

• 临床检验研究论著 •

FQ-PCR 检测宫颈癌 hWAPL 基因 mRNA 及其诊断价值分析

张文虹¹, 郑卫东^{2△}

(1. 湖北省十堰市妇幼保健院检验科 442000; 2. 湖北医药学院附属人民医院检验部, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测宫颈癌人半翼(hWAPL)基因 mRNA 的诊断价值。方法 使用高危型人乳头瘤病毒(HPV)检测试剂盒以及建立的 FQ-PCR 检测慢性宫颈炎、宫颈上皮内瘤样变(CIN)和宫颈癌共 100 例患者 hWAPL 基因 mRNA 和高危型 HPV。结果 宫颈癌组 hWAPL 基因 mRNA 表达显著高于慢性宫颈炎组和 CIN I ~ III 组($P < 0.05$);慢性宫颈炎组与 CIN I ~ III 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。慢性宫颈炎组和 CIN I ~ III 组部分患者中查出高危型 HPV,但无宫颈癌变。宫颈癌组高危型 HPV 检出率显著高于无宫颈癌变各组。结论 高危型 HPV 检出率与宫颈癌发生密切相关,但 hWAPL 基因 mRNA 表达与宫颈癌变更直接相关,更有特异性,有助于宫颈癌的早期诊断。

关键词:宫颈肿瘤; RNA,信使; 逆转录聚合酶链反应; hWAPL 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1189-02

Fluorescent quantitation PCR detection of cervical cancer hWAPL mRNA and its diagnostic value

Zhang Wenhong¹, Zheng Wendong^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shiyan Maternal and child Health Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Renmin Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of hWAPL mRNA detected by fluorescent quantitation polymerase chain reaction(FQ-PCR). **Methods** High-risk type papilloma virus(HPV) test kit and established FQ-PCR technology were performed for the detection of hWAPL mRNA and high-risk HPV in 100 cases of patients with chronic cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia(CIN) or cervical cancer. **Results** The expression level of hWAPL mRNA in cervical cancer group was significantly higher than in chronic cervicitis group and CIN I - III group($P < 0.05$), but there was no statistical difference between chronic cervicitis group and CIN I - III group($P > 0.05$). High-risk HPV could be detected in part of patients of chronic cervicitis group and CIN I - III group, but no cervical lesions could be observed. Detection rate of high-risk HPV in cervical cancer group than in other groups without cervical cancer. **Conclusion** Detection rate of high-risk HPV might be closely correlated with cervical cancer, but mRNA level of hWAPL gene could be with more closely correlation and specific for cervical cancer, and be more helpful for the early diagnosis of cervical cancer.

Key words: uterine cervical neoplasms; RNA, messenger, polyadenylated; reverse transcriptase polymerase chain reaction; hWAPL genes

人半翼(hWAPL)基因是于 2000 年发现果蝇体内(wings apart-like, WAPL)基因在人体内的同源序列,定位于 10q2312^[1]。近年来发现宫颈癌中 hWAPL 基因 mRNA 表达升高十分明显。研究还发现人乳头瘤病毒(HPV)阳、阴性的宫颈癌细胞系中 hWAPL 基因均为高表达,但 HPV 阳性的正常宫颈组织 hWAPL 基因的表达呈低水平。因此,相对于 HPV 感染来说,hWAPL 基因的表达与宫颈癌关系可能更为密切^[2]。有研究表明,hWAPL 基因是一种宫颈癌特异性高表达基因^[3]。本研究采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 hWAPL 基因 mRNA 表达水平作为宫颈癌特异性早期诊断,并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集门诊阴道镜检查、取材并经病理检查的宫颈组织 100 份,患者均未经任何物理、化学、放射及手术治疗,包括慢性宫颈炎、宫颈上皮内瘤样变(CIN) I ~ III、宫颈癌各 20 例。取材宫颈组织先保存于液氮中,后转移至 -80 °C 冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 FQ-PCR 仪(美国 ABI7000 型)、总 RNA 提取试剂(北京天根生化科技有限公司)、hWAPL 基因 mRNA

逆转录合成 cDNA 和实时定量 PCR 试剂(上海信然生物技术有限公司)、高危型 HPV 测定试剂(中山大学达安基因股份有限公司)等。

1.3 方法

1.3.1 hWAPL 靶基因核苷酸序列范围 查 Genebank (AB065003),hWAPL 基因全长 6 307 bp,依据其核苷酸序列确定检测靶基因核苷酸序列范围:3641 CATGATAAGA GTGGAGAGTG GCAAGAAACA AGTGGAGAAA TACAGTGGGT GTCAACTGAA; 3701 AAGACTGATG ATACA-GAAGA GAAACATAAG AAGGAGGAGG AGGATGAAGA ACTTGACCTC; 3761 AATAAAGCCC TTCAGCATGC CGGCAAACAC ATGGAGGATT GCATTGTGGC CTCCTA-CACG。

1.3.2 hWAPL 基因 PCR 引物序列设计和合成 hW-A(上游)5'-GATAAGAGTGGAGAGTGGCAA-3'; hW-B(下游)5'-ACAATGCAATCCTCCATGTG-3'。

1.3.3 内参照 β-actin 基因 PCR 引物序列设计和合成 actin-A(上游)5'-TCAAATCATTGCTCTCCTG-3'; actin-B(下游)5'-TCATAGTCCACCTAGAAGCAT-3'。

△ 通讯作者, Tel: (0719) 8637081; E-mail: zhengweidong002@163.com。

1.3.4 检验步骤

1.3.4.1 总 RNA 每份样本取冻存组织 50~100 mg, 使用总 RNA 提取试剂盒, 用离心柱法进行总 RNA 提取。

1.3.4.2 hWAPL 基因 mRNA 逆转录合成 cDNA 和实时定量 PCR 基因 mRNA 表达测定采用王攀等^[4]方法, 使用 TURE script SYBR Green q 逆转录 (RT)-PCR Kit, 按说明书操作, 通过逆转录合成 cDNA, 反应条件为: 25 °C 5 min, 37 °C 1 h, 95 °C 5 min。采用 SYBR Green I 荧光染料掺入法进行实时定量 PCR 反应。每个样品做两个平行, 并设双蒸水空白对照。扩增条件: 93 °C 预变性 60 s; 93 °C 30 s, 55 °C 40 s, 40 个循环。

1.3.4.3 hWAPL 基因 mRNA 实时定量 PCR 检测 hWAPL 基因 mRNA 实时定量 PCR 检测^[4]标准曲线的制定为校正定量过程中不同样品 RNA 中 mRNA 含量的差异, 选用 β-actin 基因作为内参照对 RNA 含量变异进行校正。以 cDNA 为模板, β-actin 基因为引物进行扩增, 将此质粒原液各稀释度作为标准曲线参照品, 按 10¹⁰、10⁹、10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ copy/mL 与测定循环数 (Ct) 制作标准曲线。

1.3.4.4 高危型 HPV 检测 使用高危型 HPV (8 个型) 核酸定量检测试剂盒, 按说明书对相关样本进行检测。

1.3.4.5 样本检测 取慢性宫颈炎、CIN I~III 和宫颈癌组织各 20 份, 每份 200~500 mg 冻存, 每份样本再取 50~100 mg 提取 RNA, 逆转录合成 cDNA 和进行实时定量 PCR 检测, 并设双蒸水空白对照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hWAPL 基因 mRNA 检测 慢性宫颈炎组、CIN I~III 组和宫颈癌组 hWAPL 基因 mRNA 相对表达量分别为 5.28 × 10³、5.43 × 10³、4.22 × 10⁴、1.36 × 10⁵、6.79 × 10⁸ copy/mL, 慢性宫颈炎组、CIN I~III 组 hWAPL 基因 mRNA 相对表达量明显低于宫颈癌组 (P < 0.05), 慢性宫颈炎组与 CIN I~III 组比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

2.2 高危型 HPV 检测 见表 1。

表 1 各组高危型 HPV 检测结果比较

组别	n	检出率 (%)
慢性宫颈炎组	20	15
CIN I 组	20	20
CIN II 组	20	45
CIN III 组	20	65
宫颈癌组	20	85

3 讨论

hWAPL 基因编码一种聚合锚定蛋白, 有利于其在分裂前

期适时从染色体臂解离。hWAPL 基因过表达使姐妹染色单体过早解离, 并且扰乱有丝分裂和胞质分裂, 从而诱导染色体不稳定性, 促进肿瘤形成^[1-5]。Kuroda 等^[6]实验显示, 在 CIN 和宫颈癌组织中 hWAPL 基因表达增加, 预示 hWAPL 基因高表达可作为宫颈癌早期诊断指标。有研究表明 hWAPL 基因是宫颈癌特异性高表达基因。曹春霞等^[7]用 RT-PCR 技术扩增 hWAPL-cDNA 片段连接到 pMD182T 载体, 证实载体能够表达 hWAPL 蛋白。本研究应用 FQ-PCR 检测慢性宫颈炎、CIN I~III 和宫颈癌组织中 hWAPL 基因 mRNA 表达, 结果表明在所有实验组中均有 hWAPL 基因 mRNA 表达, 且随宫颈病变程度加重 hWAPL 基因 mRNA 表达量逐渐上升。宫颈癌组表达量明显高于慢性宫颈炎组、CIN I~III 组, 表明 hWAPL 基因在宫颈癌发生、发展中可能起极其重要的作用。

高危性 HPV 感染是宫颈癌及癌前病变主要标志物^[8]。本研究对临床样本进行高危型 HPV 检测, 在宫颈癌组织中的检出率达到 85%, 慢性宫颈炎、CIN I~III 组织中的检出率为 15%~65%, 表明高危型 HPV 与宫颈癌发生密切相关, 与文献报道较一致, 但并不能直接说明发生宫颈癌变, 而 hWAPL 基因 mRNA 高表达才能说明发生宫颈癌变。本研究结果表明, 检测 hWAPL 基因 mRNA 表达对宫颈癌有诊断价值, 但还需对大批量宫颈临床样本进行检测, 结合病理分析, 确定 hWAPL 基因 mRNA 表达的临界值, 才能将这一方法用于临床样本检测, 成为一项诊断宫颈癌的既有价值又实用的技术。

参考文献:

- [1] Gandhi R, Gillespie PJ, Hirano T. Human wapl is a cohesion-binding protein that promotes sister2chromatid resolution in mitotic prophase[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(24): 2406-2417.
- [2] 曹利仙, 沈忠飞, 潘巍巍. 半翼基因的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2010, 41(1): 27-29.
- [3] 黄莫婉, 马英. 宫颈癌研究新进展[J]. *重庆医学*, 2006, 35(23): 2185-2187.
- [4] 王攀, 郑志保, 李招云, 等. 荧光定量 PCR 检测肝细胞癌患者 GPC3mRNA 和 AFPmRNA 的诊断价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(6): 1448-1450.
- [5] 卢博奇, 蔺莉. 实时定量聚合酶链反应检测人半翼基因在宫颈病变中的表达及意义[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(10): 3345-3347.
- [6] Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, et al. Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL[J]. *Cancer Letters*, 2005, 221(1): 21-28.
- [7] 曹春霞, 马军, 寻萌, 等. 宫颈癌相关新癌基因 hWAPL 的原核表达和免疫原性分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(6): 562-564.
- [8] 卢晓芬, 张树泉. hWAPL 基因在宫颈癌中作用的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2007, 13(6): 509-511.

(收稿日期: 2011-10-28)

(上接第 1188 页)

- [7] 王寰, 范晓磊, 王海燕. I 类整合子介导的铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(12): 1304-1305, 1307.
- [8] Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, et al. Class 1 integrons in Dutch Salmonella enterica serovar Dublin isolates from clinical cases of bovine salmonellosis[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 117(2): 192-

200.

- [9] 陈丹华, 张如霖, 丁星, 等. 整合子耐药机制的动态检测[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(1): 19-21.

(收稿日期: 2011-10-03)