

nm23-H1 和 p53 基因在子宫内膜异位症患者异位组织中的表达及意义

汪根莲^{1,2} 林爱琴² 段仁杰² 李铁臣² 孙 青¹

(1. 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 妇产科, 安徽 芜湖 241001; 2. 皖南医学院 分子生物学研究室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 通过对子宫内膜异位症患者的异位内膜组织和正常对照组子宫内膜组织中 nm23-H1 基因和 p53 基因 mRNA 表达水平的研究, 探讨 nm23-H1 基因和 p53 基因在子宫内膜异位症发生中的作用以及两基因表达的相关性。方法: 收集 30 例子宫内膜异位症患者的异位内膜组织和 30 例正常对照组子宫内膜组织标本, 用 qRT-PCR 方法检测 nm23-H1 基因和 p53 基因在两组中的表达, 并分析两基因表达的相关性。结果: ①相比于正常子宫内膜组织, nm23-H1 基因和 p53 基因在异位内膜组织中的表达均下调, 其表达差异具有统计学意义 ($t = 2.575, P = 0.015$ vs $t = 2.708, P = 0.011$)。②nm23-H1 基因和 p53 基因在子宫内膜异位症患者异位内膜组织中的表达有一定相关性 ($r = 0.42, P = 0.02$)。结论: nm23-H1 基因和 p53 基因 mRNA 表达水平的下降可能与子宫内膜异位症的发生、发展相关。nm23-H1 基因可能通过 p53 途径导致子宫内膜异位症的发生, 其确切机制仍有待进一步研究。

【关键词】子宫内膜异位症; nm23-H1; p53; real-time qPCR

【中图分类号】R 711.71 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.01.002

Expression and implication of nm23-H1 and p53 gene in endometriosis

WANG Genlian LIN Aiqin DUAN Renjie LI Tiechen SUN Qing

Department of Obstetrics and Gynecology, The first Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To investigate the mRNA expression level of nm23-H1 and p53 gene in subjects with normal endometrium or endometriosis for clarifying the roles of the two genes in the pathogenesis and development of endometriosis. **Methods:** Endometrium samples were retrospectively obtained from healthy women ($n = 30$) and patients with endometriosis ($n = 30$). Real-time quantitative PCR was performed to determine the mRNA expression level of nm23-H1 and p53 gene in the two groups, and the relationship between the two genes were analyzed. **Results:** By comparison with the normal endometrial tissues, patients with endometriosis had down-regulated mRNA expression levels of nm23-H1 and P53 gene ($t = 2.575, P = 0.015$ vs $t = 2.708, P = 0.011$) in which the two genes were correlated to a certain extent ($r = 0.42, P = 0.02$). **Conclusion:** Down-regulated levels of nm23-H1 gene and p53 gene may be associated with the occurrence and development of endometriosis, and nm23-H1 gene leading to endometriosis may be involved in the alteration of p53. However, the exact mechanism remains to be further clarified.

【Keywords】 endometriosis; nm23-H1; p53; real-time quantitative PCR

子宫内膜异位症是常见的妇科疾病^[1-2], 育龄妇女中的发病率约为 10%^[1-2], 患者主要表现为慢性盆腔疼痛、痛经等症状^[1-3], 其中近一半的患者合并不孕症^[2-3]。该病虽然是一种良性疾病, 却具有恶性肿瘤浸润和转移的特点^[3-4], 因而可能具有与癌症相类似的发病机制, 某些抑癌基因和肿瘤转移抑制基因可能参与该病的发生与发展。nm23-H1 基因是一个重要的肿瘤转移抑制基因, 与多种肿瘤的转移潜能负相关^[5]; p53 基因是迄今发现与肿瘤发生最相关的基因, 人类 50% 的癌症出现该基因的突变和表达异常^[6]。

本研究采集子宫内膜异位症患者的异位内膜组

织和正常对照组织标本各 30 例, 运用 qRT-PCR 方法检测两组间 nm23-H1 基因和 p53 基因的表达, 比较两基因在子宫内膜异位症组和正常对照组中的表达差异及分析两基因表达之间的关联性, 探讨抑癌基因和肿瘤转移抑制基因在内异症发生中的作用及其机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料 30 例子宫内膜异位症组织标本来自 2014 年 9 月 ~ 2015 年 3 月皖南医学院附属弋矶山医院妇产科经开腹或腹腔镜手术切除标本, 均为卵巢巧克力囊肿, 患者无特殊疾病史, 术前 3 个月内未采用过激素治疗, 年龄 24 ~ 49 岁, 平均年龄 (34 ±

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2014A267)

收稿日期: 2015-07-02

作者简介: 汪根莲 (1981-), 女, 2013 级硕士研究生, (电话) 13605632467, (电子信箱) 2603542847@qq.com;

孙 青, 女, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) sunqingl@126.com, 通讯作者。

4.6) 岁。30 例对照组标本为同期妇产科门诊行诊断性刮宫的育龄妇女的正常子宫内膜,均为增生期子宫内膜,患者年龄 25 ~ 50 岁,平均年龄(42 ± 3.5) 岁。

以上所有标本均经镜下病理检查证实。术中无菌条件下采集组织标本后置于存有样本保存液的无菌无 RNA 酶的离心管内,4℃ 冰箱过夜后转入干燥离心管中,-20℃ 低温冰箱保存,用于后续实验。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采用 TRIzol(Invitrogen, 美国)一步法常规提取组织总 RNA。紫外分光光度计检测总 RNA 浓度与纯度,将 RNA 的终浓度调至 1 μg/μL。随后逆转录合成 cDNA,反应总容量 30 μL,先配制混合液 A(容量 14 μL):3 μL Oligo dT (15) (Promega 公司)、2 μL RNA、9 μL ddH₂O,混匀、离心,70℃ 反应 5 min,迅速置于冰上 3 min,然后加入混合液 B(容量 16 μL):5 × RT buffer 6 μL、M-MLV 1 μL、dNTPs 1.5 μL(均为 Promega 公司产品)、RNasin 0.5 μL、ddH₂O 7 μL。42℃ 反应 60 min 后 95℃ 5 min 灭活反转录酶,反转录产物置于 -20℃ 冰箱保存或立即进行下游实验。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 根据文献^[7]合成 p53 基因引物序列,使用 NCBI 数据库进行 nm23-H1 和 β-actin 序列的查找,采用 Primer 5.0 进行引物设计,引物由上海捷瑞生物有限公司合成,序列见表 1。用 qRT-PCR 方法对子宫内膜异位症异位内膜组织和正常子宫内膜组织中的 nm23-H1 和 p53 表达进行定量检测。qRT-PCR 反应采用 Maxima SYBR Green/ROX qPCR 试剂盒进行,体系 12 μL,置于 ABI-7500 PCR 仪上 50℃ 2 min,95℃ 10 min 后 95℃ 15 s、60℃ 1 min 共 40 循环。以 β-actin 为内参,用 2^{-ΔΔCT} 法计算相对定量结果。

表 1 qPCR 实验中的引物序列(5'→3')

基因	引物序列	片段大小/bp
β-actin	F-CTCCATCTGGCCTCGCTGT	267
	R-GCTGTACCTTCACCGTTCC	
nm23-H1	F-GACCGTCCATTCTTTGCC	93
	R-GCCCGTCTTACCACATT	
p53	F-AGGCCTTGGAACTCAAGGAT	85
	R-CCCTTTTGGACTTCAGGTC	

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行统计分析。所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 t 检验分析两组中 nm23-H1 和 p53 在 mRNA 水平上表达的差异,并对 nm23-H1 和 p53 的表达水平进行相关分

析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 nm23-H1 基因在子宫内膜异位症中的表达 nm23-H1 基因在子宫内膜异位症组和正常对照组中 mRNA 表达水平分别为 0.67 ± 0.29 和 1.23 ± 1.15,子宫内膜异位症异位内膜组织中 nm23-H1 的 mRNA 表达水平低于正常对照组,差异有统计学意义(t = 2.575, P < 0.05),见表 2。

2.2 p53 基因在子宫内膜异位症中的表达 p53 基因在子宫内膜异位症和正常对照组中的 mRNA 表达水平分别为 0.51 ± 0.42 和 1.62 ± 2.2,子宫内膜异位症异位内膜组织中 p53 基因的 mRNA 表达低于正常对照组,差异有统计学意义(t = 2.708, P < 0.05),见表 2。

表 2 子宫内膜异位症组和正常对照组中 nm23-H1 基因和 p53 基因 mRNA 表达强度的比较

组别	n	nm23-H1	p53
对照组	30	1.23 ± 1.15	1.62 ± 2.2
病例组	30	0.67 ± 0.29	0.51 ± 0.42

2.3 nm23-H1 和 p53 基因表达的相关性 子宫内膜异位症异位内膜组织中 nm23-H1 基因和 p53 基因 mRNA 表达水平均下调,两者在子宫内膜异位症患者的异位内膜组织中的表达有一定的相关性(r = 0.42, P = 0.02),正常对照组中 nm23-H1 基因和 p53 基因的表达无相关性(r = 0.093, P = 0.62)。

3 讨论

子宫内膜异位症是极具侵袭性和复发性、严重影响妇女健康和生活的妇科疑难病,目前致病机制仍不明确^[1-3]。该病虽然是一种良性疾病,却具有恶性肿瘤浸润和转移的特点,因而可能具有某些与癌症相类似的发病机制,一些肿瘤转移抑制基因在疾病的发生、发展中可能发挥一定的作用。

nm23 基因是第一个被发现的肿瘤转移抑制基因^[5]。已知 nm23 基因家族有 10 个成员^[8]: H1 ~ H10,其中 nm23-H1 与肿瘤转移关系密切^[8-9]。研究证实 nm23-H1 基因与多种肿瘤的转移潜能负相关,与病人生存期正相关^[8-10]。其抑制肿瘤转移的机制尚不明确^[8-11]。

nm23-H1 基因在子宫内膜异位症中的作用研究不多, Schneider 等^[12]的研究发现,在 16 例盆腔子宫内膜异位症患者中仅 7 例表达了 nm23 蛋白(阳性率为 43.7%),本实验室前期研究结果^[13]也显示子宫内膜异位症中 nm23-H1 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于各自的正常子宫内膜对照组。本研究表

明, nm23-H1 基因在子宫内膜异位症异位内膜组织中的表达下调, 低于正常对照组, 这与 Schneider 等及本实验室前期研究结果一致, 表明 nm23-H1 基因与子宫内膜异位症的发生有一定的关联。

p53 基因是迄今发现与肿瘤发生最相关的基因, 野生型 p53 基因是重要的肿瘤抑制基因, 参与细胞周期调控, 与细胞增殖、凋亡相关^[6]。p53 基因的突变和表达异常频繁出现在人类多种癌症中。p53 基因是否在子宫内膜异位症中发挥作用仍是不明确的。Schneider 等^[12]使用免疫组织化学方法在子宫内膜异位症中未检测到 p53 的表达。Govatati 等^[14]研究表明, 子宫内膜异位症患者异位内膜 p53 基因表达下调与印度妇女子宫内膜异位症发病风险相关。本研究发现异位内膜组织中 p53 基因 mRNA 表达水平低于正常对照组, 该基因表达的异常可能是子宫内膜异位症发病的一个重要机制。

Jung 等^[15]研究表明 nm23-H1 可直接与 p53 相互作用, 增加 p53 核易位(nuclear translocation), 从而激活 p53 的功能。而 p53 基因作为雌激素受体的负性调控因子可能通过类固醇信号通路间接调节 nm23-H1 的表达^[16]。本实验发现子宫内膜异位症异位内膜组织中 nm23-H1 基因和 p53 基因 mRNA 表达水平均下调, 两者在子宫内膜异位症患者的异位内膜组织中的表达有一定的相关性, 而在正常对照组中两者表达无相关性。子宫内膜异位症是雌激素依赖性疾病^[1-3], 研究表明^[17]雌、孕激素可通过 PIK3/Akt 通道调节 nm23-H1 的表达。激素的改变可能通过影响 nm23-H1 基因的表达导致子宫内膜异位症的发生。在体内高雌激素水平下, nm23-H1 基因和 p53 基因可能相互协同、相互作用, 共同促进子宫内膜异位症的发生。

子宫内膜异位症是多因素疾病, 其发生、发展是一个复杂的过程, 肿瘤转移抑制基因和抑癌基因的表达失调可能在其中发挥重要的作用, 对 nm23-H1 基因在子宫内膜异位症发生中的作用及其机制的研究可能为子宫内膜异位症的发病机制和临床治疗手段提供新的思路和分子靶。

【参考文献】

- [1] BONOCHER CM, MONTENEGRO ML, ROSA E, SILVA JC *et al.* Endometriosis and physical exercises: a systematic review [J]. *Reprod BiEndocrinol* 2014 6(12): 4-9.
- [2] EMRE A, AKBULUT S, YILMAZ M *et al.* An unusual cause of acute appendicitis: Appendiceal endometriosis [J]. *Int J Surg Case Rep* 2013 4(1): 54-57.
- [3] SILVA N, SENANAYAKE H, WADUGE V. Elevated levels of whole blood nickel in a group of Sri Lankan women with endometriosis: a case control study [J]. *BMC Res Notes* 2013 6: 13.
- [4] 孙青, 孔丽娜. 子宫内膜异位症与肿瘤转移基因关系的研究进展 [J]. *国外医学遗传学分册* 2004 27(3): 184-187.
- [5] STEEG PS, BEVILACQUA G, POZZATTI R *et al.* ME. Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus2 Ela inhibition of experimental metastasis [J]. *Cancer Res* 1988 48: 6550-6554.
- [6] XI PENG LONG, WU FANG BU, YUAN WANG *et al.* Expression of p53 in the Effects of Artesunate on Induction of Apoptosis and Inhibition of Proliferation in Rat Primary Hepatic Stellate Cells [J]. *PLoS ONE* 2011 6(10): e26500.
- [7] HAQUES YAN X J, ROSEN L *et al.* Effects of prostaglandin E2 on p53 mRNA transcription and p53 mutagenesis during T-cell-independent human B-cell clonal expansion E [J]. *FASEB J* 2014, 28: 627-643.
- [8] JARRETT SG, NOVAK M, HARRIS N *et al.* NM23 deficiency promotes metastasis in a UV radiation-induced mouse model of human melanoma [J]. *Clin Exp Metastasis* 2013 30(1): 25-36.
- [9] ZHAO RONGZHI, GONG LEI, LI LIN *et al.* nm23-H1 is a negative regulator of TGF- β 1-dependent induction of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Exp Cell Res* 2013 319(5): 740-749.
- [10] MARINO N, MARSHALL JC, STEEG PS. Protein-protein interactions: a mechanism regulating the anti-metastatic properties of Nm23-H1 [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2011, 384: 351-362.
- [11] LIONELLO M, BLANDAMURA S, AGOSTINI M *et al.* A prognostic role for Nm23-H1 in laryngeal carcinoma treated with postoperative radiotherapy: an introductory investigation [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013 270(1): 197-203.
- [12] SCHNEIDER J, JIMENEZ E, RODRIGUEZ F *et al.* c-myc, c-erbB2, nm23 and p53 expression in human endometriosis [J]. *Oncol Rep* 1998 5(1): 49-52.
- [13] 李铁臣, 孔丽娜, 孙青, 等. 子宫内膜异位症中 nm23-H1 基因表达的意义 [J]. *中国病理生理杂志* 2007 23(1): 116-119.
- [14] GOVATATI S, CHAKRAVARTY B, DEENADAYAL M *et al.* p53 and risk of endometriosis in Indian women [J]. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012 6(8): 865-873.
- [15] JUNG H, SEONG HA, HA H. NM23-H1 tumor suppressor and its interacting partner STRAP activate p53 function [J]. *J Biol Chem*, 2007 282(48): 35293-35307.
- [16] CHEN SHEN-LIANG, WU YI-SHIN, SHIEH HSIN-YING *et al.* p53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1 [J]. *Mol Carcinog* 2003 36: 204-214.
- [17] HUA KEQIN, DIN JINGXIN, CAO QI *et al.* Estrogen and progesterone regulate HIF-1 α expression in ovarian cancer cell lines via the activation of Akt signaling transduction pathway [J]. *Oncol Rep*, 2009 21(4): 893-898.