

【基础研究】

通信作者: 千新来 (1966 -), 男, 河南武陟人, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 肿瘤分子病理及肿瘤生物治疗; E-mail: qxlssws@163.com。

入过程和转录反式激活等过程,在病毒感染中发挥重要作用^[6]。鉴于上述研究结果,推测 Agrin 可能与肿瘤(特别是病毒感染相关的肿瘤)的发生、发展有关。本研究拟通过 Western blot 和实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)等方法探讨 Agrin 在 HPV 阳性和阴性宫颈癌细胞中的表达,为深入研究 Agrin 基因在宫颈癌发生发展中的作用及相关机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养条件 人乳头瘤病毒 16(human papillomavirus type 16, HPV16)阳性的宫颈癌 Caski 细胞和 SiHa 细胞、HPV18 阳性的宫颈癌 HeLa 细胞、HPV 阴性的宫颈癌 C33-A 细胞购自中科院上海细胞库,培养于含体积分数 10% 胎牛血清、 $100\text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的高糖达尔伯克改良的伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM),于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 孵箱中常规培养。

1.2 试剂及仪器 高糖 DMEM 培养基为美国 Invitrogen 公司产品,兔抗人 Agrin 多克隆抗体、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、辣根酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠二抗为美国 Abcam 公司产品,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒为美国 Santa Cruz 公司产品,TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品,PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time)和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (TliRNaseH Plus)试剂盒购自大连 TaKaRa 公司,实时荧光定量 PCR 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,倒置显微镜(TE2000-U)购自日本 Nikon 公司,半干转膜仪(TE-70)购自美国 Amersham Biosciences 公司,实时荧光定量 PCR 仪(StepOne)购自美国 ABI 公司。

1.3 Western blot 检测不同宫颈癌细胞中 Agrin 蛋白水平 收集宫颈癌 Caski、SiHa、HeLa 和 C33-A 细胞,提取细胞总蛋白并定量,变性处理后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和转膜,质量分数 5% 脱脂牛奶封闭,室温放置 3 h,加一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加二抗室温温育 1 h,按照 ECL 试剂盒操作步骤进行自显影。以 β -actin 为内参照,蛋白上样量均为 $100\text{ }\mu\text{g}$,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、兔抗人 Agrin 多克隆抗体、辣根酶标记

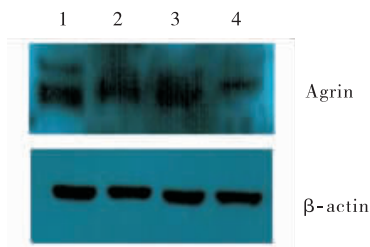
的山羊抗鼠和山羊抗兔二抗的稀释倍数分别为 1 : 500、1 : 200、1 : 5 000 和 1 : 5 000。通过 Bandscan 5.0 软件分析 Western blot 目的条带与内参照条带的灰度比值。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测不同宫颈癌细胞中 Agrin mRNA 水平 按照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA 并定量后,按照 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒说明书通过反转录反应合成 cDNA 第 1 条链,反应条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。通过实时荧光定量 PCR 方法检测不同宫颈癌细胞中 Agrin mRNA 的水平,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照。Agrin 上游和下游引物序列分别为 5'-TTGTCGAGTACCTCAACGCT-3' 和 5'-CAGGCTCAGT-TCAAAGTGGT-3', GAPDH 上游和下游引物序列分别为 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' 和 5'-AGG-GGCCATCCACAGTCTTC-3', Agrin 和 GAPDH 扩增片段长度分别为 71 bp 和 258 bp, qPCR 反应体系为: SYBR[®] Premix Ex TaqTM 12.5 μL 、去离子水 6 μL 、cDNA 0.5 μL 、上下游引物各 0.5 μL , 共 20 μL , 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

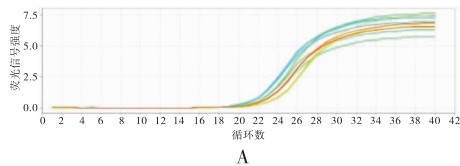
2 结果

2.1 不同宫颈癌细胞中 Agrin 蛋白的表达 结果见图 1。Western blot 结果显示,HPV 阴性的宫颈癌 C33-A 细胞、HPV16 阳性的宫颈癌 Caski 和 SiHa 细胞、HPV18 阳性的宫颈癌 HeLa 细胞中 Agrin 蛋白表达的灰度比值(Agrin/ β -actin)分别为 0.308 ± 0.016 、 1.843 ± 0.077 、 1.120 ± 0.013 和 1.774 ± 0.072 , 差异有统计学意义($F = 526.245$, $P < 0.01$); Caski、SiHa 和 HeLa 细胞中 Agrin 蛋白的表达均显著高于 C33-A 细胞($P < 0.01$); Caski 和 HeLa 细胞中 Agrin 蛋白的表达均显著高于 SiHa 细胞($P < 0.01$); Caski 和 HeLa 细胞中 Agrin 蛋白的表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$); Agrin 蛋白在 4 种宫颈癌细胞中表达的顺序为: C33-A 细胞 < SiHa 细胞 < Caski 细胞和 HeLa 细胞。



1: Caski 细胞; 2: SiHa 细胞; 3: HeLa 细胞; 4: C33-A 细胞。
图 1 Western blot 检测不同宫颈癌细胞中 Agrin 蛋白表达
Fig.1 Agrin protein expression in different cervical cancer cells by Western blot

2.2 不同宫颈癌细胞中 Agrin mRNA 的表达 实时荧光定量 PCR 结果显示, 扩增产物单一, 融解曲线未见杂峰, 无非特异性扩增(图 2)。HPV 阴性的



A: 扩增曲线; B: 溶解曲线。

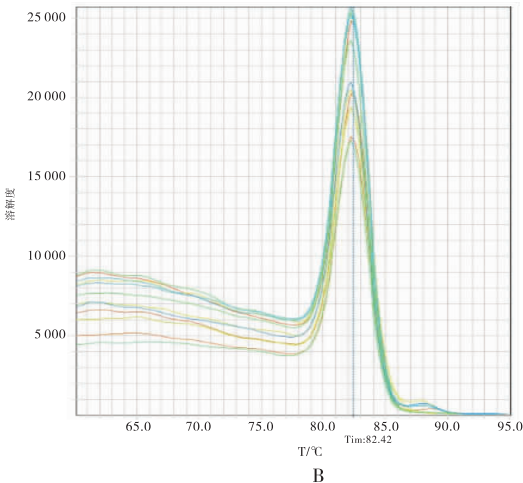
图 2 实时荧光定量 PCR 法检测不同宫颈癌细胞中 Agrin mRNA 的表达

Fig.2 Agrin mRNA expression in different cervical cancer cells by real-time fluorescence quantitative PCR assay

3 讨论

资料显示, 国内宫颈癌发病率由 1989 年至 1990 年的 3.06/10 万上升到 2007 年至 2008 年的 11.87/10 万, 病死率由 1989 年至 1990 年的 2.19/10 万上升到 2007 年至 2008 年的 3.20/10 万^[7], 发病率和病死率均呈上升趋势。Agrin 由 GODFREY 等^[8]在富含突触的电鳗电器官的 ECM 中分离获得, 其基因定位于人类染色体 1p36.33, 编码蛋白质的相对分子质量约为 220 000^[9]。Agrin 蛋白是存在于 ECM 中的一种肝素硫酸酯类蛋白聚糖, Agrin 可通过 N 末端的与 K 型蛋白酶抑制剂同源的序列区与层黏连蛋白结合^[9], C 端含有 3 个与层黏连蛋白-α 链的 G 区同源的序列和 4 个富含半胱氨酸残基的类表皮样生长因子(epidermal growth factor, EGF)重复序列区^[9], 前者参与 Agrin 与 α-肌营养不良蛋白聚糖的结合和细胞黏附, 后者可提供二硫键结合位点^[9]。研究显示, Agrin 以分泌或者膜结合形式存

宫颈癌 C33-A 细胞、HPV16 阳性的宫颈癌 Caski 和 SiHa 细胞、HPV18 阳性的宫颈癌 HeLa 细胞中 Agrin mRNA 表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值分别为 1.001 ± 0.049 、 2.409 ± 0.231 、 1.363 ± 0.249 和 2.270 ± 0.082 , 其差异有统计学意义 ($F = 45.318, P < 0.01$); Caski、SiHa 和 HeLa 细胞中 Agrin mRNA 的表达均显著高于 C33-A 细胞 ($P < 0.01$ 或 0.05); Caski 和 HeLa 细胞中 Agrin mRNA 的表达均显著高于 SiHa 细胞 ($P < 0.01$); Caski 和 HeLa 细胞中 Agrin mRNA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Agrin mRNA 在 4 种宫颈癌细胞中表达的顺序为: C33-A 细胞 < SiHa 细胞 < Caski 细胞和 HeLa 细胞。



在, 可参与正常神经肌肉接头形成过程中突触的构成^[10]、血脑脊液屏障的形成与维持^[11]等, 并由此可能与阿尔兹海默病、多发硬化、帕金森病和精神分裂症等神经系统疾病有关。另外, Agrin 还参与免疫突触的形成^[12]、足细胞肾小球基底膜在的附着等^[13]。关于 Agrin 与肿瘤的关系, 现有的研究结果显示, Agrin 在肝癌^[14]和口腔鳞癌^[15]中表达增加, 但在胶质母细胞瘤中表达降低^[16], RAJKUMAR 等^[17]通过基因表达谱芯片技术发现 Agrin 是正常宫颈上皮和宫颈癌组织间的一个差异表达基因, BERETOV 等^[18]通过蛋白组学分析发现 Agrin 是乳腺正常上皮和乳腺癌细胞间的一个差异表达蛋白。本研究中, Western blot 和实时荧光定量 PCR 结果均显示: 与 HPV 阴性的宫颈癌 C33-A 细胞比较, HPV16 阳性的宫颈癌 Caski 和 SiHa 细胞、HPV18 阳性的宫颈癌 HeLa 细胞中的 Agrin 蛋白和 mRNA 的表达均显著增加, Agrin 蛋白和 mRNA 在 4 种宫颈癌细胞中表达的顺序为: C33-A 细胞 < SiHa 细胞 < Caski 细胞和 HeLa 细胞。

提示 HPV 阳性的宫颈癌细胞中 Agrin 基因的表达显著高于 HPV 阴性的宫颈癌,Agrin 可能是 HPV 直接或间接调控的一个靶基因,详细的相互作用机制有待进一步研究。另外,通过本研究获得了 Agrin 高表达和低表达的宫颈癌细胞系,为深入研究 Agrin 基因与宫颈癌的关系及相关机制奠定了基础。

参考文献:

[1] FERLAY J,SOERJOMATARAM I,DIKSHIT R,et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*,2015,136(5):359-386.

[2] MATHEVET P,JACOT-GUILLARMOD M. Current developments in uterine cervical carcinoma prevention and screening[J]. *Rev Med Suisse*,2015,11(492):1999-2003.

[3] 尹宝靛,潘莹. 人乳头瘤病毒感染与宫颈癌[J]. 新乡医学院学报,2014,31(12):1055-1056.

[4] BALACESCU O,BALACESCU L,TUDORAN O,et al. Gene expression profiling reveals activation of the FA/BRCA pathway in advanced squamous cervical cancer with intrinsic resistance and therapy failure[J]. *BMC Cancer*,2014,14:246-259.

[5] NEILL T,SCHAEFER L,IOZZO R V. Decoding the Matrix: Instructive Roles of Proteoglycan Receptors[J]. *Biochemistry*,2015,54(30):4583-4598.

[6] 章漳,王硕,邱宏,等. 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与病毒感染[J]. 中国医疗前沿,2009,4(3):1-3.

[7] 胡尚英,郑荣寿,赵方辉,等. 1989 至 2008 年中国女性子宫颈癌发病和死亡趋势分析[J]. 中国医学科学院学报,2014,36(2):119-125.

[8] GODFREY E W,NITKIN R M,WALLACE B G,et al. Components of Torpedo electric organ and muscle that cause aggregation of acetylcholine receptors on cultured muscle cells[J]. *J Cell Biol*,1984,99(2):615-627.

[9] RUEGG M A,TSIM K W,HORTON S E,et al. The agrin gene

codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution[J]. *Neuron*,1992,8(4):691-699.

[10] ZHANG B G,QUIGLEY A F,BOURKE J L,et al. Combination of agrin and laminin increase acetylcholine receptor clustering and enhance functional neuromuscular junction formation *in vitro*[J]. *Dev Neurobiol*,1981,78(1/2/3/4):101-107.

[11] ALMUTAIRI M M,GONG C,XU Y G,et al. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier[J]. *Cell Mol Life Sci*,2016,73(1):57-77.

[12] KHAN A A,BOSE C,YAM L S,et al. Physiological regulation of the immunological synapse by agrin[J]. *Science*,2001,292(5522):1681-1686.

[13] GROFFEN A J,VEERKAMP J H,MONNENS L A,et al. Recent insights into the structure and functions of heparin sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane[J]. *Nephrol Dial Transplant*,1999,14(9):2119-2129.

[14] CHAKRABORTY S,LAKSHMANAN M,SWA H L,et al. An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*,2015,6:6184.

[15] KAWAHARA R,GRANATO D C,CARNIELLI C M,et al. Agrin and perlecan mediate tumorigenic processes in oral squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*,2014,9(12):e115004.

[16] NOELL S,WOLBURG-BUCHHOLZ K,MACK A F,et al. Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma[J]. *Cell Tissue Res*,2012,347(2):429-441.

[17] RAJKUMAR T,SABITHA K,VIJAYALAKSHMI N,et al. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis[J]. *BMC Cancer*,2011,11:80-93.

[18] BERETOV J,WASINGER V C,MILLAR E K,et al. Proteomic analysis of urine to identify breast cancer biomarker candidates using a label-free LC-MS/MS approach[J]. *PLoS One*,2015,10(11):e0141876.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)

(上接第 364 页)

[10] WITKO-SARSAT V,GAUSSON V,NGUYEN A T,et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients[J]. *Kidney Int*,2003,64(1):82-91.

[11] SMALL D M,COOMBES J S,BENNETT N,et al. Oxidative stress,anti-oxidant therapies and chronic kidney disease[J]. *Nephrology(Carlton)*,2012,17(4):311-321.

[12] RENKE M,TYLICKI L,KNAP N,et al. High-dose angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress in patients with chronic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*,2009,24(2):689-690.

[13] SWAMINATHAN S,SHAH S V. Novel approaches targeted toward oxidative stress for the treatment of chronic kidney disease[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*,2008,17(2):143-148.

[14] 王超云,傅风华,田京伟,等. 黄芩苷对化学性肝损伤的保护作用[J]. 中草药,2005,36(5):730-732.

[15] 谢红东,杨珂,穆焕德,等. 黄芩提取物对大鼠肾间质纤维化的作用及其抗氧化机制[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(3):240-242.

[16] 赵曙光,李慧艳,赵保民,等. 黄芩甙对重症急性胰腺炎大鼠胰腺氧化应激的保护作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2009,18(9):863-865.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)