

实时荧光定量 PCR 检测宫腔脱落细胞中 P27^{kip1} 及 cyclin E 基因的表达及意义*

李菊香¹, 潘云燕¹, 曹玲¹, 文惠方¹, 葛万文¹, 杨佩琦¹, 沈明辉¹, 张尚弟¹, 常运朝², 胡巍³, 车团结^{2,3△} (1. 兰州大学第二医院, 兰州 730000; 2. 甘肃省功能基因组与分子诊断重点实验室, 兰州 730000; 3. 甘肃省基因芯片公共服务平台, 兰州 730000)

【摘要】目的 探讨宫腔脱落细胞中 P27^{kip1}、cyclin E 基因的表达在子宫内膜癌早期诊断中的意义。**方法** 收集健康志愿者及子宫内膜癌患者宫腔脱落细胞样本共 80 例; 提取总 RNA, 采用实时荧光定量 PCR 法检测目的基因的表达, 比较健康志愿者及子宫内膜癌患者宫腔脱落细胞中 P27^{kip1}、cyclin E 基因表达量的差异。**结果** 荧光定量 PCR 结果显示, P27^{kip1} 基因在健康志愿者宫腔脱落细胞中的表达显著高于子宫内膜癌患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并随恶性程度升高, P27^{kip1} 的表达水平降低, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); cyclin E 基因的表达随恶性程度的增高而增高, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 联合检测 P27^{kip1} 和 cyclin E 基因可作为子宫内膜癌早期诊断的依据。

【关键词】 实时荧光定量 PCR; 子宫内膜癌; P27^{kip1}; cyclin E; 早期诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.12.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)12-1681-03

Real-time quantitative PCR in determination of P27^{kip1} and cyclin E expression in ntrauterine exfoliated cells and its clinical relevance* LI Ju-xiang¹, PAN Yun-yan¹, CAO Ling¹, WEN Hui-fang¹, GE Wan-wen¹, YANG Pei-qi¹, SHEN Ming-hui¹, ZHANG Shang-di¹, CHANG Yun-chao², HU Wei³, CHE Tuan-jie^{2,3△} (1. Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Key Laboratory of Functional Genomics and Molecular Diagnosis, Lanzhou, Gansu 730000, China; 3. Gene Chip Public Service Platform in Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China)

【Abstract】Objective To detect the expression of P27^{kip1} and cyclin E genes in intrauterine exfoliated cells of endometrial cancer and normal people and explore its clinical relevance in diagnosing and prognostic monitoring. **Methods** 80 cases about intrauterine exfoliated cells of the endometrial cancer patients and normal people were collected and extracted the total RNA. And the target genes were detected by the real-time quantitative PCR and calculate the data through the method of $\Delta\Delta Ct$. Then compare the expression of P27^{kip1} and cyclin E genes in endometrial cancer patient and normal people. All the experimental data were statistically analyzed by SPSS17.0 software. **Results**

The real-time quantitative PCR dedicated that the expression of P27^{kip1} gene in normal people was higher than endometrial cancer patients ($P < 0.05$). With the increasing degree of malignancy, the expression of P27^{kip1} was significantly reduced ($P < 0.05$). The expression of cyclin E gene was presented a negative correlation with P27^{kip1}. **Conclusion** Real-time fluorescent quantitative PCR can sensitively and specifically detected the expression of P27^{kip1} and cyclin E in the intrauterine exfoliate cells. There has a close relationship between the expression of P27^{kip1} and cyclin E and the development of endometrial cancer. The research has provide us some theory and data support of the diagnosing and monitoring of endometrial cancer.

【Key words】 real-time quantitative PCR; endometrial cancer; P27^{kip1} gene; cyclin E gene; early diagnosis

子宫内膜癌(EMC)占女性生殖系统恶性肿瘤的 20%~30%, 近年来其发病率及发病年龄呈上升和年轻化趋势^[1-2]。目前医院对 EMC 的诊断普遍采用诊刮术配以病理学检查的方法, 检出率和准确性较低^[3]。同时, 诊刮术给患者带来极大痛苦, 因此开发更简便易行、无痛、价廉、准确性高、能对高危患者进行初筛的检查方法显得尤为迫切。随着分子生物学的迅猛发展, 基因检测可能将成为子宫内膜癌早期诊断, 筛查高危人群的主要手段^[4]。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用内膜管收集 2006~2011 年兰州大学

第二医院妇产科、甘肃省人民医院妇产科原发性子宫内膜癌患者宫腔脱落细胞样本共 60 例(患者组), 年龄 38~70 岁, 平均年龄(54.5±15.6)岁, 所有患者术前均未做放疗、化疗及免疫治疗。根据 FIGO 2009 年子宫内膜癌分期标准, I 期 33 例, II 期 22 例, III 期以上 15 例, 所有病例临床资料完整。同时收集健康志愿者宫腔脱落细胞样本 20 例作为健康对照组, 2 组研究对象的年龄、绝经状态等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 检测方法 根据 PubMed 公布的 P27^{kip1}、cyclin E 的 cD-

* 基金项目: 甘肃省科学计划项目(113JHTA003); 兰州市科学计划项目(2010-1-143)。

作者简介: 李菊香, 女, 本科, 副主任护师, 主要从事妇产科宫颈瘤筛查、母婴保健、优生优育、母婴健康教育及管理研究。△ 通讯作者, E-mail: chetj@126.com。

NA 序列设计特异性引物,以 β -actin 为内参照;Trizol 法提取所有研究对象的样本总 RNA,将其逆转录为 cDNA,全部 cDNA 浓度均调整为 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$,进行 PCR 反应之前,所有 cDNA 样本、引物浓度等均标准化;将制备好的 cDNA($10 \text{ ng}/\mu\text{L}$)各取 $1 \mu\text{L}$ 在 ABI Prism 7300 Real-time PCR 仪上进行实时 PCR 反应,PCR 循环参数: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min、 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 31 s,40 个循环,目的基因的扩增效率和管家基因的扩增效率一致,实验结果应用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法进行相对定量^[5]。见表 1。

表 1 引物序列表

基因类型	引物序列(5'~3')	长度 (bp)
P27 ^{kip1}	上游:CAA GTA CGA GTG GCA AGA GGT G	172
	下游:ATG CGT GTC CTC AGA GTT AGC C	
Cyclin E	上游:GAG GCG TGC GTT TGC TTT TA	163
	下游:GGT GTC TGG AGG TGG CTG GT	
β -actin	上游:TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG	205
	下游:CTG GAA GGA GGA CAG CGA GG	

1.3 仪器与试剂 电子分析天平(日本岛津株式会社),低温冷冻超速离心机(德国 GAMR),System 9700 PCR 仪(美国 ABI),稳压电泳系统(北京六一厂),电热恒温水箱(北京长安科学仪器厂),凝胶成像系统(美国 ABI),MDF1-290 超低温冰箱(日本三洋),ABI Prism 7300 Real-time PCR 仪(美国 ABI)。Trizol 试剂,逆转录酶,Oligd(T15)引物,引物合成,荧光定量检测试剂盒,琼脂糖均购自 TaKaRa 公司;其余试剂均为国产产品。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本应用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组研究对象宫腔脱落细胞中 P27^{kip1} 的表达 实时荧光定量 PCR 法检测结果显示,2 组 P27^{kip1} 基因的表达量有一定变化趋势($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} < 1$ 表示表达量较健康对照组降低, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} > 1$ 表示表达量较健康对照组升高),健康对照组与患者组各期患者比较,其表达量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 III 期以上比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);I 期、II 期、III 期以上各组 P27^{kip1} 表达量依次下降,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 P27^{kip1} 基因的表达量在健康者及子宫内膜癌患者宫腔脱落细胞中的表达量存在差异,随恶性程度增高,P27^{kip1} 表达量降低。见表 2。

表 2 所有研究对象 P27^{kip1} 在宫腔脱落细胞中的表达结果比较

组别	n	ΔCt	$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	P
健康对照组	20	-3.056 ± 0.165	0.165	1.000(0.892~1.121)	< 0.05
患者组					
I 期	33	-2.293 ± 0.146	0.146	0.589(0.904~1.106)	< 0.05
II 期	22	-1.743 ± 0.667	0.667	0.402(0.928~1.078)	< 0.05
III 期以上	15	6.704 ± 0.752	1.752	0.001(0.594~1.684)	< 0.05

2.2 2 组研究对象宫腔脱落细胞中 cyclin E 的表达 实时荧光定量 PCR 结果显示($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} < 1$ 表示表达量较健康对照组降

低, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} > 1$ 表示表达量较健康对照组升高),健康对照组与患者组各期比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 III 期以上比较差异有统计学意义($P < 0.01$);I、II、III 期以上各组组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 cyclin E 基因的表达量在子宫内膜癌及健康者的表达量存在明显差异,呈一定的变化规律,随着恶性程度增高,其表达量也升高,且与 P27^{kip1} 的表达呈负相关。见表 3 和图 1。

表 3 所有研究对象 cyclin E 在宫腔脱落细胞中的表达结果比较

组别	n	ΔCt	$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	P
健康对照组	20	9.985 ± 0.952	0.952	1.000 (0.517~1.195)	< 0.05
患者组					
I 期	33	8.178 ± 0.834	0.834	3.499 (0.904~1.106)	< 0.05
II 期	33	7.209 ± 0.667	0.801	6.850 (0.928~1.078)	< 0.05
III 期以上	15	6.106 ± 1.012	1.012	14.713 (0.594~1.684)	< 0.05

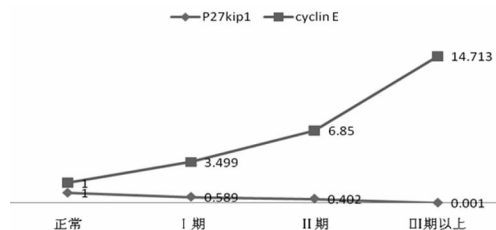


图 1 P27^{kip1} 及 cyclin E 在宫腔脱落细胞中表达量的变化趋势

2.3 P27^{kip1} 及 cyclin E 基因与子宫内膜癌的相关性分析 P27^{kip1} 及 cyclin E 基因与子宫内膜癌的发生、发展密切相关,两者在子宫内膜癌患者宫腔脱落细胞中发生异常表达,且随着恶性程度的升高,两基因的表达呈现一定的变化规律,P27^{kip1} 低表达而 cyclin E 高表达,提示 P27^{kip1} 和 cyclin E 基因可作为子宫内膜癌早期诊断的标志物。

3 讨 论

EMC 是女性生殖道三大恶性肿瘤之一,随着近些年人类生活环境的改变,子宫内膜癌的发病率呈现逐年上升趋势及年轻化趋势^[1]。Loukovaara 等^[2]对美国女性子宫内膜癌的发病及病死率进行统计,发现 2009 年全美新增子宫内膜癌病例 42 160 例,病死 7 780 例,在女性生殖道恶性肿瘤中发病率第一。目前,临床对子宫内膜的诊断及确诊常采用宫腔镜检查、诊断性刮宫等方法,此类方法在不同程度上给患者生理及心理造成了极大的伤害和痛苦,且此类方法的诊断结果有 80% 患者都为良性,这与临床实际情况不符^[3]。而宫腔脱落细胞样本收集方法简单,无痛,因此本研究收集健康志愿者及患者宫腔脱落细胞样本,通过荧光定量 PCR 技术检测脱落细胞中肿瘤相关标志物的表达变化情况,达到对子宫内膜癌的早期诊断。

有研究表明,EMC 的发生同其他肿瘤的发生、发展一样,均由多种基因共同参与和协同作用,同样与抑癌基因失活或突变、原癌基因激活等有关^[6]。本研究结果显示,利用荧光定量 PCR 法检测宫腔脱落细胞中 P27^{kip1} 及 cyclinE 基因表达变化规律与文献报道的利用子宫内膜癌组织为样本的检测结果相一致^[7]。提示宫腔脱落细胞样本可作为检测样本对子宫内膜癌进行广谱型筛查,同时为子宫内膜癌甚至是其他癌症的早期诊断供了一种新的思路和检测方法。

相关研究报道,P27^{kip1} 基因是调控细胞周期并抑制细胞分裂的重要基因,是目前细胞分子生物学、肿瘤分子生物学等学科的研究热点,P27^{kip1} 蛋白具有高度同源性的热稳定蛋白质,

对肿瘤的发生、发展及预后作用国外已有众多报道,如结直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等^[8-11]。Hewedi 等^[12]的研究发现细胞分化程度越低,恶性程度越高,P27^{kip1} 阳性表达率越低,提示 P27^{kip1} 的异常表达与子宫内膜癌的分化程度有密切关系。本研究结果表明,健康对照组, I、II、III 期以上患者组宫腔脱落细胞中 P27^{kip1} 蛋白的表达量呈现出一定的变化趋势, I、II、III 期以上患者组与健康对照组比较,表达量依次显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$), III 期以上患者组与健康对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$); I、II、III 期以上患者组之间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);由此可见 P27^{kip1} 的表达量在各组宫腔脱落细胞中的表达量呈一定的变化趋势,随着恶性程度增高,其表达量降低,这一结果与有关文献报道一致^[13]。提示检测宫腔脱落细胞中 P27^{kip1} 基因的表达对子宫内膜癌的早期诊断具有一定的指导意义。

细胞周期素 E(cyclin E)是细胞 G₁ 期分泌的蛋白,与细胞周期素依赖性激酶(CDK)-2 在 G₁ 期末结合而发挥作用,促进细胞进入 S 期,但是如果其过度表达可导致细胞增殖失控,是肿瘤发生、发展的内在原因之一^[14]。Guthalu 等^[15]的研究显示, cyclin E 与肿瘤的发生、发展关系密切。本研究结果提示,各组宫腔脱落细胞中, cyclin E 的基因表达健康对照组与患者组各期比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与患者组 III 期以上比较,差异有统计学意义($P < 0.01$); I、II、III 期以上 cyclin E 的表达量依次呈上升趋势,患者组之间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);随着恶性程度增高, cyclin E 表达升高,结果与 P27^{kip1} 的检测结果呈负相关,这是因为在正常细胞中 P27^{kip1} 是 CDK 抑制因子之一,其参与细胞的增殖和分化调控,并能抑制 cyclin E 与 CDK2 分子结合,阻止细胞由 G₁ 期进入 S 期,从而抑制细胞的增殖^[16]。当 P27^{kip1} 的表达失活或异常时,由 P27^{kip1} 参与的细胞增殖和分化调控失控,同时 cyclin E 表达升高,细胞向癌变发展^[17]。

本研究结果表明,P27^{kip1} 与 cyclin E 基因是癌症发生、发展整个复杂过程中其中 2 个比较关键的因子,两者在子宫内膜癌的发生、发展及恶性化过程中,其表达量存在微妙的变化规律,随着恶性程度升高,P27^{kip1} 的表达量降低而 cyclin E 基因表达量升高,两者的表达变化呈负相关。所以同时检测宫腔脱落细胞中 P27^{kip1} 及 cyclin E 基因的表达量变化对子宫内膜癌的早期诊断具有临床意义,同时也为子宫内膜癌或其他癌症的诊断提供了一定的思路和方法。

参考文献

[1] Bregar A, Robison K, Dizon DS. Update on the chemotherapeutic management of endometrial cancer[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2014, 12(10): 659-665.

[2] Loukovaara M, Luomaranta A, Leminen A. Treatment of endometrial carcinoma[J]. Duodecim, 2014, 130(22-23): 2348-2355.

[3] Rakha E, Wong SC, Soomro I, et al. Clinical outcome of atypical endometrial hyperplasia diagnosed on an endometrial biopsy: institutional experience and review of literature[J]. Am J Surg Pathol, 2012, 36(11): 1683-1690.

[4] Lino-Silva LS, de León DC, Salcedo-Hernández RA, et al. A high body mass index is not a worse prognostic factor for endometrial carcinoma in a predominantly obese popu-

lation[J]. Clin Transl Oncol, 2013, 15(3): 243-247.

[5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[6] Kattan MB, Canman CE, Leonard CJ, et al. P53 cell cycle control and apoptosis; implications for cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 1995, 14(1): 3-15.

[7] Akli S, Zhang XQ, Bondaruk J, et al. Low molecular weight cyclin E is associated with p27-resistant, high-grade, high-stage and invasive bladder cancer[J]. Cell Cycle, 2012, 11(7): 1468-1476.

[8] Gezginc ST, Celik C, Dogan NU, et al. Expression of cyclin A, cyclin E and p27 in normal, hyperplastic and frankly malignant endometrial samples[J]. J Obstet Gynaecol, 2013, 33(5): 508-511.

[9] Li F, Cao H, Wu Y. Expression and their significance of Jab1 P27^{kip1} in laryngeal squamous cell carcinoma and Hep-2 cells[J]. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2012, 26(6): 252-255.

[10] Halina A, Artur P, Barbara MK, et al. Alterations in TP53, cyclin D2, c-Myc, p21WAF1/CIP1 and P27^{kip1} expression associated with progression in B-CLL[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2010, 48(4): 534-541.

[11] Esposito V. Prognostic role of the cyclin dependent kinase inhibitor P27^{kip1} in nonsmall cell lung cancer[J]. Cancer Res, 1997, 57(10): 3381-3385.

[12] Hewedi IH, Osman WM, Mahdy MM. Differential expression of cyclin D1 in human pituitary tumors; relation to MIB-1 and p27/Kip1 labeling indices[J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2011, 23(4): 171-179.

[13] 岑慧, 柯佩琪, 王丽, 等. PTEN、P27 基因甲基化及蛋白表达与子宫内膜癌发生发展的关系[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(1): 28-31.

[14] Zhou YJ, Xie YT, Gu J, et al. Overexpression of cyclin E isoforms correlates with poor prognosis in rectal cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2011, 37(12): 1078-1084.

[15] Guthalu N, Joshi-Gokhale S, Harb G, et al. Parathyroid hormone-related protein enhances human cell proliferation and function with associated induction of cyclin-dependent kinase 2 and cyclin E expression[J]. Diabetes, 2010, 59(12): 3131-3138.

[16] Heeran MC, Hgdall CK, Kjaer SK, et al. Limited prognostic value of tissue protein expression levels of cyclin E in Danish ovarian cancer patients: from the Danish MAL-OVA ovarian cancer study[J]. APMIS, 2012, 120(10): 846-854.

[17] Lin F, Lin P, Zhao D, et al. Sox2 targets cyclin E, p27 and survivin to regulate androgen-independent human prostate cancer cell proliferation and apoptosis[J]. Cell Prolif, 2012, 45(3): 207-216.