

纺锤体检查点蛋白 Cenp-E 在肝癌组织的表达及临床意义

刘 斌,刘 婧,刘卓然,汪 翼,吴 广

(南华大学附属第二医院检验科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 观察纺锤体检查点蛋白(Cenp-E)在肝癌组织和人类正常肝组织表达水平的差异,以探讨 Cenp-E 蛋白在肝癌细胞中的表达及临床意义。**方法** 用荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 Cenp-E 基因和蛋白在肝癌组织和正常肝组织的表达水平。**结果** 正常肝组织中 Cenp-E 基因 mRNA 水平($0.023\ 78 \pm 0.009\ 73$)明显高于肝癌组织($0.014\ 58 \pm 0.008\ 73$);Cenp-E 蛋白表达量在正常肝组织中(0.656 ± 0.012)明显高于在肝癌组织中的表达(0.301 ± 0.009),且二者有显著性差异。**结论** Cenp-E 低表达在肝癌的发生过程中起重要作用。

关键词: 纺锤体检查点; Cenp-E 基因; 肝癌

中图分类号:446 **文献标识码:**A

Expression of the Spindle Checkpoint Protein Cenp-E in the Human Hepatom Tissue and Its Clinical Significance

LIU Bin, LIU Jing, LIU Zhuoran, et al

(Clinical laboratory, the second affiliated hospital, university of south china, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the differential expression and its clinical significance of the spindle checkpoint protein Cenp-E gene between the human hepatoma and hepatic tissue. **Methods** Real-time fluorescent-quantitation PCR and Western blot were employed to detect the expressions of the Cenp-E mRNA and protein, respectively. **Results** The expression of the Cenp-E mRNA in human hepatic tissue($0.023\ 78 \pm 0.009\ 73$) was higher than that in human hepatoma tissue($0.014\ 58 \pm 0.008\ 73$). The expression of the Cenp-E protein in human hepatic tissue(0.656 ± 0.012) was higher than that in human hepatoma tissue(0.301 ± 0.009). **Conclusion** Cenp-E gene low expression in human hepatocellular carcinoma plays an important role in the its developmental process.

Key words: spindle checkpoint; Cenp-E gene; hepatoma

肝细胞癌(human hepatocellular carcinoma, HCC)是十大恶性肿瘤之一,发生机制仍不十分清楚。研究证实,HCC 存在基因组不稳定性或遗传学不稳定性。应用比较基因组杂交(CGH)技术对 50 例的 HCC 基因组图谱进行了分析,发现 DNA 缺失普遍存在于 4q(70%)、8p(65%)、17p(51%)、13q(37%)、6p(37%)和 1p(30%);而 DNA 扩增频繁

发生在 8q(60%)、1q(58%)、6p(30%)和 17q(30%),表明在 HCC 的发生发展过程中存在多种染色体的异常^[1]。以上表明 HCC 的发生是一种多染色体,多基因异常的结果。但具体涉及哪些基因以及他们在癌变过程中所起的作用尚有待进一步研究。

纺锤体检查点(spindle checkpoint, SCP)的功能是监测细胞染色体分离。检查点功能丧失的一个后果是遗传不稳定性,促使细胞更容易恶变。由此可见由于纺锤体检查点在有丝分裂中负责监督染色体排位和分离,它们的结构改变和组分丧失也可以引发一些癌症^[2]。有报道 SCP 另一个重要基因有丝

分裂阻滞缺陷蛋白 2 (MAD2) 在乳腺癌中蛋白表达是降低的^[3]。本研究探讨纺锤体检查点蛋白 Cenp-E 在肝癌组织的表达情况, 为肝癌的临床诊断提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 实验材料

收集 2012 年 1 月 ~ 2013 年 10 月南华大学附属第一医院和南华大学附属第二医院肝癌患者术中肝癌组织及癌旁正常肝组织 21 例。术前经患者及家属同意, 并通过南华大学伦理委员会批准。DNA 及质粒抽提试剂盒, 琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自上海华舜公司。Cenp-E 和 GAPDH 的兔一抗, 羊抗兔二抗购自 Santa-Cruz 公司。SYBR Green 染料荧光定量试剂购自 Takara 公司。RIPA 裂解液购自上海申能博彩。

1.2 标准质粒的构建

1.2.1 RNA 的提取和逆转录 将肝癌组织及癌旁正常组织按照试剂盒说明书操作作用 Trizol 试剂 (GIBICO 公司) 提取总 RNA。然后按照 Takara 公司逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA 保存备用。

1.2.2 PCR 反应及产物鉴定 引物序列由 Takara 公司设计并合成, Cenp-E 基因上游引物: 5'-GCTGTCTGCGATACTGTGAAC-3'; 下游引物: 5'-CAATCCTCCAAAATCAAGTG-3'。内参 GAPDH 上游引物: 5'-GCAGAGGGGGCAGAGATGA-3', 下游引物: 5'-ACTCCTCTGGCTTCTCTGGTT-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 15 s, 63 °C 15 s, 72 °C 15 s, 35 个循环; 最后 72 °C 退火延伸 10 min; PCR 产物 4 °C 保存。

1.2.3 T-A 克隆 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 按照华舜胶回收试剂盒说明书纯化 PCR 产物, 按照 Takara 操作说明书将其连接到 pMD18-T 质粒上, 转入 DH5a 感受态细菌中, 铺板挑阳性菌落做菌落 PCR, 初步鉴定为阳性者增菌提质粒送公司测序, 经 DNAssist Versuib 1.02 软件比对后制备纯化质粒用于定量 PCR 标准曲线的建立。

1.3 荧光定量 PCR

用 SYBR Green 染料荧光定量法 (Takara 公司的试剂) 检测 Cenp-E 基因的 mRNA 的水平, Cenp-E 基因与内参引物见前。用已稀释的标准质粒作为阳性标准品。扩增条件为: 95 °C 10 s 1 个循环; 95 °C

5 s, 63 °C 31 s 40 个循环。

1.4 Western blot 免疫印迹

1.4.1 蛋白质抽提和定量 (参照试剂说明), 步骤如下 (1) 每 100 mg 组织加入 400 μL RIPA 裂解液和 4 μL PMSF。放入匀浆器中于冰上研磨。

(2) 移至 1.5 mL Ep 管, 冰上放置 30 min 后, 4 °C 13 000 rpm 离心 30 min。

(3) 收集上清即为蛋白液, 分装为 50 μL 每管于 -20 °C 保存备用。

(4) 采用 BCA 法进行蛋白质定量测定。

1.4.2 Western blot 检测 Cenp-E 蛋白的表达 将肝癌组织, 提出的蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至 PVDF 膜。兔一抗的释度为 1:200; 羊抗兔二抗皆作 1:5 000 稀释; ECL 法显色。

1.5 统计学方法

使用 SPSS16.0 统计软件包处理数据, 结果以平均数 ± 标准差表示。组内比较用配对 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有显著性。

2.1 Cenp-E 基因 mRNA 水平分析

荧光定量 PCR 检测 Cenp-E 基因在各组的 mRNA 水平, 溶解曲线如图 1 所示, 以 Cenp-E 基因 mRNA 拷贝数/GAPDH 基因 mRNA 拷贝数的均值作为该样品中 Cenp-E 基因表达水平, 在正常肝组织中表达水平 ($0.023\ 78 \pm 0.009\ 73$) 高于肝癌组织 ($0.014\ 58 \pm 0.008\ 73$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 肝癌组织 Cenp-E 蛋白表达

Cenp-E 蛋白表达如图 2 所示, 可以发现 Cenp-E 与 GAPDH 的灰度值比值在正常肝组织中为 0.656 ± 0.012 , 在肝癌组织中为 0.301 ± 0.009 。 $P < 0.05$, 差异有统计学意义 ($n = 21$)。

3 讨 论

Cenp-E 主要定位于着丝粒的外层, 是一种重要着丝粒特异蛋白, 同时也是着丝粒点与微管有效连接的动力蛋白。越来越多的实验证明 Cenp-E 在 SCP 机制起着非常重要的作用, 现在研究表明, 一定量的 Cenp-E 水平, 对 SCP 的激活是起非常重要的作用^[4]。Cenp-E 主要通过 BubR1 来影响 SCP 机制, 当 Cenp-E 与 BubR1 作用时, 通过一系列的分子反应后, MAD2 开始从着丝粒脱落, 姐妹染色单体开

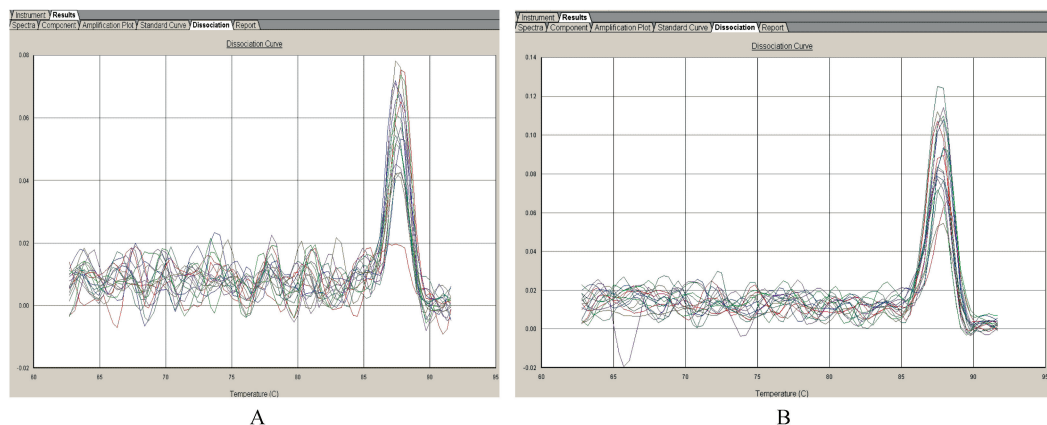


图 1 荧光定量 PCR 溶解曲线图 A: Cenp-E 基因的荧光定量 PCR 溶解曲线图; B: GAPDH 基因的荧光定量 PCR 溶解曲线图

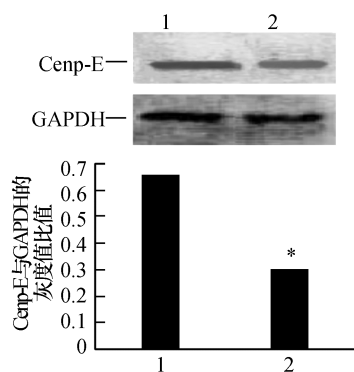


图 2 Cenp-E 蛋白表达。 1: 正常肝组织; 2: 肝癌组织。与正常肝组织相比, *: $P < 0.05$

始分离,从而导致细胞分裂开始^[5]。

另外研究发现在许多癌细胞有异常的 SCP 功能。MAD2 表达降低见于鼻咽癌、肝细胞癌、人乳腺癌及其一些乳腺癌细胞系和卵巢癌等,并与 SCP 缺陷切相关^[6]。Bubl 是 SCP 中另外一种较重要的癌基因,Bubl 的 mRNA 降低也见于结肠癌和急性粒细胞性白血病^[7],高水平 Bubl、BubR1 和 Bub3 表达也与胃癌细胞增殖能力密切相关^[8]。但 Cenp-E 与肿瘤之间的关系还不明确。

本研究发现 Cenp-E 在正常肝组织中表达明显高于肝癌组织,肝癌组织中 Cenp-E 蛋白表达的降低引起的纺锤体检查点监控功能下降,很可能是导致肝癌细胞有丝分裂失控并导致染色体数目紊乱的重要原因之一。我们推测肝癌组织 Cenp-E 表达水平的不足可能是引起纺锤体检查点的功能异常的重要原因之一,最终导致细胞分裂失控和染色体数目异常以及肿瘤细胞的发生。

由于组织标本包含细胞的复杂性和不纯性,本

研究只能大致从量上分析肝癌和正常组织 Cenp-E 的表达差异。进一步在肝癌细胞系和正常细胞系中研究 Cenp-E 的功能,将为进一步探明肝癌的发生机制奠定基础,也为肝癌临床早期预防及诊断治疗提供新的依据。

参考文献:

- [1] Taylor SS, Scott MI, Holland AJ, et al. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome Segregation [J]. Chromosome Res, 2004, 12 (6): 599-616.
- [2] Karess R. Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. Trends Cell Biol, 2005, 15 (7): 386-392.
- [3] Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, et al. The dynamic kinetochore-microtubule interface [J]. Cell Sci, 2004, 117 (23): 5461-5477.
- [4] Gardner MK. CENP-E hangs on at dynamic microtubule ends [J]. Nat Cell Biol, 2013 15 (9): 1030-1032.
- [5] Shrestha RL, Draviam VM. Lateral to end-on conversion of chromosome-microtubule attachment require kinesins CENP-E and MCAK [J]. Curr Biol, 2013, 23 (16): 1514-1526.
- [6] Waters JC, Chen RH, Murray, et al. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension [J]. Cell Biol, 1998, 141 (5): 1181-1191.
- [7] Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond [J]. Mol Cell, 2002, 9 (5): 931-943.
- [8] Kim Y, Holland AJ, Lan W, et al. Aurora kinase and protein phosphatase 1 Mediate chromosome congression through regulation of CENP-E [J]. Cell, 2010, 142 (3): 444-445.

(此文编辑:秦旭平)