

· 实验研究 ·

中心体相关蛋白 CDK5RAP2 单克隆抗体的制备及其在乳腺癌中的表达

张霖 张彤雯 杨毅 李萌辉 罗艺 魏熙胤 牛昀 牛瑞芳 齐众

【摘要】 目的 通过制备中心体相关蛋白 CDK5RAP2 的单克隆抗体,检测 CDK5RAP2 在正常乳腺及乳腺癌中的表达差异,为进一步研究 CDK5RAP2 在乳腺癌发生、发展中的作用提供依据。方法 采用传统的杂交瘤方法制备 CDK5RAP2 的单克隆抗体,通过敲除 CDK5RAP2 的细胞模型进行免疫荧光检测,验证其特异性。选取正常乳腺、导管内癌和浸润性导管癌 3 组标本各 30 例,用制备的单克隆抗体进行免疫组化检测。结果 得到一株 CDK5RAP2 单克隆抗体(5F6),亚型为 IgG1,用免疫荧光检测确证其特异性。免疫组化检测 CDK5RAP2 的表达显示浸润性导管癌和导管内癌之间无明显的差别,但是两组均明显高于正常乳腺组($P < 0.001$)。结论 乳腺正常组织不表达或低表达 CDK5RAP2,而乳腺癌组织中该蛋白的表达率明显增高,提示 CDK5RAP2 可能成为乳腺癌诊治的新型标志物。

【关键词】 CDK5RAP2; 乳腺癌; 单克隆抗体

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Evaluation of CDK5RAP2 expression in breast cancer by preparing its monoclonal antibody ZHANG Lin, ZHANG Tong-wen, YANG Yi, LI Meng-hui, LUO Yi, WEI Xi-yin, NIU Yun, NIU Ri-fang, QI Zhong. Central Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, Tianjin 300060, China

【Abstract】 Objective To evaluate the difference of CDK5RAP2 expression between normal breast tissue(N) and malignant breast cancer by its monoclonal antibody. **Methods** Monoclonal antibody of CDK5RAP2 was prepared by means of hybridoma technique and its specificity was tested by immunofluorescence on the cell knockout CDK5RAP2. Three groups of samples: normal breast tissue, ductal carcinoma in situ (DCIS) and infiltrating ductal carcinoma (IDC) (30 cases in each group) were selected. Immunohistochemistry (IHC) was performed on paraffin blocks by the CDK5RAP2 McAb to determine the expression patterns of CDK5RAP2 in breast cancer and normal breast tissue respectively. **Results** One antibody against CDK5RAP2 (5F6) with IgG1 subtype was obtained. IHC staining indicated that the CDK5RAP2 expression in both IDC and DCIS cases was higher than that in normal group($P < 0.001$), but there was no difference between IDC and DCIS groups. **Conclusion** CDK5RAP2 is not expressed or lowly expressed in normal breast tissue. The CDK5RAP2 expression is increasingly enhanced in breast cancer tissues to lead to breast cancer occurrence and progressing. Therefore CDK5RAP2 may be a potential indicator of breast cancer.

【Key words】 CDK5RAP2; Breast cancer; Monoclonal antibody

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院中心实验室 国家教育部乳腺癌防治重点实验室(张霖、张彤雯、杨毅、李萌辉、罗艺、魏熙胤、牛昀、牛瑞芳);香港,香港科技大学(齐众)

通信作者:牛瑞芳,邮箱 niurf1982@yahoo.com.cn

中心体是细胞骨架的重要组成部分,作为细胞中首要的微管组织中心(microtubule-organizing center, MTOC),中心体在细胞的生命活动中发挥着重要的作用^[1-3]。中心体异常出现在肿瘤早期甚至癌前病变中,并且和恶性肿瘤进展具有相关性^[4-5],因此对定位于中心体并实现其功能的各种蛋白的研究越来越受到关注。

CDK5RAP2(CDK5 regulatory subunit associated protein 2)是一种崭新的蛋白,分布于胞质中,并在中心体处聚集^[6]。CDK5RAP2 基因发现于常染色体隐性遗传疾病——小头畸形。该因子异常导致中枢神经系统发育障碍,患者的大脑皮层体积明显减小^[7-8]。荧光免疫法检测结果显示,CDK5RAP2 广泛存在于细胞质中,但是其分布的荧光强度有着明显的差别,在细胞分裂间期它富集于中心体而在细胞分裂期则富集于染色体极。这说明 CDK5RAP2 在细胞分裂间期同中心体的复制相关而在分裂期则是纺锤体形成的主要部分^[9]。

作为中心体功能蛋白成分的一分子,CDK5RAP2 在肿瘤中的作用值得深入探索。本研究通过制备 CDK5RAP2 蛋白的单克隆抗体,检测其在乳腺组织中的表达情况,为进一步探讨中心体在肿瘤发生过程中的可能作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 动物、细胞株和主要试剂

Balb/c 小鼠购自中国医学科学院动物研究所,小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)为本室冻存。宫颈癌细胞 HeLa 及 CDK5RAP2 稳定敲除的 HeLa 细胞由香港科技大学齐众教授惠赠,乳腺癌 MCF-7 细胞为本室所藏。

弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂、HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤、胸腺嘧啶核苷)、HT(次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷)条件培养基购自 Invitrogen 公司。DMEM 培养基、聚乙二醇(PEG)、RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 Ig、邻苯二胺(OPD)、二氨基联苯胺(DAB)、8-氮鸟嘌呤(8-AG)购自 Sigma 公司。中心粒周蛋白(pericentrin)多抗购自 Santa Cruz, Alexa Fluor 488 标记羊抗鼠 Ig、Alexa Fluor 594 标记羊抗兔 Ig 购自分子探针公司。

CDK5RAP2 免疫原为原核表达重组蛋白,涵盖该分子 1~70 氨基酸,由香港科技大学齐众教授表达纯化并惠赠。

1.2 单克隆抗体制备

取 7~10 周龄 Balb/c 雌性小鼠 4 只,将 100 μ g CDK5RAP2 多肽与弗氏完

全佐剂充分混匀,于小鼠腹部皮下多点注射。此后间隔 14 d 加强免疫 3 次,抗原量减半与弗氏不完全佐剂充分混匀。融合前 3 d 由尾静脉注射 50 μg 多肽强化免疫。取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合,融合后细胞接种于含 HAT 的甲基纤维素半固体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后在解剖镜下将克隆转移至液体培养基继续培养^[10]。

用间接酶联免疫法筛选阳性克隆。包被重组 CDK5RAP2 多肽,每孔加培养上清液 100 μl ,孵育后加入酶标二抗,OPD 显色。经确认得到的阳性克隆继续培养扩增,接种至小鼠腹腔生产腹水,收集腹水后用 ProteinG 提纯抗体,紫外分光光度计测定抗体的浓度,ELISA 测定效价。

1.3 CDK5RAP2 单克隆抗体的特异性检测

将 HeLa 细胞及 CDK5RAP2 稳定敲除的 HeLa 细胞用胰酶消化,取适量细胞点于载玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h 后,冷甲醇固定,加 CDK5RAP2 单克隆抗体、pericentrin 抗体孵育,加不同荧光素标记的二抗,荧光显微镜下观察。

1.4 CDK5RAP2 单克隆抗体的乳腺癌细胞染色

取适量 MCF-7 细胞点于载玻片上,置于无菌的平皿中 37 $^{\circ}\text{C}$,培养 8 h 后,置于冷丙酮中固定 20 min,封闭后加 CDK5RAP2 单克隆抗体孵育 1 h,洗涤后加 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG,DAB 显色,常规苏木素复染。

1.5 CDK5RAP2 在乳腺癌组织中的表达

收集天津市肿瘤医院乳腺病理研究室 2003 ~ 2007 年保存的常规石蜡包埋组织块,包括正常乳腺组织或轻度增生组织、导管内癌和浸润性导管癌(非特殊型)3 组标本。每组样本数为 30 例,共 90 例。经过该院乳腺病理研究室至少 2 名副高以上病理医师根据 2003 年 WHO 新分类再次明确其病理诊断。患者术前均未接受放射治疗和化疗,中位年龄 55.8 岁。

组织切片抗原修复、封闭后,应用 CDK5RAP2 单克隆抗体 1:500 稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 漂洗 3 遍,加 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,DAB 显色,常规复染与封片。

免疫组织化学分析染色结果的判定方法如下^[11]:将每张切片放置于 400 倍视野的显微镜上选取 5 个有代表性的不同区域,每个区域选 150 ~ 200 个细胞,每个视野的得分由阳性细胞的比例和显色强度两方面决定。依照阳性细胞比例 < 5%, 5% ~ 25%, 25% ~ 50%, 50% ~ 75%, > 75% 分别得 0 分、1 分、2 分、3 分、4 分;依照细胞质的显色强度未着色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别得

0 分、1 分、2 分、3 分;将两项得分相乘得到该视野的最终得分。每张切片的得分为该切片选取的 5 个视野得分的平均值。最后将切片按照得分分为以下 4 个等级:0~1 分为阴性(-),2~4 分为(+),5~8 分为(++),9 分以上为(+++)。

1.6 统计学处理

全部数据采用 SPSS13.0 软件包处理,不同组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDK5RAP2 单克隆抗体筛选

用间接 ELISA 法筛选获得 5 株单克隆抗体,其中一株单克隆抗体(5F6)亚型鉴定为 IgG1,纯化抗体效价为 1:5000。

2.2 CDK5RAP2 单克隆抗体的特异性检测

Pericentrin 作为中心体标志在两组细胞(对照和 CDK5RAP2 敲除)中均有染色,而敲除 CDK5RAP2 的 HeLa 细胞没有 CDK5RAP2 单克隆抗体的荧光显色,对照 HeLa 细胞则在中心体处有明显的聚集荧光,说明该抗体对于 CDK5RAP2 蛋白具有明显的特异性(图 1)。

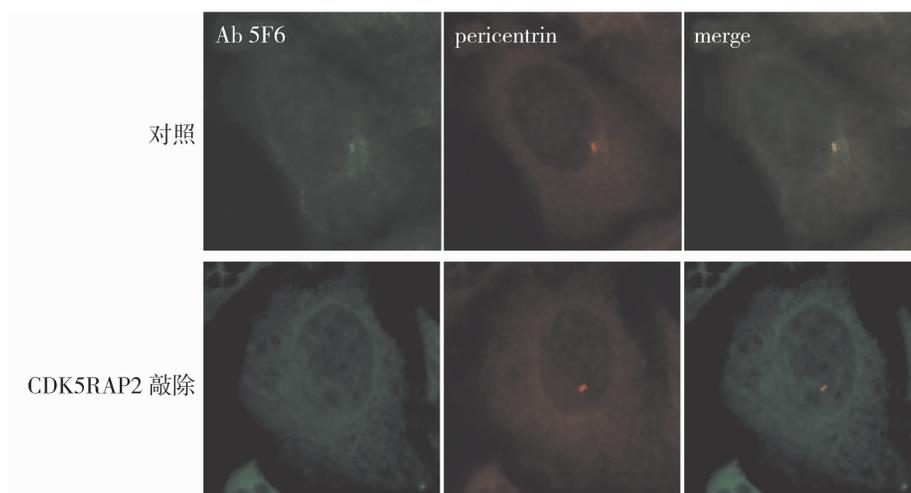
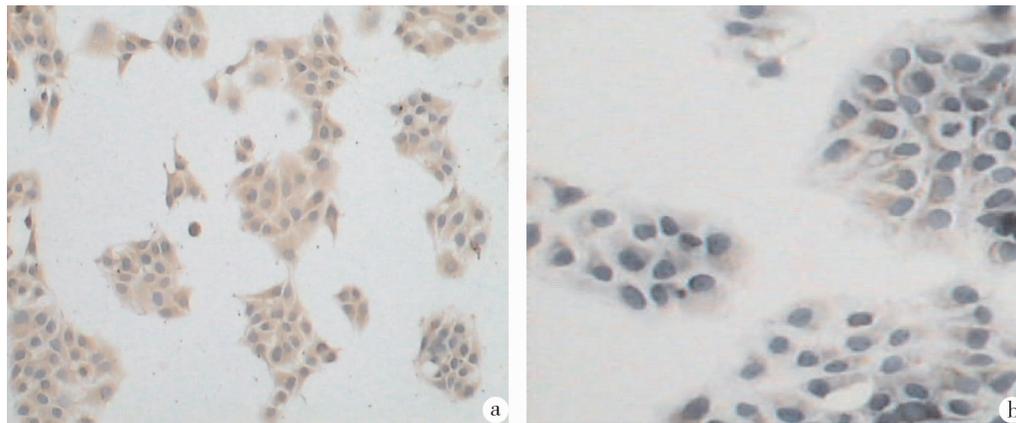


图 1 CDK5RAP2 单克隆抗体免疫荧光检测($\times 400$)

2.3 乳腺癌细胞免疫化学染色

MCF-7 细胞 CDK5RAP2 染色显示胞质呈明显的阳性反应(图 2)。阴性

对照为正常鼠血清。

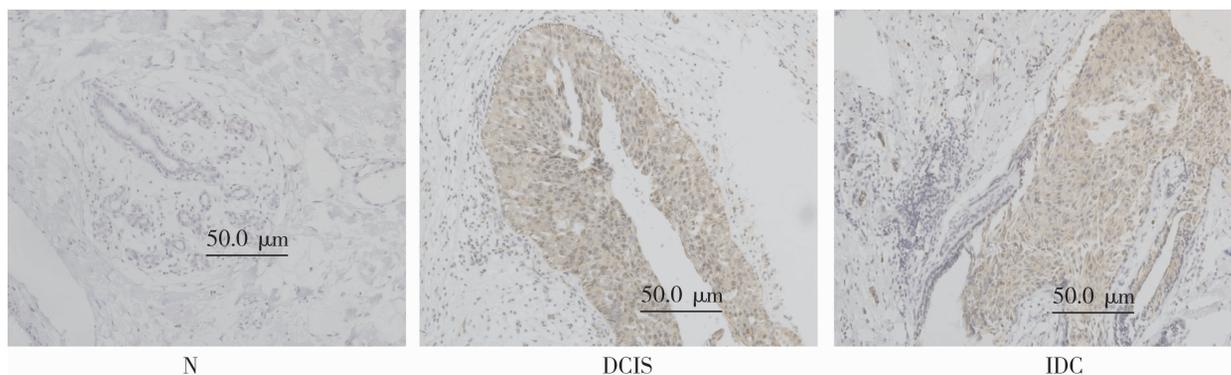


a :CDK5RAP2 染色;b:鼠血清染色阴性对照

图 2 MCF-7 细胞 CDK5RAP2 的免疫组织化学染色结果(×200)

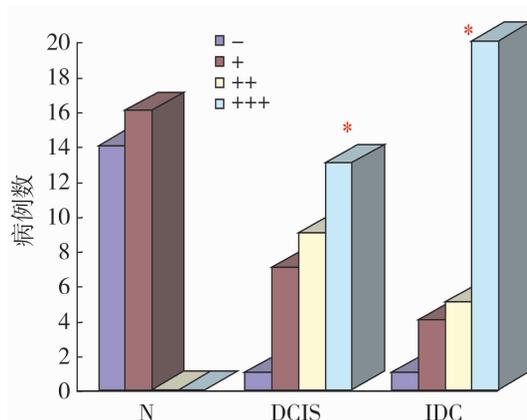
2.4 CDK5RAP2 在乳腺癌组织中的表达

光镜下观察结果,可见在阳性细胞质内呈均匀着色的棕/黄色颗粒,阳性细胞密集或(和)散在分布,部分阳性样本中存在有部分细胞核着色,纤维间质细胞,淋巴细胞等不着色,背景清晰(图 3)。利用 SPSS13.0 软件包, crosstabs 总体分析正常乳腺组织及轻度增生(N),导管内癌(DCIS)和浸润性导管癌(IDC)中 CDK5RAP2 的表达情况($\chi^2 = 85.657, P < 0.001$),说明不同组别样本的着色效果之间差异有显著的统计学意义。CDK5RAP2 在导管内癌组和浸润性导管癌组表达没有显著性差异($\chi^2 = 3.446, P = 0.328$),但两者均高于正常乳腺组(DCIS 组比 N 组, $\chi^2 = 36.788, P < 0.001$; IDC 组比 N 组, $\chi^2 = 43.467, P < 0.001$,图 4)。



N:正常乳腺;DCIS:导管内癌;IDC:浸润性导管癌

图 3 CDK5RAP2 在乳腺癌组织中的表达(×200)



* : $P < 0.001$, 与正常乳腺相比; N: 正常乳腺; DCIS: 导管内癌; IDC: 浸润性导管癌

图 4 CDK5RAP2 在各组样本中的表达情况

3 讨论

细胞骨架是构成细胞的支持性结构,维持着细胞的形状。除此之外,其还在细胞分裂、运动、信号转导等方面起重要作用。研究发现细胞骨架蛋白成分的异常表达及分布可能与肿瘤发生、发展过程中细胞病理表型及病理生理过程有关^[12],并可能与肿瘤发生和细胞增殖失控,以及肿瘤细胞的恶性生物学行为如无限生长,侵袭和转移等密切相关^[13-14]。

中心体是细胞骨架重要的组成部分,扮演着微管组织中心的角色,其功能的发挥有赖于相关蛋白的募集和正确的相互作用。CDK5RAP2 为中心粒周围物质(PCM)组成成分之一。研究表明,CDK5RAP2 对于 γ 微管蛋白(γ -tubulin)锚定在中心体至关重要。该蛋白的缺失将使 γ 微管蛋白脱离中心体,从而抑制微管的形成及有丝分裂期纺锤体的形成^[9]。该蛋白在肿瘤组织中的表达尚无文献报道。

抗体是研究蛋白质表达、分布的有效工具之一。本研究首先利用原核表达 CDK5RAP2(1~70 氨基酸)制备 CDK5RAP2 单克隆抗体,获得一株单克隆抗体(5F6),经 CDK5RAP2 敲除细胞免疫荧光鉴定确认其特异性。免疫细胞化学染色表明乳腺癌 MCF-7 细胞质呈明显的阳性反应,从而为该抗体在免疫组化中的应用奠定了基础。

应用该单克隆抗体,在乳腺癌组织标本检测中发现,相对于正常和良性的轻度增生的乳腺组织,导管原位癌($P < 0.001$)、浸润性癌($P < 0.001$)中 CDK5RAP2 的表达明显增加,差异具有统计学意义。因此,可以初步的推测 CDK5RAP2 在乳腺癌的发生、发展中可能起到一定的促进作用。在原位癌、浸

润性癌的发展过程中,细胞的分裂活动变得活跃,细胞的形态发生明显的改变,而决定细胞形态的微管数目和排列也会发生相应变化。

本研究提示,CDK5RAP2 是具有潜能的乳腺癌诊断标志物之一。其在浸润性癌中的强表达提示它可能对于病情的进展具有促进作用。该因子的深入研究有助于加深对于乳腺癌发生、进展机制的认识,并为开发新的肿瘤治疗靶点增加了新的内容。

参考文献

- [1] Doxsey S. Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2001,2:688 - 698.
- [2] Zimmerman W C, Sillibourne J, Rosa J, *et al.* Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentriol controls spindle organization and mitotic entry. *Mol Biol Cell*,2004,15:3642 - 3657.
- [3] Davis L J, Odde D J, Block S M, *et al.* The importance of lattice defects in katanin-mediated microtubule severing in vitro. *Biophys J*,2002,82:2916 - 2927.
- [4] Pihan G A, Purohit A, Wallace J, *et al.* Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res*,2001,61:2212 - 2219.
- [5] Duensing S, Lee L Y, Duensing A, *et al.* The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2000,97:10002 - 10007.
- [6] Ching Y P, Qi Z, Wang J H. Cloning of three novel neuronal Cdk5 activator binding proteins. *Gene*,2000,242:285 - 294.
- [7] Hassan M J, Khurshid M, Azeem Z, *et al.* Previously described sequence variant in CDK5RAP2 gene in a Pakistani family with autosomal recessive primary microcephaly. *BMC Med Genet*,2007,8:58 - 63.
- [8] Bond J, Roberts E, Springell K, *et al.* A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet*,2005,37:353 - 355.
- [9] Fong K W, Choi Y K, Rattner J B, *et al.* CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the {gamma}-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell*,2008,19:115 - 125.
- [10] 蒋毅,陈实平,董红燕,等. SARS 冠状病毒核壳蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. *解剖学报*,2005,36:221 - 223.
- [11] 孟令华,刘巍,宋丽楠,等. BCSG1、C-erbB-2、VEGF 表达与乳腺癌临床病理因素相关性研究. *中华乳腺病杂志(电子版)*,2007,1:82 - 86.
- [12] Sankaran S, Parvin J D. Centrosome function in normal and tumor cells. *J Cell Biochem*,2006,99:1240 - 1250.
- [13] Herblot S, Chastagner P, Samady L, *et al.* IL-2-dependent expression of genes involved in cytoskeleton organization, oncogene regulation, and transcriptional control. *J Immunol*,1999,162:3280 - 3288.
- [14] Lingle W L, Barrett S L, Negron V C, *et al.* Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2002,99:1978 - 1983.

(收稿日期:2008-01-29)

(本文编辑:范林军)

张霖,张彤雯,杨毅,等. 中心体相关蛋白 CDK5RAP2 单克隆抗体的制备及其在乳腺癌中的表达[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*,2008,2(5):554 - 560.