

Mybl2 在不同病变程度宫颈组织中的表达^{*}

林金端^a, 刘红伟^a, 张欣宁^b, 李介华^a

(广州医科大学附属第六医院 a. 检验科; b. 妇产科, 广东清远 511500)

摘要:目的 探讨 Mybl2 在不同病变程度宫颈组织中的表达情况及差异。方法 收集宫颈组织 74 例, 采用 ELISA 法检测组织中的 Mybl2 蛋白表达水平, 分析 Mybl2 蛋白浓度与临床病理资料的关系。结果 宫颈组织中的 Mybl2 表达量随着宫颈病变程度的增加而增加, 组间差异有统计学意义 ($F=27.39, P<0.05$); 同一病变组中, 高龄组的 Mybl2 表达量高于非高龄组, 但差异无统计学意义 (P 均 >0.05)。结论 随着宫颈病变程度的增加, Mybl2 的表达量也增加, Mybl2 在宫颈组织中高表达, 可能与宫颈癌的发生发展有关。

关键词: Mybl2; 宫颈癌; 酶联免疫吸附试验; 宫颈上皮内瘤变

中图分类号: R737.33; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)02-141-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.039

Expression Level and Clinical Significance of Mybl2 in Cervical Tissues

LIN Jin-duan^a, LIU Hong-wei^a, ZHANG Xin-ning^b, LI Jie-hua^a

(a. Department of Laboratory Medicine; b. Department of Gynecology and Obstetrics, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Qingyuan, 511500, China)

Abstract: **Objective** To study the expression and clinical significance of Mybl2 in Cervical tissues. **Methods** 74 cases of cervical tissues were obtained from the department of obstetrics and gynecology. The expression level of Mybl2 was detected by Elisa method, and the relationship with clinical pathology was analyzed. **Results** Elisa results showed that the expression of Mybl2 was significant among inflammation, CIN I, CIN II, CIN III and ICC groups ($F=27.39, P<0.05$). The expression level of Mybl2 was higher in the older group than the younger one which were in the same clinical pathology degree, but it was not significant ($P>0.05$). **Conclusion** The expression levels of Mybl2 were related with the pathological changes of cervix. Disturb expression level of Mybl2 maybe induce the development of cervical cancer.

Keywords: Mybl2; cervical cancer; ELISA; cervical intraepithelial neoplasia

宫颈癌的发生、发展是一个漫长而复杂的过程。其中包含了无数蛋白质的变化^[1,2]。分析这些蛋白质的变化,可以帮助我们发现特异性肿瘤标志物,来诊断宫颈癌及监测病情的变化,甚至可能找到肿瘤治疗的靶点。Mybl2 又名 b-myb, 与 a-myb, c-myb 是同源基因,属于 myb 基因家族的主要成员,Mybl2 的表达水平变化与细胞凋亡,衰老的发生密切相关,并与多种癌症相关^[3~5]。但目前关于 Mybl2 在宫颈癌组织中的表达研究较为少见,本研究拟通过分析不同程度宫颈病变组织中 Mybl2 表达水平的差异,初步探讨 Mybl2 蛋白在宫颈癌发生发展中的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 为 2013 年 12 月~2014 年 10 月清远市人民医院妇产科患者切除的宫颈癌组织标本和宫颈活检组织标本,共 74 例。

1.2 试剂与仪器 一步法蛋白质提取液由上海博谷生物有限公司提供。BCA 法总蛋白浓度检测试剂由碧云天试剂有限公司提供。Mybl2 ELISA 试剂盒由美国 RD 公司提供,酶标仪为 Thermo 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 标本保存: 所有标本在离体后迅速装入专用的含有苯甲基磺酰氟(PMSF)的容器中,并迅速置于 -80°C 冰箱中冻存。

1.3.2 实验分组: 根据病理结果和年龄(≥ 45 岁为高龄组, <45 岁为非高龄组)对标本进行分组,其中宫颈浸润癌组 20 例(高龄组 12 例,非高龄组 8 例),宫颈上皮内瘤变(CIN) I 级组 26 例(高龄组 8 例,非高龄组 18 例),CIN II 组 12 例(高龄组 4 例,非高龄组 8 例),CIN III 组 8 例(高龄组 4 例,非高龄组 4 例),炎性组 8 例(均为非高龄组)。

^{*} 基金项目:清远市科技计划项目(编号:2013B042)。

作者简介:林金端(1983—),女,在读博士,副主任检验师,主要研究领域为临床检验诊断(分子生物学方向),Tel:0763-3113890, E-mail:linjinduan4@163.com。

通讯作者:李介华,主任技师, E-mail:13828501998@126.com。

1.3.3 实验方法:每份标本均进行总蛋白提取,用提取的总蛋白液进行总蛋白浓度测定,并按说明书调整蛋白含量至 1 mg/ml,进行 Mybl2 浓度检测。

1.3.3.1 提取总蛋白:取出一 80℃ 冰箱中的组织,将其置于液氮中并研磨成粉末状,加入蛋白质抽提试剂继续研磨提取总蛋白,4℃ 离心取上清备用。

1.3.3.2 总蛋白浓度的检测:将 1.2.3.1 步骤提取的总蛋白溶液按顺序加入 96 孔板酶标板,同时设置标准曲线孔和空白孔,加入 BCA 工作液,37℃ 放置 30 min。 $A_{562\text{ nm}}$ 波长,酶标仪读取吸光度,根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度,并按说明书调整蛋白含量至 1 mg/ml。

1.3.3.3 Mybl2 浓度的检测:在包被有 Mybl2 抗体的人 Mybl2 抗体微板孔中分别加入 1.3.3.1 步骤中提取的总蛋白溶液和试剂盒自带的标准品溶液,并设空白孔,37℃ 孵育 30 min,洗板,并加入酶标记的 Mybl2 抗体,37℃ 孵育 30 min,洗板,加入显色液 37℃ 显色,在 $A_{450\text{ nm}}$ 波长,酶标仪读取吸光度,根据标准曲线计算出样品的 Mybl2 浓度。

1.3.3.4 数据的处理:每个反应孔都会得到一个 CO 值,根据试验所设的标准曲线读取相对应的浓度。

1.4 统计学分析 收集临床资料与实验结果资料,建立数据库。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计软件使用 SPSS17.0。统计学方法采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mybl2 表达水平与宫颈病变程度的关系 宫颈组织中 Mybl2 蛋白浓度随着宫颈病变程度的增加而增加,差异均有统计学意义($F = 27.39$, $P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同病变宫颈组织中 Mybl2 蛋白浓度

组别	n	Mybl2 表达量(pg/ml)
炎性组	8	$0.15 \pm 0.27^{\#}$
CIN I 组	26	$0.50 \pm 0.98^{\#}$
CIN II 组	8	$1.09 \pm 0.58^{* \#}$
CIN III 组	12	$1.41 \pm 1.12^{* \#}$
宫颈浸润癌组	20	$2.15 \pm 1.99^{*}$

注: * 与炎性组比较, $P < 0.05$; # 与宫颈浸润癌组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 Mybl2 表达量与年龄的关系 同一病变程度的宫颈组织, ≥ 45 岁组的 Mybl2 表达量高于 < 45 岁组的 Mybl2 表达量,但差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见图 1。

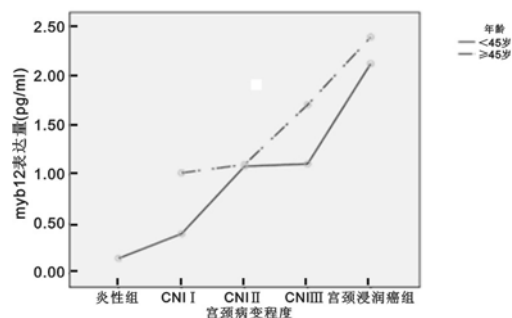


图 1 不同年龄组宫颈病变组织中 Mybl2 蛋白浓度结果图

3 讨论 Mybl2 又名 b-myb, 与 a-myb, c-myb 是同源基因, 属于 myb 基因家族的主要成员, 在哺乳动物中, c-myb 和 a-myb 基因仅在特定的细胞和特定的细胞周期中表达, 而 Mybl2 基因几乎存在于所有增殖细胞, 在 S 期中表达最高, Mybl2 编码一种转录因子, 是细胞周期进程必需的一种因子, 控制细胞癌变和细胞衰老, 其功能主要通过调节 G/S 期转换来发挥重要作用, 参与细胞周期调控、DNA 复制损伤修复和维持基因组的完整性。Mybl2 的表达变化与细胞凋亡^[4], 衰老^[6]的发生密切相关。本实验通过对同一病变程度组内不同年龄的比较发现, 高龄组的 Mybl2 表达量高于低龄组, 与文献^[13]报道的 Mybl2 参与细胞周期的调控, 与细胞衰老相关一致, 但经统计学处理, 两组间差异无统计学意义, 可能是由于样本量较少, 抽样误差大所致。

近年来研究表明, Mybl2 表达水平改变与癌症^[7]的发生相关, 已有研究表明, Mybl2 在神经母细胞瘤^[8]、肝癌^[9,10]、白血病^[11]等疾病中高表达。本研究通过研磨法提取组织总蛋白, 通过 ELISA 法初步分析宫颈组织中的 Mybl2 表达量, 显示宫颈组织中的 Mybl2 表达水平随着宫颈病变严重程度的增加而增加, 在宫颈癌组的 Mybl2 表达量最高, 提示 Mybl2 表达水平改变可能参与宫颈癌的发生发展, 与 Astbury 等^[12]人研究一致。Astbury 等人在研究中采用免疫组化的方法发现, 在不同病变程度的宫颈组织中, Mybl2 的表达量不同。本研究以 ELISA 方法检测宫颈组织中的 Mybl2 蛋白表达水平, 也得到相类似结果。ELISA 与免疫组化法比较, 仪器设备要求低, 操作简便, 对人员要求较低, 适合于基层使用, 同时, ELISA 法检测快速, 费用低, 可大批量操作, 适合于大规模使用, 因此, 如果可以将 ELISA 法应用于检测宫颈癌发生发展过程中的关键蛋白, 用于大规模的宫颈癌筛查, 对宫颈癌的防治具有重要作用。本文用 ELISA 法检测宫颈癌发生发展中发挥重要作用的蛋白 Mybl2, 为宫颈癌的疾病监控、

(下转 145 页)

- 瘤, 2015, 24(7): 433-436.
- Dong Y, Zhu HF, Hou LP, et al. Clinical analysis of JAK2 V617F gene mutation in 120 patients with myeloproliferative neoplasms[J]. Journal of Leukemia & L-lymphoma, 2015, 24(7): 433-436.
- [3] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [4] 郭慧梅, 贺建辉, 李云鹏, 等. 骨髓增殖性肿瘤患者 JAK2-V617F 突变和脑血管事件的相关性研究[J]. 医学研究与教育杂志, 2014, 31(6): 28-30.
- Guo HM, He JH, Li YP, et al. Study on the correlation of JAK2-V617F mutation and cerebrovascular events in patients with myeloproliferative neoplasms [J]. Journal of Medical Research and Education, 2014, 31(6): 28-30.
- [5] 白雪燕, 白贝贝, 于小蕊, 等. 骨髓增殖性肿瘤伴发卒中中的临床分析[J]. 中国卒中杂志, 2013, 8(1): 31-38.
- Bai XY, Bai BB, Yu XR, et al. Clinical analysis of myeloproliferative neoplasms with stroke [J]. Chinese Journal of Stroke, 2013, 8(1): 31-38.
- [6] Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes[J]. Blood, 2014, 123(10): 1544-1551.
- 收稿日期: 2016-11-22
修回日期: 2017-01-17

(上接 142 页)防治提供新思路。接下来,我们将进一步对该方法进行临床准确度、特异度等方面的评价,并进一步评价其作为筛查标志物在疾病诊断、鉴别诊断、疾病监控、预后评估等方面的意义。

参考文献:

- [1] 田英,王双勇,赵雅,等. 宫颈癌组织细胞中 Numb 基因表达及相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(6): 42-45.
- Tian Y, Wang SY, Zhao Y, et al. Study on correlation and expression of numb gene in cervical cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(6): 42-45.
- [2] 赵一琳,崔映红,黄少芝. 实时荧光定量 RT-PCR 检测宫颈癌组织中 HIC1 基因表达的应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(3): 38-40.
- Zhao YL, Cui YH, Huang SZ. Determination of expression levels of HIC1-mRNA in cervical cancer tissues by real-time fluorescent quantitative RT-PCR [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(3): 38-40.
- [3] Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, et al. Myb overexpression overrides androgen depletion-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells, and confers aggressive malignant traits: potential role in castration resistance[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(6): 1149-1157.
- [4] Ye P, Zhao L, Gonda TJ. The MYB oncogene can suppress apoptosis in acute myeloid leukemia cells by transcriptional repression of DRK2 expression[J]. Leuk Res, 2013, 37(5): 595-601.
- [5] Martinez I, Dimaio D. B-Myb, cancer, senescence, and microRNAs [J]. Cancer Res, 2011, 71(16): 5370-5373.
- [6] Hu Z, Klein JD, Mitch WE, et al. MicroRNA-29 induces cellular senescence in aging muscle through multiple signaling pathways[J]. Aging, 2014, 6(3): 160-175.
- [7] Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A, et al. Long non-coding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB [J]. PLoS Genet, 2013, 9(3): e1003368.
- [8] Sottile F, Gnemmi I, Cantilena S, et al. A chemical screen identifies the chemotherapeutic drug topotecan as a specific inhibitor of the B-MYB/MYCN axis in neuroblastoma[J]. Oncotarget, 2012, 3(5): 535-545.
- [9] 吴飞翔,曹骥,赵荫农,等. B-myb C-myc 在肝细胞性肝癌中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(5): 269-271, 276.
- Wu FX, Cao J, Zhao YN, et al. Expression of B-myb and C-myc in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2008, 35(5): 269-271, 276.
- [10] 曹骥,杨春,李丽萍,等. B-myb 在人肝细胞癌中表达的生物学意义及与 cyclin D1 相关性的研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(5): 386-389.
- Cao J, Yang C, Li LP, et al. Biological significance of the expression of B-myb in hepatocellular carcinoma and the correlation with cyclin D1 [J]. Cancer, 2007, 27(5): 386-389.
- [11] Baker SJ, Ma'Ayan A, Lieu YK, et al. B-myb is an essential regulator of hematopoietic stem cell and myeloid progenitor cell development [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(8): 3122-3127.
- [12] Astbury K, Mcevoy L, Brian H, et al. MYBL2 (B-MYB) in cervical cancer: putative biomarker [J]. Int J Gynecol Cancer Society, 2011, 21(2): 206-212.
- [13] Martinez I, Cazalla D, Almstead LL, et al. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(2): 522-527.
- 收稿日期: 2016-09-19
修回日期: 2017-01-10