

- 21 Hodgson L, Henderson AJ, Dong C. Melanoma cell migration to type IV collagen requires activation of NF- κ B. *Oncogene* 2003;22:98-108.
- 22 Lee TL, Yang XP, Yan B, et al. A novel NF- κ B gene signature is differentially expressed in head and neck squamous cell carcinomas in association with TP53 status. *Clin Cancer Res* 2007;13:

5680-5691.

- 23 Chen Z, Ricker JL, Malhotra PS, et al. Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor- κ B and activator protein-1 related mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1949-1960.

(收稿:2008-12-23)

Survivin 与黑素瘤关系的研究进展

曹永倩 王法刚 综述 王一兵 审校

摘要 Survivin 是一种细胞凋亡抑制因子,其结构、功能和分布有不同的特点。Survivin 在黑素瘤病人的诊断、基因治疗及预后各方面都扮演重要角色,同时作为特殊的肿瘤抗原,有可能为黑素瘤的免疫治疗提供新思路。

关键词 黑素瘤; survivin; 凋亡

近年来对凋亡相关分子在黑素瘤中的变化成为黑素瘤耐药研究的热点,肿瘤细胞对凋亡的抵抗性可降低细胞对化疗药物的敏感性,凋亡及其调节因子是决定黑素瘤耐药的重要机制。Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IAP)家族的一员,是目前发现最强的凋亡抑制因子。已证明 survivin 基因的高表达与化疗耐药有密切关系,抑制 survivin 基因表达能增加肿瘤对化疗的敏感性,对维持正常细胞生物学特性具有重要作用。

1 Survivin 结构、分布和功能

Survivin 是 1997 年 Ambrosini 发现的一种凋亡抑制基因,¹ 是利用效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1) cDNA 在人类基因组文库中首先克隆出来的,因可延长细胞的生存又名“存活素或生存素”。该基因定位于 17q25,全长 14.7 kb,含有 3 个内含子和 4 个外显子,序列与 EPR-1 高度同源,反向互补。Survivin 编码的蛋白质由 142 个氨基酸组成,分子量 16.5 KD,是分子量最小的 IAP 分子。IAP 家族一般都含有 2-3 个串连的含有半胱氨酸/组氨酸共有序列在内的 70 个氨基酸组成的杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列(baculovirus IAP repeat, BIR)及羧基末端环指结构,主要为 BIR 发挥抗凋亡作用。Survivin 只有 1 个 BIR 结构,而且羧基末端缺乏环指结构,代之以一条长的交织螺旋结构(coiled coil)- α 6,调节其与纺锤体上的微管蛋白结合,发挥抗凋亡作用。

Survivin 主要表达于胚胎、子宫内膜、胸腺及多数肿瘤组织内,在分化成熟的正常组织中未见表达。

Survivin 80%分布在细胞浆,20%在细胞核内。胞浆中的 survivin 作用于着丝点、微管和有丝分裂其它部分,而核内 survivin 定位于染色体分裂中期的动粒上。提示 survivin 在有丝分裂的各个时段均起调节作用。因此,恶性肿瘤中过高的 survivin 可能参与异常的分裂活动,导致肿瘤细胞的非整倍性。Survivin 的分布具有周期依赖性,其在 G1 期不表达,在 S 期表达增加 6 倍,G2/M 期增加 40 倍。这种高表达使 survivin 与有丝分裂纺锤体的微管结合,间接抑制 caspase 对纺锤体的水解作用,保证有丝分裂进行,同时通过活化周期依赖蛋白激酶 CDK4,越过 G2/M 期的“checkpoint”完成异常的有丝分裂,无限制增殖。Survivin 可直接与 caspase-3 和 caspase-7 结合并抑制其活化,而现在认为 survivin 更可能与 caspase-9 结合从而启动内源性途径。另外, survivin 还可与细胞周期调控因子 CDK4 结合,使 p21 从与 CDK4 结合的复合物中释放出来,与线粒体 procaspase-3 作用,灭活 caspase-3 从而抑制凋亡。

2 Survivin 与黑素瘤

Lu 等比较环氧合酶-2(Cox-2)、 α -chemokine SDF-1 受体(cxcR4),² 上皮糖蛋白-2(EGP-2)和 survivin,发现 survivin 在黑素瘤细胞中表达活性最强,因此是最有价值的肿瘤特异性启动子,是黑素瘤基因治疗的重要靶目标。Tas 等抽取 344 个黑素瘤病人的血液标本分析 survivin 与 Bel-2 的水平,³ 发现这两种抗凋亡因子与对照组均没有明显差别,而在接受达巴卡嗪治疗的 10 例转移的病人中 survivin 表达提高 10 倍,而 bel-2 无变化。Gradilone 等应用 RT-PCR 和免疫组化研究黑素瘤病人哨兵淋巴结(CLNS)内凋亡相关基因 survivin,⁴ bcl-2, bcl-x, bax 与预后之间关

基金项目:山东省科技攻关计划,项目编号 2007GG20002044

作者单位:山东大学附属省立医院烧伤整形美容外科,250021

系,发现只有 survivin 与预后明确相关。表达 survivin 的病人有 61.5% 死亡或疾病进展,38.5% 康复,而 survivin 表达阴性病人经随访 52.9 个月全部康复,而其他因子未发现明显相关性。因此,黑素瘤中 survivin 不仅具有诊断价值,而且是治疗的潜在靶目标。

Survivin 基因选择性转录产生 5 种不同的异构体: survivin、survivin-2 α 、survivin-2 β 、survivin-3 β 、survivin- Δ Ex3。它们在细胞内有不同的定位和作用。Survivin-2 β 位于胞浆内,尤其线粒体内,其表达有细胞毒性,已证明在肺癌、结肠癌中它通过抑制线粒体释放 survivin 从而诱导细胞凋亡。Survivin- Δ Ex3 定位于核仁,其表达与病人死亡和肿瘤复发有关,是细胞抗凋亡所必须的。核染色阳性与 survivin- Δ Ex3 表达有关。独立的 survivin 核染色与 I 期、II 期黑素瘤病人的不良预后密切相关,是预后的早期重要指标,能帮助筛查病人或辅助治疗。Ding 等发现痣与黑素瘤的胞浆内 survivin 分布无明显差别,⁵ 而核内 survivin 仅在黑素瘤中表达,痣中无表达。对黑素瘤生物学行为具有诊断和治疗的双重价值。Piras 等通过对 50 例 I 期和 II 期黑素瘤标本免疫组化染色发现,⁶ survivin 核染色阳性与低生存率明显相关,阳性病人(53.3%)与阴性病人(90%)5 年生存率存在明显差异,而且阳性病人术后 3 年复发率 6 倍增长,但胞浆 survivin 染色阳性与生存率、复发率无关。

在黑素瘤众多的基因改变中最显著的包括:(1) BRAF、HRAS 或 NRAS 的突变;(2)端粒酶活性的提高;(3)视网膜母细胞瘤(Rb)信号的缺失;(4)p53 信号的改变。正常黑素细胞发生此 4 种基因改变就足以转化为侵袭性黑素瘤。Deepak 等证实正常黑素细胞中 p53、E2F 相邻结合于 survivin 启动子并对 survivin 表达起抑制作用。⁷ p53、E2F 结合位点的突变可激活 survivin 启动子,阻碍凋亡。他们证实 p53 不仅通过 p21-Rb-E2F 途径发挥作用,还可直接对 survivin 起作用。在黑素细胞中,p53 和 Rb 都与 survivin 的表达相关,任一因子的失活,均可激活 survivin 的表达。

最近 Piras 等发现在 p53 突变病人中 survivin 的表达明显高于 p53 未突变的病人,⁸ 证明 p53 对 survivin 在黑素瘤的表达有抑制作用,但 survivin 与 p16 无明显关联。在单变量分析中,survivin 的核表达、p53 的突变和 p16 均与不良预后有关。而且,这三者结合起来的预后价值高于任一单量,死亡率随着这些分子数量的增加而提高。Hilmi 等证实 IGF1 在黑素瘤细胞中发挥其抗凋亡作用的机制之一是增加 Bcl-2、Bcl-x 和 survivin 的 mRNA 及蛋白表达水平,⁹ 通过小分子干扰 RNA 来沉默它们的表达,能阻止 IGF1 的抗凋亡作用。

Ryu 将影响黑素瘤进展的转录子分为三种:¹⁰ (1)

基因上调与激活加速细胞周期、DNA 复制和修复有关,包括: CDCA2、NCAPH、NCAPG、PBK、NUSAP1、survivin 等;(2)基因缺失与细胞粘附和黑色素细胞分化有关,包括: CDH3、CDH1、C-KIT、PAX3 等;(3)基因上调与抗凋亡因子 survivin 有关。

Andersen 等证明在原发和转移的黑素瘤病人的血液及肿瘤中均可找到 survivin 特异的细胞毒性 T 细胞(CTL)。¹¹ Coughlin 等则发现血循环中 survivin 特异性 CTL 多见,¹² 而黑素瘤内少见,因此以 survivin 为基础的免疫治疗应以 T 细胞汇聚肿瘤内为重点,最近报道了首例针对 survivin 的 T 细胞免疫应答的治疗,给 IV 期黑素瘤病人应用 HLA-A2 限制性 survivin 疫苗,显示有 survivin 反应性 CD8⁺ T 细胞聚集到转移组织中,而且没有疫苗相关毒副反应。¹³ 因此,诱导 T 细胞免疫来对抗 survivin 是可行的,即使对晚期肿瘤病人这些疫苗也是可以接受的。另外在黑素瘤完全切除的病人应用白介素-2 为基础的免疫治疗,其抗 survivin 活性可维持超过 7 年,即使临床表现消失后在外周血仍有活性。¹⁴ 针对黑素瘤、结肠癌、乳腺癌和大肠癌的 4 种口服 DNA 疫苗已在大鼠模型中证明能起到保护作用。这些疫苗来自减毒的鼠伤寒沙门氏菌,到达转移的淋巴器官针对血管上皮生长因子受体-2、转录因子 Fas-相关抗原-1、survivin 和 legnmain 起作用,激活细胞免疫对自身抗原,从而抑制肿瘤生长和转移。其核心机制是抑制肿瘤血管生成和激活细胞毒性 T 细胞、自然杀伤细胞、抗原递呈细胞等。这种疫苗为肿瘤治疗提供新的希望。¹⁵ Reker 等的实验证实了两种 survivin 起源的 HLA-B35 的抗原决定簇所引起的 T 细胞的活性能够在黑素瘤病人外周血中找到,而且在原发的黑素瘤中存在针对 survivin 的自发的细胞毒性 T 细胞的反应,这为癌症病人应用 survivin 为基础的免疫治疗提供了依据。¹⁶

Takeuchi 等应用 qRT 研究 survivin mRNA 水平与 IV 期黑素瘤病人预后,¹⁷ 显示 63 例黑素瘤中 62 例免疫组化染色阳性,在接受抗癌疫苗 CanvaxinTM 中,低水平 survivin 表达的病人预后及对免疫治疗的疗效都好于高水平 survivin 表达者。

Survivin 是热休克蛋白(Hsp)-90 的“服务蛋白”(client protein),survivin 与 Hsp-90 的结合有助于 survivin 蛋白的成熟、装配与转运。阻断 survivin 抗凋亡途径能提高光动力疗法(PDT)的疗效,Ferrario 等应用黑素瘤细胞转染沉默 survivin 后发现其与野生型 survivin 细胞相比,¹⁸ 经过 PDT 治疗后,细胞 caspase 多聚酶活性、凋亡水平及细胞毒性均增加,提示控制 survivin 介导的抗凋亡途径可提高 PDT 的治疗效果。

Liu 等研究 survivin 的突变体在体外及动物模型中对黑素瘤的作用,¹⁹ survivin 由 Thr34-Ala 突变可导

致主要的有丝分裂激酶 P34cdc2 - cyclin B1 去磷酸化而引起凋亡。Survivin 阻断引起线粒体内的多极化, 细胞色素 C 和 Smac/DIABLO 释放, 但其他 IAP 分子无变化。最先变化的是线粒体凋亡诱导因子(AIF)的核异位, 从而引起线粒体凋亡途径和 Caspase 依赖的 DNA 碎裂。这表明 survivin 重要的抗凋亡途径是对线粒体及 AIF 依赖的凋亡途径的抑制。Survivin 在黑素瘤的表达阻止了依赖和非依赖 Caspase 的凋亡。Survivin 突变体在 3 种人黑素瘤细胞中均促进细胞凋亡, 并增强细胞对化疗药物顺铂的敏感性。应用 survivin 突变体可阻止免疫缺陷大鼠接种 YUSAC2 黑素瘤细胞后形成黑素瘤, 而对已形成的黑素瘤应用 survivin 突变体可阻止肿瘤生长达 60% ~ 70%。

尽管许多 survivin 拮抗剂已被证实能诱导肿瘤细胞凋亡, 但其利用价值却因其不能有效渗透细胞而受到限制。Yan 利用 TAT 蛋白转导区和野生型 survivin 或 survivin 负显性变构体结合,²⁰ 增加它们的渗透性, 形成两种重组蛋白: TAT - Surv - WT 和 TAT - Surv - T34A, 发现 TAT - Surv 蛋白在浓度 30nM 时 30 min 内快速进入细胞, TAT - Surv - WT 对 YUSAC2 和 WM793 黑素瘤细胞无明显作用, 而 TAT - Surv - T34A 可诱导细胞分离、DNA 断裂、caspase - 3 激活和线粒体释放促凋亡因子。给予皮下种植 YUSAC2 黑素瘤细胞的大鼠腹腔注射 TAT - Surv - T34A, 发现 1 h 内就形成肿瘤内聚集, 在原位加速细胞凋亡和异形核形成, 重复腹腔注射则导致肿瘤体积减小 40% ~ 50%, 而注射 TAT - Surv - WT 则无明显效果, 证实应用细胞渗透性 survivin 拮抗剂对系统治疗肿瘤的实用性。

抗凋亡因子 survivin 为黑素瘤的诊断、预后及治疗提供新的思路, 是基因治疗的一个靶目标, 因其良好的靶向性、特异性和安全性, 并且与化疗等其他治疗相结合, 可更大程度地发挥抗肿瘤效应。由 survivin 起源的抗原免疫治疗试验已成功应用于黑素瘤的治疗。

参 考 文 献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *Biol Chem* 1998;273:11177 - 11182.
- 2 Lu B, Makhija SK, Nettelbeck DM, et al. Evaluation of tumor - specific promoter activities in melanoma. *Gene Ther* 2005;12:330 - 338.
- 3 Tas F, Duranyildiz D, Argon A, et al. Serum, bcl - 2 and survivin levels in melanoma. *Melanoma Res* 2004;14:543 - 546.
- 4 Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, et al. Survivin, bcl - 2, bax, and bcl - x gene expression in sentinel lymphnode from melanoma patients. *J Clin Oncol* 2003;21(2):306 - 312.
- 5 Ding Y, Victor GP, Peter SZ, et al. Nuclear expression of the anti-

- apoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer* 2006;106:1123 - 1129.
- 6 Piras F, Murtas D, Minerbal, et al. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 2007;50:835 - 842.
- 7 Deepak R, Tong L, George S, et al. Survivin repression by P53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis* 2008;29:194 - 201.
- 8 Piras F, Perra MT, Murtas D, et al. Combinations of apoptosis and cell - cycle control biomarkers predict the outcome of human melanoma. *Oncol Rep* 2008;20:271 - 277.
- 9 Hilmi C, Larrubere L, Giuliano S, et al. IGF1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of Bcl - 2, Bcl - x(1), and survivin. *J Invest Dermatol* 2008;128:1499 - 1505.
- 10 Ryu B, Kim DS, Deluca AM, et al. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLOS ONE* 2007;2:594.
- 11 Andersen MH, Pedersen LO, Capeller - B, et al. Spontaneous cytotoxic T - cell responses against surviving - derived MHC class I restricted T - cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:5964 - 5968.
- 12 Coughlin CM, Flening MD, Carroll RG, et al. Immunosurveillance and survivin - specific T - cell immunity in children with high - risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2006;24:5725 - 5734.
- 13 Otto K, Andersen MH, Eggert AO, et al. Therapy - induced T cell responses against the universal tumor antigen survivin. *Vaccine* 2004;23:884 - 889.
- 14 Hadrup SR, Gehl J, Sorensen RB, et al. Persistence of survivin specific T cells for seven years in a melanoma patient during complete remission. *Cancer Biol Ther* 2006;5:480 - 482.
- 15 Xiang R, Luo Y, Niethammer AG, et al. Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunol Rev* 2008;222:117 - 128.
- 16 Reker S, Becker JC, Sevane IM, et al. HLA - B35 - restricted immune response against survivin in cancer patients. *Int J Cancer* 2004;108:937 - 941.
- 17 Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, et al. Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer* 2005;117(6):1032 - 1038.
- 18 Ferrario A, Rucker N, Wong S, et al. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res* 2007;67:4989 - 4995.
- 19 Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase - independent apoptosis in survivin - targeted melanoma cells. *Oncogene* 2004;23:39 - 48.
- 20 Yan H, Thomas J, Liu T, et al. Induction of melanoma cell apoptosis and inhibition of tumor growth using a cell - permeable survivin antagonist. *Oncogene* 2006;25:6968 - 6974.

(收稿:2008 - 12 - 09 修回:2009 - 01 - 09)