

紧密连接蛋白-2、4、5、10、18 mRNA 在宫颈上皮内瘤变和宫颈癌中的表达研究*

赵 芹¹, 黄 伟², 杨 凤³, 邱文凤², 杜 华¹(广东省东莞康华医院:1. 检验科;2. 妇科;3. 病理科 523080)

【摘要】目的 探讨紧密连接蛋白(Claudin)-2、4、5、10、18 在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变(CIN)及宫颈癌组织中的表达及意义。**方法** 选取 10 例 CIN I、10 例 CIN II、18 例 CIN III 和 20 例宫颈癌共计 58 例病变组织作为研究对象,以 9 例正常宫颈组织作为对照组,采用 TRIzol 法提取宫颈标本组织总 mRNA,SYBR 荧光实时定量反转录聚合酶链反应分析 Claudin-2、4、5、10、18 在各组织中的 mRNA 表达情况。**结果** Claudin-2、4 的 mRNA 表达在正常宫颈组织、CIN、宫颈癌的疾病进展中呈递增趋势,CIN III 及宫颈癌中的 Claudin-2、4 的 mRNA 表达明显高于 CIN I、CIN II 及正常宫颈组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),而在 CIN III 与宫颈癌比较中,差异无统计学意义($P > 0.05$)。Claudin-5、10、18 在正常宫颈组织及异常宫颈组织中均无表达。**结论** Claudin-2、4 可能与宫颈癌的发生、发展相关,检测 Claudin-2、4 mRNA 的表达可为 CIN III 及宫颈癌的早期诊断及化疗治疗提供辅助参考依据。

【关键词】 宫颈上皮内瘤变; 宫颈癌; 紧密连接蛋白; 荧光实时定量反转录聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.01.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)01-0021-03

Study on expression of Claudin-2,4,5,10,18 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer* ZHAO Qin¹, HUANG Wei², YANG Feng³, QIU Wen-feng², DU Hua¹(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Gynecology; 3. Department of Pathology, Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan, Guangdong 523080, China)

【Abstract】Objective To investigate the expression and significance of Claudin-2,4,5,10,18 in normal cervical tissue, cervical intraepithelial neoplasia(CIN) and cervical cancer tissue. **Methods** The cervical tissues samples from 10 cases of CIN I, 10 cases of CIN II, 18 cases of CIN III and 20 cases of cervical cancer were taken as the research objects and 9 cases of normal cervical tissues were taken as controls. The TRIzol method was adopted to extract mRNA from the cervical tissue samples. The expression of Claudin-2,4,5,10,18 mRNA were detected by SYBR Green real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). **Results** The expression of Claudin-2,4 mRNA showed the progressively increasing trend during the disease developing process from the normal cervical tissue to CIN and cervical cancer. The expression of Claudin-2,4 mRNA in CIN III and cervical cancer tissues were significantly higher than that in the CIN I, II and normal cervical tissues, the difference was statistically significant($P < 0.05$), but which had no statistical difference between CIN III and cervical cancer tissues($P > 0.05$). There was no expression of Claudin-5, 10, 18 in normal cervical tissues and abnormal cervical tissues. **Conclusion** Claudin-2,4 are probably associated with the initiation and progression of cervical cancer. Detecting the expression of Claudin-2,4 mRNA could provide the assistant reference basis for the early diagnosis and chemotherapy of CIN III and cervical cancer.

【Key words】 cervical intraepithelial neoplasia; cervical cancer; Claudin; real-time fluorescence quantitative PCR

在宫颈癌的形成、进展、转移过程中,紧密连接蛋白(Claudin)起着至关重要的作用。紧密连接(TJ)存在于机体的上皮细胞间,通过其栅栏功能和屏障功能,维持着组织结构的完整性和细胞极性,对于物质转运、信号转导、协调细胞功能有着重要的意义。其结构的拆卸或改建可导致细胞极性的丧失,增加细胞的运动、肿瘤细胞的侵袭^[1-3]。Claudins 是构成 TJ 的最为主要和关键的细胞黏附分子^[4]。研究发现, Claudins 在多种上皮性恶性肿瘤中表达异常,可能与恶性肿瘤的发生、发展相关。目前报道和肿瘤密切相关的 Claudin 亚型主要为 Claudin-1、2、

3、4、5、7、10、18 等。因此作者应用 SYBR 荧光实时定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 Claudin-2、4、5、10、18 在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变(CIN)及宫颈癌中 mRNA 的表达,旨在研究宫颈癌及癌前病变组织中 Claudins 的表达变化,分析其相关性,为研究宫颈癌发生、发展的分子机制及治疗靶点提供实验依据和理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1~12 月在本院妇科住院手术治疗的宫颈癌 I a1~II a2 患者的肿瘤组织 20 例,同期住院行

* 基金项目:广东省医学科研基金课题(A2013854)。

作者简介:赵芹,女,大专,主管技师,主要研究方向为分子生物学。

宫颈环形电切术治疗的 CIN I 患者的病变组织 10 例, CIN II 10 例、CIN III 18 例;另选因子宫肌瘤行全子宫切除术患者的正常宫颈组织 9 例为对照组。宫颈癌患者年龄 42~56 岁,中位年龄 50 岁;CIN 患者年龄 31~50 岁,中位年龄 43 岁,宫颈正常患者年龄 38~52 岁,中位年龄 45 岁。

1.2 仪器与试剂 RNA 提取试剂购自 Life technology 公司;反转录酶试剂盒、SYBR Green I 荧光定量试剂盒均购自上海生工技术服务公司;ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),琼脂糖凝胶电泳仪(伯乐公司)。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 用无菌剪将组织剪成小块,在匀浆器中倒入 1 mL 的 TRIzol 溶液,将小块组织放入匀浆器打磨,直到组织块变碎,溶液浑浊,转移至已消毒的离心管,加入氯仿,震荡至组织完全溶解均匀,4 °C 低温高速离心,进行水相分离。取出水相,用异丙醇沉淀 RNA,用 75% 的乙醇洗涤 RNA。去掉上清液,开盖挥发乙醇后用 RNase Free dH₂O 溶解 RNA 备用。所有操作均在冰上进行。用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度, A_{260 nm}/A_{280 nm} 值为 1.8~2.0;1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定抽提的 RNA 的质量。按照反转录酶试剂盒说明书操作,反转录反应:每 20 μL 体系加入 1 μg 的模板进行反应;反转录条件:25 °C 5 min,42 °C 60 min,70 °C 5 min,获得的 cDNA -20 °C 保存。

1.3.2 引物合成及 SYBR-PCR 引物由上海生工技术服务公司合成。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,合成 Claudins 各引物序列,见表 1。PCR 总反应体系为 25 μL,包括 2×SGE PCR 缓冲液 12.5 μL(含 SYBR Green I 荧光染料),上、下游引物 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, Rnase 水补足至 25 μL。循环参数:95 °C 10 min;95 °C 15 s,58~61 °C 1 min,共 40 个循环对 Claudin-2,4,5,10,18 先进行梯度 PCR 实验,确定各基因的退火温度。按如上的反应体系进行 SYBR-PCR,每个标本做 3 个复管,退火温度一致的可同一批检测,以 GAPDH 为内参照基因,dH₂O 为阴性对照。用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪及自带软件进行溶解曲线分析。基因相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 法计算,公式:ΔCt=Ct(Claudin)-Ct(GAPDH),ΔΔCt=ΔCt 实验组标本-ΔCt 对照组标本。

1.3.3 PCR 产物特异性分析 将 PCR 产物 2% 的琼脂糖凝胶电泳,确定特异性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。用 ROC 曲线评价 RT-PCR 检测各宫颈组织中 Claudin mRNA 的诊断效能。

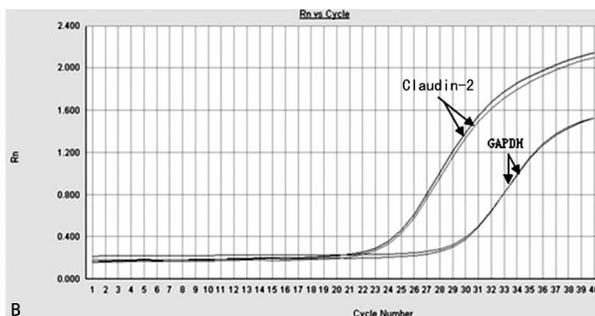
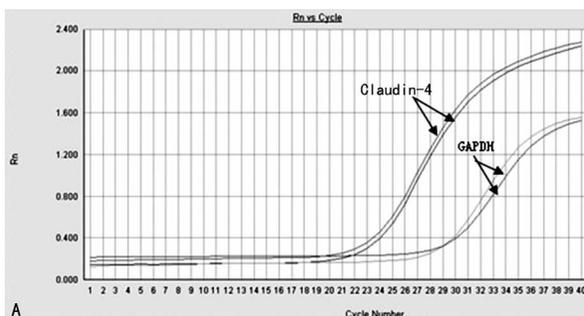
2 结 果

2.1 RNA 质量 分光光度计检测抽提总 RNA 的 A_{260 nm}/A_{280 nm} 值为 1.8~2.0,提示总 RNA 纯度较好,Claudins 各基因总 RNA 浓度在 598~2 000 ng/μL。

2.2 Claudin-2,4,5,10,18 在各宫颈组织中的表达 RT-PCR 检测 GAPDH 和 Claudin-2,4 扩增曲线 Ct 值有明显差异,见图 1。溶解曲线图表明,GAPDH 和 Claudin-2,4 的溶解曲线单一峰值略有差异,Claudin-2,4 和 GAPDH 的解链温度分别为 80.4,81.9,82.6 °C 未见杂峰信号出现。2% 琼脂糖凝胶电泳扩增产物无引物二聚体现象,产物特异性较好。用特异性引物对 Claudin-2,4,5,10,18 进行扩增,同时以 GAPDH 作为内参,3 个复孔的实验结果相近。各宫颈组织中 Claudin-2,4,5,10,18 的表达水平经内参校正发现,Claudin-2,4 在 CIN III 及宫颈癌组织中表达水平较高。宫颈癌及 CIN III 宫颈组织的 Claudin-2,4 表达较正常宫颈组织中明显增高(P<0.05)。与正常宫颈组织比较,Claudin-2,4 表达随病变级别的上升,其 mRNA 表达量呈上升趋势,慢性宫颈炎、CIN I~II 组织的 Claudin-2,4 表达分别增高 1.739、3.797 倍和 1.723、5.043 倍,宫颈癌及 CIN III 组织的 Claudin-2,4 表达分别增高 7.99、7.69 倍及 7.85、7.28 倍。而 Claudin-5,10,18 在实验中各组均未看到明显扩增曲线。提示 Claudin-5,10,18 可能在宫颈组织中无表达。

表 1 Claudins 各基因的引物序列

基因	引物序列(5'~3')
CLDN2-F	TTCTTGAGGCTGCTTGTGG
CLDN2-R	GCTCTTGCTCCTTGAACACC
CLDN4-F	TATGGATGAACTGCGTGGTG
CLDN4-R	CGATGATGCTGATGATGACG
CLDN5-F	AGACTGAGGATTTTCGCTTCC
CLDN5-R	GCCGATGGAGTAAAGACCAG
CLDN10-F	GCTCCGATAAAGCCAAAGC
CLDN10-R	CCTGCCCATCCAATAAACAG
CLDN18-F	AGTTCAGGCTTCACCGAATG
CLDN18-R	TCAGGGCAAAGATGGATACC



注:A 为 Claudin-4 的扩增曲线;B 为 Claudin-2 的扩增曲线。

图 1 宫颈组织中 Claudin-2、Claudin-4 和 GAPDH 扩增产物的反应曲线

3 讨 论

Claudins 家族成员中,目前研究较多与肿瘤有关的有 Claudin-1、2、3、4、5、7、10、18 等 8 种。近年研究发现,多种上皮性恶性肿瘤的 Claudins 异常表达,并且与这些肿瘤发生、发展有关。每种 Claudin 在不同种类肿瘤中表达也有一定特异性,有的肿瘤中表达是上调,有的则是下调或缺失,如肝癌的 Claudin-1 较正常肝组织高表达^[5],乳腺癌的 Claudin-1 较正常乳腺上皮低表达^[6]。目前多数文献报道 Claudins 蛋白在不同癌组织中表达是上调的。Szabó 等^[7]总结了近年 Claudins 与妇科恶性肿瘤研究,大多显示 Claudins 在妇科恶性肿瘤中的表达是上调的。

本文采用 RT-PCR 方法研究 Claudins mRNA 表达,具有高灵敏性,实时监测,定量准确等优点,近年来已广泛应用于分子生物学领域的研究^[8]。作者采用 RT-PCR 法检测 Claudin-2、4、5、10、18 在宫颈组织中的表达,该方法在应用过程中需结合熔解曲线分析来确定 PCR 产物的特异性。本实验通过熔解曲线分析,确定 PCR 反应特异性好,反应过程中荧光信号可反映扩增产物浓度的实时变化。结果分析采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,用 GAPDH 对各组 RNA 作均一化处理,计算各病变组织相对于正常宫颈组织的 RNA 表达的差异倍数。本研究结果显示,Claudin-2、4 mRNA 在正常宫颈组织、CIN I ~ III 和宫颈癌组织中均有表达,在 CIN 中,随着病变级别的上升,其 mRNA 表达量呈上升趋势,组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但在宫颈癌组织中,mRNA 的表达比正常组织和 CIN I ~ II 均要高,但与 CIN III 的表达量比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

有研究表明,Claudins 在正常的宫颈鳞状上皮的各层细胞中的表达存在不均一性,即 Claudin-2 存在于基底层细胞,Claudin-1、4、7 存在于颗粒层和棘层细胞;CIN I ~ III 时,在整个上皮层中 Claudin-1、2、4、7 高表达;并且明显高于在原位癌或浸润性癌组织中的表达^[9]。晚期 Claudins 低表达也可能影响癌组织的浸润和转移。本研究与文献^[9-11]报道结果一致。李燕等^[12]通过免疫组化发现,Claudin-2 表达在正常宫颈鳞状上皮的基底层和基底层之上 7~8 层细胞的细胞膜,其他中间层和表层的细胞不表达。早期 Soble 等^[13]研究发现,Claudin-1、2、4、7 在 CIN、原位癌和浸润癌损害中较正常组织有明显上升表达,同时认为宫颈上皮中 Claudins 表达上调或表达紊乱是宫颈癌发生的早期分子事件,对鳞状上皮细胞的癌变具有促进作用。Claudins 表达的组织特异性,使它们可能成为早期诊断和鉴别各种肿瘤的重要指标。D'Souza 等^[14]研究发现,由蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 活性增加所致的 Claudin-2 和 Claudin-4 磷酸化可能是宫颈癌中 Claudin-2 和 Claudin-4 表达异常及 TJ 结构破坏的分子机制之一。

本研究结果显示,Claudin-2 和 Claudin-4 的表达与宫颈病变进展级别成正相关,在 CIN III 级别中最高,说明 Claudin-2 和 Claudin-4 可能参与宫颈组织细胞恶性转化过程。RT-PCR 法联合检测 Claudin-2 和 Claudin-4 可成为常规病理检查的补充,有利于宫颈癌的早期发现、诊断和治疗评估,同时有可能为宫颈癌的治疗提供新的靶点。

参考文献

[1] Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junc-

tions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(3): 225-236.

[2] Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286(6): 1213-1228.

[3] Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130(1): 55-70.

[4] Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins [J]. Genome Biol, 2009, 10(8): 235.

[5] Holczbauer Á, Gyöngyösi B, Lotz G, et al. Increased expression of claudin-1 and claudin-7 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2014, 20(3): 493-502.

[6] Kwon MJ. Emerging roles of claudins in human cancer [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 18148-18180.

[7] Szabó I, Kiss A, Schaff Z, et al. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer [J]. Histol Histopathol, 2009, 24(12): 1607-1615.

[8] 鲍鑫, 刘向国, 刘茜. 实时荧光定量 PCR 技术研究及其在医学领域的应用 [J]. 医学理论与实践, 2013, 26(12): 1579-1580.

[9] Sobel G, Páska C, Szabó I, et al. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma [J]. Hum Pathol, 2005, 36(2): 162-169.

[10] Kimbung S, Kovács A, Bendahl PO, et al. Claudin-2 is an independent negative prognostic factor in breast cancer and specifically predicts early liver recurrences [J]. Mol Oncol, 2014, 8(1): 119-128.

[11] Chae MC, Park CK, Keum DY, et al. Prognostic significance of claudin 4 in completely resected adenocarcinoma of the lung [J]. Korean J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 47(3): 262-268.

[12] 李燕, 秦蓉, 王弦, 等. 子宫颈上皮内瘤变进展过程中 Claudin-1、3、4、7 的表达及意义 [J]. 临床与试验病理学杂志, 2013, 29(1): 49-52.

[13] Sobel G, Páska C, Szabó I, et al. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma [J]. Hum Pathol, 2005, 36(2): 162-169.

[14] D'Souza T, Aqarwal R, Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280(28): 233-240.

(收稿日期: 2015-05-17 修回日期: 2015-08-15)