

双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 在宫颈病变组织和癌细胞中的表达

余莎莎,周海燕

(新疆博州人民医院,新疆 博尔塔拉 833400)

摘要:目的 探讨双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1b(DYRK1b)在宫颈病变组织和癌细胞中的表达情况及其作用。方法 选取宫颈癌患者 127 例为研究组,同期确诊为慢性宫颈炎患者 32 例为对照组,收集上述患者石蜡组织标本,免疫组化 SP 法检测 DYRK1b 蛋白表达情况。依据宫颈癌细胞系 HeLa 229 和 SiHa 细胞将标本分为实验组(加 DYRK1b 抑制剂 Az191)、对照组(不加 Az191),Western blot 法检测细胞中 DYRK1 蛋白表达情况,MTT 法检测细胞增殖情况,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果 子宫颈癌阳性表达率明显高于慢性宫颈炎、低级别鳞状上皮内病变、高级别鳞状上皮内病变,差异均具有统计学意义($P<0.01$);高级别鳞状上皮内病变明显高于慢性宫颈炎、低级别鳞状上皮内病变,差异具有统计学意义($P<0.05$)。在 HeLa 229 和 SiHa 细胞中,DYRK1b 蛋白表达量随 Az191 剂量增加而减少,且均明显低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。研究组 HeLa 229 和 SiHa 细胞抑制率随 Az191 浓度增加而提升,均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Az191 作用后,研究组 HeLa 229 和 SiHa 细胞凋亡率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 宫颈病变过程中 DYRK1b 蛋白表达水平逐渐提升,宫颈癌组织和细胞中均呈高表达;下调 DYRK1b 蛋白表达后可抑制宫颈癌细胞增殖,促进凋亡。

关键词:DYRK1b;宫颈癌;细胞凋亡

中图分类号:R737.33

文献标志码:A

【引用格式】余莎莎,周海燕. 双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶在宫颈病变组织和癌细胞中的表达[J]. 北华大学学报(自然科学版),2017,18(2):186-189.

Expression of Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase in Cervical Lesions and Cancer Cells

Yu Shasha,Zhou Haiyan

(People's Hospital of Xinjiang Bozhou,Bortala 833400,China)

Abstract: Objective To investigate the expression and its effects of dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1b (DYRK1b) in cervical lesions and cancer cells. **Method** 127 cervical cancer patients including 38 cases of cervical squamous cell carcinoma,68 cases of low-grade squamous intraepithelial lesions, and 21 cases of high grade squamous intraepithelial lesions;32 cases of patients diagnosed with chronic cervicitis were selected as the controls;the patients' paraffin-embedded tissue samples were prepared and DYRK1b protein expressions in the samples were detected by immunohistochemical SP method. Cervical cancer cell line HeLa 229 and SiHa cells were divided into experimental group (incubated with DYRK1b inhibitor Az191) and control

收稿日期:2016-10-16

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2014211A073)。

作者简介:余莎莎(1980-),女,主治医师,主要从事宫颈癌治疗学研究,E-mail:yshasha@sunmail.cn.

group (incubated without Az191); the expression of DYRK1 protein was detected by Western blot, the cell proliferation by MTT, and the cell apoptosis by flow cytometry. **Results** The positive expression rate of cervical squamous cell carcinoma was significantly higher than that of chronic cervicitis, low grade squamous intraepithelial lesion and high grade squamous intraepithelial lesions, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$); that in high grade squamous intraepithelial lesion was significantly higher than that in chronic cervicitis and low grade squamous intraepithelial lesions, with statistically significant differences ($P < 0.05$). DYRK1b protein expressions in HeLa 229 and SiHa cells decreased with the increase of Az191 dosage, and were significantly lower than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The inhibition rate of HeLa 229 and SiHa in the study group increased with the increase of Az191 concentration, which was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). After the treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ Az191, the apoptosis rate of HeLa 229, SiHa cell in the study group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$).

Conclusion The expression level of DYRK1b protein in the process of cervical lesions was gradually increased, and the cervical cancer tissues and cells showed a high expression of DYRK1b protein. Down-regulating the expression of DYRK1b may inhibit the proliferation of cervical cancer cells and promote the apoptosis of them.

Key words: DYRK1b; cervical cancer; apoptosis

宫颈癌发生率在女性生殖器官肿瘤中占首位,根治术和放疗是目前主要治疗方案,但治疗带来的不良反应会严重影响患者生命质量^[1],因此,在分子水平上探索宫颈癌治疗靶点具有重要意义.研究发现:双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1b (DYRK1b) 在人体多数正常组织中表达不明显,但在结肠癌、肺癌、胰腺癌等恶性组织中呈高表达^[2]. 相关研究显示: DYRK1b 在结肠癌细胞中呈高表达,下调其表达后可诱导癌细胞凋亡^[3]; 但其在宫颈癌发生、发展过程中的作用及作用机制仍未阐明. 本次研究通过检测 DYRK1b 在不同病变程度宫颈组织和宫颈癌细胞中的表达情况,探讨其在宫颈癌发生、发展中的作用机制.

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 6 月—2016 年 6 月在新疆博州人民医院确诊为宫颈癌的患者 127 例为研究组,超声检查均显示宫颈增厚且表面不平整,宫颈管内可见乳头样或斑块样强回声,阴道回声不均匀; 进一步行病理检查证实为子宫颈鳞癌 68 例,低级别鳞状上皮内病变 21 例,高级别鳞状上皮内病变 38 例. 选取同期经病理检查诊断为慢性宫颈炎患者 32 例为对照组,收集上述患者的石蜡组织标本进行免疫组化检测.

1.2 材料与试剂

人宫颈癌细胞系人宫颈癌细胞系 HeLa 229 (为宫颈腺癌细胞系)、SiHa (宫颈鳞癌细胞系,上海安妍生物有限公司); DYRK1b 单抗、DYRK1b 抑

制剂(上海江莱生物科技有限公司); Max Vision 检测试剂、DAB 显色试剂盒, 细胞凋亡检测试剂盒.

1.3 方 法

1.3.1 免疫组化检测

将石蜡标本 4 μm 连续切片,常规脱蜡至水,抗原修复,室温,3% H_2O_2 孵育 20 min,磷酸缓冲液冲洗后滴加 DYRK1b 单抗,室温下孵育 60 min,滴加 Max Vision 检测试剂,室温下放置 30 min, DAB 显示,蒸馏水冲洗,二甲苯透明,封片固定. 光学显微镜下观察,黄色、棕黄色、褐色为 DYRK1b 蛋白阳性细胞. 根据阳性细胞比例和染色强度进行评分,标准为: 阳性细胞比例 $< 5\%$ 0 分, $5\% \sim 24\%$ 1 分, $25\% \sim 75\%$ 2 分, $> 75\%$ 3 分; 无染色 0 分, 黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 褐色 3 分. 总评分为阳性细胞比例与染色强度的乘积, DYRK1b 蛋白阴性表达为 0 分, 弱阳性表达为 1 ~ 3 分, 阳性表达为 4 ~ 6 分, 强阳性表达为 1 ~ 9 分.

1.3.2 Western blot 检测

取对数期 HeLa 229 和 SiHa 细胞,配置成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液, CO_2 孵箱中培养 24 h, 研究组分别加入 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DYRK1b 抑制剂 (Az191), 对照组不加 Az191, 继续培养 24 h, 提取总蛋白, 测定浓度. 每份样本取 80 μg , 高温变性, SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜, 封闭 48 min 后滴加 DYRK1b 单抗 (1 : 500), 4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜. TBST 洗膜, 滴加二抗 (1 : 3 000), 室温放置 60 min, 洗膜后检测条带表达强度.

1.3.3 Az191 作用后宫颈细胞增殖和凋亡情况检测

MTT 法检测细胞增殖情况:取对数期 HeLa 229 和 SiHa 细胞, 6×10^5 个/mL 浓度接种到 96 孔板, CO_2 孵箱中培养 24 h. 研究组加不同浓度的 Az191, 对照组不加 Az191, 培养 48 h, 终止培养前 4 h 加 5 mg/mL 的 MTT 10 μL , 吸去细胞培养液, 加二甲基亚砜 150 μL /孔, 450 nm 处读取吸光度值, 计算抑制率.

流式细胞术检测细胞凋亡情况:取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化后 2×10^5 个/mL 浓度接种到培养皿, 孵育 24 h. 研究组分别加入 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Az191, 对照组不加 Az191, 培养 48 h, 胰蛋白酶消化后收集细胞, 分别以 $(1\sim 5)\times 10^5$ 浓度重悬在 400 μL 的反应液中, 加双染色剂后暗室放置 20 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况.

1.4 统计学分析

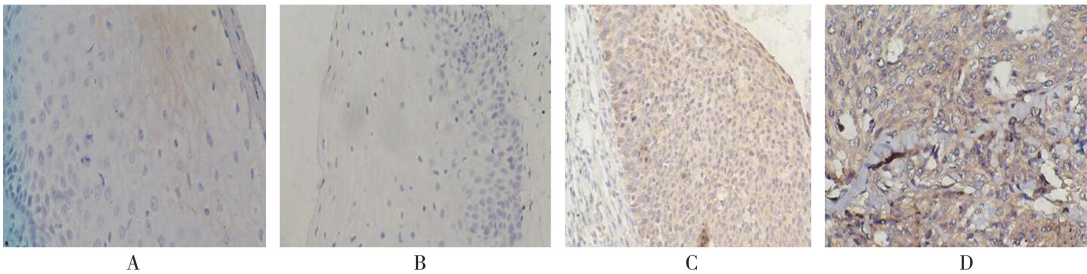
应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 计量资

料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 进行 t 检验, 计数资料进行 χ^2 检验, 以双侧 $\alpha=0.05$ 为校验水准.

2 结 果

2.1 不同宫颈病变组织中 DYRK1b 蛋白表达情况

在慢性宫颈炎、低级别鳞状上皮内病变、高级别鳞状上皮内病变、子宫颈鳞癌组织中, DYRK1b 蛋白多表达在细胞质中, 表达强度依次增加. 见图 1. DYRK1b 蛋白表达阳性率依次为: 12. 50% (4/32), 9. 52% (2/21), 42. 10% (16/38), 75. 00% (51/68), 子宫颈鳞癌阳性表达率明显高于慢性宫颈炎、低级别鳞状上皮内病变、高级别鳞状上皮内病变, 差异均具有显著统计学意义 ($P<0.01$). 高级别鳞状上皮内病变明显高于慢性宫颈炎、低级别鳞状上皮内病变, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$). 慢性宫颈炎与低级别鳞状上皮内病变之间差异无统计学意义 ($P>0.05$).



A:慢性宫颈炎组织;B:低级别鳞状上皮内病变组织;C:高级别鳞状上皮内病变组织;D:子宫颈鳞癌组织

图 1 免疫组化法检测宫颈病变组织中 DYRK1b 蛋白表达 ($\times 400$)

Fig.1 Expression of DYRK1b in cervical lesions detected by immunohistochemical method ($\times 400$)

2.2 Az191 作用后不同宫颈癌细胞中 DYRK1b 蛋白表达情况

对照组和 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ Az191 作用的研究组 HeLa 229 细胞中 DYRK1b 蛋白表达量分别为 12.06 ± 2.18 , 6.33 ± 1.42 , 3.95 ± 1.87 , 在 SiHa 细胞中表达量分别为 9.22 ± 1.08 , 4.93 ± 0.82 , 2.07 ± 0.34 ; 在 HeLa 229 和 SiHa 细胞中 DYRK1b 蛋白表达量随 Az191 剂量增加而减少, 且均明显低于对照组, 差异具有显著统计学意义 ($P<0.01$). 见图 2~3.

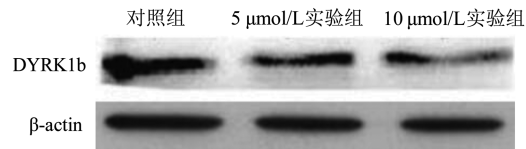


图 2 Az191 作用后 HeLa 229 细胞中 DYRK1b 蛋白的表达

Fig.2 Expression of DYRK1b protein in HeLa 229 cells after Az191

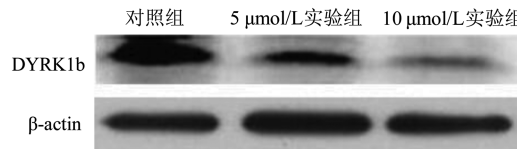


图 3 Az191 作用后 SiHa 细胞中 DYRK1b 蛋白的表达

Fig.3 Expression of DYRK1b protein in SiHa cells after Az191

2.3 Az191 作用后不同宫颈癌细胞增殖情况

分别用 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Az191 作用 24 h 后, HeLa 229 细胞抑制率分别为 $(4.61\pm 0.85)\%$, $(16.50\pm 8.36)\%$, $(36.91\pm 5.52)\%$, $(84.39\pm 3.13)\%$, $(89.17\pm 0.63)\%$, $(89.52\pm 1.27)\%$; SiHa 细胞抑制率分别为 $(24.35\pm 6.71)\%$, $(29.73\pm 5.50)\%$, $(44.28\pm 1.06)\%$, $(74.23\pm 2.94)\%$, $(81.63\pm 5.38)\%$, $(81.89\pm 2.81)\%$; 对照组 HeLa 229 和 SiHa 细胞抑制均为 $(0.00\pm 0.00)\%$. 研究组 HeLa 229 和 SiHa 细胞抑

制率随 Az191 浓度增加而提升均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$).

2.4 Az191 作用后不同宫颈癌细胞凋亡情况

5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Az191 作用后研究组 HeLa 229, SiHa 细胞凋亡率为 $(13.15\pm1.25)\%$, $(4.03\pm1.71)\%$,与对照组中 $(10.21\pm1.06)\%$, $(2.39\pm1.34)\%$ 之间差异均无统计学意义($P>0.05$). 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Az191 作用后研究组 HeLa229 和 SiHa 细胞凋亡率为 $(18.24\pm2.95)\%$, $(9.37\pm3.02)\%$,均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$).

3 讨 论

DYRK1b 位于人类染色体 19q 12 ~ 13.11 上,已在多个肿瘤组织中发现 DYRK1b 蛋白高表达,但其在癌细胞中并非突变基因^[4-5]. 本次研究中 DYRK1b 在不同宫颈病变组织中多表达于细胞质,高级别鳞状上皮内病变组织和子宫颈鳞癌组织中表达水平较高,在低级别鳞状上皮内病变、慢性宫颈炎组织中表达不明显,说明 DYRK1b 表达水平与宫颈癌进展相关.

细胞中基因存在缺陷是癌细胞异常增殖的原因之一,干扰癌细胞周期、降低其存活力是抗癌治疗的主要思路,也是众多化疗药物的作用机制^[6]. CDK 抑制因子在正常细胞中发挥抑制增殖的作用,当 CDK 抑制因子低表达时,细胞周期蛋白 D 水平会增加,导致跳过 G0 期,细胞异常增殖^[7-8]. 亦有研究发现:敲除 DYRK1b 蛋白后可促进非小细胞肺癌细胞凋亡,主要与 BCL2 家族 BAK 蛋白水平提升和 Stat3 磷酸化活性下降有关^[9-10]. 本次研究显示:使用 DYRK1b 抑制剂(Az191)下调 HeLa 229 和 SiHa 细胞中 DYRK1b 蛋白表达水平后,研究组细胞增殖率随 Az191 浓度增加而提升,明显高于对照组. DYRK1b 在宫颈癌两种细胞中均存在不同表达,但 Az191 对两种细胞增殖抑制作用和促凋亡作用之间均无明显差异,说明 Az191 对不同病理类型的宫颈癌细胞增殖均有明显抑制作用,并可诱导癌细胞凋亡,但该作用的具体分子机制仍需深入研究.

综上所述,DYRK1b 蛋白在宫颈癌组织和细胞中均存在高表达,且在宫颈局部炎症向宫颈癌转变过程中 DYRK1b 蛋白阳性表达比例逐渐增加;DYRK1b 抑制剂(Az191)下调宫颈癌细胞中 DYRK1b 表达后,明显抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,说明 DYRK1b 参与宫颈癌病情进展,可作为宫颈癌治疗的一个靶基因.

参考文献:

- [1] 周雯娟. 宫颈癌治疗后患者生活质量与性生活状况的研究[D]. 长沙:中南大学,2012. DOI:10.7666/d.y2197031.
- [2] 王鸾鸾. 双底物特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1A 与肌细胞增强因子 2D 相互作用的研究[D]. 济南:山东大学,2012.
- [3] Gao J, Zheng Z, Rawal B, *et al.* Mirk/Dyrk1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Biology & Amp Therapy*, 2009,8(17):1671-1679.
- [4] 裴燕. Dyrk1B、IKK ϵ 、Laminin γ 1 在上皮性卵巢癌中的表达及意义[D]. 大连:大连医科大学,2014.
- [5] Balleyguier C, Fournet C, BenHassen W, *et al.* Management of cervical cancer detected during pregnancy: Role of magnetic resonance imaging[J]. *Clinical Imaging*, 2013,37(1):70-76.
- [6] Nattika Saengkrit, Somsak Saesoo, Wanwisa Srinuanchai, *et al.* Influence of curcumin-loaded cationic liposome on anticancer activity for cervical cancer therapy[J]. *Colloids and Surfaces, B Biointerfaces*, 2014,114:349-356.
- [7] 孙雯. DYRK1B 在子宫内膜癌组织和细胞中的表达及意义[D]. 大连:大连医科大学,2015.
- [8] 陈婧盈. Dyrk1B 在卵巢癌组织和细胞中的表达及意义[D]. 大连:大连医科大学,2015.
- [9] Lertworapreecha, Monthon, Patumraj, *et al.* Cytotoxic function of gamma delta (γ/δ) T cells against pamidronate-treated cervical cancer cells[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2013,51(8):597-605.
- [10] Ye NLi J. Serum protein profiling of cervical cancer patients using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Letters*, 2013,46(1/3):250-257.

【责任编辑:陈丽华】