论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1471-04

宫颈永生化细胞和癌细胞的α、β、γ-微管蛋白比较分析

吕玉宇,赵 涌,巫静娴,祝建芳,宋大萍
(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨中心体α、β、γ-微管蛋白在人鳞状上皮宫颈永生化细胞(H8细胞株)和癌细胞(Caski细胞株)的表达差异及其在宫颈癌发生发展过程中的作用。方法:采用免疫细胞化学SP法检测中心体α、β-微管蛋白在人宫颈永生化细胞和癌细胞中的表达差异,提取两株细胞的骨架蛋白并用Western blotting对α、β、γ-微管蛋白的表达水平进行半定量分析。结果:Caski细胞中α、β-微管蛋白表达水平高于H8细胞,差异均有统计学意义($P<0.05$)。半定量分析α、β、γ-微管蛋白,Caski细胞中的表达量高于H8细胞。结论:中心体异常可能是宫颈癌细胞恶性表型的特征之一,以中心体微管蛋白为治疗靶点的研究有着可期待的前景。

【关键词】宫颈癌;永生化;微管蛋白;中心体
【中国图书分类法分类号】R737.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-24

Comparative analysis of α-tubulin, β-tubulin and γ-tubulin of Immortalized cells and carcinoma cells of the Cervix

LV Yu-yu, et al
(*Department of Parthology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of α-tubulin, β-tubulin and γ-tubulin of centrosome in immortalized human squamous epithelial cell(H8) and cervical cancer cell(Caski) and the role of them in occurrence and development of cervical cancer. *Methods*: Immunocytochemistry was used to analyze the protein expressions of α-tubulin and β-tubulin in immortalized human cervical cells and carcinoma cells. The skeleton protein was extracted by ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, and then Western blotting was used to determine the protein expressions of α-tubulin, β-tubulin and γ-tubulin semi-quantitatively. *Results*: The protein expressions of α-tubulin, β-tubulin and γ-tubulin in Caski were higher than those in H8($P<0.05$). *Conclusion*: Centrosome abnormality may be one of the malignant phenotypes of cervical cancer cells. The microtubulin protein as a target in tumor treatment can have a good perspective.

【Key words】 Cervical carcinoma; Immortalization; Microtubulin; Centrosome

微管是细胞骨架的组成部分之一,具有维持细胞形态,参与细胞内运输、鞭毛和纤毛运动、纺锤丝和染色体运动,形成基粒和中心体等重要功能。中心体是细胞微管组织中心(Microtubule organizing centers,MTOCs),具有保证有丝分裂精确性和细胞骨架结构正确性的双重功能。研究发现多种肿瘤/细胞系有中心体的异常,在宫颈原位癌中也观察到中心体的异常[1],但中心体在宫颈癌前病变发展成癌过程中的作用国内外鲜有文献报道。本实验通过检测α、β、γ-微管蛋白在人宫颈HPV16-E6永生化细胞和癌细胞中的表达,探讨中心体微管蛋白异常在宫颈癌发生发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人宫颈鳞癌细胞株(Caski,HPV16阳性)从重庆医科大学分子生物教研室获得,人宫颈鳞状上皮永生化细胞株(H8,HPV16阳性)源于中国医学科学院协和医科大学基础研究所。

1.2 主要试剂和仪器

亚细胞结构蛋白质提取试剂盒Calbiochem®(ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit)购于德国Merck生物制剂公司,免疫细胞化学所用α-微管蛋白(ZM-0438)、β-微管蛋白(ZM-0439)一抗及实验所用二抗均购自北京中杉公司,Western所用β-Actin(sc-47778)、α-微管蛋白

作者介绍:吕玉宇(1977-),女,硕士,研究方向:妇科肿瘤病理。
通讯作者:赵 涌,男,教授,E-mail: blys01@163.com。

（sc-8035）、β-微管蛋白（sc-9104）一抗及Luminol Reagent试剂盒（sc-2048）为Santa Cruz公司产品，γ-微管蛋白（T5192）为Sigma公司产品，Fermentas公司预染Maker，PVDF膜为Millipore公司产品。

电泳仪、半干电转仪及凝胶扫描成像系统购于美国Bio-Rad公司，5417R高速离心机（德国Eppendorf公司）。

1.3 α，β-微管蛋白免疫细胞化学检测

将H8细胞和Caski细胞置于含100 ml/L胎牛血清的RPMI 1640培养液中常规培养。取对数生长期细胞按5×10^4个/ml制备细胞爬片，按照免疫细胞化学SP法操作步骤常规进行。用过氧化氢处理细胞片以阻断内源性过氧化物，血清封闭之后分别滴加α，β-微管蛋白一抗工作液4℃过夜，生物素化二抗工作液37℃孵育30 min，DAB显色，树脂封片。

1.4 α，β，γ-微管蛋白Western blotting检测

细胞培养同前，待细胞数达到3×10^6个时收集细胞，吸尽培养液，取3×10^6个对数生长期细胞，按照亚细胞结构蛋白质提取试剂盒操作步骤提取细胞骨架蛋白，Bradford蛋白质定量试剂盒用酶标仪对样品定量，加入6×样品缓冲液100℃变性5 min，-80℃冰箱保存。

取样品进行SDS-PAGE蛋白电泳，表达产物采用半干电转移至PVDF膜上，牛奶室温封闭1h，一抗（β-Actin 1∶2000；α-微管蛋白1∶200；β-微管蛋白1∶200；γ-微管蛋白1∶2 000）孵育4℃过夜，二抗（1∶2 000）室温孵育2 h，PVDF膜化学显色，凝胶成像仪照相。

1.5 统计学分析

实验数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用SPSS11.5统计分析软件对样本的平均光密度采用方差齐性检验和组间 t 检验统计学分析，检验水准 α 为0.05，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

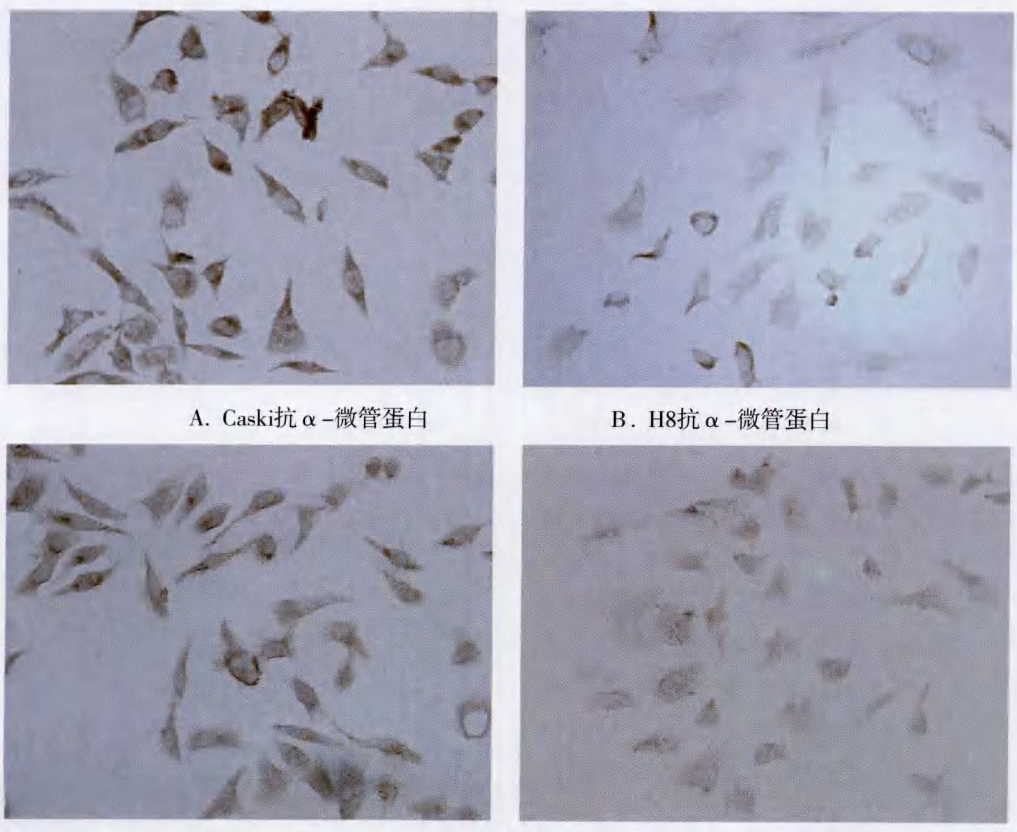
2 结 果

2.1 α、β-微管蛋白免疫细胞化学结果

抗 α-微管蛋白、抗 β-微管蛋白分别检测两种细胞，光镜下胞浆内见均匀的不同程度着色的棕色颗粒（图1），Caski 细胞着色深度强于 H8 细胞。Image-Pro-Plus 6.0 分析 Caski 细胞和 H8 细胞 α、β-微管蛋白表达结果，计算平均光密度（平均光密度 = 累积光密度 / 着色面积）。两种细胞 α-微管蛋白的表达差异有统计学意义（t=5.011，P=0.030）；两种细胞 β-微管蛋白的表达差异有统计学意义（t=7.233，P=0.011）

2.2 α、β、γ-微管蛋白Western blotting结果

α-微管蛋白抗体、β-微管蛋白抗体和 γ-微



A. Caski抗α-微管蛋白　B. H8抗α-微管蛋白

C. Caski抗β-微管蛋白　D. H8抗β-微管蛋白

图1 免疫细胞化学检测α、β-微管蛋白结果（400×）

管蛋白抗体在两种细胞的表达明显不同(图2)。目的条带用图像分析软件Quantity-one进行光密度积分值分析,以目的蛋白与β-Actin积分光密度值的比值作为该蛋白表达的相对含量。α-微管蛋白、β-微管蛋白和γ-微管蛋白在Caski细胞表达高于H8细胞(表1),Western blotting检测结果与免疫细胞化学检测结果一致。

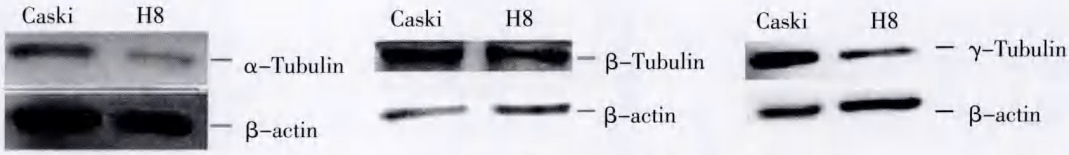


图2 Western blotting检测α、β、γ-微管蛋白结果

表1 Western blotting检测α、β、γ-微管蛋白结果

group	α-Tubulin	β-Tubulin	γ-Tubulin
Caski	0.037 70 ± 0.003 55	2.824 30 ± 0.956 56	2.024 40 ± 0.649 70
H8	0.018 10 ± 0.006 46▲	1.484 30 ± 0.323 56*	0.561 60 ± 0.518 90△

Caski与H8相比较,▲$P<0.001$,*$P=0.004$,△$P=0.002$

3 讨 论

在真核细胞中,中心体负责组织微管网络和调控细胞周期,决定着细胞微管的极性、数目及分布,并在染色体分配和有丝分裂中起关键作用。几乎全部人类实体瘤都有异常数目的中心体,淋巴造血系统的恶性病变如非霍奇金淋巴瘤和急性白血病也表现了高频率的中心体异常[2]。中心体异常包括:中心体数目增多、结构异常,中心粒周围物质(Pericentriolar material,PCM)过多聚焦,中心体蛋白的异常磷酸化,无粒中心体,微管成核能力增强等[3,4]。

中心体由中心粒和PCM两部分组成,α、β-微管蛋白是主要的中心粒微管蛋白,γ-微管蛋白则是PCM中有代表性的一种蛋白,这3种单体均是GTP结合蛋白。微管负端连接MTOCs,正端游离于胞浆中,从而形成细胞的极性结构,为信号分子的流动提供导向,微管的结构特点以及微管两端以不同速率聚合和解聚的动态性变化,使微管成为细胞内信息通路的重要角色。微管蛋白在人类肿瘤细胞中的突变和表达水平的变化都会导致中心体的异常,引起非整倍体的形成,导致染色体不稳定和细胞骨架紊乱,为引发细胞获得恶性表型提供遗传背景和环境条件。本实验中的两株细胞均以对数生长期作为研究对象,可以认为两者处于相同的细胞周期,且实验中的细胞以分裂期为主。微管蛋白是真核细胞中普遍存在的结构,由于其他功能微管蛋白在细胞周期中表达相对稳定,而与细胞分裂增殖有关的中心体变化活跃,中心体异常和染色体不稳定在肿瘤细胞尤为明显,因此构成中心体的微管蛋白的表达量也应随之发生变化。由于目前尚无提纯中心体的成熟技术,我们通过免疫组化(如图1)和免疫印迹(如图2)用微管蛋白的表达来推测中心体的表达情况,从中心体蛋白水平异常的角度探讨中心体微管蛋白α、β、γ-微管蛋白在宫颈永生化细胞和癌细胞的表达及意义,结果显示癌细胞的α、β、γ-微管蛋白的表达量显著高于永生化细胞,即癌细胞的中心体数目多、PCM过多聚集,具有更强的微管成核能力,中心体异常更为显著。

α、β-微管蛋白表达异常及排列破坏与肿瘤的恶性生物学行为密切相关。在化学致癌物7,12-二甲苯蒽作用6周后鼠乳腺组织中α-微管蛋白mRNA表达水平上调,表明微管动力学破坏及异常有丝分裂可能是乳腺癌进展过程中的重要事件[6]。牛昀等[7]发现随着乳腺病变(包括癌前病变、早期癌变和侵润癌)恶性程度的增加,α-微管蛋白也呈上升趋势。有研究发现β-微管蛋白Ⅱ型在多种肿瘤组织高表达,并推测该亚型可能成为一种有效的肿瘤标记物。直肠癌Dukec分期(B/C期)分别与α、β-微管蛋白表达的相关性具有统计学意义,提示微管蛋白可能在侵润癌的发展过程中具有一定的作用[9]。本实验显示宫颈癌细胞的α、β-微管蛋白的表达量显著高于永生化细胞,癌细胞的中心粒分裂失控,形成多个单中心粒的中心体可能是导致中心体扩增

的机制之一。

位于细胞内MTOCs的γ-微管蛋白是微管执行功能所必不可少的,可能对微管的形成及微管极性的确定起重要作用,还参与纺锤体组装检查点的功能和细胞周期的调控[10],许多疾病都与γ-微管蛋白的变化有关,但某些癌变是否与其过表达有关还不明确。对早期侵润性乳腺癌的研究表明γ-微管蛋白的高表达可以作为乳腺癌预后不良的一个指标[11]。牛昀等[7]的研究也发现γ-微管蛋白表达与乳腺疾病的恶性程度正相关。本实验结果也显示癌细胞γ-微管蛋白表达上调,PCM过多聚集导致中心体异常,引起异倍体的形成,使细胞表型异常,促进肿瘤恶性发展。

许多重要的激酶都参与了中心体复制及其复制周期的调控,在肿瘤细胞中,许多激酶及其底物在中心体扩增发生以及发展阶段都发生了改变。对乳腺癌细胞MDA-MB-231和前列腺癌细胞DU145的研究显示活化的肌动蛋白骨架重排关键蛋白LIM激酶联合γ-微管蛋白在纺锤体组装中发挥重要作用[12]。我们之前在Caski和H8核蛋白组差异分析中鉴定出蛋白磷酸酶PP4C(Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit)于Caski细胞中高表达(另文待发表),PP4C对微管最初在中心体上的生长、微管于中心体连接的维持及中心体的成熟过程中都具有重要作用。同时,HPV E6/E7癌蛋白可能通过不同途径来阻碍中心体的自身平衡,E6使p53钝化,累积异常的中心体数目同时致多核细胞和核异型形成;E7主要通过灭活Rb基因和细胞周期检查点,激活表型正常的细胞中心体扩增,E7还能独立聚集γ-微管蛋白,E6和E7协同作用,导致中心体异常和染色体不稳定[13,14],从而使基因组发生特征性变化,引起细胞恶性增殖。根据实验结果,我们推测微管蛋白表达及中心体酶学的改变导致了中心体拷贝数、结构或功能发生改变,这可能是宫颈癌发生的关键性步骤和促进其发展的重要环节。

临床利用微管蛋白作为某些抗肿瘤药物的作用位点[15],抑制微管聚合或抑制微管解聚,影响微管动力学改变微管的功能来治疗恶性肿瘤。

中心体扩增是所有实体肿瘤的标志,是驱动多步骤肿瘤形成的强大力量。本研究结果显示中心体微管蛋白α、β、γ-微管蛋白在癌细胞的表达明显高于永生化细胞,中心体异常可能是宫颈癌细胞恶性表型的特征之一,以中心体微管蛋白为治疗靶点的研究有着可期待的前景。

参 考 文 献

[1] Pihan GA,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.

[2] Krämer A,Neben K,Ho A D. Centrosome aberrations in hematological malignancies[J]. Cell Biol Int,2005,29(5):375-383.

[3] Lingle W L, Barrett S L, Negron V C,et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2002,99(4):1978-1983.

[4] Fukasawa K.Introduction.Centrosome[J]. Oncogene,2002,21(40):6140-6145.

[5] Nigg E A. Centrosome aberrations:cause or consequence of cancer progression[J]. Nat Rev Cancer,2002,2(11):815-825.

[6] Papaconstantinou A D,Shanmugam I,Shan L,et al. Gene expression profiling in the mammary gland of rats treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene[J]. Int J Cancer,2006,118(1):17-24.

[7] 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.

[8] Oda E,Nakamura Y,Yamamoto M,et al. Immunohistochemical distribution of tubulin beta II in human normal and neoplastic tissues[J]. Kurume Med J,2005,52(4):117-125.

[9] Giarnieri E,De Francesco G P,Carico E,et al. Alpha- and beta-tubulin expression in rectal cancer development[J]. Anticancer Res,2005,25(5):3237-3241.

[10] Cuschieri L,Nguyen T,Vogel J.Control at the cell center:the role of spindle poles in cytoskeletal organization and cell cycle regulation[J]. Cell Cycle,2007,6(22):2788-2794.

[11] Schneeweiss A,Sinn HP,Ehemann V,et al. Centrosomal aberrations in primary invasive breast cancer are associated with nodal status and hormone receptor expression[J]. Int J Cancer,2003,107(3):346-352.

[12] Chakrabarti R,Jones J L,Oelschlager D K,et al. Phosphorylated LIM kinases colocalize with gamma-tubulin in centrosomes during early stages of mitosis[J]. Cell Cycle,2007,6(23):2944-2952.

[13] Nguyen C L,Eichwald C,Nibert M L,et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin[J]. J Virol,2007,81(24):13533-13543.

[14] Schneeweiss A,Sinn HP,Ehemann V,et al. Centrosomal aberrations in primary invasive breast cancer are associated with nodal status and hormone receptor expression[J]. Int J Cancer,2003,107(3):346-352.

[15] Sengupta S,Thomas SA. Drug target interaction of tubulin-binding drugs in cancer therapy[J]. Expert Rev Anticancer Ther,2006,6(10):1433-1447.

(责任编辑:关蕴良)