell line, SO-RB<sub>50</sub>, was cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum. The expression of survivin mRNA in SO-RB<sub>50</sub> was detected by RT-PCR, and expression of survivin protein in SO-RB<sub>50</sub> was detected by Western blot and immunohistochemistry. The retina of eyeball from donor was prepared for the detect of survivin protein by immunohistochemistry as control. **Results** Three bands at 5 s, 18 s and 28 s were clearly showed by agarose gel electrophoresis after extract of total RNA, and the band with 260 bp was verified to be an amplified product of survivin mRNA. Western blot revealed a expression of survivin protein in SO-RB<sub>50</sub> cell with the relative molecular weight 16 500. Immunohistochemistry determined that the survivin protein distributed in both nucleolus and cytoplasm of SO-RB<sub>50</sub>. However, no survivin protein was detected in normal retina of donor. **Conclusion** Survivin plays a role in the pathogenesis of retinoblastoma.

**Key words** retinoblastoma; apoptosis; survivin

**摘要 目的** 研究凋亡抑制因子生存素 (survivin) 在视网膜母细胞瘤细胞株 SO-RB<sub>50</sub> 中的表达。 **方法** 收集培养的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞, 通过 RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学法检测 SO-RB<sub>50</sub> 细胞中 survivin mRNA 和蛋白的表达情况。免疫组织化学法检测 survivin 在正常视网膜组织中的表达。 **结果** SO-RB<sub>50</sub> 细胞中可检测到 survivin mRNA 和蛋白的表达, 免疫组织化学检测显示 survivin 在 SO-RB<sub>50</sub> 细胞核和细胞浆中均有表达。正常视网膜组织中未见 survivin 表达。 **结论** Survivin 参与了视网膜母细胞瘤的发病。

**关键词** 视网膜母细胞瘤; 凋亡; 生存素

**分类号** R 774.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0554-04

生存素或存活素 (survivin), 是迄今为止发现的最强的凋亡蛋白抑制剂家族成员, 在胚胎发育过程中出现, 终末分化成熟的组织中几乎不表达。在很多肿瘤, 如神经母细胞瘤、胃癌、膀胱癌等中均能检测到 survivin 的表达, 被认为是肿瘤的通用抗原<sup>[1]</sup>。为了研究 survivin 在视网膜母细胞瘤 SO-RB<sub>50</sub> 细胞系中的表达, 本研究采用 RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学等方法检测 SO-RB<sub>50</sub> 细胞中 survivin 基因和蛋白的表达, 进一步揭示凋亡蛋白抑制因子 survivin 在视网膜

母细胞瘤发病机制中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 视网膜母细胞瘤细胞系** 人视网膜母细胞瘤细胞系 SO-RB<sub>50</sub> 由本室建系, 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 置 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。  
**1.1.2 主要试剂** RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); Goldview (北京赛百盛生物技术有限公司); 兔抗人 survivin 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); Western blot 化学发光底物试剂盒、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (美国 Cell Signal 公司); 细胞裂解液 (美国 Pierce 公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公

本课题为国家自然科学基金 (30672276、39870801)、广东省科技计划项目 (2003A3020302) 资助

作者单位: 510060 广州, 中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室 (聂莉, 硕士研究生, 现在温州医学院附属眼视光医院 325027)

通讯作者: 李永平 (Email: zoc201@ yahoo. com)

司);DEPC(美国 Sigma 公司);RT-PCR 逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司);Taq 酶和 dNTP(上海生工公司);DL2000(大连 Takala 公司);DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司);即用型免疫组织化学试剂盒(福州迈新生物公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 RT-PCR 法检测 survivin mRNA 的表达

收集培养的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞, PBS 清洗 3 遍, 总 RNA 的提取按 Trizol 操作说明书进行, 紫外分光光度计检测 RNA 的吸光度值, 各组 RNA 的 A260/A280 均为 1.8 ~ 2.0。确定 RNA 浓度后取 1 μg 总 RNA 进行逆转录合成互补 cDNA。Survivin 产物长度为 206 bp, 引物序列为 5'-CAGATTTGAATCGCGGGACCC-3', 引物由北京赛百胜生物技术有限公司合成。PCR 反应体系: 10 × 缓冲液 3 μL、MgCl<sub>2</sub> 1.8 μL、dNTP 0.6 μL、引物 0.75 μL、cDNA 4 μL、Taq 聚合酶 0.4 μL, 三蒸水补足 30 μL。扩增条件为: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, Goldview 染色, 紫外灯下观察, 计算机凝胶成像系统照相。

### 1.2.2 Western blot 检测 survivin 蛋白的表达

收集培养的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞, PBS 洗 3 遍, 细胞裂解液裂解细胞后, 12 000 r/min 离心取上清, 120 V 聚丙烯酰胺凝胶电泳 1 h, 恒压 100 V 1 h 电转移蛋白至硝酸纤维素膜上, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 兔抗人 survivin 多克隆抗体一抗 (1:500) 4 °C 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h, 在暗室内浸泡化学发光显色底物 1 min, 曝光 2 ~ 10 min, 底片依次放入显影液、定影液, 图像分析系统分析。

### 1.2.3 免疫组织化学法检测 survivin 蛋白的表达

正常情况下, SO-RB<sub>50</sub> 细胞呈悬浮生长, 经过 D-赖氨酸溶液处理后可促进细胞贴壁生长。将盖玻片高压消毒后烤干, 用前滴加 5 μL D-赖氨酸涂匀后放在培养皿中。加入含 SO-RB<sub>50</sub> 细胞悬液的培养液, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后细胞贴壁生长, PBS 冲洗后 4 °C 冷丙酮固定 15 min, PBS 冲洗, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断内源性过氧化物酶的活性, 血清封闭未结合的抗原后滴加兔抗人 survivin 多克隆抗体一抗 (1:200), 阴性对照滴加 PBS 代替一抗, 室温下孵育 60 min, PBS 冲洗, 常规滴加羊抗兔二抗后 DAB 显色, 显微镜下观察。角膜移植取材后供体眼球 5 例作为正常对照, 常规 10% 甲醛固定 24 h 后, 乙醇脱水, 石蜡切片后脱蜡, 枸橼酸钠修复抗原后同上法行免疫组织化学染色观察。

## 2 结果

### 2.1 Survivin mRNA 和蛋白的表达

总 RNA 提取后琼脂糖凝胶电泳显示出 3 条清晰的条带, 分别为 5 s、18 s、28 s, 表明提取的总 RNA 无降解。琼脂糖凝胶电泳结果显示 206 bp 的条带为靶基因 survivin mRNA 的扩增产物条带 (图 1)。Western blot 结果显示, SO-RB<sub>50</sub> 细胞表达相对分子质量为 16 500 的 survivin 蛋白 (图 2)。

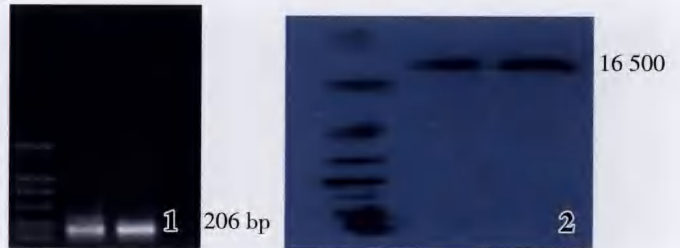


图 1 RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达 图 2 Western blot 检测 survivin 蛋白表达

Fig.1 RT-PCR shows the expression of survivin mRNA Fig.2 Western blot shows the expression of survivin protein

### 2.2 免疫组织化学检测 survivin 蛋白的表达

正常培养状态下的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞呈悬浮团状生长, D-赖氨酸处理后的玻片上可见培养的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞大部分呈贴壁生长, 细胞核浆比例大, 免疫组织化学显示培养的人视网膜母细胞瘤 SO-RB<sub>50</sub> 均能表达 survivin 蛋白, 但不同 SO-RB<sub>50</sub> 细胞表达强度之间有差别, 细胞核和细胞浆内均有棕黄色阳性颗粒分布 (图 3), 个别处于有丝分裂阶段的细胞浆和细胞核均能强表达 survivin (图 4)。阴性对照细胞内无阳性表达 (图 5)。眼球免疫组织化学结果显示正常成人视网膜组织中均未见 survivin 蛋白表达 (图 6)。

## 3 讨论

Survivin 基因是 1997 年 Ambrosini 由效应蛋白酶受体 (effector cell protease receptor -1, EPR-1) cDNA 在人类基因库杂交筛选分离出来的, 定位于人类染色体 17q25, 由 3 个内含子和 4 个外显子组成, 编码 142 个氨基酸, 相对分子质量为 16 500<sup>[2]</sup>。在人类大部分肿瘤中均能检测到 survivin 的表达, 被认为是肿瘤的通用抗原<sup>[3]</sup>。Survivin 主要作用是抑制细胞凋亡, 促进细胞增生, 其过度表达会使细胞失去正常增生周期中凋亡“开关”的限制, 造成细胞不断增生, 凋亡减少, 最终导致肿瘤的发生。目前的研究认为 survivin 与肿瘤的发生、发展、分期、组织分化程度、预后和化疗耐药等



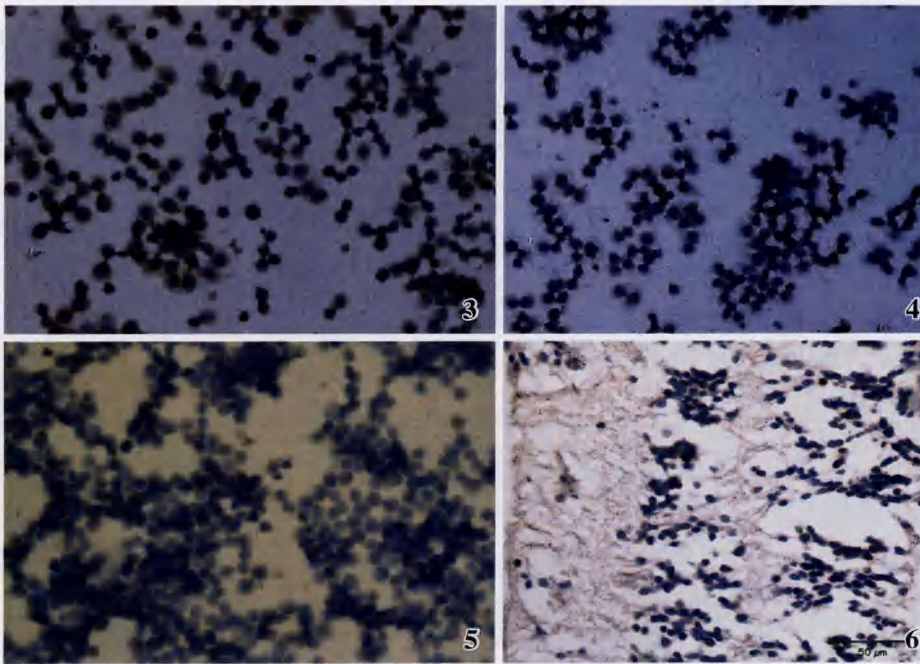


图3 人视网膜母细胞瘤 SO-RB<sub>50</sub> 细胞 survivin 免疫组织化学染色(×200) 图4 处于有丝分裂阶段的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞高度表达 survivin(×400)(箭头) 图5 阴性对照组 SO-RB<sub>50</sub> 细胞未见 survivin 表达(×200) 图6 正常对照组中未见 survivin 表达(×400)  
**Fig. 3** Expression of survivin presents the brown-yellow staining in cytoplasm and nucleus of SO-RB<sub>50</sub> cells (×200) **Fig. 4** The intensive expression of survivin is displayed in mitochysis stage of SO-RB<sub>50</sub> cells (black arrow) (×400) **Fig. 5** Survivin is absently expressed in SO-RB<sub>50</sub> cells in negative control group(×200) **Fig. 6** No expression of survivin is found in normal retina of donor(×400)

有着重要的联系<sup>[2,4]</sup>。回顾性研究表明, survivin 表达程度与肿瘤分期和恶性程度呈正相关, 且与肿瘤的复发和转移有关, 表达 survivin 的肿瘤阳性患者 5 年生存率明显低于表达阴性的患者, 且具有复发率高、容易对治疗产生抵抗性的特点<sup>[5-8]</sup>。Survivin 作为一种新的凋亡抑制蛋白在肿瘤发病机制中的作用以及治疗靶点的应用已经引起了广泛关注。

目前 survivin 抗凋亡的分子机制尚未完全阐明。Survivin 能抑制 Fas、Bax 和某些化疗药物、IL-3、TNF- $\alpha$ 、X 射线诱导的半胱天冬蛋白酶(caspase)活化和凋亡, 提示 survivin 是在凋亡通路汇集点的部位起作用, 即在线粒体释放的下游直接作用, 通过 BIR 中的 Trp<sup>67</sup>、Pro<sup>33</sup>、Cys<sup>84</sup> 与 caspase-3 和 caspase-7 结合而抑制 caspase 活性<sup>[9]</sup>。survivin 也可通过 p21 间接抑制半胱天冬蛋白酶, 其机制是 survivin 与细胞周期调控因子 CDK4 形成 survivin/CDK4 复合体, 使得 p21 从 CDK4 的复合体中释放出来, p21 进一步与线粒体 caspase-3 结合, 抑制其活性, 阻止 Fas 介导的细胞凋亡<sup>[10]</sup>。Survivin 还可以部分地通过对纺锤体微管的作用调节细胞有丝分裂过程, 进而发挥其抗凋亡功能。

本实验在 mRNA 和蛋白水平揭示了 survivin 在视网膜母细胞瘤细胞系 SO-RB<sub>50</sub> 细胞中的表达, 同时细

胞免疫组织化学检测发现 survivin 在 SO-RB<sub>50</sub> 细胞核和细胞浆中的表达强度不一致, 个别处于有丝分裂阶段的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞浆和细胞核均能强烈表达 survivin, 说明 survivin 在 SO-RB<sub>50</sub> 细胞周期不同阶段定位是变化的。研究表明, survivin 是着丝粒相关蛋白, 体内 80% 的 survivin 蛋白位于有丝分裂部位, 如中期染色体动原体、分裂间期微管、分裂后期中间纺锤体等, 以细胞周期依赖方式高表达于 G2/M 期并能和有丝分裂纺锤体结合<sup>[11-12]</sup>。通过基因转染技术使细胞系稳定表达 survivin 能导致 G0/G1 期细胞数量减少, 而 S 期数量明显增加<sup>[13-15]</sup>。

综上所述, 本实验通过 RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学法证实了 SO-RB<sub>50</sub> 细胞能表达 survivin, 且细胞核和细胞胞浆内均有分布。由于 survivin 仅特异

性地表达于肿瘤细胞 SO-RB<sub>50</sub>, 在正常成人视网膜组织中不表达, 针对 survivin 的特异性抗体免疫治疗以及基因治疗等具有良好的靶向性、特异性及安全性, 为治疗视网膜母细胞瘤提供新途径。

### 参考文献

- 1 Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, et al. Expression of survivin and bcl-2 in the normal human endometrium[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6: 529 - 538
- 2 Kappler M, Bache M, Bartel F, et al. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53 [J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11: 186 - 193
- 3 Augello C, Caruso L, Maggioni M, et al. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 125 - 129
- 4 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. Oncogene, 2003, 22: 8581 - 8589
- 5 Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, et al. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Diagn Mol Pathol, 2002, 11: 33 - 40
- 6 Monzo M, Rosell R, Felip E, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers[J]. J Clin Oncol, 1999, 17: 2100 - 2104
- 7 Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy[J]. Int J Cancer, 2001, 95: 92 - 95



8 Swana HS, Grossman D, Anthony JN, et al. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341: 452 - 453

9 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: 5315 - 5320

10 Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspase3/p21 complex formation as a result of interaction with CDK4 to resist Fas-mediated cell death [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 1346 - 1353

11 Cheng SQ, Wang WL, Yan W, et al. Knockdown of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 756 - 759

12 Nigam N, Prasad S, George J, et al. Lupeol induces p53 and cyclin-B-mediated G2/M arrest and targets apoptosis through activation of caspase in mouse skin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381: 253 - 258

13 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 (INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 3225 - 3234

14 Wang WL, McHenry P, Jeffrey R, et al. Effects of Iejimalide B, a marine macrolide, on growth and apoptosis in prostate cancer cell lines [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105: 998 - 1007

15 Liu WS, Yan HJ, Qin RY, et al. siRNA directed against survivin enhances pancreatic cancer cell gemcitabine chemosensitivity [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54: 89 - 96

(收稿: 2008-12-28 修回: 2009-05-23)

(本文编辑: 王莉红)

· 病例报告 ·

## 视网膜中央动脉阻塞治疗后视力提高一例

刘李平 罗 英 宋 徽

患者,女,45岁。2008年2月9日因右眼突然视物不见半月余至我院就诊。患者全身一般情况良好,否认心血管系统疾病,父亲有高血压病史。眼科检查:视力右眼光感,左眼1.0。双眼眼前节正常,玻璃体轻度混浊。右眼视盘边界清,颞侧视网膜可见灰白色水肿,盘斑束区可见“舌状”正常视网膜区域,动脉陡变细(图1)。左眼眼底视盘边界清,视网膜平覆。眼压右眼16.5 mmHg,左眼14.2 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)。荧光素眼底血管造影(FFA)检查:右眼动脉期颞侧黄斑支荧光充盈,视盘边界欠清;静脉期颞上分支静脉未见充盈,黄斑周围毛细血管扩张;后期视盘荧光渗漏,黄斑部可见多个针尖样荧光,颞上周边仍见未充盈的小动静脉。诊断:右眼视网膜中央动脉阻塞。给予贝特舒滴眼液右眼点眼,口服维生素B1、肠溶阿司匹林、益脉康、卵磷脂络合碘及醋酸泼尼松,右眼颞侧皮下注射复方樟柳碱注射液,血管扩张药物静脉滴注等治疗,门诊随访。

2008年3月11日患者来我院复诊,视力右眼0.8,左眼1.0。眼底检查右眼视盘色淡、边界清,视网膜呈“晚霞”状(图

2)。其余体征同治疗前。FFA:右眼动脉期视网膜动脉完全充盈;静脉期视网膜静脉充盈,黄斑周围毛细血管扩张;后期视盘荧光渗漏,黄斑部仍有多个针尖样荧光点。视野检查:右眼中心“视岛”及颞侧“新月形”视岛(图3)。

讨论:睫状视网膜动脉来源于睫状后短动脉,可走行于黄斑区上方或下方,提供黄斑区及其附近视网膜内层小部分区域的血液供应。解剖学上它不属于终末动脉,彼此间有吻合<sup>[1]</sup>。由于该动脉对供应黄斑区范围的血流有重要的临床意义,即使发生视网膜中央动脉阻塞,患者中心视力仍可较好地恢复。绝大多数(90%)的视网膜中央动脉阻塞患者视力预后差,视力>0.2者仅为12.9%~27%。而有睫状视网膜动脉者,根据其供应黄斑区的范围,中心视力可有不同程度的提高。睫状视网膜动脉供应到黄斑拱环者,预后较好;但发病时视力差,治疗后80%以上的患眼中心视力>0.4,受害区有相应的视野缺损,甚至只有管状视野<sup>[2]</sup>。该患者出现症状后半个月就诊,因视网膜黄斑区有睫状视网膜血管供血,故中心视力损害较小。因此临床上不能仅凭视网膜中央动脉阻塞的诊断或病程较长而放弃治疗,应积极寻找病因,对症治疗,并预防对侧眼发病。

### 参考文献

1 徐永宁,李棣,张惠成,等. 单独睫状视网膜动脉阻塞的临床观察 [J]. *中华眼底病杂志*, 2007, 23(3): 203 - 204

2 张承芬. 眼底病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 181



图1 CRAO治疗前眼底像 图2 CRAO治疗后眼底像 图3 CRAO治疗后视野表现

(收稿: 2009-03-03)

(本文编辑: 尹卫靖)