

· 临床研究 ·

Slug 基因在宫颈癌、宫颈上皮内瘤变组织中的表达与意义^{*}

张 铭¹, 张一鸣¹, 蒋丽霞¹, 欧阳俊², 周蓓蓓³

(南京医科大学附属常州市妇幼保健院: 1. 检验科; 2. 病理科; 3. 妇科, 江苏常州 213003)

摘 要:目的 研究转录因子 Slug mRNA 在宫颈癌、宫颈上皮内瘤变(CIN)组织中的表达情况及意义。方法 采用实时定量 PCR 方法检测 56 例宫颈癌组织、60 例 CIN 组织中 Slug mRNA 的相对表达量,以 35 例正常宫颈组织及慢性宫颈炎组织作为对照,并分析其与宫颈癌各临床病理参数的相关性。**结果** 对照组、CIN 组、宫颈癌组 Slug mRNA 相对表达水平分别为 $(1.33 \pm 0.32) \times 10^{-2}$ 、 $(2.99 \pm 0.95) \times 10^{-2}$ 、 $(4.69 \pm 1.02) \times 10^{-2}$,宫颈癌组、CIN 组 Slug mRNA 相对表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);宫颈癌组 Slug mRNA 相对表达水平高于 CIN 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。宫颈癌组织中 Slug 的表达与国际妇产科学联盟(FIGO)分期、淋巴结转移相关,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与年龄、肿瘤大小、病理类型、分化程度无关,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Slug 基因在 CIN、宫颈癌组织中表达上调,可能与宫颈癌的发生、发展及转移密切相关。

关键词: 宫颈肿瘤; Slug 基因; 宫颈上皮内瘤变; 实时定量 PCR

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.36.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)36-3817-03

Expression and clinical significance of Slug gene in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia^{*}

Zhang Ming¹, Zhang Yiming¹, Jiang Lixia¹, Ouyang Jun², Zhou Beibei³

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pathology; 3. Department of Gynecologic, Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression pattern and significance of transcription factor Slug in CIN and cervical cancer tissues. **Methods** The expression of Slug mRNA in tissues of 56 cases of cervical cancer, 60 cases of CIN, 35 cases of normal cervical or chronic cervicitis(control group) was detected by Real-time PCR. The correlation analysis was conducted to assess the relationship between Slug expression and clinical pathological parameters of cervical cancer. **Results** The level of Slug mRNA expression in control group, CIN group and cervical cancer group was $(1.33 \pm 0.32) \times 10^{-2}$, $(2.99 \pm 0.95) \times 10^{-2}$, $(4.69 \pm 1.02) \times 10^{-2}$, respectively, the expression of Slug in cervical cancer group and CIN group was significantly higher than that in control group($P < 0.01$), the expression of Slug in cervical cancer group was significantly higher than that in CIN group($P < 0.01$), Slug expression in the cervical cancer tissues was correlated to FIGO stage and lymph node metastasis($P < 0.05$), but not to age, tumor size, differentiation status of tumor and pathological type($P > 0.05$). **Conclusion** The up-regulated expressions of Slug gene in the CIN and cervical cancer tissues are probably associated with the initiation, progression and metastasis of cervical cancer.

Key words: uterine cervical neoplasms; Slug gene; cervical intraepithelial neoplasia; real-time PCR

宫颈癌是女性最常见的生殖道恶性肿瘤,在发展中国家占女性恶性肿瘤的第 1 位^[1]。宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是与宫颈浸润癌密切相关的一组癌前期病变,它反映宫颈癌发生、发展中的连续过程,但 CIN 不一定都发展为癌, CIN I 期和 II 期是可逆的, III 期是不可逆的^[2]。转录因子 Slug 在多种恶性肿瘤的发生、发展和转移中起重要作用^[3-4],但其在宫颈癌、CIN 组织中的表达情况及意义文献报道甚少。本研究采用实时定量 PCR 方法检测了 Slug mRNA 在宫颈癌、CIN、慢性宫颈炎及正常宫颈组织中的表达,分析宫颈癌组 Slug 表达与临床病理参数的相关性,探讨 Slug 基因在宫颈癌发生发展过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 3 月至 2011 年 12 月,常州市妇幼保健院妇科手术切除的宫颈癌患者组织 56 例,其中鳞癌 46 例;腺癌 10 例;年龄 21~68 岁,中位年龄 46 岁,术前均未接受化疗和放疗。CIN 组织 60 例(I、II、III 期各 20 例);年龄 22~

65 岁,中位年龄 45 岁。同期收集因子宫肌瘤而行子宫全切或因宫颈炎行宫颈活检的正常宫颈或宫颈炎组织标本共 35 例为对照组,年龄 22~66 岁,中位年龄 46 岁。手术取材后立即置于 -70℃ 冻存备用,所有病例均经病理检查确诊。患者均知情同意,研究符合常州市妇幼保健院伦理委员会所制定的伦理学标准并得到委员会的批准。

1.2 仪器和试剂 PCR 仪(2720, ABI 公司)、实时荧光定量 PCR 仪(CFX96, Bio-Rad 公司)、核酸蛋白测定仪(Eppendorf 公司)、TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)、逆转录试剂盒(Fermentas 公司)、实时定量 PCR 检测试剂盒(Toyobo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取和逆转录 取 50~100 mg 组织,放入匀浆器中并加入 1 mL TRIzol 提取 RNA,核酸蛋白质测定仪测定 RNA 样品浓度,取 A_{260}/A_{280} 在 1.80~2.0 之间,且琼脂糖凝胶电泳鉴定质量好的 RNA 标本进行逆转录(不符合要求的 RNA 重新提取),按逆转录试剂盒说明书操作,以 oligo

^{*} 基金项目:南京医科大学科技发展基金面上项目(2011NJMU109);常州市卫生局指导性科技项目(WZ201120)。△ 通讯作者, Tel: 13961257132; E-mail: zmw0701@163.com。

(dT)为引物,合成 cDNA.

1.3.2 引物设计 根据 GenBank 已知基因序列编号 (Slug: NM_003068.4, β -actin: NM_001101.3) 设计引物,由上海生工公司合成,引物序列为: Slug 正向: 5'-CCT GGT TGC TTC AAG GAC AC-3',反向: 5'-TCC ATG CTC TTG CAG CTC TC-3',产物长度为 395 bp. β -actin 正向: 5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3',反向: 5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3',产物长度为 265 bp.

1.3.3 实时定量 PCR 检测 常规方法构建 Slug 基因标准质粒为标准品^[5-6],稀释成 $10^3 \sim 10^7$ copy/ μ L 浓度,构建标准曲线.实时定量 PCR 反应总体积 20 μ L,包括: 2 $\times$ SYBR Green Master Mix 10 μ L, cDNA 模板 1 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), ddH₂O 8 μ L.循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, Slug (60 $^{\circ}$ C)/ β -actin (56 $^{\circ}$ C) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, Slug (78 $^{\circ}$ C)/ β -actin (84 $^{\circ}$ C) 8 s 后采集荧光,共 35 个循环,每个样本重复测定 3 次.由荧光定量 PCR 分析仪附带软件测定并绘制标准曲线. Slug mRNA 相对表达水平 = Slug cDNA 拷贝数/ β -actin cDNA 拷贝数.

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行分析, Slug 的相对表达量经正态性检验服从近似正态分布,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析,组间两两比较采用 LSD *t* 检验(方差齐性),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 标准曲线建立及线性检测范围 实时荧光定量 PCR 检测结果显示, Slug 基因实时定量 PCR 标准曲线方程为 $Y = -3.514X + 45.110$,在 5 个数量级检测范围内,其起始模板量对数值(*X*)与相应反应循环数(*Y*)有良好的线性相关($r^2 = 1.000$),实时定量 PCR 效率 *E* 为 92.6%,说明扩增效率较好,见图 1、2.

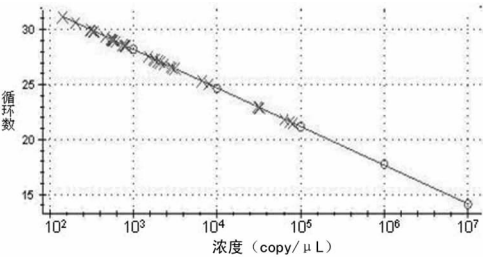


图 1 Slug 基因 SYBR Green 实时荧光 PCR 标准曲线

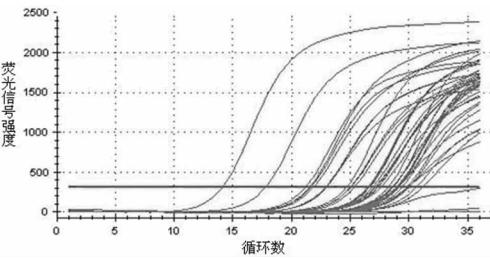


图 2 Slug 基因 SYBR Green 实时荧光 PCR 扩增曲线

2.2 不同宫颈组织中 Slug mRNA 的表达 对照组、CIN 组、宫颈癌组 Slug mRNA 相对表达水平分别为 $(1.33 \pm 0.32) \times 10^{-2}$ 、 $(2.99 \pm 0.95) \times 10^{-2}$ 、 $(4.69 \pm 1.02) \times 10^{-2}$,3 组间差异有统计学意义($F = 56.70, P < 0.01$).两两比较发现,宫颈癌组、CIN 组 Slug mRNA 相对表达水平高于对照组($P <$

0.01),宫颈癌组 Slug mRNA 相对表达水平高于 CIN 组,差异有统计学意义($P < 0.01$).

2.3 宫颈瘤组织中 Slug mRNA 相对表达量与临床病理参数的关系 实时定量 PCR 检测所得 Slug mRNA 相对表达量与宫颈癌的 FIGO 分期、是否有淋巴结转移相关(t 分别为 2.23、2.37, $P < 0.05$),但与年龄、肿瘤大小、病理类型、分化程度无关(t 分别为 0.30、0.42、0.81、1.83, $P > 0.05$),见表 2.

表 2 宫颈癌组织中 Slug 相对表达量与临床病理参数的关系($\bar{x} \pm s$)

观察指标	<i>n</i>	Slug 相对表达量($\times 10^{-2}$)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(年)			0.30	0.77
≤ 46	25	4.62 $\pm$ 0.95		
> 46	31	4.70 $\pm$ 1.05		
FIGO 分期			2.23	0.03
I 期	22	4.32 $\pm$ 1.05		
II 期	34	4.98 $\pm$ 1.10		
肿瘤直径(cm)			0.42	0.68
< 4	38	4.60 $\pm$ 1.02		
≥ 4	18	4.72 $\pm$ 0.98		
病理类型			0.81	0.42
鳞癌	46	4.56 $\pm$ 0.94		
腺癌	10	4.83 $\pm$ 1.01		
分化程度			1.83	0.07
中、高分化	36	4.53 $\pm$ 0.98		
低分化	20	5.02 $\pm$ 0.92		
淋巴结转移			2.37	0.02
有	16	5.22 $\pm$ 1.06		
无	40	4.55 $\pm$ 0.91		

3 讨 论

宫颈癌的发生、发展是一个多步骤、多因素的过程^[7],它是由 CIN 逐步形成的,经历了 CIN I、CIN II、CIN III、原位癌、早期浸润癌和浸润癌连续发展过程.高危型人乳头瘤病毒感染是宫颈癌前病变和浸润性宫颈癌发生的必要条件^[8],其他一些癌基因、抑癌基因也在宫颈癌前病变、宫颈癌的发生、发展中发挥重要作用.上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)是上皮细胞向间质细胞转化的现象,以上皮细胞极性的丧失及其间质特性的获得为主要特征,并与肿瘤细胞的原位侵袭和远处转移有着密切的关系^[9]. E-钙黏着蛋白(E-cadherin)的减少或丢失是 EMT 最重要的标志性变化. Slug 基因是锌指转录因子 Snail 家族成员之一,能够下调 E-cadherin,诱导 EMT 的发生^[10].多项研究表明, Slug 基因过度表达与胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[11-13],其在宫颈癌发生、发展过程中作用尚未见文献报道.

本研究采用实时定量 PCR 方法检测宫颈癌、CIN、慢性宫颈炎及正常宫颈组织中的 Slug 基因的表达,结果显示,对照组、CIN 组、宫颈癌组 Slug mRNA 相对表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$),从正常宫颈及慢性宫颈炎到 CIN 再到宫颈癌的演变中, Slug 基因表达水平逐渐升高,提示 Slug 表达量的

提高可能出现于宫颈恶性转化的早起,可能具有促进这些损伤恶性转化的作用,表明 Slug 表达上调与 CIN、宫颈癌的发生发展有关,有可能作为宫颈癌发生的早期标志物。本研究还发现,Slug 表达水平与宫颈癌的 FIGO 分期、是否有淋巴结转移相关,Ⅱ期相对表达量高于Ⅰ期,淋巴结转移组高于淋巴结未转移组,差异有统计学意义($P<0.05$),但与年龄、肿瘤大小无关,不能为子宫颈癌的病理类型、分化程度提供依据。说明 Slug 不仅参与了 CIN、宫颈癌的发生、发展,还可能与宫颈癌的侵袭和转移密切相关。

综上所述,Slug 在 CIN、宫颈癌组织中的表达增加,可能通过下调 E-cadherin,诱导 EMT 的发生,参与了宫颈癌的发生、发展及转移。随着对 Slug 基因研究的深入,将有助于阐明宫颈癌发生、发展、侵袭、转移的本质,对临床早期诊断宫颈癌、判断 CIN 的发展及肿瘤侵袭转移也有重要指导意义。

参考文献:

[1] Parkin DM, Bray F. Chapter 2: the burden of HPV related cancers[J]. Vaccine, 2006, 24(Suppl 3): 11-25.

[2] 高超, 李保玉, 曲从玲, 等. 宫颈上皮内瘤样病变 108 例的临床病理分析[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2000, 1(7): 26-27.

[3] Kurrey NK, KA, Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level[J]. Gynecol Oncol, 2005, 97(1): 155-165.

[4] Côme C, Magnino F, Bibeau F, et al. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18): 5395-5402.

[5] De Graves FJ, Gao D, Kaltenboeck B. High-sensitivity

quantitative PCR platform [J]. Biotechniques, 2003, 34(1): 106-110, 112-115.

[6] Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, et al. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies [J]. Methods, 2001, 25(4): 443-445.

[7] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer [J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244-265.

[8] 钱德英, 岑坚, 王丁, 等. 高危型人乳头状瘤病毒 DNA 检测与细胞学联合检查对子宫颈癌前病变筛查的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(1): 34-37.

[9] Thierry JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 740-746.

[10] Yu J, Ebert MP, Miehlik S, et al. α -Catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives [J]. Gut, 2000, 46(5): 639-644.

[11] Thierry JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454.

[12] Chart AO. E-cadherin in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(2): 199-203.

[13] Shih JY, Tsai MF, Chang TH, et al. Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(22): 8070-8078.

(收稿日期: 2012-09-24 修回日期: 2012-10-22)

(上接第 3816 页)

[5] Booth-Kewley S, Larson GE. Predictors of psychiatric hospitalization in the Navy [J]. Mil Med, 2005, 170(1): 87-93.

[6] Larson GE, Booth-Kewley S, Merrill LL, et al. Physical symptoms as indicators of depression and anxiety [J]. Mil Med, 2001, 166(9): 796-769.

[7] Liston C, McEwen BS, Casey BJ. Psychosocial stress reversibly disrupts prefrontal processing and attentional control [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(3): 912-917.

[8] Collins WE, Schroeder DJ, Nye LG. Relationships of anxiety scores to screening and training status of air traffic controllers [J]. Aviat Space Environ Med, 1991, 62(3): 236-240.

[9] Kowal DM, Patton JF, Vogel JA. Psychological states and aerobic fitness of male and female recruits before and after basic training [J]. Aviat Space Environ Med, 1978, 49(4): 603-606.

[10] Stander VA, Merrill LL, Thomsen CJ, et al. Posttraumatic stress symptoms in Navy personnel: prevalence rates a-

mong recruits in basic training [J]. J Anxiety Disord, 2007, 21(6): 860-870.

[11] Rona RJ, Hyams KC, Wessely S. Screening for psychological illness in military personnel [J]. JAMA, 2005, 293(10): 1257-1260.

[12] Barbour KA, Edenfield TM, Blumenthal JA. Exercise as a treatment for depression and other psychiatric disorders: a review [J]. J Cardiopulm Rehabil Prev, 2007, 27(6): 359-367.

[13] Carek PJ, Laibstein SE, Carek SM. Exercise for the treatment of depression and anxiety [J]. Int J Psychiatry Med, 2011, 41(1): 15-28.

[14] Herring MP, O'Connor PJ, Dishman RK. The effect of exercise training on anxiety symptoms among patients: a systematic review [J]. Arch Intern Med, 2010, 170(4): 321-331.

[15] Moran DS, Evans RK, Arbel Y. Prediction model for attrition from a combat unit training program [J]. J Strength Cond Res, 2011, 25(11): 2963-2970.

(收稿日期: 2012-07-09 修回日期: 2012-09-25)