

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

Expression and interfering factors of ACTN4 and CD133 in osteosarcoma ZHONG Zhihui, LIN Yanbin, ZHUANG Yan, YOU Longmu, CHEN Xiaoxia, WU Chunling. Department of Orthopedics, the Affiliated Fuzhou Municipal Second Hospital, Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To observe the expression of α -actinin-4 (ACTN4) and CD133 in osteosarcoma and to explore the related factors affecting their expression. **Methods** The clinicopathological data of 50 patients with osteosarcoma diagnosed by pathology from January 2015 to January 2018 were collected. The protein expression of ACTN4 and CD133 was detected by immunohistochemistry, and the differences of protein expression among different levels of various factors were further analyzed. **Results** The positive rates of ACTN4 and CD133 in osteosarcoma were 58% and 54%, respectively. Both positive rates were higher than their expression in osteochondroma. There were significant differences in the expression of ACTN4 between different Enneking surgical stages and lung metastasis ($P < 0.05$). There were significant differences in the expression of CD133 between different Enneking surgical stages, local recurrence and lung metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** ACTN4 and CD133 play an important role in the occurrence and development of osteosarcoma.

【Key words】 osteosarcoma; α -actinin-4; CD133; cancer stem cells

骨肉瘤在原发性恶性骨肿瘤中发病率位居第一位,在儿童和青少年癌症相关死亡病因中位居第二位^[1]。它可能起源于骨形成的原始间充质细胞,发病部位通常为长骨的干骺端,如膝关节周围的股骨远端和胫骨近端。尽管过去几十年新辅助化疗方案不断完善,手术切除重建水平不断提高,但骨肉瘤的总体生存率没有明显改变^[2]。更为糟糕的是,如果发生局部肿瘤复发和远处转移,5年内患者总体生存率低于30%。虽然一些基因的改变已被报道与骨肉瘤相关,但其发病的复杂分子机制仍极不清楚。因此,寻找新的诊断和预后标志物以及发现潜在的治疗靶点对改善骨肉瘤患者的预后具有重要的意义。新近研究表明肿瘤干细胞是多种肿瘤的发生、耐药和复发的源头,而CD133(+)亚群细胞可视为骨肉瘤的肿瘤干细胞^[3]。本课题组用高通量的差异蛋白质组学技术发现骨肉瘤CD133(+)细胞亚型中 α -辅肌动蛋白(α -actinin-4, ACTN4)高表达^[4],但ACTN4与CD133在骨肉瘤组织中的表达情况及相关因素尚不明确。因此,本研究采用免疫组化的方法评估骨肉瘤组织标本中ACTN4和CD133的表达情况,并探讨不同因素之间ACTN4和CD133的表达差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料: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设为观察组。其中男32例,女18例;年龄10~68岁,中位年龄16.5岁。根据随访3年内是否发生远处转移分为转移亚组和非转移亚组。其中转移亚组28例,无转移亚组22例。另选取同期经过手术治疗并病理确诊为骨软骨瘤的23例患者作为对照组。对

照组中男12例,女11例;年龄8~52岁,中位年龄14岁。

1.2 主要试剂:鼠抗人ACTN4单克隆抗体购自美国Abcam公司;鼠抗人CD133单克隆抗体购自德国Miltenyi公司;PV9000试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司;柠檬酸抗原修复液购自福州迈新生物公司。

1.3 免疫组化方法:将骨肉瘤或骨软骨瘤组织蜡块切成4 μ m厚切片,置60℃烤箱中烤片过夜;取出后顺序脱蜡、水化、抗原修复,再依次添加一抗和二抗后进行显色。每张切片至少由2名病理科医生独立双盲观察。在显微镜下任意选取具有代表性的10个高倍视野,计数量约200个细胞/视野。最终评分由每张切片染色细胞百分率得分与染色强度得分相乘得来。染色细胞百分率分为4级,染色细胞占比小于等于5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,超过51%为3分;染色强度也分为4级,基本不着色为0分,浅着色为1分,中度着色为2分,深着色为3分。最终得分0~2者为阴性表达,而 ≥ 3 分为阳性表达。

1.4 统计学分析:所有统计分析均采用SPSS 22.0软件进行。ACTN4和CD133的表达率为计数资料,采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACTN4和CD133蛋白在不同骨肿瘤组织的表达:免疫组化结果表明ACTN4和CD133蛋白主要表达于细胞质和细胞膜中。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%,均明显高于它们在骨软骨瘤组织中的表达,差异均具有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

表1 ACTN4和CD133蛋白在不同骨肿瘤组织的表达情况 [例 (%)]

组别	ACTN4 阳性	ACTN4 阴性	χ^2 值	P 值	CD133 阳性	CD133 阴性	χ^2 值	P 值
骨肉瘤 (n=50)	29 (58.0)	21 (42.0)	6.248	0.011	27 (54.0)	23 (46.0)	6.659	0.010
骨软骨瘤 (n=23)	6 (26.1)	17 (73.9)			5 (21.7)	18 (78.3)		

2.2 各因素不同水平间ACTN4和CD133蛋白表达比较:骨肉瘤患者不同性别、年龄、发病部位、肿瘤大小、局部复发之间的ACTN4表达差异无统计学意义($P > 0.05$),不同Enneking外科分期、肺转移之间的ACTN4表达差异有统计

学意义($P < 0.05$)。患者不同性别、年龄、发病部位、肿瘤大小之间的CD133表达差异无统计学意义($P > 0.05$),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($P < 0.05$)。见表2。

表 2 各因素不同水平间 ACTN4 和 CD133 蛋白表达比较 [例 (%)]

因素	ACTN4 阳性	ACTN4 阴性	χ^2 值	P 值	CD133 阳性	CD133 阴性	χ^2 值	P 值
性别								
男	19 (59.4)	13 (40.6)	0.069	0.793	17 (53.1)	15 (46.9)	0.027	0.869
女	10 (55.6)	8 (44.4)			10 (55.6)	8 (44.4)		
年龄								
<30 岁	21 (58.3)	15 (41.7)	0.006	0.939	20 (55.6)	16 (44.4)	0.125	0.723
≥30 岁	8 (57.1)	6 (42.9)			7 (50.0)	7 (50.0)		
解剖部位								
膝部	22 (57.9)	16 (42.1)	0.001	0.979	21 (55.3)	17 (44.7)	0.102	0.750
其他	7 (58.3)	5 (41.7)			6 (50.0)	6 (50.0)		
肿瘤直径								
<5 cm	13 (56.5)	10 (43.5)	0.038	0.845	12 (52.2)	11 (47.8)	0.057	0.811
≥5 cm	16 (59.3)	11 (40.7)			15 (55.6)	12 (44.4)		
外科分期								
II	19 (48.7)	20 (51.3)	7.287	0.007	18 (46.2)	21 (53.8)	4.393	0.036
III	10 (90.9)	1 (9.1)			9 (81.8)	2 (18.2)		
局部复发								
是	18 (69.2)	8 (30.8)	2.805	0.094	19 (73.1)	7 (26.9)	7.936	0.005
否	11 (45.8)	13 (54.2)			8 (33.3)	16 (66.7)		
肺转移								
是	20 (71.4)	8 (28.6)	4.711	0.030	22 (78.6)	6 (21.4)	15.46	0.000
否	9 (40.9)	13 (59.1)			5 (22.7)	17 (77.3)		

3 讨论

随着外科技术和影像技术的发展,对骨肉瘤原发灶进行较为彻底的切除已经相对容易,但对复发病灶和远处转移灶进行控制较为困难。因此,寻找更为准确预测复发和转移的因素至关重要,其有利于开发出新的靶向治疗手段进而提高骨肉瘤存活率^[5]。当前的研究大多聚焦于肿瘤干细胞的分子生物学改变。

ACTN4 为肌动蛋白 (actin) 交联蛋白家族的成员之一。早在 1998 年, Honda 等^[6]最先证实 ACTN4 是乳腺癌转移相关基因,随后其又发现 ACTN4 能增加结直肠癌细胞运动能力,并与淋巴结转移相关。Liu 等^[7]研究表明, ACTN4 在有转移的胃癌患者组织中表达上调, ACTN4 能减少胃癌细胞黏附并增加转移和侵袭的能力。Jung 等^[8]发现 ACTN4 能参与调节肿瘤干细胞的特性,进而导致宫颈癌的耐药。Fukushima 等^[9]对 39 例浸润性胶质瘤患者的病理组织进行免疫组化分析,发现 ACTN4 表达与肿瘤的 WHO 分级有关, II 级肿瘤 ACTN4 表达都阴性,而 IV 级肿瘤大部分阳性;并且 ACTN4 表达可区分星形胶质细胞和少突胶质细胞类型胶质瘤,提示其可能无法当作胶质瘤的生物标记物,但有助于肿瘤分级评定。Wang 等^[10]已证实鞣花酸能直接抑制 ACTN4,并通过调节肿瘤干细胞中 β -连环蛋白的稳定性来限制乳腺癌转移。这些研究提示了 ACTN4 在肿瘤组织中可能具有多种功能,与多种肿瘤的恶性度相关。因此,靶向 ACTN4 进行骨肉瘤的治疗也可能是一种新的治疗策略。本研究初步表明, ACTN4 表达在骨肉瘤患者不同 Enneking 分期、肺转移之间存在差异。而 Huang 等^[11]研究表明 ACTN4 高表达能促进骨肉瘤裸鼠模型中肿瘤的生长和肺转移。

近年来随着肿瘤干细胞理论的提出和兴起,对肿瘤干细胞表型的鉴定应运而生。CD133 为人第 4 条染色体编码的一种糖基化蛋白,细胞表面 CD133 阳性被认为是多种肿瘤的干细胞表型。尽管有多种方法被认为可获取骨肉瘤干细胞, CD133 (+) 亚群细胞被广泛认为骨肉瘤干细胞模型^[12]。本研究初步表明, CD133 表达与骨肉瘤患者 Enneking 分期、局部复发和肺转移明显相关。这之前一些学者的研究相吻合。如洪峰等^[13]发现 CD133 表达水平与骨肉瘤分期和肺转移明显相关; Xu 等^[14]发现 CD133 表达不仅与骨肉瘤复发转移有关,还将导致 5 年存活率降低。这些结果表明 CD133 阳性表达增多,可能导致骨肉瘤组织中肿瘤干细胞含量相对增加,进而容易导致复发和转移。因此临床中检测骨肉瘤组织 CD133 的表达有助于判断恶性程度及进一步评估预后。

当然本研究纳入样本量较小,随访时间较短,未能进行全面的临床预后分析,这些都是本研究的局限所在。今后需继续扩大样本量和进行更长时间的随访研究。既往大多研究认为 ACTN4 的表达受 NF- κ B 信号通路影响,其能在细胞浆内与肌动蛋白相结合,介导细胞突触形成,并可能与一些重要蛋白激酶相互作用来发挥重要的功能^[15]。那么 ACTN4 在骨肉瘤参与复发和转移的进程中,通过什么信号通路发挥作用,又是如何与 CD133 进行相互作用,是否还具有其他功能,这一系列问题值得进一步探索。

参考文献

- [1] Lagmay J P, Krailo M D, Dang H, et al. Outcome of patients with recurrent osteosarcoma enrolled in seven phase ii trials through children's cancer group, pediatric oncology group, and children's oncology group: learning from the past to move forward [J]. J Clin Oncol, 2015, 34 (25): 3031-3038.

- [2] Sayles L C, Breese M R, Koehne A L, et al. Genome-Informed targeted therapy for osteosarcoma [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9 (1): 46-63.
- [3] Brown H K, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Cancer stem cells in osteosarcoma [J]. *Cancer Lett*, 2017, 386: 189-195.
- [4] Zhong Z H, Mao S F, Lin H F, et al. Comparative proteomics of cancer stem cells in osteosarcoma using ultra-high-performance liquid chromatography and Orbitrap Fusion mass spectrometer [J]. *Talanta*, 2018, 178: 362-368.
- [5] Robin P, Singh K, Suntharalingam K. Gallium (iii) -polypyridyl complexes as anti-osteosarcoma stem cell agents [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56 (10): 1509-1512.
- [6] Honda K, Yamada T, Hayashida Y, et al. Actinin4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128 (1): 5162.
- [7] Liu X, Chu K M. α -Actinin-4 promotes metastasis in gastric cancer [J]. *Lab Invest*, 2017, 97 (9): 1084-1094.
- [8] Jung J, Kim S, An H T, et al. α -Actinin-4 regulates cancer stem cell properties and chemoresistance in cervical cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41 (7): 940-949.
- [9] Fukushima S, Yoshida A, Honda K, et al. Immunohistochemical actinin4 expression in infiltrating gliomas: Association with who grade and differentiation [J]. *Brain tumor pathology*, 2014, 31 (1): 1116.
- [10] Wang N, Wang Q, Tang H, et al. Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis via regulation of β -catenin stabilization in cancer stem cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36 (1): 172.
- [11] Huang Q, Li X, Huang Z, et al. ACTN4 promotes the proliferation, migration, metastasis of osteosarcoma and enhances its invasive ability through the NF- κ B pathway [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26 (2): 893-904.
- [12] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo [J]. *FASEB J*, 2011, 25 (6): 2022-2030.
- [13] 洪峰, 袁高乐, 张辉洁, 等. 微管不稳定蛋白和 CD133 在骨肉瘤组织的表达及其临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34 (3): 516-518.
- [14] Xu N, Kang Y, Wang W, et al. The prognostic role of CD133 expression in patients with osteosarcoma [J]. *Clin Exp Med*, 2020, 20 (2): 261-267.
- [15] Zhang Y Y, Tabataba H, Liu X Y, et al. ACTN4 regulates the stability of RIPK1 in melanoma [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (29): 4033-4045.

• 基础研究 •

hsa-miR-26b 靶向 ER α 调控人卵巢癌 HO-8910 细胞周期的作用机制

厦门大学附属福州第二医院妇科 (福州 350007) 何霞娜 刘小梅 刘凌瑜

【摘要】目的 探讨 hsa-miR-26b 靶向 ER α 基因调控人卵巢癌 HO-8910 细胞周期的分子机制。**方法** HO-8910 细胞分为 3 组: 空白对照组 (control 组)、miR-26b 激动剂组 (miR-26b mimic 组) 和 miR-26b 激动剂阴性对照组 (mimic NC 组), Real-time PCR 检测 miR-26b 转染效率, 细胞增殖试验 (CCK8) 检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞周期, Real-time PCR 和 Western Blot 检测 ER α mRNA 和蛋白的表达水平, 双荧光素酶报告基因检测 miR-26b 与 ER α 3'UTR 的相互作用。**结果** CCK8 显示 miR-26b 可抑制 HO-8910 细胞增殖活性, 流式细胞术显示细胞增殖活性抑制与 G1 期阻滞相关, Real-time PCR 和 Western Blot 显示其可抑制 ER α mRNA 和蛋白表达, 并抑制 Cyclin D1 和 CDK6 蛋白表达水平, 双荧光素酶报告基因检测显示 miR-26b 与 ER α 3'UTR 可相互结合。**结论** miR-26b 通过负调控 ER α 表达水平, 下调 Cyclin D1 和 CDK6 以阻滞 HO-8910 细胞 G1 期, 从而抑制细胞的增殖活性。

【关键词】 hsa-miR-26b; 雌激素受体 α ; 细胞周期; 卵巢癌

【中图分类号】 R737.31 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2021)05-0120-03

卵巢癌起病隐匿, 60%~70% 患者确诊时已经处于 III 期、IV 期^[1], 即使经过手术、化疗和靶向治疗, 5 年生存率也仅为 20%^[2]。雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 在卵巢癌中起启动因子作用^[3], 因此探讨 ER α 的上游调控机制是研究热点之一。miR-26b 作为抑癌基因, 与多种肿瘤的恶性程度呈负相关, 其在卵巢癌中的表达显著下调^[4], 上调卵巢癌细胞中 miR-26b 表达可抑制增殖并诱导凋亡及细胞周期^[5]。生物信息学预测 miR-26b 可能结合 ER α 起调控作用,

然而具体分子机制尚未明确。本研究通过人上皮性卵巢癌 HO-8910 细胞系中过表达 miR-26b, 观察 miR-26b 调控 ER α 表达对细胞增殖和细胞周期的影响, 并进一步探讨其潜在的作用机制, 为 miR-26b 作为卵巢癌诊断治疗和预后的分子标记物提供实验室数据支持。

1 材料与方法

1.1 细胞株: 人卵巢癌细胞 HO-8910、人胚胎肾细胞 293 (HEK293) 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资