

# 肝胆肿瘤细胞转录因子 Oct-4 的表达对 Survivin 抗凋亡作用的调控

王端明<sup>1</sup> 刘辰<sup>2</sup> 姜小清<sup>2</sup> 谭蔚锋<sup>2</sup> 王敬晗<sup>2</sup> 李林芳<sup>2</sup> 钱其军<sup>2</sup> 苏长青<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>石河子大学动物科技学院/医学院, 石河子 832003; <sup>2</sup>第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

**摘要** 对临床原发性肝癌、胆囊癌、胆管癌标本 Oct-4 和 Survivin 的表达进行了免疫组化鉴定; 进一步建立肝癌、胆囊癌、胆管癌细胞系 EHBH-H1、EH-GB1 和 EH-CA1, 利用腺病毒携带 Survivin-shRNA 或 Oct-4 基因感染癌细胞系, 并利用流式细胞术观察细胞周期和细胞凋亡的变化, 探讨转录因子 Oct-4 与 Survivin 之间的相互调控及对癌细胞遗传特性的影响。结果表明, 临床原发性肝癌、胆囊癌、胆管癌标本 Oct-4 阳性率达 60.7%, Survivin 阳性率达 75.0%, 且两者之间存在明显的正相关关系; 特异性 shRNA 沉默 EH-CA1 癌细胞 Survivin 的表达后, 其 Oct-4 表达没有变化, 但诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡; EH-GB1 癌细胞获得 Oct-4 表达后, Survivin 表达增强, 促进细胞周期运行并下调细胞凋亡。实验证实 Oct-4 可以增强癌细胞 Survivin 的表达, 从而发挥促进细胞周期运行、抑制细胞凋亡的作用, 此研究为建立并优化肿瘤基因治疗的策略提供了新的靶点。

**关键词** 肝胆肿瘤; 转录因子 Oct-4; Survivin; 细胞周期; 凋亡

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族的成员之一, 在胚胎发育和细胞分化中调控细胞的有丝分裂, 抑制细胞凋亡。Survivin 在绝大多数人类肿瘤组织中均高表达, 显示 Survivin 与肿瘤的发生发展存在极为密切的关系<sup>[1,2]</sup>。Survivin 抑制肿瘤细胞凋亡的分子机制已有较多报道, 但结果分歧较大, 尚有许多有待解决的疑难问题。其中, Survivin 与其它调控因子的相互作用尤为值得注意。体细胞在分化成熟的过程中可通过 STAT3、c-myc 和 VEGF 等上游基因使 Survivin 表达沉默<sup>[3]</sup>。野生型的 p53 基因可负调控 Survivin 基因表达, 突变的 p53 基因丧失了对 Survivin 基因转录的抑制作用, 促使 Survivin 高表达<sup>[4,5]</sup>。我们在肝胆肿瘤的研究中发现, 转录因子 Oct-4 对 Survivin 的表达有正向调节作用, 可能是 Survivin 抑制肝胆肿瘤细胞凋亡的一个重要调控因子。深入研究 Oct-4 对 Survivin 抗凋亡作用的调控机制, 有望发现肿瘤基因治疗的新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本 新鲜的手术标本共 28 例, 其中 16 例原发性肝癌, 7 例胆囊癌, 5 例胆管癌, 均经病理诊断证实。标本经 10% 中性福尔马林固定 6 h, 石蜡包埋, 连续切片, 备作 HE 染色和免疫组化染色。取原

发性肝癌、胆囊癌和胆管癌标本的新鲜组织各 1 例, 经胶原酶消化, 原代培养细胞, 传代培养后建成 1 株原发性肝癌细胞系 EHBH-H1, 1 株胆囊癌细胞系 EH-GB1 和 1 株胆管癌细胞系 EH-CA1<sup>[6,7]</sup>。

1.1.2 主要试剂 细胞培养液购于美国 GIBCO 公司, 鼠抗人 Oct-4 单抗为美国 Santa Cruz 公司产品, 兔抗人 Survivin 多抗购于美国 R&D 生物公司, 双染 SP 试剂盒和 FITC 荧光素标记的羊抗鼠或羊抗兔 IgG 购自福州迈新生物技术公司。表达 Oct-4 基因的腺病毒载体 Ad-Oct4、表达 Survivin-shRNA 的腺病毒载体 Ad-shRNA 由上海东方肝胆外科医院病毒与基因治疗研究室构建并保存。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组化 采用链菌素亲生物素-过氧化物酶法(SP法)进行免疫组化染色。切片脱蜡至水, PBS 洗后, 按 SP 试剂盒说明书进行 Oct-4 和 Survivin 蛋白的免疫组化染色。实验以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判断, 对每张切片在高倍镜( $\times 400$ )下计数 10 个视野。以染色强度计分, 与阴性对照相同者

收稿日期: 2010-04-14 接受日期: 2010-09-08

国家科技重大计划新药创制项目(No.2009ZX09102-235)和国家自然科学基金(No.30872507, No.81071866)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 021-81875372, E-mail: suchangqing@gmail.com

计0分, 浅、中、深染色分别计1、2、3分; 再以阳性细胞比例计分, 全部阴性0分, 1/3以下、1/3~2/3、2/3以上细胞数阳性分别计1、2、3分, 两项得分相加,  $\geq 3$ 分为阳性, 计算阳性率。

**1.2.2 重组腺病毒感染肿瘤细胞实验** 培养EHBH-H1、EH-GB1和EH-CA1细胞系, 回收细胞, 预实验用免疫荧光标记鉴定 Oct-4 和 Survivin 蛋白的表达。在预实验基础上, 选择 Oct-4 阴性表达的 EH-GB1 细胞系感染腺病毒载体 Ad-Oct4, 选择 Survivin 阳性表达的 EH-CA1 细胞系感染腺病毒载体 Ad-shRNA, 感染强度 MOI=10。病毒感染后 48h 回收裂解细胞, Western blot 鉴定 Oct-4 和 Survivin 蛋白的表达。EH-CA1 细胞系感染阴性对照 shRNA 载体作为对照组。

**1.2.3 流式细胞术** 分别回收感染和未感染腺病毒载体 Ad-Oct4 或 Ad-shRNA 的 EH-GB1 和 EH-CA1 细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7/\text{ml}$ , 终浓度 70% 的预冷酒精固定 6 h, PBS 洗涤并重悬, 加碘化丙啶 (PI) 至终浓度  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  和 RNase A 至终浓度  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 室温孵育 30 min 后, 流式细胞仪检测。

**1.2.4 统计分析** Oct-4 和 Survivin 表达采用阳性率比较的卡方检验; 细胞周期和细胞凋亡比例以“平均值±标准差”来表示, 采用方差分析进行统计学处理, 分析软件为 SPSS13.0, 当  $P < 0.05$  时为差异具有显著性。

**Table 1 Relationship between Oct-4 and Survivin expression in hepatobiliary cancer cells**

Index	n	Oct-4		P value
		Positive	Negative	
Survivin	Positive	21	5	0.0037
	Negative	7	6	
Total	28	17	11	

Note: Chi-square test between Oct-4 and Survivin expression.

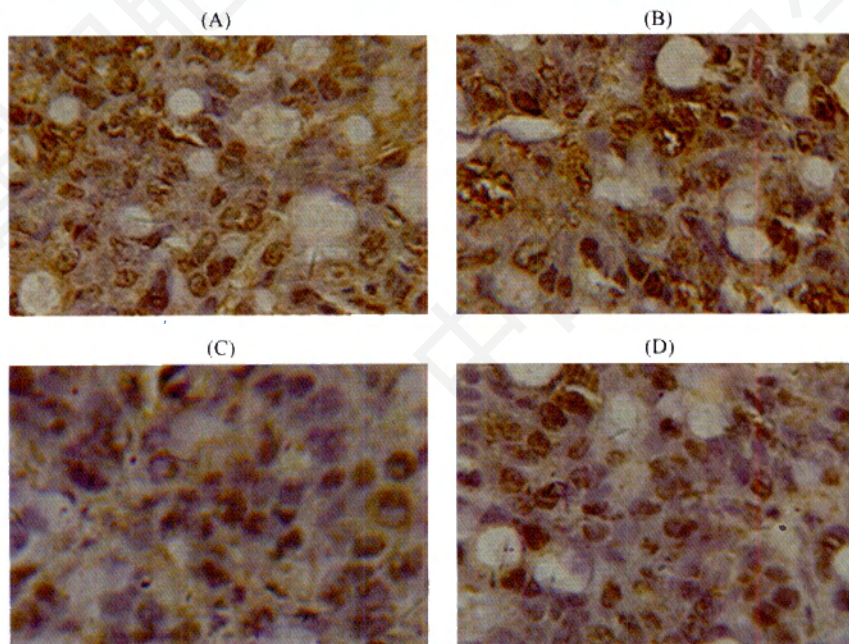
## 2 结果

### 2.1 肿瘤细胞 Oct-4 和 Survivin 表达的相关性

临床肿瘤标本中, Survivin 阳性率为 75.0% (21/28), 其中肝癌 12 例, 胆囊癌 5 例, 胆管癌 4 例, 阳性反应主要分布于细胞核和细胞浆(图 1A, 图 1B); Oct-4 阳性率为 60.7% (17/28), 其中肝癌 9 例, 胆囊癌 4 例, 胆管癌 4 例, 阳性反应主要分布于细胞核(图 1C, 图 1D)。在 Oct-4 阳性的 17 例肿瘤标本中, Survivin 阳性 16 例(94.1%), 而在 Oct-4 阴性的 11 例肿瘤标本中, Survivin 阳性仅 5 例(45.5%), 两者之间存在明显的正相关关系( $P=0.0037$ ), 见表 1。

### 2.2 Oct-4 对 Survivin 蛋白表达的调控

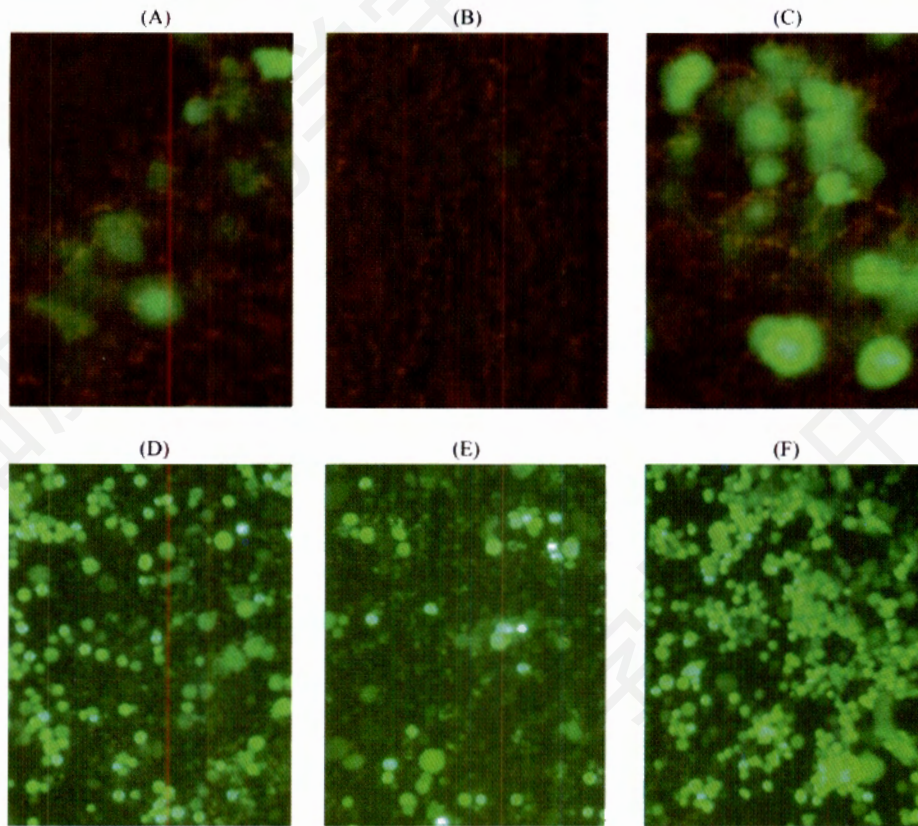
免疫荧光标记鉴定, Oct-4 阳性表达见于 EHBH-H1 和 EH-CA1 细胞系, 而 EH-GB1 呈 Oct-4 阴性表达(图 2A~2C); EHBH-H1、EH-GB1 和 EH-CA1 三个细



**Fig.1 Expressions of Oct-4 and Survivin in hepatobiliary cancer cells**

A: Survivin expression in liver cancer (300 ×); B: Survivin expression in biliary duct cancer (300 ×); C: Oct-4 expression in liver cancer (300 ×); D: Oct-4 expression in biliary duct cancer (300 ×).



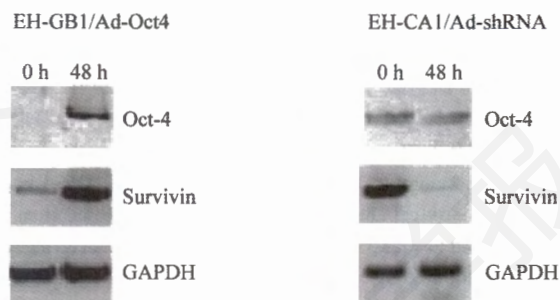


**Fig. 2 Immunofluorescent labeling of Oct-4 and Survivin expression in hepatobiliary cancer cells**

A~C: Oct-4 expression in EHBH-H1, EH-GB1, EH-CA1, respectively (400 ×); D~F: Survivin expression in EHBH-H1, EH-GB1, EH-CA1, respectively (200 ×).

胞系均呈 Survivin 阳性表达(图 2D~2F)。

EH-GB1 细胞感染腺病毒载体 Ad-Oct4 后 48 h, Oct-4 表达由阴转阳, Survivin 蛋白的表达与病毒感染前相比有所增强。EH-CA1 细胞系感染腺病毒载体 Ad-shRNA 后 48 h, Survivin 表达由阳转阴, 而 Oct-4 表达没有明显变化(图 3)。



**Fig. 3 Expressions of Oct-4 and Survivin in hepatobiliary cancer cells after infection of Ad-Oct4 and Ad-shRNA, respectively**

### 2.3 肿瘤细胞周期和细胞凋亡

上述EH-GB1和EH-CA1癌细胞系分别感染腺病毒载体 Ad-Oct4 或 Ad-shRNA 后, 流式细胞术检测肿瘤细胞周期和细胞凋亡的变化。结果发现, 与感染前(0h)相比, EH-GB1 细胞感染腺病毒载体 Ad-Oct4 后 48 h, 其 S 期细胞比例明显上升,  $G_0/G_1$  期细胞比例下降, 凋亡细胞比例明显下降。EH-CA1 细胞系感染腺病毒载体 Ad-shRNA 后 48 h, 其 S 期细胞比例明显下降,  $G_0/G_1$  期细胞比例上升, 而凋亡细胞比例明显上升(表 2)。

### 3 讨论

Survivin 抑制肿瘤细胞凋亡已有较多文献报道, 但其体内调节机制以及与其它关键基因之间的相互作用还存在诸多有待解决的问题。有实验证实, 小鼠胚胎细胞 Survivin 的功能活性受 Oct-4 转录因子的调节, 降低细胞 Oct-4 表达会明显抑制 Survivin 基因启动子的活性, 从而抑制 Survivin 的表达<sup>[8]</sup>。Oct-4 属

Table 2 Cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells

Cell lines	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub> (%)	S(%)	G <sub>2</sub> /M(%)	Apoptosis(%)
EH-GB1				
Ad-Oct4 (0h)	59.06±11.22	40.90±10.24	0.04±0.01	5.40±1.32
Ad-Oct4 (48h)	38.50±10.45*	60.00±13.45*	1.50±0.51	0.76±0.09**
EH-CA1				
Ad-shRNA (0h)	44.01±9.98	55.74±14.72	0.25±0.05	0.73±0.06
Ad-shRNA (48h)	58.62±12.65*	40.28±9.86**	1.10±0.64	11.22±2.33**

Note: versus the group before infection (0h), ANOVA, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

于 POU 转录因子家族, 是一类 DNA 结合蛋白, 能够激活在启动子或增强子区域内带有顺式反应元件(ATG CAA AT)的基因的转录, 在维持干细胞的未分化状态和调节干细胞的分化过程中起着关键性作用。同 Survivin 一样, Oct-4 仅在发育早期的胚胎、生殖细胞和未分化的胚胎干细胞中表达, 而在成熟的体细胞中则仅见于具有干细胞特征的组织细胞中。但近来的研究证实, 人体很多类型的肿瘤细胞也有较高水平的 Oct-4 表达, 可能参与维持肿瘤细胞特别是肿瘤干细胞的自我更新、阻止肿瘤细胞分化等功能<sup>[9]</sup>。那么, 在恶性转化的肿瘤细胞中, Survivin 和 Oct-4 之间是否存在相互调节或影响的关系, 目前国内外尚未见文献报道。

通过对临床肿瘤标本的研究发现, 原发性肝癌、胆囊癌、胆管癌 Oct-4 阳性率达到 60.7%, Survivin 阳性率达到 75.0%, 显示两者在肝胆肿瘤标本中阳性率较高, 而且两者之间存在明显的正相关关系。为了更深入地研究肝胆肿瘤的生物学特性, 我们利用这些临床标本分别建立了肝癌、胆囊癌、胆管癌细胞系各一株。通过免疫荧光标记鉴定, 发现肝癌 EHBH-H1、胆囊癌 EH-GB1 和胆管癌 EH-CA1 三个细胞系均增殖活跃, Survivin 表达阳性。但 EH-GB1 呈 Oct-4 阴性表达, EHBH-H1 和 EH-CA1 呈 Oct-4 阳性表达。因此, 我们利用腺病毒载体携带 Survivin-shRNA 或 Oct-4 表达盒, 选择 Survivin 阳性的 EH-CA1 进行该基因表达的抑制实验, 选择 Oct-4 阴性表达的 EH-GB1 进行基因表达的增强实验, 并利用流式细胞术观察细胞周期和细胞凋亡的变化, 试图验证 Survivin 和 Oct-4 在肿瘤细胞中的表达是否存在相互调控及其对细胞的影响。实验结果发现, EH-GB1 细胞获得外源性 Oct-4 表达后, Survivin 表达增强, 而 EH-CA1 细胞在沉默 Survivin 表达后, Oct-4 表达没有变化, 结果显示 Oct-4 对 Survivin 的表达有正向调控作用, Oct-4 是

Survivin 表达的上游调控基因。Oct-4 引起的 Survivin 增强表达, 直接促进了癌细胞周期的进展和细胞凋亡的抑制, 而沉默 Survivin 表达则引起细胞周期阻滞, 诱导细胞的凋亡。

综上所述, 肝胆肿瘤细胞中转录因子 Oct-4 可以调控 Survivin 的增强表达, 从而发挥促进细胞周期进展、抑制细胞凋亡的作用。这项研究为建立并优化肿瘤基因治疗的策略提供了新的靶点。

### 参考文献(References)

- Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009; 35(7): 553-62.
- Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, Razmin G, Shiran MS, Hatta AZ, *et al.* Immunohistochemical study of p16 INK4A and survivin expressions in cervical squamous neoplasm. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53(1): 1-6.
- Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, Sandur SK, Pandey MK, Kunnumakkara AB, *et al.* Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1091: 151-69.
- Kannangai R, Wang J, Liu QZ, Sahin F, Torbenson M. Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; 35(1): 53-60.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; 277(5): 3247-57.
- 钱炎珍, 黎江, 李林芳, 刘辉, 刘韬, 姜梨华, 等. 人肝癌细胞系 EH-H1 的建立及其相关生物学特性. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2009; 16(1): 84-7.
- 李林芳, 胡还章, 刘辰, 王敬晗, 吴红平, 金华君, 等. 首株来源于转移灶的人胆囊癌细胞系 EH-GB1 的建立及鉴定. *中华肿瘤杂志* 2010; 32(2): 84-7.
- Guo Y, Mantel C, Hromas RA, Broxmeyer HE. Oct-4 is critical for survival/antiapoptosis of murine embryonic stem ce<sup>l</sup>s subjected to stress: effects associated with Stat3/surviving. *Stem Cells* 2008; 26(1): 30-4.
- Lau SK, Chang KL. OCT4: a sensitive and specific immunohistochemical marker for metastatic germ cell tumors. *Adv Anat Pathol* 2006; 13(2): 76-9.



## Expression of Oct-4 Transcriptional Factor Regulates the Anti-Apoptosis Effect of Survivin in Hepatobiliary Cancer Cells

Duan-Ming Wang<sup>1</sup>, Xiao-Qing Jiang<sup>2</sup>, Wei-Feng Tan<sup>2</sup>, Chen Liu<sup>2</sup>, Jing-Han Wang<sup>2</sup>, Lin-Fang Li<sup>2</sup>,  
Qi-Jun Qian<sup>2</sup>, Chang-Qing Su<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China; <sup>2</sup>Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**Abstract** The transcriptional factor Oct-4 and Survivin are the key regulatory factors in cancer cell proliferation and mitosis. To investigate the relationship between Oct-4 and Survivin and the effect on genetic characteristics of cancer cells, the expressions of Oct-4 and Survivin were examined immunohistochemically in the clinical specimens of primary hepatocellular carcinoma, gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. The positive rates of Oct-4 and Survivin were 60.7% and 75.0%, respectively, and there was a parallel relationship between Oct-4 and Survivin in the hepatobiliary cancers. The cancer cell lines of primary hepatocellular carcinoma, gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma, EHBH-H1, EH-GB1 and EH-CA1, were established. The expression of Survivin in EH-CA1 was silenced by adenovirus carrying Survivin-shRNA, and the re-expression of Oct-4 in EH-GB1 was done by adenovirus carrying Oct-4 cDNA. The cell cycle and apoptosis were observed by flow cytometry. The results demonstrated that Oct-4 could regulate and enhance the expression of Survivin, then promote the cell cycle progression and inhibit cell apoptosis in cancer cells. This finding provides us a novel target for cancer gene therapy.

**Key words** hepatobiliary cancer; Oct-4; Survivin; cell cycle; apoptosis

Received: April 14, 2010 Accepted: September 8, 2010

This work was supported by the National Significant Science and Technology Special Projects of New Drugs Creation (No.2009ZX09102-235) and the National Natural Scientific Foundation of China (No.30872507, No.81071866)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-81875372, E-mail: suchangqing@gmail.com