

• 基础研究 •

Numb 基因调控前列腺癌 PC-3 细胞生长的研究

福建医科大学附属第二医院泌尿外科 (泉州 362000) 张建业 潘振良

【摘要】 目的 探讨 Numb 基因与前列腺癌发生发展的关联性及其与 p53、Notch 信号通路之间的关系。**方法** 通过构建 Numb 过表达质粒, 转染人 PC-3 细胞 (CRPC 细胞), 建立稳转细胞株并验证, 通过 CCK-8 检测肿瘤细胞的增殖水平; 通过免疫印迹检测过表达 Numb 后对细胞中 p53 与 Notch1 的表达影响; 将 PC-3 细胞植入裸鼠皮下, 建立人去势抵抗性前列腺癌裸鼠移植瘤模型; 计算并绘制肿瘤的生长曲线, 通过流式细胞技术检测细胞的生长周期, 并对移植瘤进行病理鉴定。**结果** 过表达 Numb 可抑制 PC-3 细胞增殖水平。过表达 Numb 可抑制 PC-3 细胞中 Notch1 表达、促进 p53 的表达。过表达 Numb 可抑制裸鼠种植瘤的生长, 主要是通过减少 PC-3 细胞中 S 期细胞比例, 并且免疫组化也证实过表达 Numb 可抑制肿瘤中 Notch1 表达并促进 p53 表达。**结论** Numb 基因的过表达会促进抑癌基因 p53 的激活以及癌基因 Notch 表达下调, 抑制前列腺癌的发生发展。

【关键词】 前列腺癌; Numb 基因; Notch 基因; p53 基因; 裸鼠移植瘤

【中图分类号】 R737.25 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)05-0115-03

Growth of prostate cancer PC-3 cell regulated by Numb ZHANG Jianyu, PAN Zhenliang. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between Numb and the development and progression of prostate cancer and its relationship with P53 and Notch signaling pathways. **Methods** Numb overexpressed plasmid was constructed and transfected into human PC-3 cells (CRPC cells) to establish stable cell lines. The proliferation level of cell line was detected by CCK-8. The expression of p53 and Notch1 in Numb-expressed cells after overexpression was detected by Western blot. PC-3 cells were implanted subcutaneously into nude mice to establish the xenograft model of castration-resistant prostate cancer in nude mice. The tumor growth curve was calculated and plotted, the cell growth cycle was detected by flow cytometry, and the transplanted tumor was pathologically identified. **Results** Overexpression of Numb can inhibit proliferation level of PC-3 cells; Overexpression of Numb inhibits Notch1 and promotes P53 expression in PC-3 cells; Numb overexpression inhibits the growth of Numb-expressed PC-3 cells in nude mice by decreasing the proportion of S phase cells in PC-3 cells. Overexpression of Numb also inhibits Notch1 and promotes P53 expression in nude mice. **Conclusion** Numb gene overexpression can promote the activation of cancer suppressor gene p53 and decrease the expression of oncogene Notch, and inhibit the progression of prostate cancer.

【Key words】 prostate cancer; Numb gene; Notch gene; p53 gene; nude mouse xenograft

前列腺癌为男性泌尿生殖系常见恶性肿瘤, 严重影响男性健康。去势抵抗性前列腺癌 (CRPC) 治疗困难且存在危害。Numb 基因在肿瘤发生发展中调控多种癌基因与抑癌基因^[1]。本研究拟建立 Numb 过表达人 PC-3 细胞 (CRPC 细胞) 株, 从细胞层面与组织层面, 探讨 Numb 基因对前列腺癌细胞增殖与分化的影响, 并分析其与 p53 及 Notch 信号通路之间的关系, 为 Numb 基因在 CRPC 基因治疗中的可能作用提供思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料: 人 PC-3 细胞; DH5 α 感受态细胞; DMEM 培养基; 胎牛血清; HEK293T 细胞; PLVX-puro-MCS-HA 质粒; BamH I 和 EcoR I 酶; T4 连接酶; 琼脂糖 (北京索莱宝生物公司); Turbofect 转染试剂; CCK-8 试剂盒 (上海碧云天); polybrene; 蛋白酶抑制剂; HA 抗体 (武汉三鹰生物公司); HRP-IgG (武汉三鹰生物公司); ECL 化学发光液。

1.2 质粒构建和慢病毒包装: 将 Numb cDNA 插入 PLVX-puro-MCS-HA 载体构建质粒, 并与病毒包装质粒 (psPAX2 和 pMD2G) 共同转染 HEK293T, 进行慢病毒包装, 获得 Numb 过表达慢病毒和对照慢病毒。

1.3 细胞病毒感染和稳转细胞株筛选: 将 Numb 过表达及其对照慢病毒感染 PC-3 细胞, 并通过嘌呤霉素 (Puro) 进行选择, 获得稳转细胞株。

1.4 细胞增殖与活性检测 (CCK-8 实验): 细胞接种于 96 孔板中, 培养 1 d 后加入 CCK-8 试剂, 37 °C 孵育 30 min, 置于酶标仪上 450 nm 波长测定各组 OD 值, 取均值。实验重复 3 次。

1.5 蛋白质免疫印迹 (Western Blot, WB) 实验: 收集细胞样品, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞、提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取一定体积裂解蛋白, 加入蛋白上样缓冲液, 95 °C 沸水浴 5~10 min 使蛋白变性。在 12% 聚丙烯酰胺凝胶板的每个孔内加入蛋白样本进行蛋

白电泳和免疫印迹检测,一抗稀释度为 1:1 000,羊抗鼠 HRP-IgG 稀释度为 1:3 000;ECL 显色并观察记录结果。

1.6 裸鼠皮下移植瘤模型建立:健康 6 周雄性 SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠 30 只,平均体质量 (24.5 ± 2.4) g。来源:上海斯莱克实验动物有限公司;动物质量合格证号:44824700000464;许可证号:SYXK(闽)2018-0009。动物使用协议已由审查委员会批准,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

将转染重组质粒的细胞(Numb-PC-3 细胞)、未转染细胞(PC-3 细胞)分别接种于裸鼠皮下,按每只裸鼠 2×10^6 体积接种。定期观察裸鼠精神状态、活动力、皮肤色泽、饮食、饮水、成瘤等情况,1 周起每周观察记录移植瘤的生长情况,绘制肿瘤生长曲线,4 周后采用脱颈椎法处死裸鼠,剥离皮下瘤结节,拍照后称量瘤重、计算抑瘤率。取部分移植瘤,分离出对照组和实验组的前列腺癌细胞,流式细胞术分析并比较细胞周期变化。剩下瘤组织用 10% 中性福尔马林固定,以便行常规 HE 及免疫组化染色备用。

1.7 裸鼠移植瘤组织免疫组化:采用 EnVision 法检测蛋白表达。常规石蜡包埋、切成 4 μm 厚切片;3% 过氧化氢作为阻断剂进行室温孵育 10 min;5% 正常山羊血清封闭 15 min;加入一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,阴性对照用 0.01 mol/L 的 PBS;滴加生物素标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;DAB 显色,室温 3 min;苏木素复染 1 min,酒精脱水,中性树脂封片。

1.8 统计学方法:采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

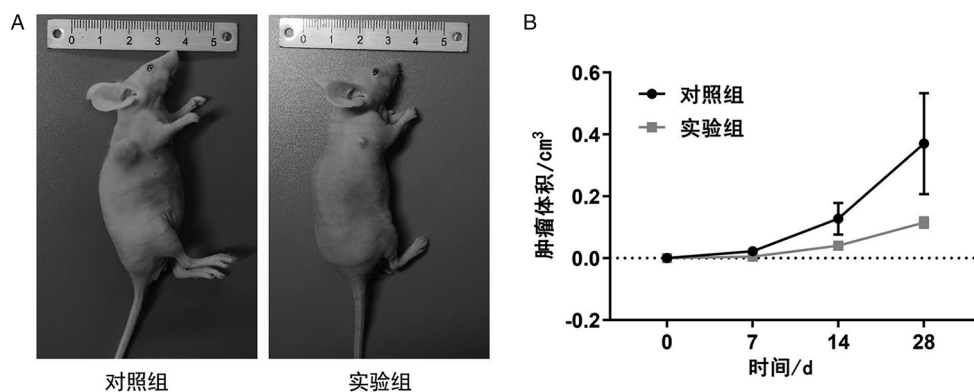
2 结果

2.1 过表达 Numb 的 PC-3 稳转细胞株建立与鉴定:通过构建 Numb 过表达质粒,转染人 PC-3 细胞,建立稳转细胞株,WB 实验检测 Numb 的表达,发现仅实验组在 75 kDa 附近出现明显条带,与预计分子量(Numb-HA)相近,表明 Numb 在稳转 PC-3 细胞中表达成功。

2.2 Numb 过表达对 PC-3 细胞增殖能力的影响:通过 CCK-8 技术检测实验组 Numb-PC-3 细胞及对照组 PC-3 细胞的增殖率,发现实验组细胞的增殖水平明显下降,差异有统计学意义($P = 0.0084$)。

2.3 Numb 过表达对 p53 及 Notch 信号通路的影响:通过 WB 实验检测实验组 Numb-PC-3 细胞及对照组 PC-3 细胞中 Notch1 与 p53 两种蛋白的表达。发现与对照组(1.00 ± 0.12)比较,实验组的 Notch1 表达(0.42 ± 0.04)受抑制($P = 0.0091$);与对照组(1.00 ± 0.08)比较,p53 的表达(2.80 ± 0.42)则出现上调($P = 0.0132$)。

2.4 Numb 过表达对 PC-3 细胞在裸鼠成瘤中的影响:将实验组 Numb-PC-3 细胞株和对照组 PC-3 细胞株分别移植至裸鼠进行皮下成瘤,皮下接种细胞 2 d 后接种部位见一白色小皮丘,并逐渐增大,7 d 后逐渐转为实性结节,14 d 左右成瘤率达到 100%。但实验组皮下瘤生长速度及体积明显低于对照组,两组比较差异有显著性($P = 0.0271$,图 1)。



注: A, 对照组和实验组裸鼠移植瘤形态图; B, 第 0、7、14 和 28 d 两组裸鼠移植瘤的体积统计图。

图 1 Numb 对裸鼠移植瘤生长能力的影响

2.5 移植瘤细胞周期变化:与对照组比较,实验组移植瘤细胞在 G1 期比例显著增加($P = 0.0029$),S 期细胞比例减少,G2 细胞比例明显下调,差异有统计学意义($P = 0.0004$)。

2.6 Numb 对裸鼠移植瘤 Notch 信号通路和 p53 表达的影响:免疫组化染色结果示,在实验组移植瘤细胞中,与对照组(1.00 ± 0.11)比较,实验组移植瘤(0.50 ± 0.06)的 Notch1 表达明显下调($P = 0.0028$);与对照组(1.00 ± 0.09)比较,实验组(2.07 ± 0.17)移植瘤的 p53 表达明显上调($P = 0.0003$)。这一结果与细胞实验相一致(图 2,

见封四)。

3 讨论

中晚期前列腺癌常失去根治手术机会,因其多为激素依赖性前列腺癌(ADPC),可采用内分泌治疗,但治疗 18~24 个月左右后,大多数会转变成去势抵抗性前列腺癌(CRPC),成为前列腺癌的治疗难题^[2]。如何使前列腺癌细胞停止向 CRPC 细胞转化,并使其细胞增殖重新受到调控,成为 CRPC 治疗研究的基础和关键。

Numb 蛋白为与质膜相连的胞质蛋白,其不对称分布对细胞分化起关键作用,与肿瘤发生关系密切,被称为细胞命

运决定因子。Numb 基因在多种肿瘤细胞均有不同程度的表达下调,并与 Notch、p53 等信号通路密切相关^[3-5]。Notch 基因是经典的癌基因。Numb 蛋白可拮抗 Notch 蛋白活性,主要通过以下 3 个途径实现:介导内吞作用,影响 Notch 蛋白向胞内运输;促进质膜表面 Notch 蛋白泛素化降解;与 Notch 蛋白直接结合抑制其活性^[6]。Numb 蛋白缺失会导致 Notch 活性增加,增加肿瘤发生风险。p53 基因为经典的抑癌基因,其突变或缺失与肿瘤形成密切相关。50% 人类恶性肿瘤中存在 p53 基因突变。Numb 可正向调节 p53 的作用, Numb 蛋白缺失会导致 p53 活性降低^[7]。

有研究报道, Numb 表达可通过影响 Notch、p53 等信号通路,增加前列腺癌细胞凋亡,减少 CRPC 对内分泌治疗的抵抗^[3,8-9]。本研究通过建立人 CRPC 裸鼠移植瘤模型,探讨 Numb 基因与前列腺癌发生发展的关联性及其与 p53、Notch 信号通路之间的关系。

本研究构建了 Numb 过表达质粒,转染人 PC-3 细胞(为 CRPC 细胞),建立稳转细胞株,以动物实验验证细胞实验的结果:稳转细胞株培养后导入裸鼠体内,建立人 CRPC 裸鼠移植瘤模型。成瘤后免疫组化证实实验组移植瘤 Numb 高表达,通过进一步检测其中 Notch 及 p53 基因的表达,发现实验组移植瘤中 Notch 低表达、p53 高表达,与文献报道一致。本研究通过流式细胞术进一步分析实验组移植瘤细胞周期变化,发现与对照组比较,实验组移植瘤细胞在 G1 期比例显著增加, S 期细胞比例减少, G2 细胞比例明显下调,说明实验组移植瘤细胞分裂受到了抑制。提示:在一定时间内实验组移植瘤中, Numb 能够稳定持续激活 p53 基因表达,同时抑制 Notch 基因的表达,且主要是通过介导细胞周期的变化,使得实验组移植瘤组织整体呈现抑瘤状态。

综上, Numb 基因过表达会促进抑癌基因 p53 的激活以

及癌基因 Notch 表达下调,抑制前列腺癌发生发展,可能为前列腺癌的基因治疗提供重要参考价值。

参考文献

- [1] Kim H, Ronai Z A. Rewired Notch/p53 by Numb'ing Mdm2 [J]. J Cell Biol, 2018, 217 (2): 445-446.
- [2] Steinestel J, Schrader A J, Luedeke M. Resistance to androgen-pathway drugs in prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2014, 371 (23): 2234.
- [3] Sun J, Wang K, Teng J F, et al. Numb had anti-tumor effects in prostatic cancer [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 92: 108-115.
- [4] 杨新瑞, 孙杰, 王晶, 等. 细胞命运决定子 Numb 调控肝癌发生的研究进展 [J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26 (9): 714-717.
- [5] Xian J, Cheng Y, Qin X, et al. Progress in the reseach of P53 tumour suppressor activity controlled by Numb in triple-negative breast cancer [J]. Journal of Cellular And Molecular Medicine, 2020, 24 (13): 7451-7459.
- [6] McGill M A, Dho S E, Weinmaster G, et al. Numb regulates postendocytic trafficking and degradation of Notch1 [J]. J Biol chem, 2009, 284 (39): 26427-26438.
- [7] Colaluca I N, Tosoni D, Nuciforo P, et al. NUMB controls p53 tumour suppressor activity [J]. Nature, 2008, 451 (7174): 76-80.
- [8] Flores A N, McDermott N, Meunier A, et al. NUMB inhibition of NOTCH signalling as a therapeutic target in prostate cancer [J]. Nat Rev Urol, 2014, 11 (9): 499-507.
- [9] Guo Y, Zhang K, Cheng C, et al. Numb Enriches a castration-resistant prostate cancer cell subpopulation associated with enhanced Notch and Hedgehog signaling [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23 (21): 6744-6756.

• 基础研究 •

骨肉瘤组织 ACTN4 和 CD133 的表达及其影响因素

厦门大学附属福州第二医院骨科 (福州 350007) 钟志辉 林焱斌¹ 庄 研 尤龙木 陈小霞 吴春玲

【摘要】目的 观察 α -辅肌动蛋白 (α -actinin-4, ACTN4) 和 CD133 在骨肉瘤组织中的表达情况,并探讨影响两者表达的相关因素。**方法** 收集 2015 年 1 月至 2018 年 1 月经病理确诊为骨肉瘤的 50 例患者临床病理资料,应用免疫组化检测 ACTN4 和 CD133 的蛋白表达情况,分析各因素不同水平间 ACTN4 和 CD133 蛋白表达的差异。**结果** ACTN4 在骨肉瘤组织中阳性率为 58%, CD133 在骨肉瘤组织中阳性率为 54%,两者阳性率均高于其在骨软骨瘤组织中的表达,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同 Enneking 外科分期、肺转移之间的 ACTN4 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同 Enneking 外科分期、局部复发和肺转移之间的 CD133 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** ACTN4 和 CD133 在骨肉瘤发生、发展中具有重要作用。

【关键词】 骨肉瘤; α -辅肌动蛋白; CD133; 肿瘤干细胞

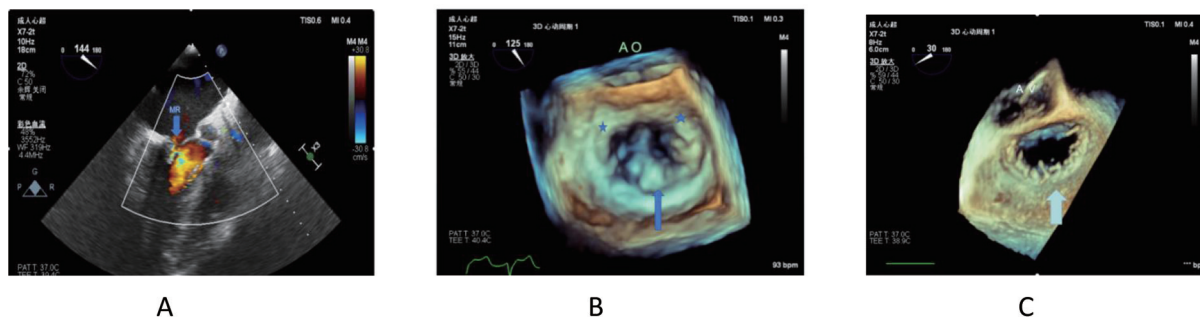
【中图分类号】 R738.1 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2021)05-0117-04

基金项目:福建省自然科学基金面上项目 (2020J011189)

1 通信作者, Email: lyab32@163.com

三维经食管超声评估二尖瓣成形环大小的可行性研究

(见正文第 13 页)

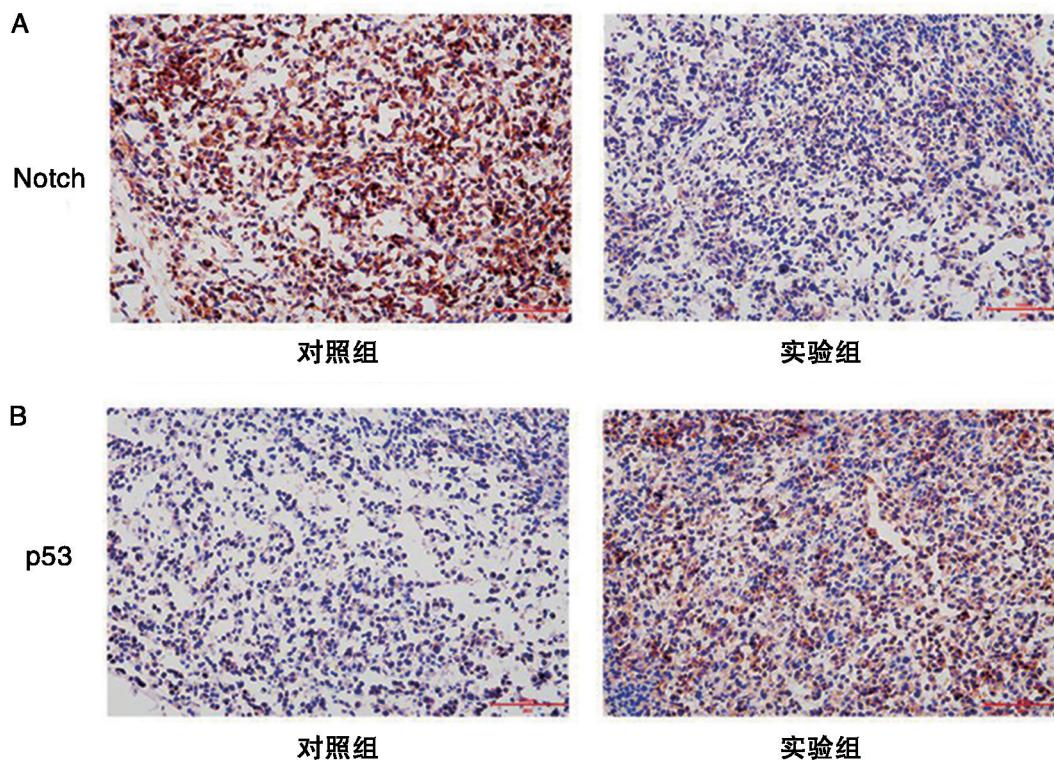


注：A，二尖瓣成形术后二尖瓣反流（MR）为轻微（↓所示）；B，二尖瓣成形术前二尖瓣环三维结构示意图，★标记为二尖瓣前叶三角区，↑标记为病变的二尖瓣后叶；C，二尖瓣成形术后，经食道三维成像示二尖瓣成形环缝合位置良好↑所示。AO，主动脉；LA，左房；LVOT，室流出道；MR，二尖瓣反流。

图 1 同一患者术前及术后经食管超声心动图表现

Numb 基因调控前列腺癌 PC-3 细胞生长的研究

(见正文第 115 页)



注：通过免疫组化方法对实验组和对照组裸鼠移植瘤进行 Notch 和 p53 蛋白表达的检测，放大倍数为 200 倍。

图 2 Numb 对裸鼠移植瘤的 Notch 和 p53 蛋白表达的影响