

SALL4 基因在宫颈癌、宫颈上皮内瘤变组织和血浆中表达的研究

巢浩界¹,张 铭^{1*},张一鸣¹,左 伟²,周蓓蓓³

(¹南京医科大学附属常州妇幼保健院检验科,²病案室,³妇科,江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:研究 SALL4 基因在宫颈癌、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)组织和血浆中的表达情况并探讨其意义。方法:采用实时定量 PCR 方法检测 56 例宫颈癌患者、120 例 CIN 患者组织和血浆中 SALL4 mRNA 的表达,以 35 例正常宫颈及慢性宫颈炎组织和血浆作为对照,分析宫颈癌组织和血浆中 SALL4 mRNA 相对表达量的相关性。并用 ELISA 方法检测各组血浆中 SALL4 水平。结果:对照组、CIN I 组、CIN II~III 组、宫颈癌组组织中 SALL4 mRNA 相对表达水平分别为 $(4.58 \pm 0.64) \times 10^{-4}$ 、 $(6.86 \pm 0.72) \times 10^{-4}$ 、 $(27.03 \pm 2.85) \times 10^{-4}$ 、 $(40.8 \pm 5.50) \times 10^{-4}$, 血浆中 SALL4 mRNA 相对表达水平分别为 $(0.14 \pm 0.05) \times 10^{-4}$ 、 $(0.16 \pm 0.07) \times 10^{-4}$ 、 $(0.49 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ 、 $(2.18 \pm 0.22) \times 10^{-4}$, 血浆中 SALL4 的浓度分别为 $(237 \pm 45) \mu\text{g/L}$ 、 $(256 \pm 59) \mu\text{g/L}$ 、 $(713 \pm 62) \mu\text{g/L}$ 、 $(1\ 135 \pm 107) \mu\text{g/L}$,随着病变的逐步进展,SALL4 的表达逐渐增强,其中 SALL4 在宫颈癌组中的表达显著增强,与其他各组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。宫颈癌组组织和血浆中 SALL4 mRNA 的相对表达水平正相关($r = 0.684, P < 0.01$)。结论:SALL4 基因在 CIN、宫颈癌组织和血浆中表达上调,可能在宫颈癌发生、发展中起一定作用。

[关键词] SALL4 基因;宫颈癌;宫颈上皮内瘤变;实时定量 PCR;酶联免疫吸附试验

[中图分类号] R737

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-188-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140213

Expression and clinical significance of SALL4 gene in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia

Chao Haojie¹,Zhang Ming^{1*},Zhang Yiming¹,Zuo Wei²,Zhou Beibei³

(¹Department of Clinical Laboratory,²Department of Medical Record,³Department of Gynecologic,Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU,Changzhou 213003,China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression pattern and significance of SALL4 gene in CIN and cervical cancer. **Methods:** The expression of SALL4 mRNA in tissues and plasma of 56 cases of cervical cancer,120 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 SALL4 expression in tissues and plasma of cervical cancer group. The levels of SALL4 in plasma were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Results:** The tissue levels of SALL4 mRNA expression in the the control group,CIN I group,CIN II~III group and cervical cancer group were $(4.58 \pm 0.64) \times 10^{-4}$ 、 $(6.86 \pm 0.72) \times 10^{-4}$ 、 $(27.03 \pm 2.85) \times 10^{-4}$ and $(40.8 \pm 5.50) \times 10^{-4}$. The plasma levels of SALL4 mRNA expression were $(0.14 \pm 0.05) \times 10^{-4}$ 、 $(0.16 \pm 0.07) \times 10^{-4}$ 、 $(0.49 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ and $(2.18 \pm 0.22) \times 10^{-4}$. The concentration of SALL4 in plasma were $(237 \pm 45) \mu\text{g/L}$ 、 $(256 \pm 59) \mu\text{g/L}$ 、 $(713 \pm 62) \mu\text{g/L}$ and $(1\ 135 \pm 107) \mu\text{g/L}$, respectively. With the progress of cervical disease,the expression of SALL4 was increasing gradually,the expression of SALL4 in cervical cancer group was higher than that in other groups($P < 0.01$). A positive correlation between SALL4 expression in tissues and plasma was observed in cervical cancer group ($r = 0.684, P < 0.01$). **Conclusion:** SALL4 expression was up-regulated in the CIN and cervical cancer tissues and plasma,and it may be probably associated with the initiation,progression of cervical cancer..

[Key words] SALL4 gene;cervical cancer;cervical intraepithelial neoplasia;real-time PCR;ELISA

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(02):188-191]

[基金项目] 常州市科技计划指导性项目(CY20120018);常州市卫生局指导性科技项目(WZ201120)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:zmoz0701@163.com

宫颈癌为妇科常见恶性肿瘤,国内外对宫颈癌的病因作了大量的研究,多数学者认为是多因素作用的结果,其研究多集中于人乳头瘤病毒感染、早婚、多产、宫颈糜烂及性激素失调等因素^[1],也有学

者提出了肿瘤干细胞学说^[2]。SALL4 是一种锌指蛋白转录因子,近年来发现,SALL4 基因是维持胚胎干细胞功能的重要调控基因,在肿瘤发生发展过程中扮演了重要的角色^[3-4]。国内关于 SALL4 基因在宫颈癌、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)组织和血浆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 SALL4 mRNA 在宫颈癌、CIN 患者组织和血浆中的表达,ELISA 方法检测各组血浆中 SALL4 水平,探讨 SALL4 基因在宫颈癌发生发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2010 年 1 月~2011 年 8 月在常州市妇幼保健院妇科手术的宫颈癌患者 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,每例收集术前血浆标本、癌组织标本、术后 2 周血浆标本;CIN 组织 120 例(I、II、III 期各 40 例),年龄 21~67 岁,中位年龄 45 岁,每例包括组织标本和血浆标本;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,同时收集相应血浆标本,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。

PCR 仪(2720,ABI 公司,美国),实时荧光定量 PCR 仪(CFX96,Bio-Rad 公司,美国),核酸蛋白测定仪(Eppendorf 公司,德国),Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国),逆转录试剂盒(Fermentas 公司,加拿大),实时定量 PCR 检测试剂盒(TOYOBO 公司,日本),Total RNA Miniprep Kit (Axygen 公司,美国)。SALL4 ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 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,血浆中 RNA 按试剂盒说明书操作提取,核酸蛋白质测定仪测定 RNA 样品浓度,取 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间,且琼脂糖凝胶电泳鉴定质量好的 RNA 标本进行逆转录。按逆转录试剂盒说明书操作,以 oligo(dT)为引物,合成 cDNA。

1.2.2 引物设计

根据 GenBank 已知基因序列编号(SALL4;

NM_020436.3, β -actin:NM_001101.3) 设计引物,由上海生工公司合成,SALL4 基因正向引物:5'-TCGATGGCCAACCTTCCTTC-3',反向引物:5'-GAGCG-GACTCACACTGGAGA-3',产物长度为 142 bp。 β -actin 正向引物:5'-CACGAACTACCTTCAACTCC-3',反向引物:5'-CATACTCCTG CTTGCTGATC-3',产物长度为 265 bp。

1.2.3 Real-time PCR

常规方法构建 SALL4 基因标准质粒^[5],稀释成 $10^3\sim 10^7$ copies/ μ l 浓度,构建标准曲线。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,正、反向引物各 0.5 μ l (10 μ mol/L),ddH₂O 8 μ l。PCR 循环参数为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,SALL4(62℃)/ β -actin(56℃)退火 30 s,72℃延伸 30 s,SALL4(82℃)/ β -actin(84℃)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 仪附带软件测定并绘制标准曲线。SALL4 相对表达水平 = SALL4 cDNA 拷贝数/ β -actin cDNA 拷贝数。

1.2.4 ELISA

检测血浆中 SALL4 浓度,试剂盒批内批间 CV 分别为 2.3%~9.1%、5.7%~8.2%,严格按照试剂说明书操作,所有样本使用双孔检测,CV 超过 10%重新检测。

1.3 统计学方法

用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。SALL4 的相对表达量经正态性检验服从近似正态分布,采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)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),相关性用线性回归分析, $P \leq 0.05$ 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

将 SALL4 基因重组质粒标准品原液用 1 \times TE 溶液按 10 倍梯度稀释成 $10^3\sim 10^7$ copies/ μ l 数量级标准品,进行实时荧光定量 PCR 检测。结果显示,SALL4 基因实时定量 PCR 标准曲线方程为 $Y = -3.718X + 39.510$,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($R^2 = 1.000$),Real-time PCR 效率 E 为 93.5%,说明扩增效率较好(图 1,2)。

2.2 不同宫颈病变组织和血浆中 SALL4 mRNA 的表达

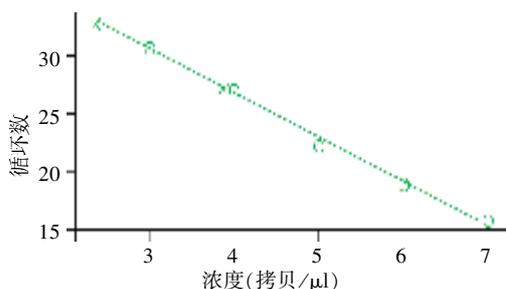


图 1 SALL4 基因 SYBR Green 实时荧光 PCR 标准曲线
Figure 1 The standard curves of SALL4 gene by SYBR green real-time PCR

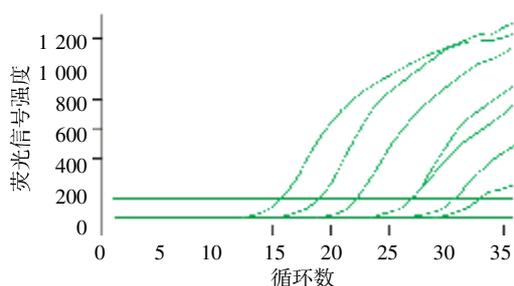


图 2 SALL4 基因 SYBR Green 实时荧光 PCR 扩增曲线
Figure 2 The amplification curves of SALL4 gene by SYBR green real-time PCR

SALL4 和 β -actin 基因的标准曲线由荧光定量 PCR 仪附带软件绘制, 相关系数(r)分别为 0.999 和 0.996。实时定量 PCR 结果显示宫颈癌组、CIN II~III 组组织和血浆中 SALL4 mRNA 相对表达水平均高于对照组和 CIN I 组($P < 0.01$), 宫颈癌组组织和血浆中 SALL4 的相对表达水平高于 CIN II~III 组($P < 0.01$), CIN I 组组织中 SALL4 的相对表达水平高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 而 CIN I 组血浆中 SALL4 的相对表达水平与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 不同宫颈病变组织和血浆中 SALL4 mRNA 的表达
Table 1 The expression of SALL4 mRNA in tissues plasma of cervical lesion ($\times 10^{-4}$)

组别	n	血浆中相对表达量	组织中相对表达量
对照组	35	0.14 \pm 0.05	4.58 \pm 0.64
CIN I 组	40	0.16 \pm 0.07	6.86 \pm 0.72*
CIN II~III 组	80	0.49 \pm 0.08**	27.03 \pm 2.85**
宫颈癌组	56	2.18 \pm 0.22** Δ	40.8 \pm 5.50** Δ

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 CIN I 组比较, ** $P < 0.01$; 与 CIN II~III 组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

2.3 血浆中 SALL4 蛋白的表达

ELISA 检测结果显示, 对照组、CIN I 组、CIN II~III 组、宫颈癌组血浆中 SALL4 的浓度分别为(237 \pm 45) $\mu\text{g/L}$ 、(256 \pm 59) $\mu\text{g/L}$ 、(713 \pm 62) $\mu\text{g/L}$ 、(1 135 \pm

107) $\mu\text{g/L}$, 4 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 两两比较发现, CIN II~III 组 SALL4 水平高于对照组和 CIN I 组 ($P < 0.01$), 宫颈癌组 SALL4 水平高于其他 3 组 ($P < 0.01$), 而对照组和 CIN I 组血浆中 SALL4 的浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 宫颈癌组织和血浆中 SALL4 mRNA 相对表达量的相关性

宫颈癌组组织中 SALL4 的 mRNA 的相对表达水平与血浆中 SALL4 的 mRNA 的相对表达水平进行直线回归分析, 回归方程为: $y = 14.653x + 10.224$, 相关系数为 $r = 0.684$ ($P < 0.01$), 决定系数为 0.468, 表明宫颈癌组组织和血浆中 SALL4 的 mRNA 的相对表达水平正相关(图 3)。

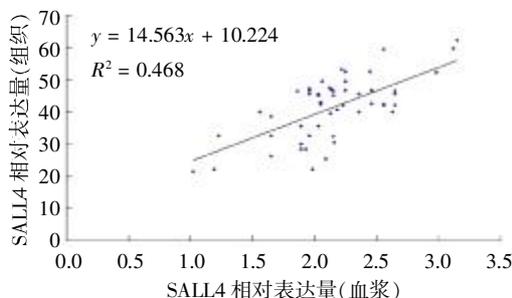


图 3 血浆和组织中 SALL4 相对表达量的相关性
Figure 3 The correlation between SALL4 expression in tissues and plasma

3 讨论

1959 年, MAKINO 首次提出肿瘤干细胞假说, 他认为肿瘤可能由肿瘤干细胞产生, 根据肿瘤干细胞理论, 肿瘤组织中存在极少量瘤细胞充当干细胞的角色, 具有无限增生的潜能, 肿瘤的生长、转移、复发是靠少数的肿瘤干细胞不断自我更新以及繁衍来维持和促成的^[6-7], 近年的研究已报道, 从血液肿瘤、乳腺癌及神经系统肿瘤中初步分离出肿瘤干细胞, 为这一理论提供了强有力证据。SALL4 是胚胎干细胞中特异表达的基因, SALL 基因家族包括 SALL1、SALL2、SALL3、SALL4。SALL4 定位于人类染色体 20q13, 包括 SALL4A 和 SALL4B 2 种亚型, 含有 4 个外显子, 目前 SALL4 基因的研究多集中于一些与造血系统疾病及生殖细胞肿瘤方面的疾病^[8-12], 基于肿瘤干细胞理论, 检测 SALL4 基因在宫颈癌中的表达状况具有非常重要的意义。

宫颈癌是由宫颈癌前病变(即 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^[13-14]。癌基因、抑癌基因在宫颈癌前病变、宫颈癌的发生、发展中发挥重要作

用。本研究采用实时定量PCR方法检测了56例宫颈癌、120例CIN(I、II、III期各40例)、35例慢性宫颈炎及正常宫颈组织和血浆中SALL4基因的表达,运用ELISA方法检测了各组血浆中SALL4的浓度,结果显示宫颈癌组SALL4表达水平显著高于其他3组,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),从正常宫颈及慢性宫颈炎到CIN I、CIN II、CIN III再到宫颈癌的演变中,SALL4基因表达水平逐渐升高,提示SALL4表达量的提高可能现于宫颈恶性转化的早期,可能具有促进这些损伤恶性转化的作用,表明SALL4基因表达上调与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。作为胚胎干细胞的基因,SALL4在肿瘤中的高表达提示宫颈细胞癌变过程中可能存在胚胎基因的激活,也有研究者认为这是干细胞致癌的一种证据^[15]。4组研究对象血浆标本中SALL4表达水平存在差异,为宫颈癌和SALL4关系的研究提供了微创性的可能。本研究还对宫颈癌组织和血浆中SALL4 mRNA的相对表达量进行了相关性分析,发现宫颈癌组织和血浆中SALL4 mRNA的相对表达水平呈中度正相关($r = 0.684, P < 0.05$),这可能与肿瘤细胞呈间隙性释放入血有关。

[参考文献]

- [1] Parkin DM, Bray F. Chapter 2: the burden of HPV related cancers [J]. Vaccine, 2006, 24(Suppl3): 11-25
- [2] Vlashi E, Kim K, Lagadec C, et al. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells [J]. J National Cancer Institute, 2009, 101(11): 833-835
- [3] Liu A, Cheng L, Du J, et al. Diagnostic utility of novel stem cell marker SALL4, OCT4, NANOG, SOX2, UTF1 and TCl1 in primary mediastinal germ cell tumors [J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34(5): 697-706
- [4] Yang J, Gao C, Chai L, et al. A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells [J]. PLOS One, 2010, 5(5): e10766
- [5] 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
- [6] Li F, Tiede B, Massague J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis [J]. Cell Res, 2007, 17(1): 3214-3215
- [7] Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? [J]. Nat Med, 2009, 15(9): 1010-1012
- [8] Wu Q, Chen X, Zhang J, et al. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281(34): 24090-24094
- [9] Yang J, Chai L, Gao C, et al. SALL4 is a key regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells [J]. Blood, 2008, 112(3): 805-813
- [10] Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, et al. SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is over expressed at early clinical stages in breast cancer [J]. Int J Oncol, 2011, 38(4): 933-939
- [11] Li F, Tiede B, Massague J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis [J]. Cell Res, 2007, 17(1): 3214-3215
- [12] Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, et al. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant [J]. Cancer Cell, 2003, 4(5): 361-370
- [13] 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
- [14] 高超, 李保玉, 曲从玲, 等. 子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, 7(1): 26-27
- [15] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radio resistance in cancer stem cells [J]. Nature, 2009, 458(7239): 780-783

[收稿日期] 2013-08-07