

• 临床检验研究论著 •

人锌指蛋白 23 在子宫内膜肿瘤中的表达分析

王艳海

(鄂尔多斯市中心医院检验科, 内蒙古 鄂尔多斯 017000)

摘 要:目的 分析 hZNF23 mRNA 在子宫内膜肿瘤组织和细胞中的表达情况,以探讨其与发病机制的关系。方法 采用实时荧光定量 PCR 法检测 30 例子宫内膜肿瘤患者癌组织及其癌旁正常组织中 hZNF23 表达水平。结果 30 例子宫内膜肿瘤患者癌组织及其癌旁正常组织标本中 hZNF23 相对表达量分别为 (7.3 ± 4.15) copies/mL 和 (22.0 ± 10.2) copies/mL,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 子宫内膜肿瘤患者中 hZNF23 基因表达水平显著下降,可能与子宫内膜肿瘤的发生发展有密切的关系。

关键词:锌指; 子宫内膜肿瘤; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.021 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)07-0803-02

Expression of human zinc finger 23 gene in carcinoma of the endometrium

Wang Yanhai

(Department of Clinical Laboratory, Erdos Central Hospital, Erdos, Inner Mongolia 017000, China)

Abstract: Objective To detect the expression level of human zinc finger 23 mRNA in carcinoma of the endometrium tissue and cell samples, to investigate hZNF23 expression in relation to disease mechanism. **Methods** The expression levels of hZNF23 in 30 cases of carcinoma of the endometrium tissue and adjacent normal tissue were measured by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** The relation expression levels of hZNF23 mRNA in 30 ovarian cancer tissue and adjacent normal tissue were (7.3 ± 4.15) copies/mL and (22.0 ± 10.2) copies/mL, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The level of hZNF23 in carcinoma of the endometrium was greatly down-regulated compared with that in the normal tissue, hZNF23 might be a potential relation of the development for carcinoma of the endometrium.

Key words: zinc fingers; endometrial neoplasms; polymerase chain reaction

人锌指蛋白 23(hZNF23)是近年发现的 KRAB 型锌指蛋白成员^[1],在许多肿瘤细胞系和人类肿瘤患者实体瘤 hZNF23 蛋白表达明显降低^[2]。子宫内膜肿瘤已成为严重威胁女性健康的生殖道恶性疾病。研究者检测其在人子宫内膜肿瘤中的表达高低,研究对肿瘤细胞生长的影响,以了解其在子宫内膜肿瘤中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 1 月至 2012 年 4 月本院子宫内膜肿瘤手术患者 30 例。手术时取部分肿瘤组织及距癌旁组织边缘 1~2 cm 处正常组织,将其放于-70℃冰箱中,待试验备用。

1.2 仪器与试剂 LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪由瑞士罗氏公司提供;Allegra X-15R 离心机由德国 Beckman 公司提供;各种型号加样器由美国杰尔森公司提供;人类组织、细胞总 RNA 提取试剂盒和 cDNA 合成试剂盒、GAPDH 和 hZNF23mRNA 所有引物、探针及标准品均由日本大连宝生物

工程有限公司提供及合成。

1.3 方法

1.3.1 目的基因提取 根据大连宝生物工程有限公司 cDNA 合成试剂盒说明书操作步骤进行逆转录,以 2 μL 的产物进行实时定量荧光 PCR,所有产物置-20℃或者-70℃冰箱中保存。经原液 10 倍稀释成 $10^4 \sim 10^9$ copy/μL 5 个数量级的标准品工作液,同时,将标准品工作液视同样本进行实时定量 PCR 检测。

1.3.2 实时定量 PCR 扩增 首先混合标本 2 μL、100 μmol/L 探针 0.1 μL、Buffer 2.5 μL、10 mmol/L dNTP 0.5 μL、100 μmol/L 上、下游引物各 0.1 μL(表 1)、25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL、5 U/μL Taq 酶;之后去离子水补足反应总量至 25 μL;之后按照 95℃预变性 1 min,95℃变性 1 s,60℃退火 15 s,40℃,30 s,45 个循环进行实时定量 PCR 检测。

表 1 实时定量 PCR 扩增引物表

基因名称	引物名称	引物序列(5'~3')
ZNF23	探针	FAM-TTT GGT CGT ATT GGG CGC CTG-TAMRA
	ZNF23-R	GAG TTC ATT CAC TAC CTG TTC
	ZNF23-F	AAG GAT ACA GCT GGA GTC AG
GAPDH	探针	FAM-CAG TGT CAG TCC CAA AAG CTC CAG CC-TAMRA
	GAPDH-F	ACA TGT TCC AAT ATG ATT CCA
	GAPDH-R	TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG

作者简介:王艳海,男,主管检验师,主要从事临床免疫学及分子生物学研究。

1.3.3 hZNF23 相对表达量计算方法 根据已知的标准品浓度,计算组织和细胞样本中内参 GAPDH 和 hZNF23 基因拷贝浓度,求出 hZNF23 及内参 GAPDH 的比值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准曲线及线性检测 将标准品稀释成 $10^4 \sim 10^9$ copy/ μ L5 个数量级的标准品工作液,视同样本进行实时定量 PCR 检测。结果显示标准曲线在 5 个数量级检测范围内,而且其起始模板量对数值与相应反应循环数有呈线性关系($r^2=0.950$, $P<0.05$),其标准线性方程为 $Y=-3.2X+50.5$ 。

2.2 子宫内膜肿瘤组织 hZNF23 相对表达量 子宫内膜肿瘤中 hZNF23 mRNA 的相对表达量为 (7.3 ± 4.15) copies/mL,明显低于癌旁组织标本 (22.0 ± 10.2) copies/mL,差异有统计学意义($P<0.05$)。其中 60% (18/30) 子宫内膜肿瘤样本 hZNF23 表达水平低于癌旁组织 80%。

3 讨论

研究显示锌指转录因子在调节个体发育,细胞分化,细胞增殖和凋亡中起到至关重要的作用^[4]。其中的许多基因定位于高度等位基因缺失的区域,这些基因预示着可能和肿瘤的发生和发展有着密切的关系^[5]。依据实时定量 PCR 策略,从一个在人类肿瘤中高度等位基因缺失的区域 16q22 扩增目的基因 hZNF23,因其与恶性肿瘤的发生发展相关^[6],因而逐渐成为人们的研究热点。目前对 hZNF23 的特性进行了深入研究,发现它在人体多种组织中表达,且与生长抑制有关。Huang 等^[1]研究发现 KRAB-ZNF23 在卵巢癌患者体内表达下调,同时发现 hZNF23 通过诱导细胞周期阻滞肿瘤细胞生长。同时 Huang 等^[7]又发现 hZNF23 可以诱导癌细胞发生凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长。目前,国内对 hZNF23 在肿瘤中的表达研究较少,而子宫内膜肿瘤是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,故对 hZNF23 在子宫内膜肿瘤中的表达进行研究。本试验结果显示,hZNF23 mRNA 在子宫内膜肿瘤及其癌旁组织中均有表达,但是在子宫内膜肿瘤组织中其表达水平显著低于癌旁组织($P<0.05$),这说明了 hZNF23 可能在肿瘤发生过程中扮演了很重要的角色。结果提示 hZNF23 是一个生长抑制因子,在肿瘤中的低表达将会促进肿瘤生长。另外推测 hZNF23 基因启动子甲基化和 hZNF23 蛋白质转录后调节等机制,都有可能是 hZNF23 基因表达下调的原因^[8]。

有研究报道 hZNF23 抑制细胞生长的另外一个机制是能够诱导细胞凋亡^[9]。在这个过程中,hZNF23 的过度表达可上调 p27kip-1 的表达,抑制细胞生长,细胞周期停滞在 G₁ 期,而且 hZNF23 还可通过线粒体依赖途径如降低线粒体跨膜电位、Bcl-XL 表达下调、细胞色素 C 释放、PARP-1 和 caspase-3/9 激活等途径诱导人子宫内膜肿瘤细胞凋亡^[10-11],最后导致细胞

核固缩。推测 hZNF23 可能经由线粒体依赖途径参与肿瘤细胞凋亡,但也有报道^[12]可能有另外的机制的存在,因为在用 siRNA 抑制 p27 表达的情况下,hZNF23 继续保持部分的生长抑制作用,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Huang C, Jia Y, Yang S, et al. Characterization of ZNF23, a KRAB-containing protein that is downregulated in human cancers and inhibits cell cycle progression[J]. Exp Cell Res, 2007, 313 (2):254-263
- [2] Castro MA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, et al. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer[J]. Cancer, 2010, 116(15):3645-3655.
- [3] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127 (12):2893-2917.
- [4] Oliver CH, Khaled WT, Frend H, et al. The Stat6-regulated KRAB domain zinc finger protein Zfp157 regulates the balance of lineages in mammary glands and compensates for loss of Gata-3 [J]. Genes Dev, 2012, 26(10):1086-1097.
- [5] Han X, Guo J, Deng W, et al. High-throughput cell-based screening reveals a role for ZNF131 as a repressor of ERalpha signaling [J]. BMC Genomics, 2008, 9(1):476.
- [6] Henriksen J, Stabell M, Meza-Zepeda LA, et al. Identification of target genes for wild type and truncated HMGA2 in mesenchymal stem-like cells[J]. BMC Cancer, 2010, 10(1):329.
- [7] Huang C, Yang S, Ge R, et al. ZNF23 induces apoptosis in human ovarian cancer cells [J]. Cancer Lett, 2008, 266(2):135-143.
- [8] Tran HT, Kim HN, Lee IK, et al. DNA methylation changes following 5-azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(2):207-13.
- [9] Alas S, Ng CP, Bonavida B. Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8 (3):836-845.
- [10] Mu R, Lu N, Wang J, et al. An oxidative an Moglle of sambogic acid • induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 is involved in its anti-cancer activity in vitro [J]. Eur J Cancer Prev, 2010, 19(1):61-67.
- [11] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. Cell, 2004, 116(2):205-219.
- [12] Hosseini SM, Herd S, Vincent AL, et al. Genetic analysis of chromosome 20-related posterior polymorphous corneal dystrophy: genetic heterogeneity and exclusion of three candidate genes[J]. Mol Vis, 2008, 14(1):71-80.

(收稿日期:2012-10-09)

(上接第 802 页)

- toxicity in humans[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(4):470-487.
- [11] Wang P C, Cai J B. Analysis on aminoglycoside resistance of Acinetobacter baumannii and related genes[J]. Int J Lab Med, 2012, 33(10):1155-1156.
- [12] 马序竹, 吕 媛. 鲍曼不动杆菌对主要抗菌药物耐药机制[J]. 中国临床药理学志, 2009, 25(1):90-94.

- [13] Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant(MDR) and pandrug-resistant(PDR) Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 12):1619-1629.

(收稿日期:2012-12-06)