

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.10.005

# 亚硝胺诱发大鼠食管癌 survivin mRNA 转录水平及与病理变化的关系

施文荣, 谢佐福, 刘艳, 陈玲, 陈小明

## Relationship between survivin mRNA Transcription Level and Pathological Changes in Esophageal Carcinogenesis of Wistar Rats Induced by Nitrosamine

SHI Wen-rong, XIE Zuo-fu, LIU Yan, CHEN Ling, CHEN Xiao-ming

College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

Corresponding Author: XIE Zuo-fu, E-mail: xiezuofu@sina.com

**Abstract: Objective** To find the relationship between the survivin mRNA transcription levels in different stages of esophageal carcinogenesis and the pathological changes in rat model induced by methyl benzyl nitrosamine (MBNA). **Methods** Wistar rats were injected of MBNA at dose of 3.5mg/kg 2 times per week. At 10, 20, 30 week, 8 rats were respectively killed to observe the general situation and the pathological changes of esophageal mucosa. We also detect the transcription level of survivin mRNA by RT-PCR method. **Results** A progressive increase in esophageal lesions was observed. There was no significant difference among 10, 20 and 30 weeks of survivin mRNA transcription levels ( $0.48 \pm 0.16, 0.42 \pm 0.15, 0.46 \pm 0.17$ ) in rats ( $P > 0.05$ ), but when compared with normal rats ( $0.24 \pm 0.13$ ), significantly increase ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) was observed. **Conclusion** The transcription levels of survivin mRNA in early stage in the esophageal carcinogenesis induced by MBNA was high and maintain a high level in the cancer process. It is suggested that the inhibition of survivin mRNA transcription of esophageal cancer was a potential molecular target for prevention and treatment.

**Key words:** Methyl benzyl nitrosamine; Esophageal tumor; Rat; survivin

**摘要:目的** 探讨甲基苄基亚硝胺(MBNA)诱发食管癌变不同阶段食管组织 survivin mRNA 转录水平的变化及其与食管组织病理改变的关系。**方法** Wistar 大鼠按 3.5 mg/kg 体重剂量皮下注射 MBNA 溶液,每周 2 次,分别于造模第 10、20、30 周各处处 8 只模型大鼠,以同批次正常大鼠为对照,观察食管黏膜大体情况,常规固定切片,并提取新鲜食管组织总 RNA,RT-PCR 检测 survivin mRNA 转录水平。**结果** MBNA 诱导 10、20 及 30 周时,食管病变呈进行性加重;10、20 及 30 周时 survivin mRNA 转录水平( $0.48 \pm 0.16, 0.42 \pm 0.15, 0.46 \pm 0.17$ )差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但均较正常大鼠( $0.24 \pm 0.13$ )显著提高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。**结论** MBNA 诱导大鼠食管癌变过程中,survivin mRNA 转录水平在食管早期病变阶段即显著升高且在癌变过程中持续维持较高转录水平,因此抑制 survivin mRNA 转录是食管癌防治的一个潜在分子靶点。

**关键词:** 甲基苄基亚硝胺;食管肿瘤;大鼠;survivin

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)10-1113-04

## 0 引言

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一,我国食管

癌发病率居世界之首,其死亡率仅次于胃癌,居消化道恶性肿瘤的第二位,在癌症致死率中,居第六位<sup>[1-2]</sup>。内外源性的亚硝胺是食管癌的常见诱因之一,通常认为亚硝胺在体内代谢过程中产生的中间产物可导致细胞遗传的不稳定性,进而导致癌变的发生<sup>[3]</sup>。survivin 是凋亡蛋白抑制因子家族(inhibitor of apoptosis protein, IAP)的一个重要成员,其选择性地肿瘤组织中表达而在正常成熟组织中不表达,其与肿瘤发生、发展有关<sup>[4]</sup>。亚硝胺作为常见的食管癌诱因之一,其在诱导食管癌变不同阶段

收稿日期:2010-10-26;修回日期:2011-02-21

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2008J0292);福建省中西医结合老年性疾病重点实验室开放课题资助项目(2008J1004-52);陈可冀中西医结合发展基金资助项目(CKJ2008089)

作者单位:350108 福州,福建中医药大学中西医结合学院

通信作者:谢佐福, E-mail: xiezuofu@sina.com

作者简介:施文荣(1975-),男,硕士,讲师,主要从事中西医结合基础研究

对食管组织 survivin mRNA 转录水平的影响尚未见研究报道,本研究以甲基苄基亚硝胺(MBNA)诱导 Wistar 大鼠食管癌变来模拟人类食管癌的发生过程,探讨 MBNA 诱导食管癌变不同阶段 survivin mRNA 转录水平的变化特征及其与食管病变的关系。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

Wistar 大鼠 32 只,雌雄各半,体重 180~200 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证:SCXK(沪)2007-0005。MBNA,由本实验室有机合成。RNA guard:上海华舜生物技术有 限公司;Trizol:Invitrogen 公司;RevertAid First Strand cDNA synthesis kit、Tag 酶、dNTP:Fermentas 公司;其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 实验分组

24 只大鼠,雌雄各半,按 3.5 mg/kg 体重剂量皮下注射 0.15% MBNA 溶液,每周 2 次,分别于造模第 10、20、30 周各处死大鼠 8 只,雌雄各半,即为 10 周、20 周、30 周组,共 3 组。另 8 只大鼠,雌雄各半,于实验结束时处死,作为同批次正常对照组。大鼠处死后,将食管纵行剖开,于解剖镜下观察食管黏膜病变情况,取中段食管约 100 mg 保存于 RNA-guard 中,提取食管组织总 RNA,余下食管固定于 10%中性福尔马林固定液中,常规制片,HE 染色,光学显微镜观察病理组织学变化。

#### 1.3 食管黏膜病理形态学观察

观察并拍照记录大鼠咽部至胃的食管上皮变化及肿瘤发生情况,上皮变化分为光滑、粗糙、乳突瘤三级。使用 Digimizer3.0 图像分析软件测量瘤体长径及短径,瘤体体积按  $V = \text{长径} \times \text{短径}^2 \times 0.5$  计算,统计体积大于  $1 \text{ mm}^3$  瘤体数。

#### 1.4 病理组织学检测

食管病理组织学变化分为 6 级:无变化、轻度增生、中度增生、重度增生、原位癌、浸润癌。

#### 1.5 survivin mRNA 转录水平检测

异硫氰酸胍法(Trizol 法)提取食管组织总 RNA,核酸蛋白分析仪检测 260/280nm 比值,比值在 1.8~2.0 之间并计算 RNA 浓度;使用 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。RNA 使用 RevertAid First Strand cDNA synthesis kit 转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。survivin 及内参  $\beta$ -actin 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。survivin 引物:上游 5'-GACCACCG-GATCTACACCTT-3',下游 5'-TCTTCCACCT-GCTTCTTGACT-3',产物长度 239 bp。 $\beta$ -actin 引物:上游 5'-TGAGACCTTCAACACCCCAG-3',下游 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3',产物长度 311 bp。PCR 反应参数为:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 45 s,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,72℃ 终末延伸 10 min,共 30 个循环。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像分析系统采集图像,使用 Gel-Pro Analyzer 4.0 凝胶图像分析软件测量 DNA 条带的积分吸光度值(IOD 值),以 survivin 条带的 IOD 值与  $\beta$ -actin 条带的 IOD 值相比较得到相对 IOD 值,作为 survivin 的 mRNA 相对表达水平。

#### 1.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,两组均数比较采用  $t$  检验,计数资料用  $\chi^2$  检验。

### 2 结果

#### 2.1 食管上皮病理形态学改变

正常组大鼠食管黏膜均光滑,未见异常改变;MBNA 诱导 10 周时,部分大鼠可见食管黏膜粗糙,黏膜表面有细小颗粒样突起;MBNA 诱导 20 周及 30 周时,此阶段大鼠食管黏膜均为乳突瘤样改变,且 30 周时的病理形态学改变较 20 周更为严重,结果见表 1、图 1。

#### 2.2 食管上皮病理组织学改变

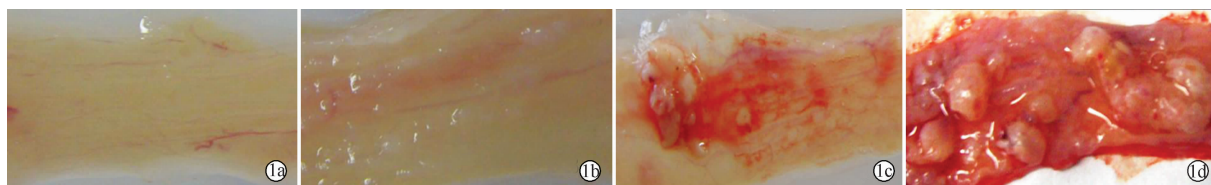
MBNA 诱导食管癌变不同阶段食管黏膜病理组织学分级,结果见表 2、图 2。

表 1 MBNA 诱导食管癌变不同阶段食管黏膜上皮变化情况

Table 1 The changes of esophageal mucosa in different stages of esophageal carcinogenesis induced by MBNA

Groups	n	The changes of esophagealmucosa			The number of tumors ( $\bar{x} \pm s$ )	Morbidity of tumor(%)
		Smooth	Rough	Papilloma		
Normal	8	8	0	0	0	0
10 Weeks	8	5	3	0	0	0
20 Weeks	8	0	0	8	8.25 ± 2.76 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
30 Weeks	8	0	0	8	13.12 ± 5.27 <sup>a,b</sup>	100 <sup>a</sup>

Note: a;  $P < 0.01$  vs. 10 weeks group; b;  $P < 0.05$  vs. 20 weeks group



1a: normal group(show the smooth esophageal mucosa); 1b: 10 weeks group(show the rough esophageal mucosa); 1c: 20 weeks group(show the papilloma); 1d: 30 weeks groups(show the papilloma)

图 1 MBNA 诱导食管癌变不同阶段食管黏膜上皮变化情况(×10)

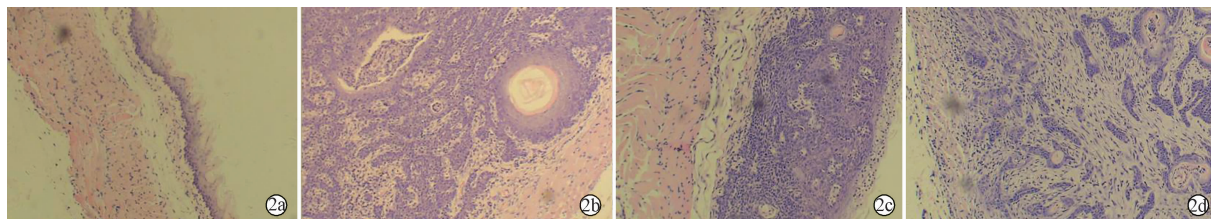
Figure 1 The changes of esophageal mucosa in different stages of esophageal carcinogenesis induced by MBNA (×10)

表 2 MBNA 诱导食管癌变不同阶段食管黏膜病理组织学分级

Table 2 The histopathological grading in different stages of esophageal carcinogenesis induced by MBNA

Groups	n	The histopathological grading						The number of cancer	The rate of cancer(%)
		NC	MiDP	MoDP	SDP	ISC	IC		
Normal	8	8	0	0	0	0	0	0	0
10 weeks	8	2	4	1	1	0	0	0	0
20 weeks	8	0	0	3	1	3	1	4	50 <sup>a</sup>
30 weeks	8	0	0	0	2	5	1	6	75 <sup>a</sup>

Note: NC: no change; MiDP: mild dysplasia; MoDP: moderate dysplasia; SDP: severe dysplasia; ISC: in situ cancer; IC: infiltration cancer; a:  $P < 0.01$  vs. normal group or vs. 10 weeks group



2a: show the normal esophageal mucosa; 2b: show the atypical hyperplasia (10 weeks induced by MBNA); 2c: show the in situ cancer (20 weeks induced by MBNA); 2d: show the infiltration cancer (30 weeks induced by MBNA)

图 2 MBNA 诱导食管癌变不同阶段食管黏膜病理组织学改变(HE ×200)

Figure 2 The histopathological changes of esophageal mucosa in different stages of esophageal carcinogenesis induced by MBNA (HE ×200)

### 2.3 食管组织 survivin mRNA 转录水平的变化

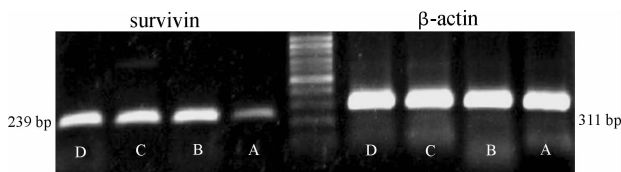
正常大鼠食管组织 survivin mRNA 转录水平较低, MBNA 诱导 10 周, 即可见 survivin mRNA 转录水平的提高, 而继续诱导至 20 及 30 周时, survivin mRNA 转录水平与 10 周时基本一致, 差异并无统计学意义, 结果见表 3、图 3。

表 3 MBNA 诱导食管癌变不同阶段食管组织 survivin mRNA 转录水平的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The change of survivin mRNA transcription level in esophageal tissue in different stages of esophageal carcinogenesis induced by MBNA ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	n	Survivin mRNA
Normal	8	0.24 ± 0.13
10 weeks	8	0.48 ± 0.16 <sup>b</sup>
20 weeks	8	0.42 ± 0.15 <sup>a</sup>
30 weeks	8	0.46 ± 0.17 <sup>b</sup>

Note: a:  $P < 0.05$  vs. normal group; b:  $P < 0.01$  vs. normal group



A: normal group; B: 10 weeks; C: 20 weeks; D: 30 weeks

图 3 MBNA 诱导不同阶段大鼠食管 survivin RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图像

Figure 3 The agarose gel electrophoresis image of product of rat esophageal survivin RT-PCR in different stages induced by MBNA

### 3 讨论

亚硝胺类化合物是世界公认的强致癌污染物, 而 MBNA 则是亚硝胺类化合物中与食管癌发病密切相关的物质之一。因此, 分析 MBNA 诱导食管癌变过程中相关基因表达的特征性改变, 是食管癌

防治研究的一个切入点。survivin 是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子,具有抑制细胞凋亡和维持细胞有丝分裂的双重功能<sup>[5]</sup>。survivin 影响食管癌的生物特性,并与食管癌的预后有关,survivin mRNA 的高转录在食管鳞癌的发生、发展和预后中起重要作用<sup>[6]</sup>。

我们研究表明,正常 Wistar 大鼠食管组织存在 survivin mRNA 的低水平转录,而经 MBNA 诱导 10 周时,即可导致 survivin mRNA 转录水平的显著提高,且在随后的阶段均维持相对稳定的高转录水平。MBNA 诱导 10 周时,食管组织的病理形态及病理组织学仅发生轻度改变,随着诱导时间的延长,食管组织病理形态学及组织学改变呈进行性加重。目前,survivin 与食管癌变进展关系的文献报道结果不尽一致。张红燕等<sup>[7]</sup>报道以正常食管活检标本为对照,survivin 蛋白在食管不典型增生、原位癌、浸润癌活检标本中的表达显著升高,但在不同病理组织学分级间的表达水平差异并无统计学意义,即未体现出随病变进展的进行性表达增强现象。钱志英等<sup>[8]</sup>报道 survivin mRNA 转录水平在人食管癌变过程中呈进行性升高,但其中不典型增生与正常对照组差异无统计学意义。而本文结果则显示,survivin mRNA 转录水平的提高是 MBNA 诱导大鼠食管癌变进程的上皮增生阶段即可发生的事件,且在病变发展过程中持续维持较高转录水平。笔者认为,本文 survivin mRNA 转录水平在食管癌变进程中持续维持高转录水平而未表现为进行性升高,可能与以下因素有关:(1)Wistar 大鼠与人类的种属差异;(2)MBNA 人工诱变效率高,在诱变的早期

阶段即可显著引起基因表达水平的改变,与食管癌的自然发生过程有一定差异。

综上所述,本研究及已有文献报道均支持 survivin 表达水平的提高是食管癌变过程中的一个特征性改变,因此在肿瘤基因治疗领域,基于 survivin 的分子治疗策略可用于亚硝胺类化合物诱导食管癌变的防治。而食管癌变过程中 survivin mRNA 及 survivin 蛋白的表达水平是否呈进行性升高尚有待更大样本的临床及基础研究予以确认。

#### 参考文献:

- [1] 王学勤,韩兴鹏. 食管癌的外科治疗[J]. 世界华人消化杂志, 2000,8(9): 1023-1024.
- [2] Russo A,Franceschi S. The epidemiology of esophageal cancer [J]. Ann 1st Super Sanita,1996,32(1):65-72.
- [3] 吴强强,魏亚宁,张素珍,等. 亚硝胺诱导食管癌变早期基因差异表达与表观遗传修饰的关系[J]. 世界华人消化杂志,2008, 16(14): 1487-1492.
- [4] 杨翌,王莉. 基于 survivin 的肿瘤生物治疗研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2006,14(9):1162-1163.
- [5] Andersen MH, thor SP. Survivin-a universal tumor antigen [J]. Histol Histopathol,2002,17(2):669-675.
- [6] 刘剑波,王克文. 食管癌 survivin mRNA 的异常表达[J]. 南华大学学报(医学版),2007,35(5):735-737.
- [7] 张红燕,李珊珊,任秀花,等. survivin 和 Mcm5 在食管活检组织中的表达及意义[J]. 实用诊断与治疗杂志,2006,20(10): 717-719.
- [8] 钱志英,何流,潘良熹,等. 荧光定量 PCR 法检测食管癌中 Survivin 基因的临床研究[J]. 肿瘤研究与临床,2005,17(2): 86-88.

[编辑:黄园玲;校对:刘红武]