

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.03.018

宫颈癌全外显组测定及易感基因研究*

胡蓉,钟田雨,陈晓红

(赣南医学院第一附属医院检验科,江西赣州 341000)

摘要:目的 临床研究微小 RNA-96(MiR-96)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、*Twist* 与 *Slug* 等易感基因在宫颈癌中的表达水平。方法 选择 2010 年 3 月至 2014 年 5 月在该院就诊的宫颈癌患者 128 例为观察组,同时选择健康者 100 例作为对照组。测定 MiR-96、HIF-1 α 、*Twist* 与 *Slug* 等在宫颈癌组织中的表达水平。(1) HIF-1 α :采用 HIF-1 α 试剂盒对单克隆抗体 HIF-1 α 进行检测,按照试剂盒的要求进行染色及制备组织标本,显微镜下观察阳性细胞率大于 10% 者为阳性;(2) MiR-96、*Twist* 与 *Slug*:用 Trizol 试剂按照试剂盒的说明提取总 RNA,将 RNA 进行反转录,通过 PCR 定量检测 MiR-96、*Twist* 与 *Slug* 的相对表达值。结果 (1) HIF-1 α 在正常组织中无阳性表达,而在肿瘤组织中阳性表达率远高于正常组织,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);(2) MiR-96 在肿瘤组织中的相对表达值远高于正常组织,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);(3) *Twist* 与 *Slug* 基因在肿瘤组织中的相对表达量远高于正常组织,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 与正常组织相比,MiR-96、HIF-1 α 、*Twist* 与 *Slug* 基因在肿瘤组织中有显著的高表达。

关键词: 宫颈肿瘤;基因表达;疾病遗传易感性;表达水平

中图分类号:R34

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)03-0340-03

Explicit determination of the whole group of cervical cancer and genetic susceptibility studies*

Hu Rong, Zhong Tianyu, Chen Xiaohong

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Gannan

Medical College, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression levels of MiR-96, HIF-1 α , *Twist* and *Slug* and other predisposing gene in cervical cancer. Methods In this study, 128 patients with cervical cancer treated in our hospital from March 2010 to May 2014 were selected as the observation group, and 100 cases of healthy people were selected as control group. MiR-96, HIF-1 α , *Twist* and *Slug* and other predisposing gene expression levels in cancer tissues were tested. (1) HIF-1 α : HIF-1 α kit was used to detect HIF-1 α monoclonal antibodies, the kit was prepared and stained according to the requirements, and the positive cell rate greater than 10% under the microscope were positive. (2) MiR-96, *Twist* and *Slug*: total RNA was extracted according to the instructions, the RNA was reverse transcribed, the relative expression values MiR-96, *Twist* and *Slug* were detected by quantitative PCR. Results (1) HIF-1 α was not expressed in normal tissues. And in tumor tissues, the positive expression rate was much higher than that of normal tissue, there was a significant difference ($P < 0.05$); (2) the relative expression values of MiR-96 in tumor tissue were much greater than that of normal tissue ($P < 0.05$); (3) the relative expression rate of *Twist* and *Slug* gene in the tumor tissue were also much higher than that of normal organizations ($P < 0.05$). Conclusion Compared with normal tissues, MiR-96, HIF-1 α , *Twist* and *Slug* gene expression in tumor tissues are significantly greater.

Key words: uterine cervical neoplasms; gene expression; genetic predisposition to disease; expression levels

宫颈癌是一种在妇女中多发的恶性肿瘤疾病,其病死率、发病率仅次于乳腺癌,发病年龄越来越趋于年轻^[1]。发展中国家宫颈癌的发病率较高,我国宫颈癌患者约占全球总患者的 1/3,且发病年龄年轻化,对女性的生命健康造成严重威胁,必须引起重视。人乳头瘤病毒(HPV)感染一直被公认为是导致宫颈癌发病的病因^[2-3],这种病毒的感染引发宫颈发生癌前病变,最终引发为宫颈癌。感染 HPV 妇女主要集中在青年和中年女性,但其中只有很少的妇女会发展为癌症,并且感染的过程需要较长的时间,如果做好预防措施,治愈的可能性很大,因此单独的 HPV 感染可能不是导致宫颈癌的主要病因。随着对基因研究的不断深入,特别是对基因多态性的研究发现,在 HPV 感染发展到宫颈癌的过程中,基因的多态性可能起到很大的作用,本研究通过对 128 例宫颈癌妇女与 100 例健康妇女

微小 RNA-96(MiR-96)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、*Twist* 与 *Slug* 基因表达水平的对比分析,评估其表达对宫颈癌发病的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 3 月至 2014 年 5 月在本院就诊的宫颈癌患者 128 例,为观察组。其中鳞癌 110 例(85.9%),腺癌 10 例(7.8%),腺鳞癌 8 例(6.3%),年龄 22~67 岁,平均(45.0 \pm 3.4)岁,手术之前均未接受化疗或者放疗。同时收集同期进行常规体检的健康者 100 例作为对照组,对照组各项化验指标正常并且无肿瘤史。两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 HIF-1 α 表达检测 采用 HIF-1 α 试剂盒(苏州普泰生

* 基金项目:江西省自然科学基金项目(2011ZBAB204018)。

作者简介:胡蓉(1974—),副主任技师,硕士,主要从事分子生物学方向研究。

物技术有限公司)对单克隆抗体 HIF-1 α 进行检测,按照试剂盒要求进行染色及组织标本制备,用显微镜对制备组织进行观察,计数阳性染色细胞数。根据肿瘤细胞染色强度及显色比例,计算阳性细胞率,大于 10%为阳性。

1.2.2 MiR-96 表达检测 将组织标本切成薄片,再研磨成粉末,用 Trizol 试剂按照 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)的说明提取总 RNA,将 RNA 进行反转录,通过 PCR 定量检测 MiR-96 的相对表达值,其正向引物:5'-TTT GGC ACT AGC ACA TT-3';反向引物:5'-TTT GGC ACT AGC ACA TT-3'。引物序列长度肿瘤的分期是按照 WHO 以及国际妇产科协会(FIGO)的肿瘤分期标准。MiR-96 表达以 U6 参数,测得到 Δ Ct 值, Δ Ct = MiR-96 平均 Ct 值 - U6 平均 Ct 值,而 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 就可以反应 MiR-96 的相对表达情况。

1.2.3 Twist 与 Slug 基因表达检测 将组织标本切成薄片,再研磨成粉末,Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取组织 RNA,根据 Twist 与 Slug 基因的序列编号来进行引物的设计, Twist 上游引物序列:5'-ACG AGC TGG ACT CCA AGA TG-3',下游引物序列:5'-GGC ACG ACC TCT TGA GAA TG-3'; Slug 上游引物序列:5'-CCT GGT TGC TTC AAG GAC AC-3',下游引物序列:5'-TCC ATG CTC TTG CAG CTC TC-3',通过 PCR 定量检测 Twist 与 Slug mRNA 的相对表达值。 Twist mRNA 相对表达水平 = Twist 拷贝数 / β -actin 拷贝数, Slug mRNA 相对表达水平 = Slug 拷贝数 / β -actin 拷贝数。

1.3 统计学处理 采用数据处理软件包为 SPSS16.0,计量资料符合正态分布、方差齐性的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HIF-1 α 在两组妇女宫颈组织中的表达 HIF-1 α 在肿瘤组织中的阳性表达率为 75.8%,在正常组织中的表达率为 0%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 HIF-1 α 在两组妇女宫颈组织中的表达结果[n(%)]

组别	例数(n)	3 年存活率	HIF-1 α 阳性
对照组	100	100(100)	0(0)
观察组	128	114(89.1)	97(75.8)
χ^2		5.342	11.373
<i>P</i>		<0.05	<0.05

2.2 MiR-96 在两组妇女宫颈组织中的相对表达值 MiR-96 在正常组织的相对表达值为 1.01 ± 0.16 ,在肿瘤组织中为 44.56 ± 3.67 ,在肿瘤组织中的相对表达值远远高于正常组织,两组进行比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);肿瘤组织 I 期、II 期、III 期 MiR-96 相对表达值分别为 15.43 ± 2.01 、 84.42 ± 7.65 、 456.32 ± 37.32 ,两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 Twist 与 Slug 基因在两组妇女宫颈组织中的表达 Twist 基因在正常组织的相对表达量为 $(2.02 \pm 0.46) \times 10^{-3}$,在肿瘤组织中为 $(6.54 \pm 1.23) \times 10^{-3}$,在肿瘤组织中的相对表达量远远高于正常组织,两组进行比较差异有统计学意义($t = 38.29, P < 0.05$); Slug 基因在正常组织的相对表达量为 $(1.32 \pm 0.34) \times 10^{-2}$,在肿瘤组织中为 $(4.68 \pm 1.02) \times 10^{-2}$,

在肿瘤组织中的相对表达量远远高于正常组织,两组比较,差异有统计学意义($t = 34.87, P < 0.05$)。

3 讨 论

宫颈癌是一种在中老年妇女中高发的癌症疾病,发生率有逐年上升的趋势。HPV 病毒感染一直以来被公认为是导致宫颈癌的主要因素,针对此类病毒的疫苗研制取得了重大进展^[4]。但随着人们对宫颈癌疾病研究的不断深入,发现只有少数的病毒感染者会最终发展为宫颈癌,提示宫颈癌的发生除了 HPV 感染导致以外,环境致癌因素与遗传因素也可能是导致宫颈癌发生的主要因素。遗传因素并不直接导致肿瘤的发生,但它会改变个体的易感性,并且在特殊的条件下被激发。

大量研究报道, MiR-96^[5]、HIF-1 α ^[6]、Twist 与 Slug 基因表达升高可使患宫颈癌的概率大大提高,宫颈癌发生与上述基因的表达有很大的关系^[7]。MiR-96 可能通过调控参与基因的信号通路,从而导致癌细胞的侵袭能力增强,在这个过程中 MiR-96 发挥了与癌基因类似的功能,间接参与了宫颈癌的发生^[8]; Twist 与 Slug 基因,对宫颈癌的发生、侵袭,甚至耐药都有着很大影响,它们的过度表达与乳腺癌、卵巢癌、胃癌等肿瘤的发生、发展关系密切^[9]。HIF-1 α 在肿瘤的发生中起着不可忽视的作用^[10]。肿瘤细胞的快速生长势必会造成肿瘤组织缺氧, HIF-1 α 在应付组织缺氧方面起着重大作用^[11-12],缺氧情况下 HIF-1 α 上调,引起多血管的形成^[13-14],细胞适应缺氧的环境导致肿瘤细胞的继续生长、扩散^[15]。本研究通过对 MiR-96、HIF-1 α 、Twist 与 Slug 等易感基因在宫颈癌组织及正常组织中的表达水平测定,结果显示: HIF-1 α 在正常组织中基本没有阳性表达,而在肿瘤组织中阳性表达率远远高于正常组织; MiR-96 在肿瘤组织中的相对表达值远远高于正常组织,并且随着疾病的进展表达量显著提高; Twist 与 Slug 基因在肿瘤组织中的相对表达量远远高于正常组织;两组进行比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述, MiR-96、HIF-1 α 、Twist 与 Slug 等易感基因均与肿瘤的发生有关,甚至可能是导致宫颈癌发生的重要因素。有必要对上述基因进行进一步的研究,为临床妇科肿瘤的诊断、治疗提供一定的科学依据。

参考文献:

[1] 张铭,张一鸣,左伟,等. 干细胞标志物 SALL4 在宫颈癌中的表达研究[J]. 重庆医学,2014,43(3):285-287.
 [2] Lei T, Mao WM, Lei TH, et al. Incidence and mortality trend of cervical cancer in 11 cancer registries of China [J]. Chin J Cancer Res, 2011, 23(1):10-14.
 [3] Duggan C, Coronado G, Martinez J, et al. Cervical cancer screening and adherence to follow-up among Hispanic women study protocol: a randomized controlled trial to increase the uptake of cervical cancer screening in Hispanic women[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1):170.
 [4] Hu SY, Hong Y, Zhao FH, et al. Prevalence of HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia and attitudes towards HPV vaccination among Chinese women aged 18-25 in Jiangsu province[J]. Chin J Cancer Res, 2011, 23(1):25-32.
 [5] Meng F, Zhao X, Zhang S. Expression and significance of SHP-2 in human papillomavirus infected cervical cancer

- [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32(2):247-251.
- [6] 徐晓英, 汤春辉, 薛晓玲. 高危型 HPV、p16、COX-2 在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2011, 40(12): 1199-1201, 1204.
- [7] Wang D, Wu M, Feng FZ, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios do not predict survival in patients with cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and radical hysterectomy [J]. Chin Med J, 2013, 126(8):1464-1468.
- [8] Chen HW, Liu SS, Miao LF, et al. Inhibitory effect of lanthanum chloride on migration and invasion of cervical cancer cells[J]. J Rare Earth, 2013, 31(1):94-100.
- [9] Liu N, Zhao LJ, Li XP, et al. Histone deacetylase inhibitors inducing human cervical cancer cell apoptosis by decreasing DNA-methyltransferase 3B [J]. Chin Med J, 2012, 125(18):3273-3278.
- [10] Ma YY, Cheng XD, Zhou CY, et al. Value of P16 expression in the triage of liquid-based cervical cytology with atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions[J]. Chin Med J, 2011, 124(16):2443-2447.
- [11] Li B, Li W, Sun YC, et al. Nerve plane-sparing radical hysterectomy: a simplified technique of nerve-sparing radical hysterectomy for invasive cervical cancer[J]. Chin Med J, 2011, 124(12):1807-1812.
- [12] Chadza E, Chirwa E, Maluwa A, et al. Factors that contribute to delay in seeking cervical cancer diagnosis and treatment among women in Malawi[J]. Health, 2013, 4(11):1015-1022.
- [13] Wu S, Lu S, Tao H, et al. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(1):114-119.
- [14] Li K, Jin X, Fang Y, et al. Correlation between physical status of human papilloma virus and cervical carcinogenesis[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32(1):97-102.
- [15] 李婵玉. MMP-9 及其相关因子与宫颈癌[J]. 重庆医学, 2012, 41(33):3545-3547.

(收稿日期:2014-09-08 修回日期:2014-11-18)

(上接第 339 页)

58(10):2887-2894.

- [6] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2013 版)[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8):637-693.
- [7] 何双, 吴淑华, 胡金龙, 等. 自噬调控因子 beclin1 及 mTOR 在大肠腺瘤癌变过程中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(7):920-926.
- [8] Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(3):205-216.
- [9] Liang C, Feng P, Ku B, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(7):688-699.
- [10] Li X, Yan J, Wang L, et al. Beclin1 inhibition promotes autophagy and decreases gemcitabine-induced apoptosis in MiaPaca2 pancreatic cancer cells [J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1):26.
- [11] Wang W, Fan H, Zhou Y, et al. Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5):1501-1505.
- [12] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2):97-110.
- [13] Roxanis I. Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2013, 66(6):517-521.
- [14] Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression [J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(1):76-84.
- [15] 吴建南, 李顺荣, 顾然, 等. 乳腺癌分子分型在新辅助化疗疗效和预后中的预测作用[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2011, 32(3):383-388, 420.

(收稿日期:2014-09-24 修回日期:2014-11-22)

更正说明

《重庆医学》2014 年 12 月 43 卷 35 期 4705-4707 页,“霍奇金淋巴瘤细胞 SHP1 表达与 CD99 表达的关系”一文,所有费用及课题来源于该文第三作者吴自劼的国家自然科学基金(81071659),由于第一作者雷翔慧的疏忽导致遗漏了吴自劼为该文共同通讯作者。经编辑部多方核实,以上情况属实。故特此更正说明,补充吴自劼为该文共同通讯作者, Tel: 13533798728, E-mail: hailian@fimmu.com.

重庆医学编辑部
2015 年 1 月 20 日