文章编号:1000-5404(2010)13-1421-04

论著

人宫颈癌细胞和永生化细胞的细胞中心体 γ-tubulin 和 Aurora-A 激酶表达的差异分析

巫静娴,赵 涌 (400016 重庆,重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心,病理学教研室)

[摘要] **目的** 对比人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)16 E6E7 基因阳性的人宫颈癌细胞(CasKi 细胞株)和人宫颈鳞状上皮永生化细胞(H8 细胞株)中 γ-tubulin 和中心体相关激酶 Aurora-A 表达的差异并探讨其意义。**方法** 采用间接免疫荧光显示 γ-tubulin 的荧光强度来分析 CasKi 和 H8 细胞中心体的差异, RT-PCR 检测中心体相关激酶 Aurora-A mRNA 水平, Western blot 方法对 γ-tubulin、Aurora-A 在两种细胞中的表达水平进行半定量分析。**结果** 宫颈癌细胞 CasKi 中 γ-tubulin 的免疫荧光信号(57.78 ±3.13)明显强于 H8 细胞(37.37 ±2.37)($P<0.05$);Aurora-A mRNA 在 CasKi 细胞(0.745 ±0.013)中的表达显著高于 H8 细胞(0.617 ±0.223)($P<0.05$);Western blot 结果显示 Aurora-A 和 γ-tubulin 在 CasKi 细胞中的蛋白表达水平分别为(0.969 ±0.011),(0.909 ±0.019)明显高于 H8 细胞[分别为(0.568 ±0.016),(0.571 ±0.022),$P<0.05$]。**结论** 中心体的异常扩增和过表达可能是宫颈癌前病变转变成癌的早期生物学标志,中心体异常可能成为诊断宫颈上皮内瘤变进展为癌的辅助分子生物学指标。

[关键词] 宫颈癌;永生化;中心体;γ-tubulin;Aurora-A
[中图法分类号] R737.3; R345.57; R394.3 [文献标志码] A

Difference of γ-tubulin and aurora-A expression in human cervical cancer and H8 cells

Wu Jingxian, Zhao Yong (Teaching and Research Section of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Centre, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare and analyze the difference of γ-tubulin and aurora-A expression in human cervical cancer cells (CasKi) and immortalized human cervical squamous H8 cells with positive HPV16 E6E7. **Methods** Difference of γ-tubulin and aurora-A expression in CasKi and H8 cells was analyzed by showing the fluorescence intensity of γ-tubulin with indirect immunofluorescence. Expression level of aurora-A mRNA was detected by RT-PCR. Expression level of γ-tubulin and aurora-A in CasKi and H8 cells was semi-quantitatively analyzed by Western blot. **Results** The immunofluorescence signal of γ-tubulin was stronger in Caski cells than in H8 cells (57.78 ±3.13 *vs* 37.37 ±2.37, $P<0.05$). The expression level of aurora-A mRNA was significantly higher in CasKi cells than in H8 cells (0.745 ±0.013 *vs* 0.617 ±0.223, $P<0.05$). Western blot showed that the expression level of γ-tubulin and aurora-A was significantly higher in CasKi cells than in H8 cells (0.969 ±0.011 and 0.909 ±0.019 *vs* 0.568 ±0.016 and 0.571 ±0.022, $P<0.05$). **Conclusion** γ-tubulin and aurora-A are over-expressed in CasKi and H8 cells, more significant CasKi cells, suggesting that amplification and over-expression of CasKi cells can be used as complementary biological indices in diagnosis of cervical epithelial cancer.

[**Key words**] cervical carcinoma; immortalization; centrosome; γ-tubulin; aurora-A

Corresponding author: Zhao Yong, Tel: 86-23-68485789, E-mail: blys01@163.com

近年来,中心体在肿瘤发生、发展中的作用逐渐受到人们的关注,恶性肿瘤细胞极性改变和染色体分离异常可能是由于中心体功能缺陷导致的,学者们已在多种恶性肿瘤中观察到中心体的异常改变[1-4]。但在宫颈癌前病变及其进展中探讨中心体扩增情况,目前研究却鲜有涉及。本实验旨在通过检测人宫颈癌细胞(CasKi 细胞株)和癌前永生化细胞(H8 细胞株)内中心体 γ-tubulin , Aurora-A 的异常并比较其差异,评估中心体异常扩增在感染 HPV 病毒的宫颈癌前疾病和宫颈癌的意义,初步探讨其在宫颈癌前疾病进展中的价值。

[通信作者] 赵 涌,电话:(023)68485789,E-mail:blys01@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈鳞癌细胞株(CasKi,HPV16 E6E7)由重庆医科大学分子生物学教研室宋方洲教授惠赠,人宫颈鳞状上皮永生化细胞株(H8,HPV16 E6E7)源于中国医学科学院协和医科大学基础研究所。羊抗人 Aurora-A 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗人 γ-tubulin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司,RT-PCR 试剂盒3.0购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 CasKi 和 H8 细胞在含有10%灭活小牛血清,青、链霉素各100 U/ml 的 RPMI1640 培养基,37℃,5% CO_2混合气体的孵箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 间接免疫荧光实验 将 CasKi 和 H8 细胞按 5×10^4/ml 密度接种到24孔板内,加入 RPMI1640 培养基培养,制成细胞爬片。用多聚甲醛固定液固定爬片,再用 TPBS 清洗后滴加一抗(兔抗人 γ-tubulin 单克隆抗体)4 ℃过夜。第2天去除一抗,用 TPBS 清洗后加 FITC 标记二抗作用 60 min,去除二抗后 TPBS 清洗,最后滴抗荧光淬灭液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片。实验爬片及时使用荧光显微镜观察,照相。用 Image-Pro plus 软件对100个细胞的中心体区域荧光强度进行测量,计算 IOD/Area 值,就得到中心体 γ-tubulin 的平均荧光表达强度,实验重复3次。

1.2.3 RT-PCR 实验 按 Biozol 试剂操作说明书并结合文献从细胞悬液中提取总 RNA。用逆转录酶(AMV Reverse Transcriptase)合成 cDNA,再根据 TaKaRa 说明书用 PCR 试剂盒进行 PCR 反应,循环参数为:94 ℃,30 s;60 ℃,30 s;72 ℃,30 s;进行35次循环。引物序列设计如下:Aurora-A 上游:5′-CTCGTCATACTCCTGCTTGCTG-3′;下游:5′-ACTGACCACCCAAAATCTGC-3′。β-actin546A 作为内参照。用1.2%的琼脂糖凝胶电泳分离 Aurora-A(219 bp)和 β-actin546A(546 bp)的 PCR 产物,灰度扫描,图像分析仪分析结果,计算光密度比值,每次样本重复3次。

1.2.4 Western blot 实验 按照 PRO-PREP 蛋白提取液说明书从细胞悬液中提取总蛋白。取适量蛋白质经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后转到 PVDF 膜上,转膜后在5%的脱脂牛奶中封闭,然后加一抗(Aurora-A 和 γ-tubulin 抗体,1∶1 000稀释),室温孵育1 h,TBST 洗涤,按1∶2 000加辣根过氧化物酶偶联的抗羊 IgG 孵育,采用 ECL 检测系统(Amersham,Piscataway,NJ,USA)检测条带,并用 ChemiDocXRS 化学发光成像系统采集图像,以 β-actin 作为内参。实验重复3次。

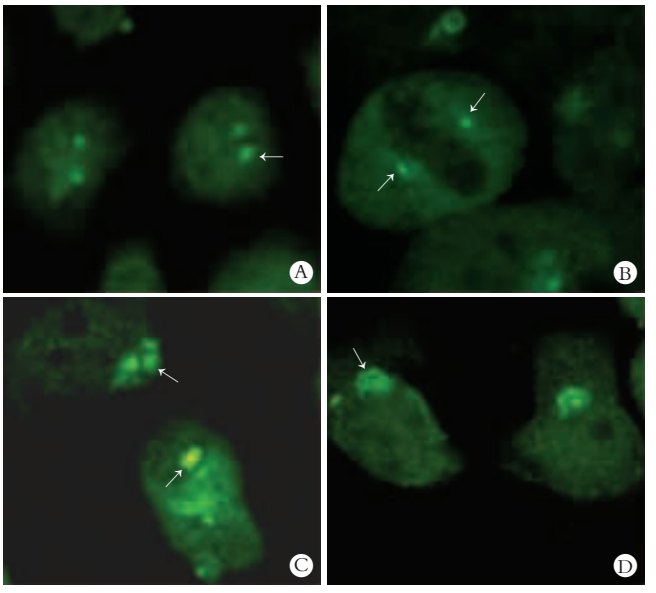
1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计分析软件对对各组数据进行正态检验以及方差齐性检验,两组数据参数比较采用 t 检验。

2 结果

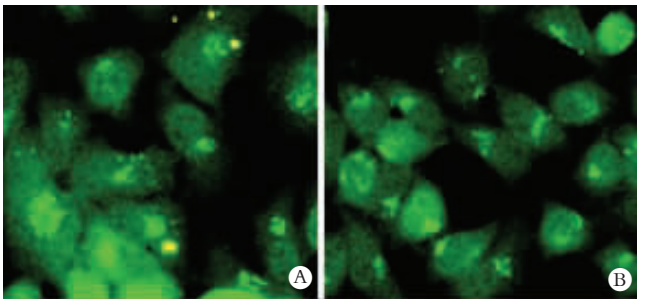
2.1 间接免疫荧光检测结果

γ-tubulin 分布在中心体,细胞爬片上呈现点状绿色荧光。在 CasKi 和 H8 细胞中均检测到了异常的中心体(图1),包括中心体数目增多(>2个),体积异常增大,或形状异常。宫颈癌细胞 CasKi 中 γ-tubulin 的平均荧光强度为(57.78±3.13),而永生化细胞 H8 则为(37.37±2.37)($n=3$),结果显示 CasKi 细胞中心体区域荧光强度显著高于 H8 细胞($P<0.05$)(图2)。



A:中心体正常的细胞;B:有丝分裂期的中心体;C:中心体形态异常的细胞;D:中心体数量异常的细胞 ↑:中心体

图1 间接免疫荧光染色显示细胞内的正常及异常的中心体形态(倒置荧光显微镜 ×400)



A:CasKi;B:H8

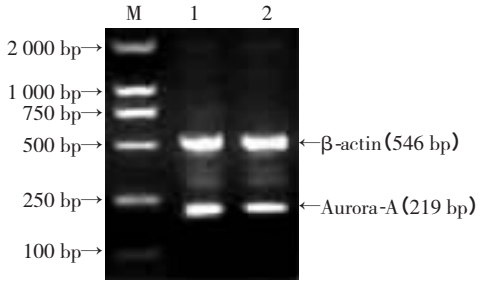
图2 CasKi 和 H8 细胞内中心体 γ-tubulin 免疫荧光表达(倒置荧光显微镜 ×400)

2.2 RT-PCR 检测结果

半定量 RT-PCR 电泳结果显示 CasKi 和 H8 细胞株均发现 Aurora-A mRNA 扩增片段,应用 Quantity One 软件进行光密度值分析,以 Aurora-A 和 β-Actin 扩增片段的光密度值之比表示 Aurora-A mRNA 的相对含量(图3)。Aurora-A mRNA 在 CasKi 和 H8 细胞中的相对含量分别为(0.745±0.013)和(0.617±0.223)($n=3$),结果显示 Aurora-A 在 CasKi 细胞中的表达显著高于 H8 细胞,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

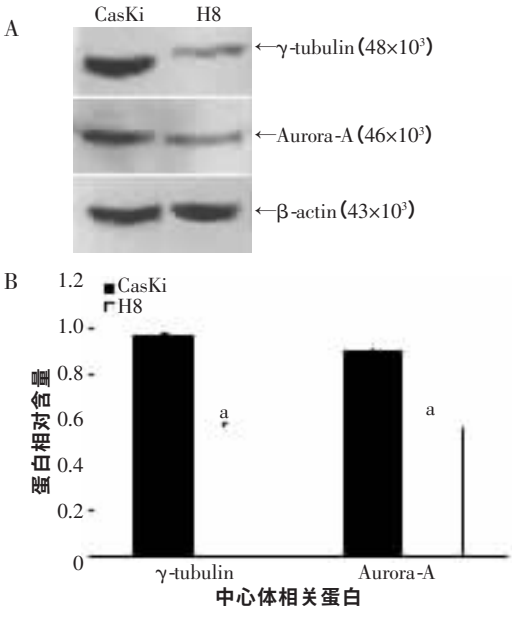
2.3 Western blot 检测结果

Western blot 蛋白电泳结果显示 Aurora-A,γ-tubulin 蛋白在 CasKi 及 H8 细胞株呈现不同水平的表达,应用 Qunity-one 软件进行图像分析,分别以 Aurora-A、γ-tubulin 与 β-Actin 的积分光密度值之比表示其蛋白的相对含量(图4)。Aurora-A 和 γ-tubulin 在 CasKi 细胞中的表达高于 H8 细胞($P<0.05$)。这一结果与免疫荧光和 RT-PCR 的检测结果一致。



M：标准；1：CasKi；2：H8

图 3 CasKi 和 H8 细胞中 Aurora-A RT-PCR 检测结果



a：$P<0.05$，与 CasKi 比较

A：两种细胞的 Western blot 蛋白电泳结果；B：两种细胞中 γ-tubulin 和 Aurora-A 蛋白的相对含量（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

图 4 CasKi 和 H8 细胞中 γ-tubulin 和 Aurora-A 蛋白的表达

3 讨论

宫颈癌是由癌前病变逐渐进展而来，从不典型增生可逐渐发展为原位癌、早期浸润癌和浸润癌[5]。中心体是细胞的微管组织中心，在有丝分裂期负责建立两极纺锤体，牵引排列在中央的染色体向两极运动，确保复制后的染色体平均分配到子细胞中，维持细胞染色体的稳定性[6]。而异常的中心体可能源于多个中心体的聚集或者中心体外周基质成分（PCM），PCM 中具有代表性的物质有 γ-tubulin 和 Aurora-A 基因[7]。

γ-tubulin 是微管蛋白家族的一个特殊成员，它起始胞内微管的晶核形成，控制有丝分裂纺锤体的复制，是有丝分裂中心体复制中的关键蛋白[8]。由于目前还没有成熟的提纯中心体的技术，我们通过检测 γ-tubulin 在两株细胞总蛋白中的荧光表达量来评估中心体的蛋白表达情况，探讨中心体蛋白水平异常由宫颈癌前病变进展到癌这一过程中的意义。荧光显微镜下 CasKi 和 H8 细胞内 γ-tubulin 荧光标记点均明显异常，即两株细胞内观察到的中心体形态异常包括中心体数目扩增、体积增大和形状异常。此外，CasKi 细胞比 H8 细胞的中心体 γ-tubulin 荧光明显增强，与蛋白水平检测结果一致，这也与本课题组前期检测到 CasKi 和 H8 细胞的骨架蛋白中 γ-tubulin 的蛋白量在 CasKi 细胞中表达较多的结论相符合[9]。以上实验结果显示宫颈癌前病变和宫颈癌细胞株中均有中心体异常，癌细胞较癌前的永生化细胞中心体相关蛋白表达量明显增加，提示中心体的形态异常程度是随着永生化细胞到宫颈癌增加的，且与宫颈癌密切相关，在细胞的恶性转化过程中伴有中心体的异常扩增。同时，牛昀等[10]研究乳腺癌及癌前病变，发现随着导管上皮增生、不典型增生至进展为原位癌和浸润性导管癌的发展变化，γ-tubulin 表达量呈增高趋势。我们得出结论：中心体形态异常是恶性肿瘤早期形成的标志，检测中心体扩增可以用于监视癌前病变至癌变的进程，为早期诊断和治疗提供理论依据。

Aurora-A 是 Aurora 激酶家族的一个重要成员，是一种调节中心体、微管功能的丝氨酸/苏氨酸激酶，在许多上皮性恶性肿瘤中发现该基因的扩增[11-12]，并且与预后不良相关，进而在多种恶性肿瘤细胞系中出现 Aurora-A 的异常高表达从而引起细胞非整倍体的形成和中心体的异常。更有学者在正常小鼠 NIH-3T3 细胞中转染 Aurora-A 基因，注入裸鼠后可在其体内成瘤[13]。因此 Aurora-A 已被确认是一种新的癌基因。目前已有研究在宫颈癌细胞株中检测到 Aurora -A 的高表达，而从宫颈癌前病变发展成癌过程中 Aurora-A 表达有无改变少见报道。本结果显示 Aurora-A 的 mRNA 和蛋白在癌细胞株 CasKi 中表达均明显高于癌前永生化细胞株 H8 细胞，可以判定宫颈癌细胞株中 Aurora-A 从基因到蛋白水平都显示出异常高表达，Aurora-A 的扩增和过表达可能是宫颈癌发生过程中的早期事件。以往研究也发现在原位癌和恶性肿瘤早期均能检测到 Aurora-A 的扩增[14-16]，所以现在已经认为 Aurora-A 是肿瘤发生早期的一个有效的分子标记物。结合 Bischoff 等[17]研究结果，推测 Aurora-A 在细胞中的异常高表达引起中心体的扩增，导致中心体功能缺陷，形成多级纺锤体，可能是 Aurora-A 对微管聚集形成有丝分裂纺锤体及微管-动粒相互作用的结果。

本研究将永生化细胞株和宫颈癌细胞株的中心体相关蛋白进行对比，结果显示与癌前的永生化细胞株相比，宫颈癌细胞株中 Aurora-A 和 γ-tubulin 均呈现出高表达。Sugimoto[18]曾报道 Aurora-A 与 γ-tubulin 协同分布，可以分析 Aurora-A 与中心体密切相关，它的异常高表达可导致中心体的扩增；γ-tubulin 又是中心体的 PCM 重要组成，随着其表达水平增高也引起了中

心体的异常。因此,我们推测,中心体的扩增和过表达可能是宫颈癌早期形成的生物学标志,共同监测γ-tubulin 和 Aurora-A 蛋白的表达可作为早期诊断宫颈上皮内瘤变进展为癌的重要分子生物学指标。

志谢 衷心感谢重庆医科大学病理生理学教研室赵敬老师,神经科学研究中心张雄老师和本课题组全体成员

参考文献:

[1] Kronenwett U, Huwendiek S, Castro J, *et al*. Characterisation of breast fine-needle aspiration biopsies by centrosome aberrations and genomic instability[J]. Br J Cancer, 2005, 92 (2): 389 - 395.

[2] Niu Y, Liu T, Tse G M, *et al*. Increased expression of centrosomal alpha, gamma-tubulin in atypical ductal hyperplasia and carcinoma of the breast[J]. Cancer Sci, 2009, 100(4): 580 - 587.

[3] Reiter R, Gais P, Steuer-Vogt M K, *et al*. Centrosome abnormalities in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)[J]. Acta Otolaryngol, 2009, 129 (2): 205 - 213.

[4] Weber R G, Bridger J M, Benner A, *et al*. Centrosome amplification as a possible mechanism for numerical chromosome aberrations in cerebral primitive neuroectodermal tumors with TP53 mutations[J]. Cytogenet Cell Genet, 1998, 83(3 - 4): 266 - 269.

[5] Deligeoroglou E, Christopoulos P, Aravantinos L, *et al*. Human papilloma virus molecular profile and mechanisms of cancerogenesis: a review[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2009, 30(2): 128 - 132.

[6] Fukasawa K. P53, cyclin-dependent kinase and abnormal amplification of centrosomes[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1786(1): 15 - 23.

[7] Lukasiewicz K B, Lingle W L. Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle[J]. Environ Mol Mutagen, 2009, 50 (8): 602 - 619.

[8] Raynaud-Messina B, Merdes A. Gamma-tubulin complexes and microtubule organization[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(1): 24 - 30.

[9] 吕玉宇, 赵涌, 巫静娴, 等. 宫颈永生化细胞和癌细胞的α、β、γ-微管蛋白比较分析[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(12): 1471 - 1474.

[10] 牛昀, 王颖, 于泳, 等. 中心体α、γ-微管蛋白在乳腺癌前病变及乳腺癌中的表达及其意义初探[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(1): 56 - 60.

[11] Sardon T, Cottin T, Xu J, *et al*. Development and biological evaluation of a novel aurora A kinase inhibitor[J]. Chembiochem, 2009, 10 (3): 464 - 478.

[12] 贾世军,赵涌,卞修武. 诺帝对人卵巢癌细胞3AO和SKOV3增殖、周期及Aurora-A表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1728 - 1731.

[13] Bischoff J R, Anderson L, Zhu Y, *et al*. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers[J]. EMBO J, 1998, 17 (11): 3052 - 3065.

[14] Goepfert T M, Adigun Y E, Zhong L, *et al*. Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2002, 62(14): 4115 - 4122.

[15] Pihan G A, Wallace J, Zhou Y, *et al*. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas[J]. Cancer Res, 2003, 63(6): 1398 - 1404.

[16] Chng W J, Fonseca R. Centrosomes and myeloma; aneuploidy and proliferation[J]. Environ Mol Mutagen, 2009, 50(8): 697 - 707.

[17] Bischoff J R, Plowman G D. The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis[J]. Trend Cell Biol, 1999, 9(11): 454 - 459.

[18] Sugimoto K, Urano T, Zushi H, *et al*. Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone h3 and nuclear membrane protein importinalpha[J]. Cell Struct Funct, 2002, 27(6): 457 - 467.

(**收稿**:2009-11-26;**修回**:2010-02-24)

(编辑 王 红)

(上接1412页)

予以甘露醇脱水降颅压、氢化可的松(含酒精)、高压氧、改善循环、营养神经等治疗,入院1周后复查头颅CTA提示:脑血管增强扫描显示大脑前、中、后动脉及基底动脉显示良好,未见明确狭窄及缺损改变。查体示:患者意识清楚,对答可,语速稍慢,可完成指令性动作,双侧瞳孔等大等圆,对光反射灵敏;眼球活动可;颈软,双侧克氏征阴性;右侧中枢性面舌瘫;右侧肢体肌张力稍高,右上肢肌力2级,右下肢3级;左侧肢体肌张力可,肌力5级;右下肢巴氏征阳性,右侧踝阵挛阳性(NIHSS评分:6分)。

2 讨论

脑脂肪栓塞综合征常见于骨折后,由于脂肪细胞被破坏,游离脂肪被挤到静脉内形成栓子,造成脑部循环障碍导致脑缺血,形成以意识障碍、神经功能缺失为主要临床表现的称为脑型脂肪栓塞综合征一般以淡漠、嗜睡、昏迷等为脑部表现。通常采用激素、酒精、脱水剂、高压氧等治疗[2,3]。

该患者由于颞部(太阳穴部位)凹陷,为了使面部丰满,要求行面部填充术。目前面部填充上最安全有效的材料就是自体脂肪。面部自体脂肪填充术的具体其手术方法:从人体脂肪较丰厚的部位,如腹、臀、大腿内侧或上臂等处的脂肪,用湿性真空吸脂方法吸出,用离心机分离处理后提取纯净脂肪颗粒,然后注入到面部所需部位。术后该患者出现意识障碍、失语、中枢性面舌瘫及肢体偏瘫,头颅MR提示脑缺血病灶,MRA提示大脑中动脉的闭塞,提示患者发生了脑栓塞,考虑脂肪栓塞可能性大。

该患者发生脑脂肪栓塞的原因少见文献报道,推测其具体机制可能为注射过程中,脂肪颗粒注入颞浅动脉,通过相吻合的动脉,脂肪颗粒进入大脑中动脉,使血管闭塞,从而导致大脑中动脉供血区域脑组织缺血,造成严重的神经系统功能损害。我们采用了相应的治疗后,复查CTA证实大脑中动脉恢复通畅,且患者症状明显好转。

参考文献:

[1] 王韬,柳伊娜. 脑型脂肪栓塞综合征的发病机制和诊治进展[J]. 疑难病杂志, 2008, 7(4): 253 - 255.

[2] 黄磊,韩玉,贾春梅. 急诊脑脂肪栓塞综合征早期诊断和治疗[J]. 职业与健康, 2008, 24(19): 2108 - 2109.

[3] 王钢,陈学新,於淑英. 高压氧和甲强龙联合治疗脂肪栓塞综合征[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(1): 100 - 101.

(**收稿**:2010-05-07;**修回**:2010-06-15)

(编辑 邓强庭)