

子宫肌瘤致病相关基因的筛选与克隆

李小毛¹, 李田¹, 杨越波¹, 黄曙方¹, 殷恒讳², 谭蜀艳³

(中山大学 1. 附属第三医院妇产科, 广东 广州 510630; 2. 附属第一医院血管外科, 广东 广州 510080;
3. 广州市黄埔区中医院, 广东 广州 510660)

摘要:【目的】研究子宫肌瘤与正常子宫肌组织中的基因表达差异, 筛选及克隆子宫肌瘤的致病相关基因。【方法】应用荧光标记的 mRNA 差异显示技术, 比较 11 例子子宫肌瘤及其正常子宫肌组织基因表达的差异, 对获得差异片段进行克隆、测序及同源性分析, 并对其中 5 条差异片段在子宫肌瘤及正常子宫肌组织中的表达情况进行 RT-PCR 分析。【结果】差异片段 NO. 3, 5, 11, 12 在子宫肌瘤正常及异常组织中的表达均存在差异。其中 NO.3 差异片段在 8 例子子宫肌瘤组织中有表达, 而相应的正常组织中仅 2 例有表达。NO. 5, 11, 12 差异片段在子宫肌瘤中的表达水平高于正常子宫肌组织中的表达水平。【结论】在子宫肌瘤的发生和发展过程中存在多个基因的表达异常, 其中 ulap8 基因有可能在子宫肌瘤组织中呈特异性的表达, ulap14, ulap25, ulap26 基因在子宫肌瘤组织中存在表达差异, 推测这些基因有可能与子宫肌瘤的发病有关。

关键词:子宫肌瘤; 克隆; 基因; 差异显示

中图分类号: R714

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)06-0684-04

Screening and Cloning of Genes Related to Uterine Leiomyoma

LI Xiao-mao, LI Tian, YANG Yue-bo, HUANG Shu-fang, YIN Heng-hui, TAN Shu-yan

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Department of Vessel Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
3. Huangpu Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 510660, China)

Abstract: 【Objective】 To study the alterations of gene expression between uterine leiomyoma tissues and normal myometrium uterine tissues; to screen and clone the genes related to uterine leiomyoma. 【Methods】 To compare different genes expressed in 11 uterine leiomyoma tissues and normal myometrium uterine tissues by fluorescent differential display reverse transcription polymerase chain reaction (FDD-RT-PCR). Differentially expressed cDNA fragments were cloned, sequenced, and analyzed in origin. And five of differentially expressed bands were analyzed by RT-PCR. 【Results】 The expression of NO. 3, 5, 11, and 12 cDNA fragments in uterine leiomyoma were differential. NO.3 cDNA fragment was expressed in eight of uterine leiomyoma tissue (8/10), but in two of corresponding normal myometrium tissue. NO. 5, 11, and 12 cDNA fragments were expressed higher in uterine leiomyoma tissue than matched myometrium. 【Conclusion】 During occurrence and development of uterine leiomyoma, expression of more than one gene altered in uterine myometrium, ulap8 gene may be expressed specially in uterine leiomyoma tissue. ulap14, ulap25, and ulap26 genes were expressed higher in uterine leiomyoma tissue than matched myometrium, it may be related to the development of uterine leiomyoma.

Key words: uterine leiomyoma; clone; gene; differential display

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005,26(6):684-687]

子宫肌瘤是女性生殖器官中最常见的良性肿瘤, 据国内统计, 妇科住院病例中子宫肌瘤的患病率占 3.3%~20.5%, 大约 70%~80% 的子宫肌瘤发生

于 30~50 岁之间^[1]。目前手术切除仍是子宫肌瘤的主要治疗手段^[2]。寻找在子宫肌瘤发生发展中出现的特异性的基因变化, 将有可能为药物治疗的研究

收稿日期: 2005-07-08

基金项目: 广州市科委科研基金资助项目(2001-J-004-01)

作者简介: 李小毛(1962-), 男, 湖南郴州人, 硕士, 教授. E-mail: tigerlee777@163.com

提供新靶点。实验证实荧光标记 mRNA 差异显示技术可应用于子宫肌瘤的研究中^[3],并已分离出在子宫肌瘤组织中呈低表达的基因片段^[4],现应用该技术对子宫肌瘤组织与正常子宫肌组织之间的基因表达差异状况进行研究,分离在子宫肌瘤组织中呈高表达的基因片段,以期分离到子宫肌瘤的致病相关基因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源 标本来自 2002 年 4 月至 2004 年 2 月间于我院行手术治疗的子宫肌瘤患者 11 例,年龄 33~56 岁,平均年龄 43.5 岁。每例患者均取手术切除的肌瘤组织及瘤旁正常组织,并经病理检查证实。组织离体后立即在液氮中速冻,并置于-70℃冰箱中保存。

1.1.2 试剂 Trizol Reagent(一步法总 RNA 提取试剂)(GIBCO-BRL 公司,美国),FluoroDD and HIEROGLYPH mRNA Profile Kit(Beckman 公司,美国),Superscript 逆转录酶(GIBCO 公司,美国),RNase-free DNase (Roche 公司,美国),dNTP、pGEM-T Easy 载体、EcoR 酶(Promega 公司,美国),E.Z.N.A.Plasmid Miniprep kit (Omega 公司,美国),DNA 片段回收试剂盒(QIAGEN 公司,美国)。

1.1.3 仪器 Genomyx LR™ DNA 测序/差异显示系统及 Genomyx SC™ 荧光图象扫描系统(Beckman 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取及鉴定 参照 TRIzol Reagent 试剂盒说明书分别提取子宫肌瘤组织及正常子宫肌组织的总 RNA。用 RNasefree DNase 清除总 RNA 中的 DNA,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,紫外分光光度计测定浓度及纯度。总 RNA 样品要求完全无降解,且 A_{260}/A_{280} 1.9~2.0。

1.2.2 荧光差异显示 引物由 Beckman 公司提供,包括 4 个锚定引物(22 bp)AP2、AP6、AP7、AP9,以及 3 个随机引物(24 bp)ARP17、ARP18、ARP19。锚定引物 3' 端带有荧光素-4 甲基罗丹明(tetramethylrhodamine, TMR)标记,包含 17 个碱基的 T₇ 通用引物序列;随机引物 5' 端含有 16 个碱基的 M₁₃ 通用引物序列。RT-PCR 反应体系及条件、测序胶电泳及荧光扫描仪的操作均按照使用说明提

供的方法进行。

1.2.3 差异片段的回收及再扩增 用手术刀切取含有明显差异的 cDNA 条带的干胶条,加 50 μL 0.5×TE 缓冲液,37℃水浴 1 h,使 DNA 从胶中溶到 TE 缓冲液中,-20℃保存。将差异片段进行再扩增,反应条件同第一次 PCR 扩增。

1.2.4 PCR 产物的克隆 用 DNA 片段凝胶回收试剂盒将扩增产物回收、纯化。在 *E.coli* XL-1 Blue 感受态制备后,将差异片段与 pGEM-T Easy 载体连接转化,转化后的细菌进行培养及蓝白斑筛选,挑选阳性克隆,以碱裂解法提取重组质粒,经 EcoR 酶切鉴定。

1.2.5 测序及同源性分析 将提取的阳性克隆质粒 DNA 纯化及测序。将每一序列输入 NCBI 文库中用 BLASTN 的 nr 及 dbest 数据库分析其同源性。

1.2.6 RT-PCR 半定量检测 将 10 例患者的子宫肌瘤组织及子宫正常组织提取的总 RNA 进行逆转录。按序列分析结果,用 primer premier 软件设计差异片段的特定引物;以 β-actin 作内部参照物,进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 DD-PCR 显示差异条带

子宫肌瘤组织和正常子宫肌组织的 cDNA 扩增产物中存在着 300~900 bp 大小不等的差异片段,从 12 对两两比较的变性胶中,按照 cDNA 条带的灰度比大于 2.0 或小于 0.5 确定回收并挑选差异条带 No.2,3,5,11,12,13 进行重扩增,其中 No.2,13 条带在正常子宫肌组织中高表达,No.3,5,11,12 条带在子宫肌瘤组织中高表达(图 1)。

2.2 差异 cDNA 片段的再扩增

将选取的 6 条差异条带用 M13 和 T7 通用引物进行二次 PCR 扩增,将扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察,见各泳道都没有出现混杂条带,分子大小与显示结果相符。

2.3 cDNA 片段测序及同源性分析

将 6 条 cDNA 差异条带进行克隆,酶切鉴定,测序及同源性比较。序列测定后采用 Blast 软件与 GenBank 的数据库序列进行同源性检索,其中差异片段 No.2 为已知序列 Homo sapiens clone GCRG 114 mRNA sequence;序列同源性分别为 96%,其余的为未知功能的 cDNA 序列。

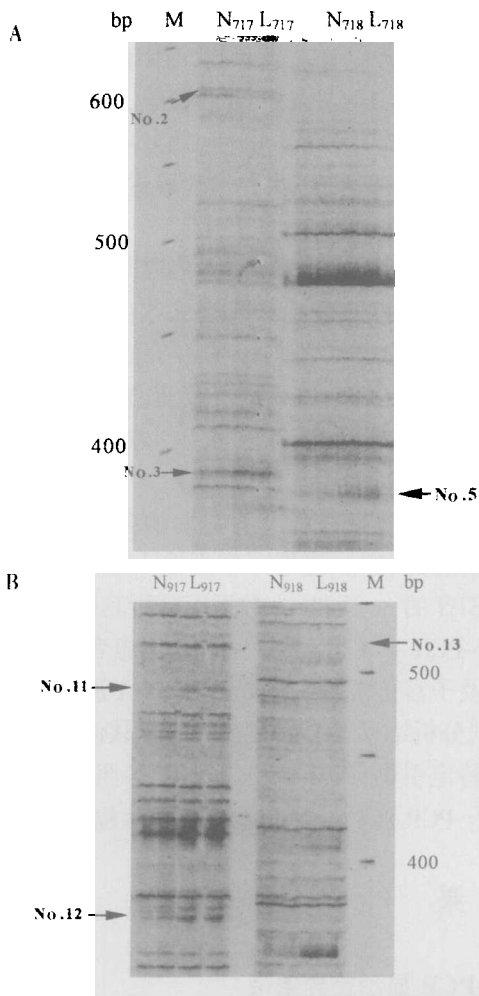


图1 荧光差异显示聚丙烯酰胺凝胶电泳显示差异条带
Fig.1 The differentially expressed cDNA bands showed on polyacrylamide gel electrophoresis of fluorescent differential display

A; M: DNA marker; N: normal myometrium tissue; L: uterine leiomyoma; 717: combination of primer sets made of anchored primer AP7 and arbitrary reverse primer ARP17; 718: combination of primer sets made of anchored primer AP7 and arbitrary reverse primer ARP18.

B; M: DNA marker; N: normal myometrium tissue; L: uterine leiomyoma; 917: combination of primer sets made of anchored primer AP9 and arbitrary reverse primer ARP17; 918: combination of primer sets made of anchored primer AP9 and arbitrary reverse primer ARP18; The arrows indicated the bands of differentially expressed cDNA fragments

2.3 RT-PCR 检测

将 4 条未知功能的,且在子宫肌瘤组织中呈高表达的差异片段在子宫肌瘤中的表达状况进行 RT-PCR 半定量验证,发现差异片段 No. 3,5,11, 12 在子宫肌瘤正常及异常组织中的表达均存在差

异。其中 No.3 差异片段在 8 例子宫肌瘤组织中有表达,而相应的正常组织中仅 2 例有表达,且表达水平较子宫肌瘤组织中的低,另外 2 例患者中的肌瘤及正常子宫肌组织中均无表达(图 2)。No. 5,11, 12 差异片段在绝大多数子宫肌瘤组织及正常子宫肌组织中均有表达,且在子宫肌瘤中的表达水平高于正常子宫肌组织中的表达水平(图 3)。

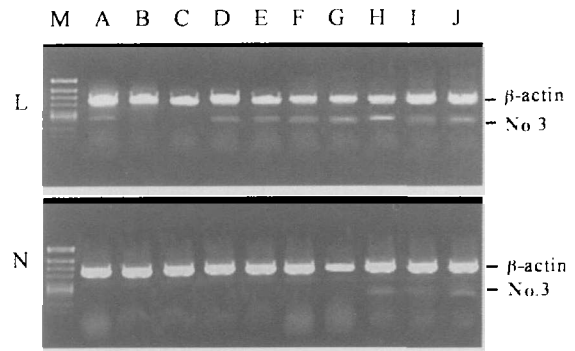


图 2 No.3 的 RT-PCR 检测
Fig.2 RT-PCR result of No.3

M: DNA maker(ϕ X174 *Hinc* II digest); A-J: patient's number; L: uterine leiomyoma; N: normal myometrium tissue

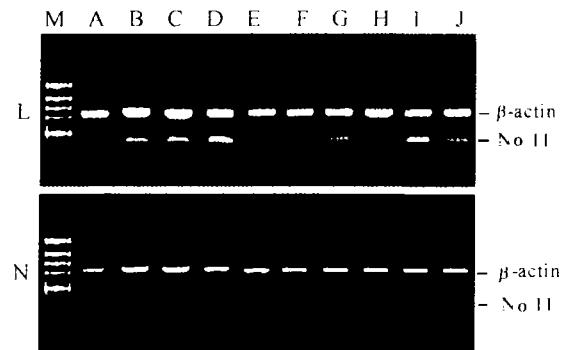


图 3 No.11 的 RT-PCR 检测
Fig. 3 RT-PCR result of No.11

M: DNA maker(ϕ X174 *Hinc* II digest); A-J: patient's number; L: uterine leiomyoma; N: normal myometrium tissue

2.4 新的 cDNA 片段提交 GenBank

将发现的 4 条新的 cDNA 序列 (No.3, 5, 11, 12) 提交 GenBank, 并已获取序列号 No.3 序列号为 AB175890, 基因名称 ulap8, 定位于 5 号染色体; No.5 序列号为 AB175892, 基因名称 ulap14, 定位于 1 号染色体; No.11 序列号为 AB175893, 基因名称 ulap25, 未知来源; No.12 序列号为 AB175891, 基因名称 ulap26, 定位于染色体 1p21.1-21.3。

3 讨论

研究表明子宫肌瘤的发生发展受体内多种因素影响,包括雌、孕激素及其受体,各种生长因子及其受体等,随着分子生物学技术的发展,发现细胞凋亡相关基因及抑癌基因^[9]等与子宫肌瘤的发生及发展存在相关性,但在子宫肌瘤发生发展过程中,仍有许多基因变化需要进行深入的研究。

mRNA 差异显示技术 (mRNA differential display, mRNA DD)是 1992 年 Liang 等^[6]发展的用于筛选差异表达基因的一种有效的方法,既可以发现已知基因的表达差异,也可以发现未知基因的差异表达。该项技术具有快速、灵敏度高、重复性好等优点,自问世以来已得到广泛应用,在肿瘤^[7,8]及其他疾病^[9]的病因等方面均检测出有意义的差异表达基因。Pambuccian 等^[10]应用银染法 mRNA 差异显示技术对子宫肌瘤进行研究,发现 ERG-1(early growth response1)基因 mRNA 的浓度在子宫肌瘤组织降低,推测该基因在子宫肌瘤的发生和发展中起了重要的作用。荧光标记的 mRNA 差异显示技术则是基于荧光素用于测序的原理,对原有的 mRNA 差异显示技术进行改进,可直接在荧光扫描仪上确定差异条带。

本研究应用荧光标记的 mRNA 差异显示技术可进行子宫肌瘤致病相关基因的筛选^[3]。实验研究发现在子宫肌瘤组织中呈低表达的 No.2 差异片段与 GCRG114 基因序列同源性达 96%, GenBank 检索已知 GCRG114 基因序列定位于 6p22.3,是王刚石等在进行人胃癌低表达 cDNA 片段筛选的研究中发现,功能仍不清。研究已证实 GCRG114 基因在子宫肌瘤组织及正常子宫肌组织中均可以有表达,且子宫肌瘤中的表达水平低于正常子宫肌组织中的表达水平,表明该基因与子宫肌瘤的发病有关^[4],有可能在抑制正常子宫肌细胞向子宫肌瘤细胞转化的过程中发挥作用。本实验进一步研究在子宫肌瘤组织中呈高表达的 4 条新的 cDNA 序列(No.3,5,11,12),在 GenBank 获取的序列号分别为 AB175890、AB175892、AB175893、AB175891,在差异显示及 RT-PCR 实验中均证实这 4 条基因片段在子宫肌瘤中均呈现高表达状况。其中定位于 5 号染色体的 ulap8 基因在 8 例(8/10)子宫肌瘤组织中有表达,而相应的正常组织中仅 2

例(2/10)有表达,且表达水平较子宫肌瘤组织中的低,推测该基因有可能在子宫肌瘤组织中呈特异性的表达,而子宫肌瘤是良性肿瘤,其特异性表达的基因并不多见,该基因的深入研究将有可能为子宫肌瘤的发病机制提供新的线索。ulap14,ulap25,ulap26 基因在子宫肌瘤及相应正常子宫肌组织中均可以有表达,且子宫肌瘤组织中的表达量较高,故推测这些基因有可能与子宫肌瘤的发病有关,其基因功能的变化可能是子宫肌瘤众多发病因素中的某个环节或是病变的结果,其具体功能尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 王世闯. 子宫肌瘤[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2000.1-3.
- [2] 李小毛,范建辉,侯红瑛,等. 腹式子宫切除术的临床评价[J]. 中国现代手术学杂志,2000,4(2):132-4.
- [3] 李小毛,李田,殷恒伟. 应用荧光标记信使核糖核酸差异显示技术分离子宫肌瘤相关基因片段[J]. 新医学,2003,34(8):472-4.
- [4] 李田,李小毛,殷恒伟,等. 子宫肌瘤致病相关基因的初步研究[J]. 癌症,2004,23(3):292-5.
- [5] Denschlag D, Bettendorf H, Watermann D, et al. Polymorphism of the p53 tumor suppressor gene is associated with susceptibility to uterine leiomyoma[J]. Fertil Steril, 2005, 84(1):162-6.
- [6] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257(5072): 967-71.
- [7] Fischer H, Chen J, Skoog L, et al. Cyclin D2 expression in familial and sporadic breast cancer[J]. Oncol Rep. 2002, 9(6):1157-61.
- [8] Maeng HY, Choi DK, Takeuchi M, et al. Appearance of osteonectin-expressing fibroblastic cells in early rat stomach carcinogenesis and stomach tumors induced with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [J]. Jpn J Cancer Res. 2002,93(9):960-7.
- [9] 臧林泉,银巍,皮荣标,等. 荧光差异显示 PCR 克隆大鼠脑缺血相关基因 KIAA0280[J]. 中山大学学报(医学科学版),2004,25(2):97-101.
- [10] Pambuccian CA, Oprea GM, Lakatua DJ. Reduced expression of early growth response -1 gene in leiomyoma as identified by mRNA differential display [J]. Gynecol Oncol, 2002,84(3):431-6.

(编辑 张恩健)