

人外周血活化淋巴细胞 *survivin* 基因的转录激活和表达相关的信号转导通路研究*

董 燕 梅柱中 宋 宜 孙国敬 钱俊杰 刘 斌 刘 华 孙志贤**

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 *Survivin* 是与细胞增殖和细胞凋亡调控密切相关的重要功能蛋白质, 也是肿瘤临床诊断的分子标志物及治疗研究的理想靶标. 由于发现人外周血活化淋巴细胞存在 *Survivin* 蛋白的显著表达, 故以植物血凝素 (PHA) 和 IL-2 共刺激培养的正常人外周血单个核细胞为实验材料, 采用 RT-PCR、蛋白质印迹以及细胞周期分析等实验方法, 观察淋巴细胞活化与 *Survivin* 蛋白表达之间的相互关系, 并利用 3 种激酶抑制剂探索了淋巴细胞活化所致 *Survivin* 蛋白表达相关的信号转导通路. 实验结果表明: 人外周血单个核细胞在刺激培养 36 h 前后出现 *survivin* 基因的明显转录激活和蛋白质的起始表达, 表达产物的水平随培养时间的延长而增加, 且具有明显的细胞周期和周期时相依赖性. JAK2 的抑制剂 AG490 阻断细胞周期的运行, 且强烈抑制 *survivin* 基因的转录激活和蛋白质表达, PI3K 和 MEK 的抑制剂 Wortmannin 和 PD98059 也有一定程度的抑制作用. 所得实验结论是: *survivin* 基因的转录激活和蛋白质表达与淋巴细胞活化相关联, 代表细胞处在增殖状态. JAK2 介导的 JAK-STAT 信号通路是淋巴细胞活化, *Survivin* 蛋白表达必需和最重要的信号转导通路, PI3K 和 MEK 介导的信号通路也具有一定的影响作用.

关键词 *Survivin*, 活化淋巴细胞, 信号转导, 细胞增殖

学科分类号 Q55

Survivin 是迄今为止已鉴定的 8 个凋亡抑制蛋白 (IAPs) 家族成员中, 在基础与临床研究方面受到最为热切关注的分子^[1], 这缘于它表达的特异性与功能的多样性. 研究揭示: 它在胚胎与人类的绝大多数肿瘤组织细胞为高表达, 而在正常终末分化的成年组织与细胞基本不表达^[2]. 同时证明: *Survivin* 表达受细胞周期调控, 为 G2/M 期依赖的特异性高表达. 已取得的研究事实证明: *Survivin* 是细胞增殖调控与细胞凋亡调控界面间的“结点” (node) 分子^[3], 因此, 它是揭示肿瘤病因学的一个关键点, 而在临床上, 它的表达异常可做为一个有用的肿瘤诊断生物标志, 同时它又是一个理想的开展肿瘤治疗研究的重要靶分子^[4]. 近年来, 针对 *Survivin* 进行的研究工作, 多以高表达 *Survivin* 蛋白的肿瘤细胞为研究对象, 然而, Fukuda 等^[5] 的研究工作证明: 正常骨髓来源的 CD34⁺ 造血细胞有 *Survivin* 蛋白的表达. 我们先前的研究工作发现^[6]: 经植物血凝素 (PHA) 和重组人白细胞介素-2 (rhIL-2) 共刺激培养的正常人外周血单个核细胞 (PBMC) 也明显表达 *Survivin* 蛋白, 提示淋巴细胞活化的信号转导通路与 *survivin* 基因转录激活和表达调控相关.

人 PBMC 主要为处于静止期的成熟淋巴细胞和

少部分单核细胞. 当机体受外源性抗原刺激时, 会引发体内特异性淋巴细胞克隆活化, 以发挥免疫学功能. 已知 PHA 是 T 淋巴细胞非特异性的有丝分裂原, 也称“多克隆激活剂”, 能在体外活化高比例的淋巴细胞, 活化淋巴细胞可以在 IL-2 作用下进入细胞周期而增殖. 鉴于活化淋巴细胞显著表达 *Survivin* 蛋白的现象, 我们以刺激培养的人 PBMC 为实验模型, 探讨了淋巴细胞活化相关的信号转导通路对 *survivin* 基因转录激活与表达调控的影响.

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

PBMC 来自健康成人个体 200 ml 全血粗分离的白细胞组分, 由 307 医院全军采供血中心提供; 淋巴细胞分离液购自 TBD 生物技术发展中心; PHA-P 购自 Sigma 公司; rhIL-2 由军事医学科学院基础医学研究所提供; PCR 引物由上海生工公司合成; Trazol 试剂及反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, Taq DNA 聚合酶购自北京天为时代科技有限

* 国家自然科学基金资助项目 (30300416).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932212, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-05-13, 接受日期: 2004-06-30

公司; Survivin 抗体 (FL-164) 和 Actin 抗体购自 Sant Cruz 公司, 硝酸纤维素 (NC) 膜购自 Pall 公司, BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司, 化学发光底物购自威格拉斯仪器 (北京) 有限公司. 激酶抑制剂 AG490、PD98059 购自 Calbiochem 公司; 激酶抑制剂 Wortmannin 购自 Sigma 公司.

1.2 PBMC 的体外刺激培养

经淋巴细胞分离液分离的 PBMC, 以 2×10^6 /ml 细胞密度悬浮于含 10% 小牛血清的 1640 培养液, 加入 PHA 5 mg/L 和 rhIL-2 400 U/ml, 以 5% CO₂、37℃ 恒温条件进行细胞培养, 分别于刺激培养的 2、12、24、36、48、64 和 72 h 收集细胞待检.

1.3 细胞形态观察

新鲜分离的 PBMC 和刺激培养 72 h 的 PBMC, 离心涂片, 经吉姆萨染色后, 在光学显微镜下对比观察正常成熟淋巴细胞和活化淋巴细胞的形态, 以形态学标准判定淋巴细胞是否发生活化.

1.4 细胞周期测定

用 PBS 缓冲液洗涤刺激培养的 PBMC, 离心后重悬于 0.3 ml 含 10% 小牛血清的 PBS 缓冲液中, 加入 0.7 ml 无水乙醇, -20℃ 固定过夜, PBS 缓冲液离心洗涤细胞 2 次, 加入 0.5 ml 含 50 mg/L 碘化吡啶和 50 mg/L RNase A 的染色液, 37℃ 水浴 30 min, 流式细胞仪测定 DNA 含量.

1.5 RT-PCR

刺激培养不同时间点的 PBMC, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 按照反转录试剂盒操作说明书反转录 cDNA, 以反转录产物为模板, 用 survivin 基因和 GAPDH 基因 (内对照) 的特异性引物在同一反应体系管中进行 PCR. 根据 survivin 基因 cDNA 设计合成的引物序列为: 5' tgccctgtgaatctgagc 3', 5' aaggatttaggccaactgc 3', 扩增产物 421 bp; GAPDH 基因片段的引物序列为: 5' ccatggagaagctgggg 3', 5' caaagttgtcatgcatgacc 3', 扩增产物 195 bp. 热循环条件: 95℃ 变性 5 min, 95℃、59℃、72℃ 各 30 s, 30 或 38 个循环, 72℃ 延伸 7 min. 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.

1.6 蛋白质印迹

刺激培养不同时间点的 PBMC, 经 PBS 洗涤 2 次, 用含混合蛋白酶抑制剂的裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、150 mmol/L NaCl、0.02% NaN₃、0.1% SDS、1% NP-40、0.5% 去氧胆酸钠) 于冰浴裂解细胞 30 min, 12 000 r/min、4℃ 离心 10 min

弃沉淀, 上清液用 BCA 蛋白质定量试剂盒定量. 按照每条泳道 30 μg 蛋白质上样, 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 将电泳后的凝胶对 NC 膜电转移 (100 V, 50 min). 再按常规程序对膜进行免疫反应: Survivin 一抗 (1:700 ~ 1:1 000), Actin 一抗 (1:1 500 ~ 1:2 000), 辣根过氧化物酶标记二抗 (1:2 000), 化学发光底物显影示踪.

1.7 激酶抑制剂对刺激培养 PBMC 的效应观察

经分离、悬浮于 10% 小牛血清 1640 培养液的 PBMC, 分瓶加入 DMSO 溶液配置的激酶抑制剂 AG490、Wortmannin 和 PD98059, 至终浓度分别为 100、3 和 40 μmol/L (未加抑制剂刺激培养的 PBMC 加入等体积的 DMSO 溶剂对照), 随即加入刺激培养所需的 PHA 和 rhIL-2, 于 64 h 后收集培养的 PBMC 进行细胞周期、RT-PCR 和蛋白质印迹测定.

2 结 果

2.1 正常淋巴细胞和活化淋巴细胞的形态学观察

光学显微镜下可见: 正常处于静止期的成熟淋巴细胞 (图 1a) 体积大小均一、染色质浓缩、细胞浆少; 经刺激培养 72 h 的 PBMC (图 1b), 可见多数淋巴细胞的体积增大至正常的数倍、染色质结构疏松、并易见深染的胞浆, 此类细胞即为刺激活化的淋巴细胞.

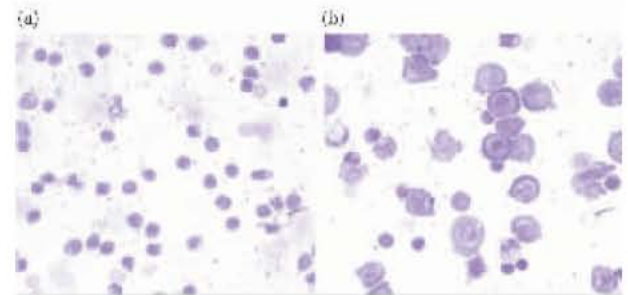


Fig. 1 The morphology of normal PBMC and PBMC cultured with PHA and rhIL-2

Cellular morphology observed by light microscope (400×): (a) Normal PBMC, (b) PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for 72 h.

2.2 刺激培养 PBMC 的细胞周期测定

流式细胞术分析细胞周期的数据显示 (表 1): 刺激培养 24 h 之内, 几乎所有的细胞都处于 G₀/G₁ 期; 36 h 时, 有少数细胞进入了 S 期; 至

64 h 时, S + G2/M 期的细胞比例已经超过了 30%. 细胞周期的启动和运行, 表明已有部分活化淋巴细胞开始进入增殖状态.

Table 1 The cell cycle of PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for different time

t/h	G0 + G1/%	S/%	G2 + M/%
0	99.09	0.28	0.63
2	97.77	0.14	2.08
12	98.73	0.29	0.98
24	98.89	0.18	0.93
36	95.63	4.37	0.00
48	81.18	14.05	4.77
64	67.83	24.00	8.17

2.3 Survivin 基因转录和蛋白质表达的时相观察

RT-PCR 结果显示: 与高表达 Survivin 蛋白的

T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞系相比, 正常人 PBMC 的 survivin 基因只有极低水平的基础转录 (图 2a), 而刺激培养不同时间的 PBMC (图 2b), 于 36 h 时间点出现 survivin 基因的明显转录激活, 后延至 64 h 则程度更强. 蛋白质印迹检测蛋白质表达的结果显示 (图 2c): Survivin 蛋白开始出现表达的时间点以及随时间延长表达水平逐渐增加的趋势, 与 RT-PCR 分析基因转录的结果基本相吻合, 此外还与细胞周期进程的动态变化相关联. 刺激培养 0 ~ 24 h, 当几乎所有细胞都处在 G0/G1 期时, 基本检测不到 Survivin 蛋白的表达; 36 h 时, 虽然只有极少数细胞进入了 S 期, 但已可见 Survivin 蛋白的微量表达; 之后, 随着 S 期和 G2/M 期细胞数量的进一步增多, Survivin 蛋白的表达量也相应增加. 由此说明, 活化淋巴细胞 Survivin 蛋白的表达具有细胞周期和周期时相依赖性.

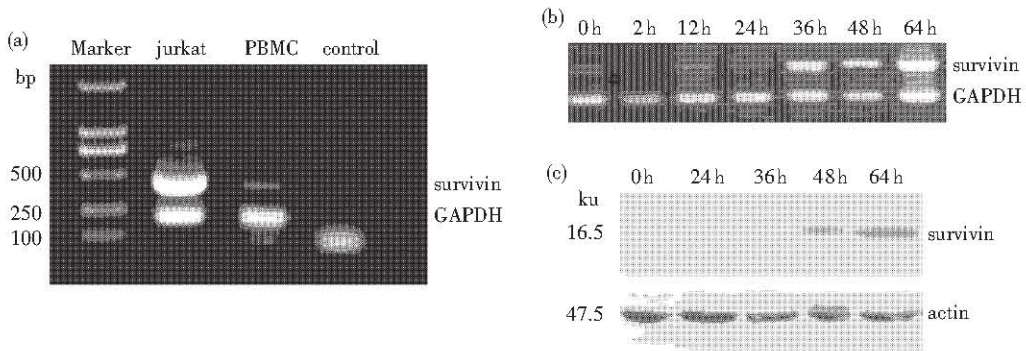


Fig. 2 RT-PCR and Western blotting analysis of the mRNA and protein level of Survivin

(a) RT-PCR (38 cycles) analysis of the survivin mRNA in T lymphocyte leukemia jurkat cell line and normal PBMC; (b) RT-PCR (30 cycles) analysis of the survivin mRNA in PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for different time; (c) Western blotting analysis of the survivin protein in PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for different time.

2.4 激酶抑制剂对 survivin 基因转录与表达的影响

考虑淋巴细胞活化以及 Survivin 蛋白表达均与细胞增殖密切相关, 我们选择了 3 种参与细胞增殖信号传导的激酶, JAK2 (Janus protein tyrosine kinase 2)、PI3-K (磷酸肌醇-3 激酶) 和 MEK (丝裂原活化的蛋白激酶激酶) 为靶, 在刺激培养体系中分别加入对应这 3 种激酶的抑制剂: AG490、Wortmannin 和 PD98059, 观察抑制激酶活性对刺激培养 64 h PBMC 的影响.

2.4.1 激酶抑制剂对刺激培养 PBMC 细胞周期的影响: 细胞周期分析显示 (表 2), 与不加抑制剂刺激培养 64 h 的 PBMC 相比, 3 种激酶抑制剂均使

进入 S + G2/M 期细胞的百分比明显降低, 特别是 AG490 完全阻断了 G0/G1 期细胞向 S 期的转换, 说明细胞周期的启动和运行受阻, 淋巴细胞活化增殖出现不同程度的障碍.

Table 2 The effects of 3 kinase inhibitors on the cell cycle of PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for 64 h

Kinase inhibitors	G0 + G1/%	S/%	G2 + M/%
Wortmannin	89.55	6.77	3.67
PD98059	89.23	6.95	3.28
AG490	97.06	0.25	2.69
DMSO Control	67.83	24.00	8.17

2.4.2 激酶抑制剂对活化淋巴细胞 survivin 基因转录和蛋白质表达的影响: RT-PCR 的结果显示 (图 3a), 与未加抑制剂刺激培养 64 h 的 PBMC 相比, Wortmannin 和 PD98059 轻度抑制 survivin 基因的转录, 而 AG490 则基本完全抑制转录. 蛋白质印迹的结果可见 (图 3b), Wortmannin 和 PD98059 在一定程度上抑制 Survivin 蛋白的表达, 而 AG490 则完全抑制 Survivin 蛋白的表达. 3 种激酶抑制剂对于基因转录水平和蛋白质表达水平的抑制趋势基本相一致. 提示 JAK2 活性为淋巴细胞活化和 Survivin 蛋白表达所必需, PI3K 和 MEK 活性也分别具有一定作用.

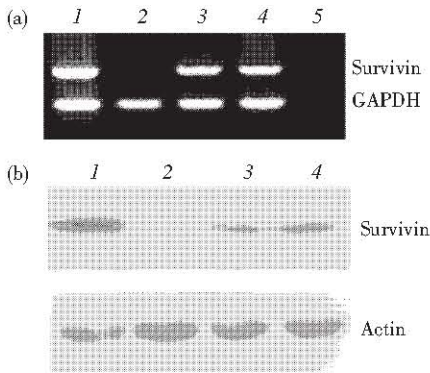


Fig. 3 The effects of 3 kinase inhibitors on the mRNA and protein level of Survivin

(a) RT-PCR (30 cycles) analysis of the survivin mRNA in PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for 64 h. 1: No kinase inhibitor; 2: 100 $\mu\text{mol/L}$ AG490; 3: 3 $\mu\text{mol/L}$ Wortmannin; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ PD98059; 5: Negative control. (b) Western blotting analysis of the survivin protein in PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for 64 h. 1: No kinase inhibitor; 2: 100 $\mu\text{mol/L}$ AG490; 3: 3 $\mu\text{mol/L}$ Wortmannin; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ PD98059.

2.4.3 激酶抑制剂 AG490 抑制刺激培养 PBMC survivin 基因转录的浓度依赖效应: 在开始刺激培

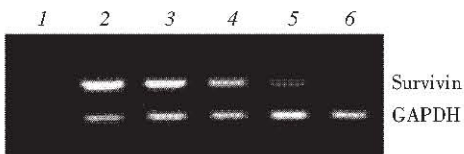


Fig. 4 The effects of different concentration AG490 on the transcription of survivin gene

RT-PCR (30 cycles) analysis of PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for 64 h. 1: Negative control; 2~5: Corresponding to 0, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ AG490 respectively; 6: DMSO (without PHA and rhIL-2).

养 PBMC 时, 先分别加入终浓度为 25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ AG490, 刺激培养 64 h PBMC 的 RT-PCR 结果表明 (图 4), survivin 基因的转录抑制具有 AG490 的浓度依赖关系, 转录抑制程度与 AG490 的浓度呈正相关, 说明 AG490 的抑制作用具有较好的特异性.

2.4.4 蛋白激酶抑制剂 AG490 不能逆转已经活化淋巴细胞 Survivin 蛋白的表达水平: 向已经刺激培养 48 h 的 PBMC 中再加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AG490, 继续刺激培养至 60 h 和 72 h, 收集细胞样本进行蛋白质印迹测定. 结果显示: 与刺激培养 48 h PBMC 先期表达的 Survivin 蛋白水平相比, 加入 AG490 继续培养后, Survivin 蛋白表达水平随时间延后而升高的趋势没有受到明显抑制 (图 5). 由此说明, 对于已经激活 survivin 基因转录和蛋白质表达的活化淋巴细胞, AG490 不能抑制或逆转活化淋巴细胞 Survivin 蛋白的表达, 提示 AG490 只在 survivin 基因转录激活以前的早期反应中发挥抑制效应.

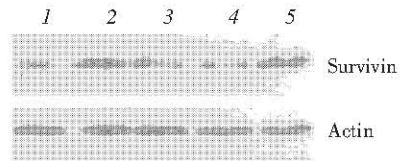


Fig. 5 AG490 effected the survivin protein expression in PBMC cultured with PHA and rhIL-2

1~3: Corresponding PBMC cultured with PHA and rhIL-2 for 48 h, 60 h and 72 h respectively; 4, 5: Adding AG490 to the PBMC after 48 h stimulation to final concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ and cultured for a total 60 h and 72 h respectively.

3 讨 论

我们的实验结果显示: 正常人 PBMC 的 survivin 基因仅有极低水平的基础转录 (RT-PCR 一般需要 35 个循环以上, 才可见极微量的扩增产物), 且蛋白质印迹方法检测不出 Survivin 蛋白的表达. 而经 PHA 和 rhIL-2 刺激培养的 PBMC, 于 36h 前后发生了 survivin 基因的明显转录激活和出现少量蛋白质的表达, 并均随刺激培养时间的延长而增强, 且 Survivin 蛋白的表达具有典型的细胞周期和周期时相依赖性. 但在刺激培养 PBMC 时分别加入针对 JAK2、PI3-K 和 MEK 3 种激酶的抑制剂: AG490、Wortmannin 和 PD98059, 则能够阻止或影响刺激培养 PBMC 细胞周期的启动和运行, 致使淋

巴细胞活化受阻, Survivin 蛋白就不能或低水平表达. 由此说明, 淋巴细胞的活化增殖与 Survivin 蛋白表达相互关联.

现已发现参与 T 淋巴细胞活化的基因大概有 70 余种, 依据激活所需要的时间或表达的顺序可分为 3 类: 即刻基因 (细胞接受刺激 15 ~ 30 min 表达)、早期表达基因 (0.5 ~ 24 h) 和晚期表达基因 (数天)^[7]. 我们的实验观察显示: 刺激培养的 PBMC 在 36 h 方出现 survivin 基因的转录激活, 表明该基因是活化淋巴细胞表达新合成蛋白质的晚期基因, 而有关基因转录激活的上游反应和直接作用的转录调控因子尚不明确.

活化的淋巴细胞是发挥正常生物学功能的免疫效应细胞, 与恶性转化的肿瘤细胞具有不同的性质, 但两者也有共同之处, 即同为进入细胞周期而进行增殖的细胞. 它们共同表达 Survivin 蛋白的现象, 说明了一个事实: 即 Survivin 蛋白表达实际上受细胞平衡 (cell homeostasis) 机制中存活通路的调控, 代表着细胞处于增殖的状态. 这个结论同样可以对胚胎组织和肿瘤组织表达 Survivin 蛋白做出解释. 另外, Fukuda 等的研究工作证明 Survivin 蛋白在正常 CD34⁺ 造血细胞中的表达, 也支持了上述结论.

淋巴细胞的刺激活化, 有赖于存活和增殖信号的跨膜转导和胞内传递, 经过复杂级联反应, 才能最终激活基因转录和效应蛋白表达. 我们利用 3 种参与细胞增殖信号传递的激酶抑制剂, 探索了淋巴细胞活化和 Survivin 蛋白表达相关的信号传导通路, 结果表明: JAK2 参与的 JAK-STAT (信号传导和转录激活子) 通路, 是淋巴细胞活化所致 Survivin 蛋白表达必需和最重要的信号传导通路. 此外, 已知 PI3K 和 MEK 所介导的 MAPK 通路也是细胞存活和增殖信号的传导通路, 并可与 JAK-STAT 通路发生“串话” (cross talk), 协同进行信号的传导. 但由于它们相对处于胞内信号传导的中、下游阶段, 所以我们的实验结果显示: PI3K 和 MAPK 通路也是能够在一定程度上影响淋巴细胞活化和 Survivin 蛋白表达的信号通路.

研究进展揭示: 细胞周期以外的一些细胞因子也可以刺激肿瘤细胞和 CD34⁺ 造血细胞 Survivin 蛋白表达的上调^[8,9], 且细胞因子的刺激是淋巴细胞活化增殖的必需条件. JAK2 为胞内非受体型酪氨酸蛋白激酶, 主要介导细胞因子和生长因子对细胞增殖信号的传导. JAK 被受体酪氨酸蛋白激酶的磷

酸化激活, 是信号跨膜传导的早期事件. 由此可知, 激酶抑制剂 AG490 是从信号转导通路的上游阻断了信号的传导, 所以显示出最强的抑制效应. 实验研究还显示, 经刺激培养 48 h、已经转录激活的 survivin 基因, 不再受 AG490 的抑制, 蛋白质表达水平也不能被逆转下调, 说明 AG490 抑制 survivin 基因转录的作用不是直接的, 而是通过阻止淋巴细胞的活化增殖, 间接抑制了 survivin 基因的转录激活. JAK2 究竟磷酸化激活哪一种 STAT? STAT 又转位入核作用于哪些即刻和早期基因? 而后再如何影响晚期基因 survivin 的转录激活? 这些未知问题都有待于进一步的研究.

我们的研究工作, 证明人外周血淋巴细胞活化过程出现 survivin 基因的转录激活, 探讨了与该基因转录激活相关的存活信号传导通路, 揭示了淋巴细胞活化与 Survivin 蛋白表达的相互关系: 即 Survivin 蛋白表达可以反映细胞的增殖状态. 上述研究, 增进了对 Survivin 蛋白表达调控机制的认识, 也可为肿瘤的临床诊断和治疗提供指导.

参 考 文 献

- Li F Z. Survivin study: what is next wave?. *J Cell Physiol*, 2003, **197** (1): 8 ~ 29
- Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med*, 1997, **3** (8): 917 ~ 921
- 唐发清, 顾焕华, 胡智, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 通过 Survivin 介导细胞增殖与细胞凋亡. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19** (5): 646 ~ 652
Tang F Q, Gu H H, Hu Z, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2003, **19** (5): 646 ~ 652
- Altieri D C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends in Molecular*, 2001, **7** (12): 542 ~ 547
- Fukuda S, Pelus L M. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34⁺ cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood*, 2001, **98** (7): 2091 ~ 2100
- 董燕, 张枫, 梅柱中, 等. 电转移中蛋白质的透膜现象及其对蛋白质印迹结果的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (3): 449 ~ 453
Dong Y, Zhang F, Mei Z Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (3): 449 ~ 453
- 周光炎. *免疫学原理*. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000. 152
Zhou G Y. *Immunology Principal*. Shanghai: Shanghai Science Technology Literature Press, 2000. 152
- Fukuda S, Foster R G, Porter S B, *et al.* The antiapoptosis protein survivin is associated with cell entry of normal cord blood CD34⁺ cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 2002, **100** (1): 2463 ~ 2471
- Carter B Z, Milella M, Altieri D C, *et al.* Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood*, 2001, **97** (9): 2784 ~ 2790

The Transcriptional Activation of Survivin Gene in Human Peripheral Blood Activated Lymphocyte and Related Signal Transduction Pathway*

DONG Yan, MEI Zhu-Zhong, SONG Yi, SUN Guo-Jing, QIAN Jun-Jie, LIU Bin, LIU Hua, SUN Zhi-Xian**

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract Survivin plays key roles in cell proliferation and apoptosis regulation. And it was recognized as a molecular marker for tumor diagnosis and an ideal target for cancer therapy. The significant expression of survivin in activated peripheral lymphocyte was observed. To clarify the signal transduction pathway of the activation of peripheral lymphocyte and resulted in expression of survivin gene, normal human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was cultured with PHA and IL-2 *in vitro* and the expression of survivin was analyzed by RT-PCR, Western blotting and cell cycle. There were significant transcription of survivin and detectable protein of survivin in PBMC cultured with PHA and IL-2 for 36 h. The expression of survivin increased with the extension of culture time and this expression was cell cycle dependent. AG490 (JAK2 inhibitor) resulted in the cell cycle arrested and inhibited the expression of survivin markedly, and Wortmannin (PI3K inhibitor) and PD98059 (MEK inhibitor) also inhibited the expression of survivin to a less extent. The results revealed that the expression of survivin correlated with the activation of peripheral lymphocyte and meant the state of cell proliferation. The JAK-STAT signal transduction pathway mediated by JAK2 was essential for the activation of peripheral lymphocyte and the expression of survivin. And the signal transduction pathway mediated by PI3K and MEK also affected this process to a certain extent.

Key words survivin, activated lymphocyte, signal transduction, cell proliferation

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30300416).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932212, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

Received: May 13, 2004 Accepted: June 30, 2004