

## • 综述 •

## 以 Survivin 为靶点的反义寡核苷酸在肝癌研究中的应用进展

钱 瑾 孟立娜

**摘要:**Survivin 是目前恶性肿瘤基因治疗研究中的新靶点。采用反义寡核苷酸等治疗方法可以抑制 Survivin 的表达,从而诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制细胞增殖并增强对化疗药物的敏感性。近年来,已有学者将其用于肝癌的研究,为肝癌的治疗提供了新的方向。

**关键词:**Survivin;反义寡核苷酸;肝癌

肝细胞癌(以下简称肝癌)是国内最常见的消化系统恶性肿瘤之一,病死率占国内恶性肿瘤第二位,由于其浸润性强、转移早、易复发,目前包括手术、放射治疗、化学治疗等各种治疗方法效果均不佳。基因治疗已成为近年来研究的热点之一。Survivin 作为一种新型的凋亡抑制因子,与肿瘤的发生、发展及预后密切相关。

### 1 Survivin 概述

Survivin 是 IAP 家族新成员,在 1997 年, Ambrosini 等<sup>[1]</sup>利用效应细胞蛋白酶受体-1(EPR-1) cDNA 在人类基因组文库中筛选克隆出来的。该基因定位于染色体 17q25,全长 14.7 kb,含 4 个外显子和 3 个内含子。Survivin 基因编码产生的蛋白由 142 个氨基酸组成,相对分子质量为 16 500,是 IAP 家族中最小的。它的结构非常独特,其 N 端只含有一个杆状病毒 IAP 重复序列(BIR),这是其发挥抗凋亡作用的关键结构域;其羧基末端不含锌指结构而代之以一个  $\alpha$  螺旋结构,后者是 Survivin 与微管相互作用调节细胞周期的关键位点。Survivin 是迄今为止发现的作用最强的凋亡抑制因子,它可能通过抑制终末效应因子 caspase-3 和 caspase-7 来干扰 caspase-9 的活性从而抑制细胞凋亡<sup>[2]</sup>。Survivin 的表达具有细胞周期依赖性,主要在 G2/M 期大量表达并控制该期细胞的凋亡,促进细胞增殖。另外, Survivin 还可能与肿瘤新生血管的生成有关<sup>[3]</sup>。

### 2 Survivin 在肝癌中的表达及意义

Survivin 特异性地表达于人类多数肿瘤组织中,除胚胎和发育中的胎儿组织外,其在正常分化成熟的组织中几乎不表达<sup>[4]</sup>,是目前肿瘤基因治疗研究中的热点之一,近年来已有学者将其用于肝癌的研究。Bao 等<sup>[5]</sup>利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术和免疫组织化学技术分别测定 Survivin

mRNA 和蛋白的表达,结果发现,两者仅在肝癌细胞和组织中有较高表达,而在正常肝组织及癌旁组织几乎不表达。Morinaga 等<sup>[6]</sup>用 RT-PCR 检测 40 例肝癌及癌旁组织和 7 例正常肝组织 Survivin 的表达时,也发现了相同的规律,并指出 Survivin 的表达与肝癌细胞的高增殖活性及低凋亡指数有关。Ye 等<sup>[7]</sup>应用免疫组化检测的 55 例肝癌组织,其中 29 例(52.7%)有 Survivin 表达,且 Survivin 表达阳性的患者,复发率高于表达阴性者,其 1 年和 3 年生存率也显著降低。以上结果表明,Survivin 在肝癌中呈特异性高表达,它不但促进肝癌细胞增殖、抑制凋亡,且与肝癌的发生、发展及预后密切相关。因此, Survivin 可能成为肝癌基因治疗研究中的新靶点。

### 3 反义寡核苷酸技术及其封闭 Survivin 靶向治疗的意义

反义核酸技术是一种新兴的基因治疗技术,是根据碱基互补原理,利用人工或生物合成特定互补的 DNA 或 RNA 片段,抑制或封闭基因表达的技术。包括反义寡核苷酸技术(ASODN)、反义 RNA 技术和核酶技术。ASODN 是体外合成的单链小分子 DNA。自 1978 年 Zamecnik 等<sup>[8]</sup>发现 ASODN 在培养的细胞中能够抑制 Rous 肉瘤病毒复制的活性以来,ASODN 已越来越受到人们的关注。其设计容易、合成简单,且具有高度的靶特异性和低毒性的优点,目前是公认的特异靶向基因表达的有效工具,也是最有可能应用于临床的基因治疗手段<sup>[9]</sup>。新近研究证实<sup>[10]</sup>,利用 ASODN 封闭 Survivin 表达,可以促进肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖,而对正常组织几乎没有不良影响,具有良好的靶向性、特异性和安全性,有望成为一种有效的基因治疗方法。

### 4 Survivin ASODN 在肝癌治疗中的研究

#### 4.1 Survivin ASODN 抑制肝癌细胞的生长

肿瘤不仅是细胞增殖和分化异常性疾病,也是凋亡异常性疾病。细胞凋亡的减弱和细胞增殖异常均会导致肿瘤的发生。Survivin 作为 IAP 家族

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学附属第一医院消化内科  
通信作者:孟立娜,Email:mln6713@163.com

成员之一,对阻断肿瘤细胞凋亡的发生过程起重要作用。利用 ASODN 封闭 Survivin 表达,能够诱导肿瘤细胞自发性凋亡,引起细胞有丝分裂失败,从而抑制肿瘤的形成和生长<sup>[11]</sup>。Chen 等<sup>[12]</sup>用脂质体介导的 Survivin ASODN 转染人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞,用 western-blot 及原位杂交方法检测 Survivin 蛋白及 mRNA 表达,流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化,结果转染后 Survivin 蛋白及 mRNA 表达分别从 69.59 及 75.61 降低至 10.71 及 22.94,细胞凋亡率从 0.7% 增加至 31.35%,进一步研究显示,Survivin ASODN 转染能够抑制肝癌细胞的生长,说明脂质体介导的 ASODN 封闭 Survivin 能够有效降低细胞内 Survivin 基因的表达,诱导肝癌细胞凋亡,抑制肝癌细胞的增生活性。Dai 等<sup>[13]</sup>通过 Survivin ASODN-脂质体复合物转染肝癌细胞株 HepG2 后,Survivin mRNA 和蛋白的表达水平也呈剂量依赖性下调,转染后还能增加 caspase-3 活性,诱导细胞凋亡,对肝癌细胞的生长有较强的抑制作用。高鹏等<sup>[14]</sup>在建立人肝癌耐药细胞系 SMMC-7721/ADM 裸鼠移植瘤模型后,将 ASODN 复合物直接注射于瘤体内,结果发现裸鼠移植瘤的体积明显减小,并呈时间-剂量-效应依赖性,说明 Survivin ASODN 不仅在体外可明显抑制肝癌细胞的生长,在体内对肿瘤也有明显的生长抑制作用。

#### 4.2 Survivin ASODN 增强肝癌化疗药物的敏感性

化学治疗是肝癌综合治疗的主要方法之一,但效果不理想,化学治疗耐药是影响其疗效的主要原因之一,而细胞凋亡调控机制的紊乱是肿瘤细胞对多种化学治疗药物产生交叉耐药的关键因素<sup>[15]</sup>。近年来研究发现,Survivin 的表达可能与化学治疗耐药有关<sup>[16]</sup>。通过反义技术封闭 Survivin 的过表达诱导细胞凋亡,可能干预肿瘤耐药的产生,增强化学治疗敏感性<sup>[17]</sup>。Gao 等<sup>[18]</sup>以脂质体为载体,用 ASODN 封闭人肝癌耐药细胞株 SMMC-7721/ADM 的 Survivin 后,肝癌细胞的生长受到明显抑制,而联合应用化学治疗药物阿霉素(ADM)后细胞的生长抑制作用更为明显,认为 ASODN 能降低肝癌耐药细胞 Survivin 的表达,增强人肝癌耐药细胞对 ADM 的化学治疗敏感性。另有学者认为<sup>[19]</sup>,ASODN 转染后的肝癌细胞对化学治疗药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)和顺铂(DDP)的敏感性也明显增加。由此可见,采用 ASODN 转染能封闭 Survivin 的表达,

在一定程度上可以逆转肝癌细胞的耐药性。

#### 4.3 Survivin ASODN 可能抑制肝癌新生血管的形成

肿瘤的侵袭与新生血管的形成关系密切。原发性肝癌是一种多血管性肿瘤,在肝癌组织内有较多的血管分布,且明显多于癌旁组织和正常肝组织。已有研究报道<sup>[15]</sup>,体外培养的血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)均能诱导血管内皮细胞中 Survivin 表达水平显著升高,血管生成素-1(Ang-1)的作用也依赖于 Survivin 的表达上调。免疫组化结果显示,Survivin 在正常皮肤的非增殖毛细血管内皮细胞中的表达量很少,而在体内肉芽组织新生血管中表达较高,提示 Survivin 可能在血管形成的中间环节发挥重要作用。Mesri 等<sup>[3]</sup>用 Survivin ASODN 作靶向治疗,可以抑制 VEGF 介导的内皮细胞保护作用,促进血管内皮细胞的凋亡和血管的退行性改变。提示,Survivin 可能是血管形成中生长因子诱导的保护性基因,它能维持血管内皮细胞的正常增殖。张鸽文等<sup>[20]</sup>将脂质体包裹 Survivin ASODN 直接注射人肝癌裸鼠皮下移植瘤内,结果瘤内的血管生成明显减少,提示 Survivin ASODN 可以抑制肝癌新生血管的生成。目前,Survivin ASODN 对肝癌新生血管作用机制尚不十分明确,仍有待进一步研究。

#### 5 展望

针对 Survivin 在肿瘤组织特异性表达上的特点,利用 ASODN 封闭 Survivin 基因表达诱导肝癌细胞凋亡、抑制其增殖并增加对药物敏感性等方面的研究已经取得了很大的成绩,但目前尚处于体外细胞、动物实验和早期临床研究阶段,要将其真正应用于肝癌的临床治疗,仍有不少问题需要解决。包括如何高效导入 ASODN,提高 ASODN 生物稳定性和穿透包膜的能力,提高其与 Survivin 的亲合力,维持体内较高的治疗浓度,降低合成成本等。相信随着这些问题的不断深入研究,以 Survivin 为靶点的 ASODN 对肝癌的综合治疗,将会产生深远意义。

#### 参 考 文 献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 1997, 3: 917-921.
- 2 Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med*, 2005, 9: 360-372.

(下转第 121 页)

- 4 Rimbara E, Noguchi N, Kijima H, et al. Mutations in the 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Japan. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 30: 250-254.
- 5 Hulten K, Gibreel A, Skold O, et al. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*; mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41: 2550-2553.
- 6 Matsuoka M, Yoshida Y, Hayakawa K, et al. Simultaneous colonisation of *Helicobacter pylori* with and without mutations in the 23S rRNA gene in patients with no history of clarithromycin exposure. *Gut*, 1999, 45: 503-507.
- 7 Chen S, Li Y, Yu C. Oligonucleotide microarray: a new rapid method for screening the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* for single nucleotide polymorphisms associated with clarithromycin resistance. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23: 126-131.
- 8 Posteraro P, Branca G, Sanguinetti M, et al. Rapid detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* using a PCR-based denaturing HPLC assay. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57: 71-78.
- 9 Moore JM, Salama NR. Mutational analysis of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 1236-1237.
- 10 Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Akada JK, et al. Roles of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. *J Bacteriol*, 2001, 183: 5155-5162.
- 11 Yang YJ, Wu JJ, Sheu BS, et al. The rdxA gene plays a more major role than frxA gene mutation in high-level metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan. *Helicobacter*, 2004, 9: 400-407.
- 12 Marais A, Bilardi C, Cantet F, et al. Characterization of the genes rdxA and frxA involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol*, 2003, 154: 137-144.
- 13 Albert TJ, Dailidene D, Dailide G, et al. Mutation discovery in bacterial genomes; metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nat Methods*, 2005, 2: 951-953.
- 14 Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*, 2007, 51: 939-944.

(下转第124页)

(上接第104页)

- 3 Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by Survivin targeting. *Am J Pathol*, 2001, 158: 1757-1765.
- 4 Sui L, Dong Y, Watanabe Y, et al. Alteration and clinical relevance of PTEN expression and its correlation with Survivin expression in epithelial ovarian tumors. *Oncol Rep*, 2006, 15: 773-778.
- 5 Bao ST, Gui SQ, Lin MS. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5: 580-583.
- 6 Morinaga S, Nakamura Y, Ishiwa N, et al. Expression of Survivin mRNA associates with apoptosis, proliferation and histologically aggressive features in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2004, 12: 1189-1194.
- 7 Ye CP, Qiu CZ, Huang ZX, et al. Relationship between Survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 6264-6268.
- 8 Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75: 280-284.
- 9 Glodde M, Sirsi SR, Lutz GJ. Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 347-356.
- 10 Altieri DC. Validating Survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 46.
- 11 Chen J, Wu W, Tahir SK, et al. Down-regulation of Survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*, 2000, 2: 235-241.
- 12 Chen T, Jia YR, Zhao TJ, et al. Inhibitory effect of antisense oligonucleotide on the expression of Survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *World Chin J Digestol*, 2004, 12: 1546-1549.
- 13 Dai DJ, Lu CD, Lai RY, et al. Survivin antisense compound inhibits proliferation and promotes apoptosis in liver cancer cells. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 193-199.
- 14 高鹏, 方驰华, 张刚庆. Survivin 反义寡核苷酸抑制肝癌裸鼠皮下移植瘤生长的作用. *中国病理生理杂志*, 2008, 24: 101-104.
- 15 Lefranc F, Facchini V, Kiss R, et al. Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist*, 2007, 12: 1395-1403.
- 16 Chang Q, Liu ZR, Wang DY, et al. Survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 415-418.
- 17 Tamm I, Dörken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet*, 2001, 358: 489-497.
- 18 Gao P, Fang CH, Zhang GQ, et al. Antisense oligonucleotide against Survivin induces apoptosis and enhances adriamycin sensitivity of SMMC-7721/ADM cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2006, 26: 1644-1647.
- 19 王颖, 王家骏. 生存素反义寡核苷酸诱导肝癌细胞凋亡的实验研究. *中华消化杂志*, 2003, 23: 11-14.
- 20 张鸽文, 汤恢焕, 王志明, 等. 靶向抑制 Survivin 基因对肝细胞癌血管生成的影响. *中华普通外科杂志*, 2007, 22: 133-136.

(收稿日期: 2008-08-12)

(本文编辑: 李瑞芳)