

· 临床研究 ·

LRP16 基因在子宫内膜癌组织中的表达及其对细胞增殖的作用*

张宇骄, 刘 玲, 汪春燕, 詹 平, 伍宗惠, 何 雯, 王定玉[△]

(泸州医学院附属医院妇产科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 研究 LRP16 在子宫内膜癌组织中的表达变化及其对子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞增殖的影响。方法 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 26 例正常子宫内膜组织及 10 例子宫内膜癌组织中 LRP16 mRNA 的表达;LRP16 转染细胞, RT-PCR 证实转染的成功性, WST-1 法观察细胞增殖的变化。结果 子宫内膜癌组织中 LRP16 mRNA 的阳性表达率及表达水平(分别为 83.33%、 0.82 ± 0.21)明显高于正常子宫内膜组织(分别为 30.00%、 0.47 ± 0.18),二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。RT-PCR 检测结果显示转染后细胞 LRP16 mRNA 表达明显增加。转染组 HEC-1-B 细胞在体外能继续增殖,但增殖能力并没有增强。结论 LRP16 的异常表达可能与子宫内膜癌的发生、发展密切相关,LRP16 基因用于子宫内膜癌基因治疗可能具有潜在价值。

关键词:子宫内膜肿瘤;LRP16 基因;HEC-1-B 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.25.012

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)25-2983-03

Expression of LRP16 in human endometrial carcinoma tissues and its role on cell proliferation*

Zhang Yujiao, Liu Ling, Wang Chunyan, Zhan Ping, Wu Zonghui, He Wen, Wang Dingyu[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression change of LRP16 in endometrial cancer tissues and its influence on the proliferation of human endometrial carcinoma HEC-1-B cells. **Methods** HEC-1-B cells were transfected with LRP16. RT-PCR was used to examine the expression of LRP16 in 26 normal endometrium specimens, 10 endometrial cancer specimens. RT-PCR was used for verifying the transfection success. WES-T was used to observe the proliferation change of HEC-1-B cells. **Results** The positive expression rate and level of LRP16 mRNA in the endometrial cancer tissues were 83.33% and 0.82 ± 0.21 , which were significantly higher than 30.00%, 0.47 ± 0.18 in the normal endometrium tissues ($P < 0.05$). The RT-PCR detection results revealed that the expression of LRP16 mRNA after transfection was significantly increased. HEC-1-B cells in the transfection group could continued to proliferate in vitro, but the proliferation capacity was not increased. **Conclusion** The expression abnormality of LRP16 may be closely related to the occurrence and progress of endometrial cancer, LRP16 gene may have potential value for the endometrial cancer gene therapy.

Key words: endometrial carcinoma; LRP16 gene; HEC-1-B cells

子宫内膜癌为女性生殖系统常见三大恶性肿瘤之一,占女性生殖道恶性肿瘤的 20%~30%。子宫内膜癌早期诊断和治疗预后较好,但一旦转移或复发,5 年生存率降低 70%。不典型增生使癌变的风险较高,但单纯性增生和复杂性增生发生癌变的风险低,子宫内膜癌可能存在误诊或治疗过度的倾向^[1],因此寻找新的预测风险的肿瘤标记物是诊治研究的重点。LRP16 基因在雌激素相关肿瘤中表达升高,其异常表达与肿瘤的发生和发展有着密切的联系。本研究应用 WST-1 法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术等来探讨子宫内膜癌组织和子宫内膜癌细胞株 HEC-1-B 细胞中 LRP16 表达的变化及其在细胞增殖中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 收集 2008 年 10 月至 2010 年 3 月在本科室进行手术治疗的子宫内膜癌患者的组织标本 26 例。26 例内膜癌组织病理诊断为高分化腺癌 10 例,中分化腺癌 10 例,低分化腺癌 6 例,其中雌激素受体(ER)阳性患者 19 例,ER 阴性患者 7 例;根据 2009 FIGO 子宫内膜癌手术病理分期 I 期 19 例,II

期 3 例,III 期 3 例,IV 期 1 例。另取同期良性疾病(子宫肌瘤或子宫腺肌瘤)手术患者的正常子宫内膜组织标本 10 例作为对照,患者平均年龄为 51 岁。所有患者术前均未接受放、化疗。

1.2 试剂 实验所用 LRP16 真核表达载体 EX-Y2069-M29、空质粒 EX-NEG-M29 由本实验组构建。人子宫内膜癌细胞株 HEC-1-B 购自上海中科院细胞库。RNA 提取试剂盒及 RT-PCR 试剂盒为 Invitrogen 公司产品,PCR 引物由上海生物工程公司合成,WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒为碧云天公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 LRP16 mRNA 表达的检测 采用 Invitrogen 公司的 Trizol 反应试剂盒提取正常子宫内膜组织及子宫内膜癌组织总的 RNA,逆转录合成 cDNA,以 LRP16 和 β -action(作为内参照)引物进行 PCR 反应,最后进行 PCR 产物的定性检测。

1.3.2 细胞培养、基因转染和转染克隆的筛选 HEC-1-B 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基在 5% CO₂ 培养箱中培养。实验分为空白对照组、EX-Y2069-M29 组、EX-

* 基金项目:四川省泸州医学院课题资助项目(07055)。 作者简介:张宇骄(1975~),主治医师,硕士,主要从事妇科肿瘤方面的研究。

[△] 通讯作者, Tel: (0830)3165601; E-mail: 190095754@qq.com。

NEG-M29 组。第 1 组中加入无质粒的脂质体稀释液,第 2 组中加入 70 μL EX-Y2069-M29-Opti-Lipofecter 复合物,第 3 组中加入 70 μL EX-NEG-M29-Opti-Lipofecter 复合物,轻轻混匀,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的孵箱培养,5 h 后换成无双抗新鲜培养基。转染 48 h 后,3 组细胞同时加入浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418 选择培养液进行筛选,每 3 天换液 1 次,筛选抗 G418 克隆,挑选阳性克隆并扩大培养。快速脂质体转染:将 HEC-1-B 细胞接种于 24 孔板,在转染 48 h 后用 RT-PCR 法检测 LRP16 基因的表达。

1.3.3 转染克隆的鉴定 收集各实验组细胞,提取细胞总 RNA,采用 RT-PCR 法检测 HEC-1-B 细胞 LRP16 基因的表达。

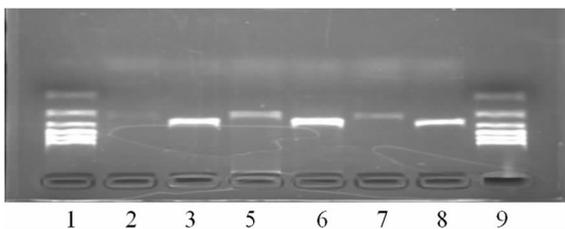
1.3.4 细胞生长曲线的绘制 收获对数生长期的稳定转染细胞及未转染 HEC-1-B 细胞,每孔 2×10^4 个细胞接种于 6 孔板中,次日开始每天计数各组的细胞数量,连续计数 7 d,绘制生长曲线。

1.3.5 WST-1 检测细胞增殖 收集对数生长期的未转染和转染 HEC-1-B 细胞,每孔 6×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板,待细胞融合率达到 70%~80% 时,用脂质体转染,实验设 3 组即:重组质粒转染组、空载体转染组和未转染组 HEC-1-B 细胞,每组 5 个复孔。向每孔中各加入 10 μL 5 mg/mL WST-1 液,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度下孵育 5 h,分别在第 24、48、72 小时用酶标仪测定 450 nm 波长时每孔的光密度(OD)值,实验重复 2 次,记录实验结果。

2 结 果

2.1 LRP16 mRNA 在子宫内癌、正常子宫内组织中的表达 26 例子宫内癌组织中有 21 例 LRP16 mRNA 阳性(83.33%),LRP16 mRNA 的平均表达水平为 0.82 ± 0.21 ;10 例子宫内癌组织中有 3 例 LRP16 mRNA 阳性(30.00%),LRP16 mRNA 的平均表达水平为 0.47 ± 0.18 ;LRP16 mRNA 的阳性表达率及表达水平分别比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 基因转染及转染克隆的筛选与鉴定 HEC-1-B 细胞在 G418 筛选培养基选择培养 1 个月后,未转染的 HEC-1-B 细胞全部死亡。维持选择培养 2 周时,实验组和空载体组分别获得抗 G418 克隆,大量扩增抗性细胞,并传代培养,分别命名为 EX-Y2069-M29(转染 LRP16 cDNA)和 EX-NEG-M29(转染空载体)。RT-PCR 法检测显示,未转染组及 EX-NEG-M29 组和 EX-Y2069-M29 组的 HEC-1-B 细胞均有 LRP16 基因表达,未转染组和 EX-NEG-M29 组的表达量分别为 $0.123 1 \pm 0.036 6$ 、 $0.148 6 \pm 0.028 7$,二者差异无统计学意义($P > 0.05$);EX-Y2069-M29 组表达量为 $0.506 0 \pm 0.019 8$,未转染组、EX-NEG-M29 组、EX-Y2069-M29 组三者差异有统计学意义($P < 0.05$),EX-Y2069-M29 组表达明显增高,见图 1。



1、9: 标记物;3、6、8: 内参;2: 未转染组;5: EX-Y2069-M29 组;7: EX-NEG-M29 组。

图 1 RT-PCR 产物凝胶电泳

2.3 LRP16 对 HEC-1-B 细胞增殖的影响 转染组细胞增殖速度明显低于非转染组,转染组细胞的生长速率低于对照组未转染 HEC-1-B 细胞;自转染的 24 h 起,转染细胞的生长明显低于未转染组细胞,增殖明显减慢(图 2)。WST-1 法检测结果显示 LRP16 转染组较阴性对照组、空载体转染组任意一组间 HEC-1-B 细胞 OD 值低($P < 0.05$);阴性对照组和空载体转染组 OD 值差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

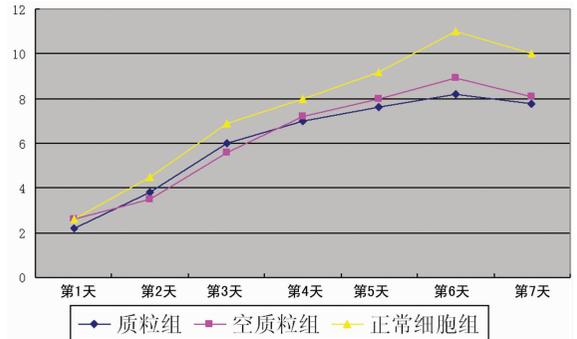


图 2 HEC-1-B 细胞的生长曲线

表 1 各组细胞质粒转染后的 OD(A450)值($\bar{x} \pm s$)

时间	阴性对照组	空质粒组	LRP16 组
24 h	$0.349 3 \pm 0.019 9$	$0.339 0 \pm 0.015 9$	$0.349 3 \pm 0.013 9$
48 h	$0.590 0 \pm 0.029 6$	$0.586 0 \pm 0.011 1$	$0.425 7 \pm 0.021 4$
72 h	$0.806 0 \pm 0.045 6$	$0.840 3 \pm 0.022 7$	$0.575 0 \pm 0.019 0$
96 h	$0.971 3 \pm 0.025 0$	$0.957 3 \pm 0.022 4$	$0.636 7 \pm 0.011 1$

3 讨 论

在既往对细胞系的研究中发现人体各种组织细胞内均有不同程度的 LRP16 表达,该基因在人类多种肿瘤细胞如乳腺癌等中的表达量明显高于其正常对应组织,尤其是在雌激素依赖性的肿瘤中表达量增高更明显,而在已公认的与雌激素无关的肿瘤中和雌激素受体阴性的肿瘤中,LRP16 基因的表达低,LRP16 的异常表达与肿瘤的发生、发展有着密切的联系^[2-3]。研究表明,LRP16 是雌激素反应性识别靶基因,雌激素诱导 LRP16 的表达上调,具体调控途径由 ER α 介导^[4]。在细胞系的研究中发现,ER α 阳性乳腺癌细胞和子宫内癌细胞中 LRP16 的表达水平依赖于雌激素活性;过表达的 LRP16 通过增强雌激素激活 ER α 功能从而促进人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖,抑制 LRP16 基因的表达通过上调 ER α 介导的 E-cadherin 表达从而抑制雌激素反应性乳腺癌和子宫内癌细胞的侵袭能力^[5-6]。Han 等^[5]观察到乳腺癌 MCF-7 细胞 LRP16 表达下调后,雌激素并没有促进细胞的生长,下调 LRP16 破坏了雌激素刺激细胞生长的作用。此外,LRP16 mRNA 的表达水平与乳腺癌的病理分级呈正相关^[7]。由此表明,LRP16 在致癌过程中起着重要的作用,通过激活 ER α 调控激素依赖性肿瘤的进展。大量研究表明,ER α 与雌激素依赖性肿瘤的治疗及预后判断密切相关,LRP16 与 ER α 之间存在表达调控与反馈激活的作用,所以检测肿瘤中 LRP16 的表达水平具备了反映 ER α 信号活性的良好特征,鉴于 LRP16 蛋白的功能特征,检测雌激素相关肿瘤中 LRP16 的表达应优于检测肿瘤中 ER α 本身的含量及其目前临床上使用的任何一个靶蛋白的水平。作为激素相关的恶性肿瘤的诊断及预后判断指标,LRP16 可能

成为反映该类肿瘤预后标志物,进一步探索 LRP16 和 ER 相互作用的分子生物学机制,以及 ER 调控下游基因的机制和通路,为进一步探索该类肿瘤形成和进展机制创造了条件。

该研究发现,子宫内腺癌组织中 LRP16 mRNA 的阳性表达率及表达水平均高于正常子宫内腺组织,由此推测 LRP16 与子宫内腺癌的发生、发展有密切联系,参与子宫内腺癌的发生、发展过程,同既往的研究结果相似,其可能成为子宫内腺癌诊断和预后判断的肿瘤标记物。该研究发现,LRP16 转染组 HEC-1-B 细胞在体外能继续增殖,说明利用脂质体转染 LRP16 基因到子宫内腺癌细胞 HEC-1-B 是安全可行的,并可使 LRP16 基因获得稳定表达,为下一步研究 LRP16 基因的转录调节和对子宫内腺癌细胞增殖情况的影响,探讨 LRP16 基因的分子生物学机制及对子宫内腺癌发生、发展的影响打下基础。但 HEC-1-B 细胞增殖能力明显下降,由此可见,LRP16 基因表达上调并没有促进子宫内腺癌 HEC-1-B 细胞的增殖,其可能通过增加 HEC-1-B 细胞的体外侵袭、生长能力参与子宫内腺癌的发生、发展^[8],其具体机制有待进一步研究。LRP16 基因参与致癌过程,参与子宫内腺癌的发生、发展过程,可望通过选择性阻遏 LRP16 基因表达,抑制正常子宫内腺细胞的恶性转变,治愈子宫内腺恶性肿瘤,从而为分子水平治愈激素相关性疾病开辟广阔的治疗前景。

参考文献:

- [1] Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach[J]. *Mod Pathol*, 2000, 13(3): 295-308.
- [2] 韩为东,楼方定,于力,等. LRP16 基因的 SAGE 谱分析及其在正常血细胞、白血病细胞中的表达状况[J]. *军医*

进修学院学报, 2002, 23(3): 161-163.

- [3] 韩为东,母义明,卢学春,等. 雌激素通过其受体上调 LRP16mRNA 表达并促进 MCF-7 细胞增殖[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, 20(2): 165-168.
- [4] Han WD, Zhao YL, Zang YL, et al. Up-regulation of LRP16 mRNA by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor alpha(ERalpha), but not ERbeta, and promotion of human breast cancer MCF-7 cell proliferation; a preliminary report [J]. *Endocr Related Cancer*, 2003, 10(2): 217-224.
- [5] Han WD, Zhao YL, Meng YG, et al. Estrogenically regulated ER α target gene LRP16 interacts with ER α and enhances the receptor's transcriptional activity[J]. *Endocr Related Cancer*, 2007, 14(3): 741-753.
- [6] Meng YG, Han WD, Zhao YL, et al. Induction of LRP16 gene by estrogen promotes the invasive growth of Ishikawa human endometrial cancer cells through down-regulation of E-cadherin[J]. *Cell Research*, 2007, 17(5): 869-880.
- [7] Liao DX, Han WD, Zhao YL, et al. The expression and clinical significance of the LRP16 gene in human breast cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2006, 25(1): 44-49.
- [8] 孟元光,韩为东,黄柯,等. 雌激素调控子宫内腺癌 Ishikawa 细胞中 LRP16 基因表达及其意义[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(11): 980-983.

(收稿日期: 2013-03-18 修回日期: 2013-05-23)

(上接第 2982 页)

质量,值得临床重视与推广。

参考文献:

- [1] 章剑. 标准大骨瓣开颅血肿清除对重度颅脑外伤侧裂区损伤致单侧脑肿胀的疗效观察[J]. *中国全科医学*, 2010, 12(11): 3682-3684.
- [2] 吴在德,吴肇汉. 外科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 597.
- [3] 杨秋荣,孙志宏,刘栋梁,等. 小骨窗开颅术治疗高血压脑出血 66 例临床分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(12): 1867-1872.
- [4] 罗民新. 3 种手术方式治疗高血压脑出血临床分析[J]. *山东医药*, 2010, 50(12): 95-97.
- [5] 张腾,邹华山,陈伟强. 小骨窗开颅术与骨瓣开颅术治疗高血压脑出血疗效比较[J]. *中华神经医学杂志*, 2011, 10(9): 953-955.
- [6] 彭友波,周建学,潘云峰,等. 标准大骨瓣开颅治疗高血压脑出血的临床分析[J]. *浙江创伤外科*, 2008, 13(3): 254.
- [7] 白利军,李步峰,黄艳贞. 早期微创血肿清除术治疗高血压基底节出血 52 例分析[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(20): 3841-3842.

- [8] Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies[J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25(7): 719-738.
- [9] 刘洪生,谢延凤. 47 例重型颅脑损伤标准外伤大骨瓣开颅术的临床体会[J]. *重庆医学*, 2011, 40(18): 1781-1782.
- [10] 张显柏,袁知富,董明. 小骨窗与常规骨瓣开颅治疗高血压脑出血效果分析[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2010, 13(4): 28-30.
- [11] 颜杰浩,于长久,王莉,等. 高血压脑出血颅内血肿抽吸引流术与开颅血肿清除术的对比研究[J]. *广东医学*, 2011, 32(20): 2680-2682.
- [12] 董伟. 50 例重度颅脑损伤大骨瓣开颅手术探讨[J]. *重庆医学*, 2009, 38(10): 1237-1238.
- [13] 杨理媛,孙晓川. 治疗高血压脑出血三种术式疗效和预后研究[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(9): 1041-1042.
- [14] 高晨,周敏慧,刘耀明. 重症高血压脑出血手术治疗时机及方式分析[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(21): 3972-3974.
- [15] Edgar J, Nicola T, Simon W. Shell shock and mild traumatic brain injury: a historical review [J]. *Am J Psychiatry*, 2007, 164(11): 1641-1645.

(收稿日期: 2013-03-14 修回日期: 2013-05-10)