

宫颈癌组织细胞中 Numb 基因表达及相关性研究*

田 英, 王双勇, 赵 雅, 兰雅娴 (西安市第一医院, 西安 710002)

摘要:目的 探讨 Numb 基因在宫颈癌组织中的表达及对宫颈癌细胞增殖的影响。方法 收集 30 例正常宫颈组织、56 例宫颈癌组织和 17 例原位癌组织采用免疫组织化学染色观察 Numb 基因的表达情况。通过构建 siRNA 表达载体下调宫颈癌 HeLa 细胞株中内源性 Numb 基因表达, MTT 实验检测下调 Numb 表达后细胞增殖能力的变化。结果 免疫组织化学染色结果显示, Numb 在宫颈癌及原位癌中的表达明显高于正常宫颈组织, 其阳性表达率分别为 72.2%, 69.6% 和 60%, ($\chi^2=30.259, P<0.05$)。siRNA 干扰宫颈癌 HeLa 细胞, 干扰后 Numb 基因的蛋白表达水平(灰度值分别为: 0.51 ± 0.04 和 0.56 ± 0.05)较对照组(灰度值分别为: 0.78 ± 0.06 和 0.75 ± 0.05)明显下降($t=4.2, P<0.05$)。MTT 实验显示, 干扰 Numb 基因后 HeLa 细胞培养第 1, 3, 5 和 7 天时, 增殖活力(吸光度值分别为: $0.211\pm 0.061, 0.235\pm 0.013, 0.438\pm 0.051$ 和 0.773 ± 0.032)较对照组(吸光度值分别为: $0.225\pm 0.047, 0.300\pm 0.026, 0.549\pm 0.039$ 和 1.023 ± 0.041)显著下降, 差异具有统计学意义($t=5.1, P<0.05$)。结论 Numb 基因在宫颈癌组织中高表达, Numb 在宫颈癌中可能通过促进癌细胞的增殖而促进宫颈癌的进展。

关键词: Numb 基因; 宫颈癌; 细胞增殖

中图分类号: R737.33; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)06-042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.012

Study on Correlation and Expression of Numb Gene in Cervical Cancer

TIAN Ying, WANG Shuang-yong, ZHAO Ya, LAN Ya-xian

(the First Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Numb gene in cervical cancer and its effect on the proliferation of cervical cancer cells. **Methods** The expression of Numb protein was detected in 30 normal peoples, 56 cases with cervical cancer and 17 cases with carcinoma in situ by immunohistochemistry assay. The siRNA technology was used to downregulate the endogenous expression of Numb in cervical cancer HeLa cell. Then MTT assay were applied to observe the change of cell proliferation. **Results** The expressions of Numb in cervical cancer in situ and invasive cervical cancer were significantly higher than in normal cervix and the positive rates were 72.2%, 69.6% and 60% respectively ($\chi^2=30.259, P<0.05$). The expression of Numb was significantly decreased in HeLa cells (0.51 ± 0.04 and 0.56 ± 0.05) ($t=4.2, P<0.05$). In 1, 3, 5 and 7 days, MTT assay showed that cell proliferation rates were dramatically decreased in the interfered HeLa cells (absorbance value: $0.211\pm 0.061, 0.235\pm 0.013, 0.438\pm 0.051$ and 0.773 ± 0.032 respectively) than the control (absorbance value: $0.225\pm 0.047, 0.300\pm 0.026, 0.549\pm 0.039$ and 1.023 ± 0.041 respectively). **Conclusion** Numb was over-expressed in cervical cancer and took part in cervical cancer progress through accelerating cell proliferation.

Keywords: numb gene; cervical cancer; proliferation

宫颈癌是一种常见的妇科恶性肿瘤, 全世界大约每年有 25 万妇女因其死亡^[1]。据 WHO 报道世界上每年新发现宫颈癌病例约有 50 万, 主要以发展中国家为多。在我国其宫颈癌发病率在 35 岁之后有升高的趋势, 严重危害着广大妇女的健康和生命^[2]。许多研究表明, 一些关键的干细胞相关基因的异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关, 可能是肿瘤发生的一个始动因素^[3]。有报道 Numb 基因在乳腺癌、结肠癌发生发展中发挥着主要作用, 然而, Numb 基因在宫颈癌中的表达及临床意义尚不是很清楚。Numb 是一种膜相关蛋白, 其不对称分布对细胞分化起着关键作用, 与肿瘤的发生关系密

切, 因而被称为细胞命运决定因子^[4]。本研究观察 Numb 基因在宫颈癌组织及细胞中的表达变化, 探寻其对宫颈癌发生发展的作用。

1 材料与方法

1.1 样本来源

1.1.1 组织标本: 收集 56 例在 2009 年 1 月~2012 年 12 月期间于西安市第一医院妇科确诊为宫颈癌住院治疗的患者的宫颈癌组织标本及 17 例原位癌患者宫颈组织标本, 年龄 31~71 岁, 平均年龄 48.5 岁, 所有样本的病理检查由两个独立富有经验的病理医生严格执行。以同期住院的患有子宫肌瘤行子宫全切的 30 例患者的宫颈组织标本作

* 作者简介: 田 英(1978-), 女, 在读博士研究生, 主治检验医师, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: tianyi7879@126.com。

为对照组。

1.1.2 细胞株:宫颈癌细胞株 HeLa 购自美国模式培养物集存库(american type culture collection, ATCC)细胞库。

1.2 试剂与仪器 DMEM 高糖培养基(Gibco 公司),MTT 试剂(碧云天生物技术研究),Numb 抗体(abcam 公司),pGPU6/GFP/Neo siRNA 和阴性对照质粒(上海吉玛生物公司),超级净化工作台(苏州净化设备厂),光学倒置显微镜(OLYMPUS, Japan),MiniTrans-Blot 转移电泳槽(Bio-Rad, USA)。

1.3 方法

1.3.1 组织标本免疫组织化学染色检测:5 μm 的石蜡包埋的组织切片,常规二甲苯脱蜡、梯度酒精水化,在柠檬酸缓冲液中进行抗原热修复 2 min,3 ml/dl 的过氧化氢封闭 10 min, PBS 洗涤(3 次,每次 5 min)后,加一抗,次日室温下复温 30 min,加二抗 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察并分析。

1.3.2 细胞转染及细胞功能学实验

1.3.2.1 细胞转染:首先,将生长状态良好,处于对数生长期且融合为 80% 左右的 HeLa 细胞弃去培养基,加入 8 ml PBS 冲洗细胞 3 次后,通过脂质体法将 pGPU6/GFP/Neo siRNA 和阴性对照质粒转染至 HeLa 细胞,分别作为 HeLa-shNumb 组和 HeLa-shCtr 组。转染 24 h 后,通过在荧光显微镜

下观察绿色荧光,评估载体转染效率。

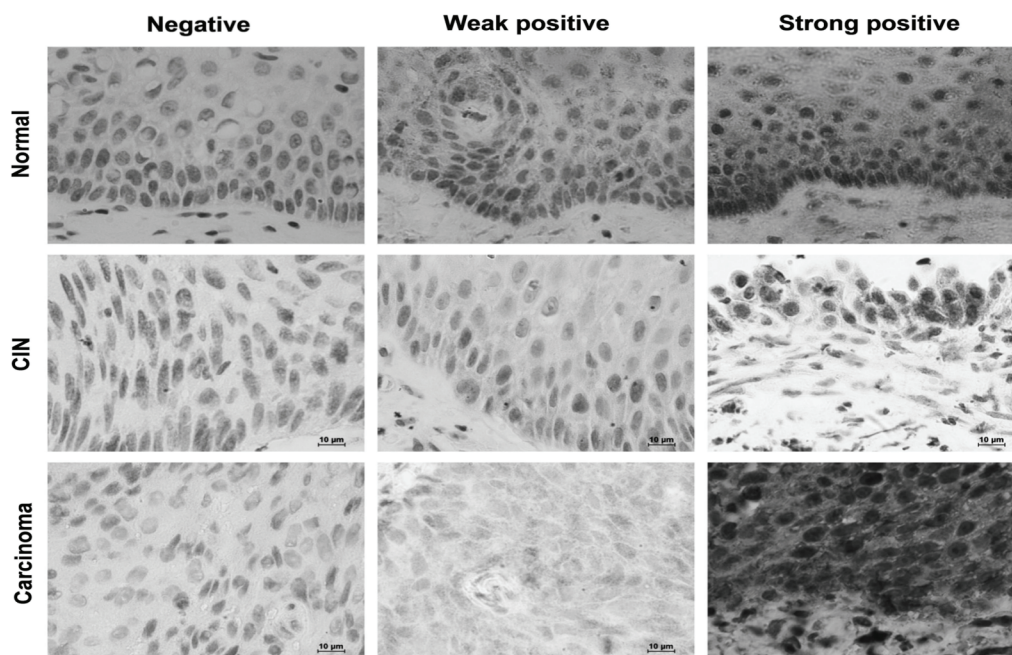
1.3.2.2 Western blot 分析:收集转染成功的阳性克隆细胞置于细胞裂解液中 4℃ 裂解 30 min。4℃ 条件下,12 000 r/min 离心 15 min,取上清进行蛋白定量。取相当于 30 μg 蛋白进行 10 g/dl SDS-PAGE 凝胶电泳,然后转膜至 PVDF 膜,5 g/dl 的脱脂奶封闭 1 h,加一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤(3 次,每次 15 min)后,加二抗室温下孵育 1 h, TBST 洗涤(3 次,每次 10 min)。ECL 法胶片曝光、显影、定影及半定量检测。

1.3.2.3 MTT 检测:将 HeLa-shNumb 组和 HeLa-shCtr 组细胞分别制成单细胞悬液,以每孔 1 000 个细胞接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl 培养基。于培养箱中常规培养,每日观察细胞生长状态,并于接种后 1, 3, 5, 7 天,采用 MTT 法检测各组吸光度 A 值。具体步骤:每孔加入 MTT(5 mg/ml)20 μl ,吹打混匀,37℃ 继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 100 μl 的 DMSO,震荡 10 min,使结晶充分溶解,在酶标仪上于 490 nm 波长处测定其吸光度值,根据吸光度值绘制生长曲线,每组设置 3 个复孔。

1.4 统计学分析 所有资料采用 SPSS16.0 软件处理,结果以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料采用卡方检验,计量资料采用 t 检验或方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中 Numb 的表达 见图 1。



Numb 在宫颈癌及原位癌中的表达水平明显高于正常宫颈组织($P<0.05$)。

图 1 组织标本免疫组织化学检测

正常对照组免疫组织化学检测阴性比例 16.6% (5/30), 弱阳性比例 23.3% (7/30), 阳性比例 60% (18/30); 原位癌组阴性比例 16.6% (3/17), 弱阳性比例 11.1% (2/17), 阳性比例 72.2% (13/17); 宫颈癌组阴性比例 12.5% (7/56), 弱阳性比例 17.9% (10/56), 阳性比例 69.6% (39/56)。Numb 在宫颈癌及原位癌中的表达水平明显高于正常宫

颈组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 30.259$, P 值均 < 0.05)。2.2 免疫细胞化学染色及免疫荧光结果

免疫细胞化学染色检测结果表明 Numb 在 HeLa 明显表达 (见图 2A, 2B)。免疫荧光检测显示 pGPU6/GFP/Neo siRNA 和阴性对照质粒在 HeLa 细胞中的转染效率较高 (见图 2C, 2D)。

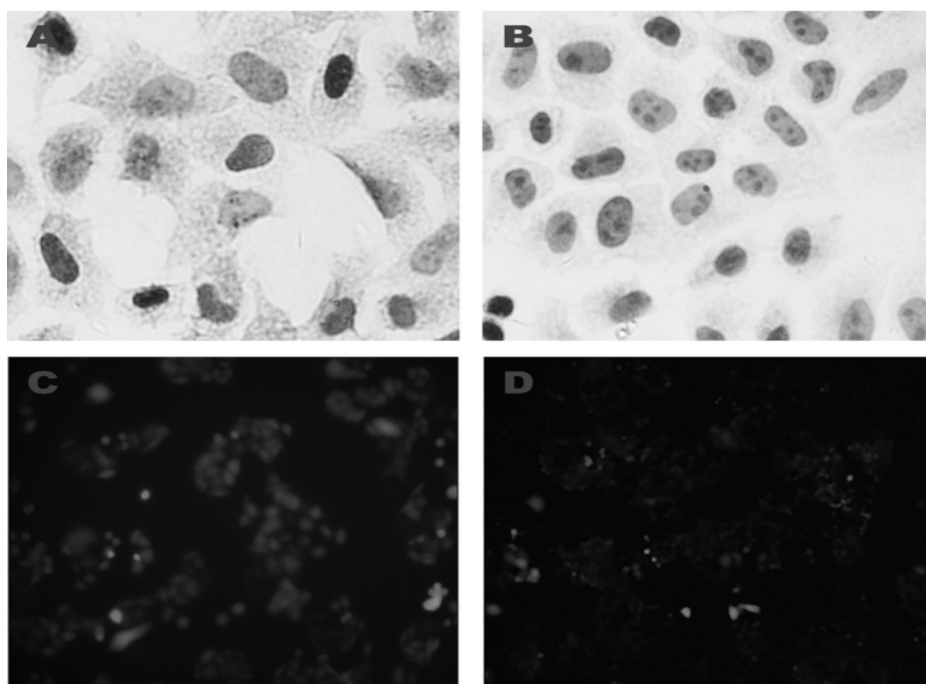


图 2 免疫细胞化学染色及免疫荧光检测 A. 免疫细胞化学染色检测 HeLa 细胞中 Numb 表达; B. 阴性对照组; C. HeLa-shNumb 组质粒转染效果; D. HeLa-shCtrl 组质粒转染效果。

图 2 免疫细胞化学染色及免疫荧光检测

2.3 Western Blot 结果 见图 3。HeLa-shNumb (Scrambled-siRNA1 和 Scrambled-siRNA2) 组 Numb 的表达分别为 0.51 ± 0.04 和 0.56 ± 0.05 ; HeLa-shCtrl (Numb-siRNA1 和 Numb-siRNA2) 组分别为 0.78 ± 0.06 和 0.75 ± 0.05 。HeLa-shNumb 组 Numb 的表达明显低于 HeLa-shCtrl 组, 差异具有统计学意义 ($t = 4.2$, $P < 0.05$)。

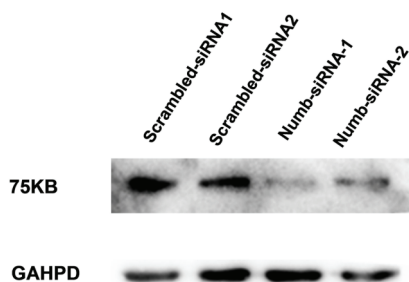


图 3 Numb 表达

2.4 MTT 检测结果 见图 4。实验第 1, 3, 5 和 7 天分别进行 MTT 检测, 发现 HeLa-shNumb 组

(吸光度值分别为: 0.211 ± 0.061 , 0.235 ± 0.013 , 0.438 ± 0.051 , 0.773 ± 0.032) 细胞增殖明显低于 HeLa-shCtrl 组 (吸光度值分别为: 0.225 ± 0.047 , 0.300 ± 0.026 , 0.549 ± 0.039 , 1.023 ± 0.041) ($t = 5.1$, $P < 0.05$)。

MTT 检测

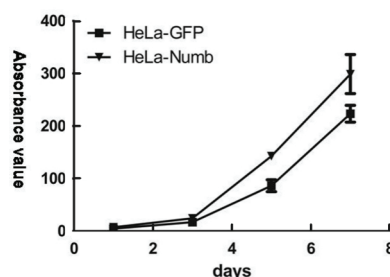


图 4 MTT 检测结果

3 讨论 宫颈癌是一种严重危害女性健康的恶性疾病, 在肿瘤致死性病因中占第二位。目前, 虽然人们认为肿瘤的发生是多种因素作用的结果, 但是一些相关基因的异常表达与调控在肿瘤的发生中起着重要的作用。Numb 首次在果蝇神经系统发

育的研究中被发现和鉴定,调控神经干细胞不对称性分裂和分化。研究报道,Numb在人类神经胶质瘤、乳腺癌和肝癌等多种肿瘤中表达降低^[5~7],并与肿瘤分期、分级和预后相关,可能发挥抑癌基因作用。然而,Chen等^[8]研究发现细胞分裂方向的改变和Numb的表达增高可能参与宫颈鳞癌的发生发展过程,并且发挥了致癌因子的作用。

本研究发现,Numb在宫颈癌及原位癌中的表达水平明显高于正常宫颈组织,提示Numb的表达可能直接或间接与宫颈癌的发生存在关联。随后,通过细胞免疫化学染色结果证实Numb在宫颈癌细胞系HeLa明显高表达。进而使用siRNA干扰技术降低Numb在Hela细胞的表达,MTT实验结果提示HeLa-shNumb组细胞增殖能力明显低于HeLa-shCtr组,表明降低Hela细胞中Numb的表达可明显降低细胞增殖能力。因此,本研究结果提示Numb在宫颈癌中高表达,促进癌细胞的增殖。

不同类型肿瘤中Numb的生物学特性不尽相同,有时发挥抑癌作用,有时却参与肿瘤的发生发展。那么,对于Numb基因在各种类型肿瘤中的作用,需要独立研究,而不能先入为主以现有的研究结论推断其在其他肿瘤中的功能。

当前,靶向基因治疗的研究备受关注。本研究发现Numb在宫颈癌的发生发展中具有一定的作用,为宫颈癌的发生发展及靶基因选择提供一定的实验依据。然而,其作用的分子机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Penaranda EK, Shokar N, Ortiz M. Relationship between metabolic syndrome and history of cervical cancer among a US national population[J]. ISRN Oncol, 2013(2013):840964.
- [2] Chang SC, Woo JS, Yau V, et al. Cervical cancer screening and chinese women: insights from focus groups[J]. Front Psychol, 2013(4):48.
- [3] Al-Kharusi MR, Smartt HJ, Greenhough A, et al. LGR5 promotes survival in human colorectal adenoma cells and is upregulated by PGE2; implications for targeting adenoma stem cells with NSAIDs[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(5):1150-1157.
- [4] Guo M, Jan LY, Jan YN. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch[J]. Neuron, 1996, 17(1):27-41.
- [5] Euskirchen P, Skaftnesmo KO, Huszthy PC, et al. NUMB does not impair growth and differentiation status of experimental gliomas[J]. Exp Cell Res, 2011, 317(20):2864-2873.
- [6] Rennstam K, McMichael N, Berglund P, et al. Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 122(2):315-324.
- [7] 王超, 张楚瑶, 冯炜炜. Numb在肿瘤中的作用[J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(7):541-544.
Wang C, Zhang CY, Feng WW. Role of numb in tumor[J]. Journal of International Oncology, 2012, 39(7):541-544.
- [8] 陈小君, 叶枫, 陈怀增, 等. 细胞分裂方向的改变和Numb的表达增高在宫颈鳞癌中的作用[J]. 实用癌症杂志, 2005, 20(5):455-457.
Chen XJ, Ye F, Chen HZ, et al. Alteration of cell division orientation and increased expression of Numb in the carcinogenesis of cervix squamous cell carcinomas[J]. Practical Journal of Cancer, 2005, 20(5):455-457.
- [1] Penaranda EK, Shokar N, Ortiz M. Relationship between metabolic syndrome and history of cervical cancer among a US national population[J]. ISRN Oncol, 2013(2013):840964.
- [10] 尹爱华, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 广东省女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(增刊):44-46.
Yin AH, Lu YQ, Rui XY, et al. Study on methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase polymorphisms among the women in Guangdong province[J]. Chinese Journal of Public Health, 2012, 28:44-46.
- [11] 颜珠苗, 鲁衍强, 李瑛, 等. 琼海市汉族女性MTHFR和MTRR基因多态性分布研究[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(1):18-20.
Yan ZM, Lu YQ, Li Y, et al. Polymorphisms of MTHFR and MTRR among the Han nationality women in Qionghai city[J]. Journal of Hainan Medical University, 2013, 19(1):18-20.
- [12] 劳海红, 贺宪民. 海南省汉族和黎族妇女亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2011, 19(11):655-657.
Lao HH, He XM. Study on methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase gene polymorphisms among the Han and Li women in Hainan province[J]. Chin J Fam Plann, 2013, 19(11):655-657.
- [13] Ali A, Singh SK, Raman R. MTHFR 677TT alone and IRF6 820GG together with MTHFR 677CT, but not MTHFR A1298C, are risks for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in an Indian population[J]. Genet Test Mol Bioma, 2009, 13(3):355-360.

收稿日期:2015-06-15

修回日期:2015-10-30

(上接41页)

收稿日期:2015-04-09

修回日期:2015-05-09