

应用 CSC- GE- 80 基因芯片筛查人子宫内膜早期异位种植的血管生长相关基因

王宁宁, 张玉凤, 张红霞, 谭金凤, 谢洪哲, 姚书忠, 庄广伦, 牛刚, 黄建昭, 何勉
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨子宫内膜异位早期种植的相关基因,特别是与早期种植相关的血管生长基因。【方法】采用裸鼠人子宫内膜皮下种植的方法,建立裸鼠人子宫内膜异位症模型,在种植后 14 d,取出成模病灶与未种植内膜进行 CSC- GE- 80 基因芯片筛查比较。【结果】在基因表达谱中最有显著性上调基因 50 个,最有显著性下调基因 47 个,包括生长因子和细胞因子及其受体的变化,其中生长因子受体结合蛋白 10(growth factor receptor-bound protein 10, Grb10) 与丁酸盐反应因子 1 (butyrate response factor 1) 中表皮生长因子 (EGF-response factor 1) 上调明显,下调明显胰岛素样生长因子结合蛋白 7(insulin-like growth factor binding protein 7)。【结论】通过基因筛查我们初步考虑生长因子结合蛋白 10(growth factor receptor-bound protein 10) 有可能参与早期异位内膜的血管生长。

关键词: 子宫内膜异位症; 早期种植; 裸鼠模型; 基因芯片; 血管生长

中图分类号: R711.71

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)02-0155-06

CSC- GE- 80 DNA Microarray Analysis of Angiogenesis Gene Expression in Early Implantation Human Endometriosis Lesion

WANG Ning-ning, ZHANG Yu-feng, ZHANG Hong-xia, TAN Jin-feng, XIE Hong-zhe,
YAO Shu-zhong, ZHUANG Guang-lun, NIU Gang, HUANG Jian-zhao, HE Mian
(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the associated genes expression (especially for angiogenesis genes) of early ectopic implantation human endometrium. 【Methods】 Using the CSC- GE- 80 gene chip to compare the endometriosis subcutaneous after 14 days later from the nude models with the unimplanted endometrium. 【Results】Validation of results of 50 up-regulated and 47 down-regulated genes including growth factors, interleukin factors and their receptors. Our data showed that growth factor receptor-bound protein 10 and butyrate response factor 1 (EGF-response factor 1) upregulated and insulin-like growth factor binding protein 7 downregulated. 【Conclusion】 Growth factor receptor-bound protein 10 is considered possibly to participate the early vessels grow in the endometriosis lesion.

Key words: endometriosis; early implantation; nude mouse model; DNA microarray; angiogenesis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):]

子宫内膜异位种植的原因,一直是人们是人们关注的热点。在我们前期的研究中,通过裸鼠进行人子宫内膜的异位种植,我们发现血管生成及其相关因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在异位内膜的早期种植与生长的过程中,起十分重要的作用^[1,2]。但

子宫内膜异位种植的早期,究竟是哪些基因发生变化或者在这一过程中起作用,仍不十分清楚。我们拟通过基因芯片筛查种植在裸鼠的人子宫内膜异位病灶,为早期的种植相关基因提供了一定的理论依据。

收稿日期: 2006-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672222); 广东省自然科学基金资助项目(4009377); 广东省科技计划项目(2005B34201020); (2006B50107001); 广东省医学科研基金资助项目(B2004035)

作者简介: 王宁宁(1970-)女,辽宁鞍山人,医学博士,副主任医师,妇产科妇科内分泌专业, Email: wangningning21cn@21cn.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

由中山大学实验动物中心提供 SPF 级饲养 BALB/c 裸鼠, 雌性, 体质量 17~21 g, 实验过程饲养在清洁环境, (温度: 22~24℃, 湿度: 45%~70%, 12 h 黑白交替), 每 1 只放 1 笼, 共 5 只, 饲养予以灭菌的水与饲料, 每周添加鸡蛋、葵花籽以增加蛋白质等营养的摄入。

1.2 人子宫内膜组织的获取

子宫内膜取自子宫腺肌症伴盆腔子宫内膜异位症患者 2 例, 年龄分别为 43 与 47 岁。手术前 6 个月未进行激素类药物治疗, 在进行全子宫切除后立即进行内膜组织的刮取, 种植前部分内膜进行 HE 染色组织病理分析。取材后将内膜无菌保存在德氏改良基础培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养液中, 一部分剪成 3 mm×3 mm 大小, 另一部分继续剪成 0.5 mm×0.5 mm 碎屑液, 诊刮后 60 min 内完成皮下种植术。两例患者术后病理均提示子宫腺肌症, 分泌期子宫内膜。

1.3 BALB/c 裸鼠人子宫内膜异位症的模型建立

详细方法参照参考文献[1]进行, 子宫内膜裸鼠皮下异位种植 14 d 成模后取出进行检测。

1.4 主要试剂

Cy3 荧光素标记的单克隆抗-平滑肌肌动蛋白抗体 (Cy3 conjugated monoclonal anti- α -smooth muscle actin clone, 1:400) 购自英国 Sigma 公司; FITC 荧光素标记单克隆羊抗兔抗体 (1:200) 购自美国 Santa Cruz 公司。DMEM 培养液购自 Gibco 公司。Trizol Reagent 购自 Life Technologies 公司。Qiagen RT-PCR、Qiagen 快速 PCR 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。Ambion messageAmp aRNA 试剂盒购自 Ambion 公司。CyScribe cDNA 荧光标记试剂盒购自 Amersham 生物制药技术有限公司。基因表达谱芯片 CSC-GE-80 由深圳微芯公司提供。

1.5 种植病灶的基因芯片检测

1.5.1 总 RNA 提取 保护液中保存的小块新鲜组织采用 Trizol 的方法进行提取与微量扩增、纯化, 把所得到的 cDNA 真空抽干至体积小于 8 μ L, 并保存在 -20℃。接着 RNA 的扩增 aRNA 的纯化

参照试剂盒进行, 将 aRNA 样品于 -80℃ 存放, 取 5~20 μ g 进行反转录标记。

1.5.2 探针标记与芯片杂交 探针标记采用 aRNA 10 μ g, second round primer 1 μ L, Spike RNA 2 μ L, DEPC water 加至 10 μ L, 70℃ 5 min 变性, 然后冰上冷却后, 采用 Buffer 4 μ L, 0.1 mol/L DTT 2 μ L, dNTP mix 1 μ L, dye-dCTP 1 μ L, Ribonuclease Inhibitor 1 μ L, RT 1 μ L, 42℃ 连续 2 h, 反应完毕后, 用 2 μ L 0.5 mol/L NaOH 处理后, 然后用将 pH 值调为中性。采用 QIAquick PCR Purification Kit 纯化按照说明书进行。

芯片杂交通过将玻片放入片夹, 将片夹放入染色缸, 置于摇床上于室温缓慢摇晃 20~30 min, 甩干与干燥, 将标记好的探针 (Cy3/Cy5) 按等量混匀 (各 50 pmol/L), 抽干后, 按顺序加入下列试剂: 杂交缓冲液 7.5 μ L, 甲酰胺 15 μ L, 加灭菌水至总体积 30 μ L; 离心, 95℃ 水浴 5 min, 立刻置于冰上 1 min, 与样品结合, 盖上盖玻片, 42℃ 孵箱中 16 h。迅速放入另一个预先盛有 200~250 mL 预热至 55℃ 的洗脱液 I 染色缸中, 将染色缸置于摇床上于室温缓慢摇晃 20 min; 取出片夹, 再重复洗涤, 干燥。玻片完全干燥后, 放入扫描片夹中, 利用扫描仪 (Generation array scanner, Amersham Pharmacia) 进行扫描; 扫描后将图像转化为基于荧光强度的数字信号 (Imagequant 5.0; Array Vision 6.0), 随后进行数据分析和处理。

1.6 统计学分析

Imagequant 5.0, Array Vision 6.0 进行基因芯片数据处理。检验水准 取 0.05。

2 结果

我们取 14 d 5 个不同裸鼠体内异位病灶与已经保存的同批种植前分泌期人子宫腺肌症子宫内膜一同进行 CSC-GE-80 基因芯片种植前后的筛查如表 1。

芯片结果中, 按照我们的数据筛选标准有 1061 个基因发生了显著性变化 (上下调 2 倍以上), 其中上调表达的基因有 410 个, 下调表达的基因有 651 个。

在筛选出来的有显著性表达差异的基因中, 按照主要的功能分类可以发现明显的特征首先是细胞骨架蛋白结构基因的变化, 初步可以判断组

表 1 实验组样品基因表达谱中参与血管生长相关最有显著性改变的调节基因

Table 1 Significant change of regulation genes associated with angiogenesis in sample specimen

Gene Function	Gene Tag	Ratio- 2000004889	Classifications	Regulation
Growth factor receptor- bound protein 10	GRB10	11.34	FG00 FT01 FT09 SC00	up
Butyrate response factor 1 (EGF- response factor 1)	BRF1	10.31	FB03 SN00	up
Insulin- like growth factor binding protein 7	IGFBP7	- 22.63	FF00 SF00	down

织异位后细胞分化更明显, 体现为平滑肌细胞相关的基因表达明显上调; 其次是与细胞外基质相关的基因表达的变化, 同时还包括生长因子和细胞因子及其受体的变化, 包括生长因子受体结合蛋白 10 (growth factor receptor- bound protein 10) 与丁酸盐反应因子 1 (butyrate response factor 1) 中表皮生长因子 (EGF- response factor 1), 下调明显是胰岛素样生长因子结合蛋白 7 (insulin- like growth factor binding protein 7)。

3 讨 论

3.1 基因芯片在子宫内膜异位症中应用的现状与利弊

子宫内膜组织的异位种植原因探讨一直是人们所感兴趣的方向之一, 既往的研究由于条件限制只能作单个基因的个别筛查, 尚未有就内膜种植的多基因改变作方向性探讨。上世纪 90 年代, 由美国 Affymetrix 公司的 Lipshutz 和 Fodor^[3]提出并开始使用基因芯片技术研究, 至今, 基因芯片技术在医学各个领域中的应用均已取得巨大突破。基因芯片 (gene chip) 又称 DNA 芯片 (DNA CHIP)、DNA 阵列 (DNA arrays)、寡核苷酸微芯片 (oligonucleotide micro- chip), 是指将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交, 再通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描, 并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作出比较和检测, 从而迅速得出所要的信息。达到对检测基因进行定性、定量和结构分析, 确定未知 DNA 分子。用于临床疾病的诊断、遗传相关基因的定位以及新基因寻找。2002 年 Eyster^[4]曾就子宫内膜异位症患者异位与在位内膜组织的基因变化作 4133 个基因检测, 发现在 3 例子宫内膜异位症患者的在位与异位内膜之间有 8 个基因的差异显示, 这 8 个基

因分别 - actin, - 2 actin, vimentin, ribosomal MHC, Complement, L 轻链, Ig germline, 除 - actin, - 2 actin 外, 其余 6 个基因均是内膜的特异性基因。至今, 已经有先后多个实验进行针对在位与异位人子宫内膜的基因差异进行比较^[5-7]。但目前的设计缺陷在于只是限于人体内种植后多年的异位内膜检测, 尚不能对其早期种植过程中参与基因进行筛查。

3.2 基因芯片筛查人子宫内膜早期异位种植的血管生长基因

我们使用的 CSC- GE- 80 人类表达谱基因芯片包括肿瘤、信号传导、免疫与代谢相关等方面共有或特异性表达的基因共 8000 个, 其中包括 VEGF- A、B、C、D、E 与胎盘生长因子 (Placenta growth factor, PlGF), 采用密度大于 5E+08, 比值大于 2 或小于 0.5 作标准。由于本组数据密度值在 5E+08 甚至更小, 由此设定有意义值在上下 2 倍或更高。同时选用在裸鼠种植的 14d 的成模人子宫内膜异位病灶作为研究对象, 本次实验结果中我们集中关注种植后异位内膜组织中细胞外基质基因变化, 包括生长因子和细胞因子及其受体的变化。前期实验表明无论人体还是裸鼠体内种植的人子宫内膜中其血管生成均呈持续升高而无在位内膜的周期性变化, 并与 VEGF 有关^[1-2]。而早期内膜种植过程中还有哪些相关血管生长因子在发生改变值得我们关注。芯片结果表明, 在 14d 种植的异位人子宫内膜中 Grb10 显著升高。Grb10 参与内皮细胞和具有 KDR 受体的细胞在 VEGF 作用后的酪氨酸磷酸化, 为 SH2 引发的信号通道过程所必需, 与胰岛素受体无关, 可能通过 VEGF 上调 Grb10 水平接着使 KDR 受体增加, 从而参与 VEGF 作用增强^[8,9]。芯片 VEGF 含量未能测出明显升高 (仅升高 1.8 倍未达到明显差异), 可能与分泌期子宫腺肌症内膜 VEGF 的含量已经明显高于正常子宫内膜, 异位后未能持续升高有关, 因此不能排除其通过 Grb10 上调内皮细胞的 KDR 受体,

从而促进血管生长, 因此不能否认 VEGF 在内膜异位种植过程中的作用。有关在早期子宫内膜种植时 VEGF 升高的时间目前也有争议, Kressin P^[10] 应用正常妇女的子宫内膜放置在鸡绒毛膜上作体外 EMs 模型观察, 发现在体外培养中 24h 明显升高 10 倍, 并且持续 72h。而 Nisolle^[11] 则发现在将正常妇女的子宫内膜种植在裸鼠腹腔后, 于种植第 1、3、5 d 并未见到腺上皮内 VEGF 蛋白含量增多, 至第 5d 才在基质发现其含量升高。因此在异位种植的内膜中 VEGF 的升高的时间以及除缺氧诱导与雌激素调控外是否存在 Grb10 的作用机制仍需进一步实验证实。

参考文献:

- [1] 王宁宁, 姚书忠, 庄广伦, 等. 裸鼠人子宫内膜异位症模型建立与病灶血管形成相关检测 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(3 增刊): 43- 45.
- [2] 王宁宁, 庄广伦, 黄建昭, 等. 卵巢子宫内膜异位症微血管密度及血管内皮生长因子表达 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(3): 264- 267.
- [3] LIPSHUTZ R J, FODOR S P, GINGERAS T R, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays [J]. Nat Genet, 1999, 21(1 Suppl):20- 24.
- [4] EYSTER K M, BOLES A L, BRANNIAN J D, et al. DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis[J]. Fertil Steril. 2002,77(1):38- 42.
- [5] MATSUZAKI S, CANIS M, POULY J L, et al. Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis [J]. Fertil Steril, 2006, 86(3):548- 553.
- [6] MATSUZAKI S, CANIS M, VAURS- BARRIERE C, et al. DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection [J]. Fertil Steril, 2005, 84 Suppl 2:1180- 9110.
- [7] MATSUZAKI S, CANIS M, VAURS- BARRIERE C, et al. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection [J]. Molecular Human Reproduction, 2004,10(10):719- 728.
- [8] GIORGETTI- PERALDI S, MURDACA J, MAS J C, et al. The adapter protein, Grb10, is a positive regulator of vascular endothelial growth factor signaling [J]. Oncogene, 2001,20(30): 3959- 3968.
- [9] Claesson- Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptor [J]. Biochemical Society Transaction, 2003,31(1):20- 24.
- [10] KRESSIN P, WOLBER E M, WODRICH H, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium[J]. Fertil Steril, 2001, 76(6): 1220- 1224.
- [11] NISOLLE M, CASANAS- ROUX F, DONNEZ J. Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice [J]. Fertil Steril, 2000,74(2):306- 312.

(编辑 张恩健)

(上接第 154 页 from page 154)

- [5] OYAJOB I B O, FRANCHIN G, WILLIAMS P J, et al. Dual effects of macrophage inflammatory protein- 1alpha on osteolysis and tumor burden in the murine 5TGM1 model of myeloma bone disease[J]. Blood, 2003, 102(1): 311- 319.
- [6] ABE M, HIURA K, WILDE J, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)- 1alpha and MIP- 1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma[J]. Blood, 2002, 100(6):2195- 2202.
- [7] UNEDA S, HATA H, MATSUNO F, et al. Macrophage inflammatory protein- 1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM[J]. Br J Haematol, 2003, 120(1):53- 55.
- [8] TERPOS E, POLITOU M, VINIOU N, et al. Significance of macrophage inflammatory protein- 1 alpha (MIP- 1alpha) in multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2005, 46(12):1699- 1707.
- [9] MOLLER C, STROMBERG T, JUREMAM M, et al. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma[J]. Leuke, 2003, 17(1):203- 210.
- [10] OBA Y, LEE J W, EHRLICH L A, et al. MIP- 1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells[J]. Exp Hematol, 2005, 33(3):272- 278.

(编辑 黄小延)