

子宫内膜异位症 Rho 家族重要成员 mRNA 表达及意义初探

张维彬¹, 吴彦岚², 黄海定², 邓时贵^{2*}

(1. 南方医科大学北滘医院, 广东 佛山 528311; 2. 广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] 目的: 检测子宫内膜异位症异位内膜组织 Rho 家族重要成员 (RhoA, RhoB, RhoC) 的 mRNA 表达, 初步探讨 Rho 家族在子宫内膜异位症发病中的意义。方法: 采用定量 RT-PCR 技术, 检测异位内膜组织 Rho 家族的 mRNA 表达。结果: RhoA, RhoC mRNA 在异位内膜中的表达低于在位内膜的表达, 与正常内膜结果比较 $P < 0.05$, 表达差异具有显著意义。RhoB 的 mRNA 表达在异位内膜和在位内膜中没有差异性。结论: 子宫内膜异位症的发病可能与 RhoA, RhoC 的低表达有关。

[关键词] 子宫内膜异位症; Rho 家族

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0271-03

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070271

Preliminary Research on the Role of Rho Family RhoA, RhoB, RhoC mRNA Expression in Endometriosis

ZHANG Wei-bin¹, WU Yan-lan², HUANG Hai-ding², DENG Shi-gui^{2*}

(1. Beijiao Hospital of Southern Medical University, Foshan 528311, China;

2. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To detect Rho family (RhoA, RhoB, RhoC) mRNA expression and study the role

[收稿日期] 20120813(492)

[基金项目] 广东省卫生厅项目(A2004234); 广东省中药药局项目(2008326); 广东省科技厅项目(2009B060300015)

[第一作者] 张维彬, 主治医师, 大专, 从事病理研究, Tel: 0757-26395532, E-mail: zhangweibin467895@163.com

[通讯作者] * 邓时贵, 研究员, 硕士, 从事药理研究, E-mail: dengshigui@yahoo.com.cn

液流变学指标没有明显影响, 野生五灵脂可以降低全血黏度, 结果提示, 家养五灵脂抗炎的药理作用优于野生五灵脂, 但没有显示出活血化瘀方面的作用; 实验结果为复齿鼯鼠的家养五灵脂提供了一定的实验依据。

[参考文献]

[1] 李强, 陆蕴茹, 鲁学照. 五灵脂的研究进展[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(9): 570.
[2] 中华人民共和国卫生部药药理委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 50.
[3] 王福麟. 复齿鼯鼠生态的初步研究[J]. 兽类学报, 1985, 5(2): 103.
[4] 王福麟, 王小非. 中国的复齿鼯鼠[J]. 生物学通报, 1995, 30(7): 11.

[5] 程明, 杨连菊, 冯学锋, 等. 养殖五灵脂和野生五灵脂等鞣质含量比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 90.
[6] 唐绪刚, 黄文权. 五灵脂药理及临床应用概述[J]. 中国中医急症, 2008, 17(1): 101.
[7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[J]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 525.
[8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 564.
[9] 王岚, 杜茂波, 刘淑芝, 等. 冠心巴布膏活血化瘀作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 217.
[10] 陈月开, 陈少松, 王美素. 五灵脂中黄酮类成分研究[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2005, 28(1): 98.
[11] 潘金火, 魏国林. 野生与家养复齿鼯鼠所产五灵脂中化学成分比较研究[J]. 中草药, 1996, 27(1): 650.

[责任编辑 何伟]

of Rho family in endometriosis. **Method:** Quantified RT-PCR technique was used in the detection. **Result:** RhoA and RhoC mRNA expression in endometriosis was lower than that in normal endometrium markedly ($P < 0.05$, vs normal). RhoB mRNA expression didn't show any distinction between the groups. **Conclusion:** Endometriosis may be related to the low expression of RhoA and RhoC.

[**Key words**] endometriosis; Rho family

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMS) 好发于生育期妇女, 为常见的妇科疑难疾病。目前, EMS 的发病机制仍不清楚, 各种学说均不能解释肺部等盆腔以外 EMS 的发病^[1]。EMS 具有临床病变的广泛性和病理表现多形性的特点, 虽属良性疾病, 却有恶性肿瘤的一些特征, 其癌变发生率 0.7% ~ 1.0%^[2-3]。随着恶变报道病例的增多, EMS 的恶变及其与癌症的关系日趋受到关注。研究表明, Rho 家族在恶性肿瘤侵袭转移中扮演重要角色^[4]。由于 EMS 与恶性肿瘤具有相似的一些特征和生物学内涵, 我们推测 EMS 的发病机制, 特别是难于解释的子宫内膜相关细胞远程侵袭可能与 Rho 家族密切相关。研究异位内膜 Rho 的表达规律, 有助于进一步解释盆腔以外 EMS 的发病, 对防治 EMS 的恶变具有重大意义, 相关研究未见文献报道。本文在既往研究小鼠 EMS 与不孕相关性的基础上^[5-7], 采用定量 RT-PCR 技术, 检测病患异位内膜 Rho 家族 3 个重要成员 (RhoA, RhoB, RhoC) 的 mRNA 差异表达, 初步探讨 Rho 家族在 EMS 发病中的意义。

1 材料

1.1 标本来源 所有 EMS 标本 (经病理检查确诊) 来源于广东省中医院妇科, 正常对照子宫颈内膜为征得患者同意后取自 EMS 患者的在位增生期子宫内膜。所有离体标本以生理盐水冲洗表面血迹后, 按 100 mg 分装, 置 -70 °C 冰箱保存备用。

1.2 试剂 Trizol 试剂 (批号 060913) 及逆转录试剂盒 (批号 061213, 购自南京凯基生物科技发展有限公司), 定量 PCR 试剂盒 (批号 F5030, 购自广州合达生物科技有限公司), 引物序列^[3]: RhoA 上游 5'-CATCCGGAAGAACTGGT-3', 下游 5'-TCCCACAAAGCCAACTC-3'; RhoB 上游 5'-CGGACTCGC TG-GAGAACA-3', 下游 5'-GAGGTAGTCGTAGGC TTG-GAT-3'; RhoC 上游 5'-GGCTGCAATCCGAAAG-3', 下游 5'-GTCCACTTCTCAGGAATGTT-3'; β -actin 上游 5'-CTATCCAGCGTACTCCAA-3', 下游 5'-AAGT-CAACTTCAATGTCGG-3', 由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 仪器 Ultraspec UV/V4000 紫外-可见分光光

度仪 (法码西亚公司, 美国), 7700 型荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国)。

2 方法

2.1 组织总 RNA 的抽提 取组织标本约 100 mg, 剪碎后加入 1 mL Trizol 在冰浴中研磨。匀浆后将混悬液移至 EP 管中, 室温下静置 5 min, 然后加入 0.2 mL 氯仿, 12 000 r·min⁻¹ 低温离心 15 min。将上清液移至另一个 EP 管中, 并加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀, 室温静置 10 min, 12 000 r·min⁻¹ 低温离心 15 min, 弃上清。加入 1 mL 0.1% DEPC 配制的 75% 乙醇, 混匀, 12 000 r·min⁻¹ 低温离心 5 min, 弃上清, 再加入 75% 乙醇重复离心 1 次, 弃上清。室温沉淀, 半干燥, 用 50 μ L 水溶解, 紫外-可见分光光度仪检测 RNA 的纯度及含量, 当 RNA 纯度于 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.0 时为高纯度 RNA, 用于实验。

2.2 荧光定量 PCR 检测 使用前每个组分轻轻混匀, 2 000 r·min⁻¹ 离心 20 s; 取去酶 0.2 mL PCR 管, 依次加入 2 ~ 5 μ g RNA 1 μ L, 10 μ mol·L⁻¹ Oligo dT (18) 2 μ L; 65 °C 保温 5 min 后, 冰浴 5 min; 依次加入 RNase 抑制剂 (40 U· μ L⁻¹) 0.5 μ L, 10 × 逆转录酶 (AMV) Reaction Buffer 2 μ L, 1 mol·L⁻¹ DTT 1 μ L, AMV 1 μ L 和 0.1% DEPC 水 13.5 μ L; 混匀后 2 000 r·min⁻¹ 离心 20 s; 37 °C 保温 1 h 后, 70 °C 保温 15 min。逆转录后再加入以下反应体系: 2.5 × RealMasterMix/20 × SYBR solution 22.5 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 0.1% DEPC 水 23.5 μ L。循环条件: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s; 60 °C 60 s, 共 40 个循环。在荧光定量 PCR 仪中扩增检测, 结果以 CT 表示。

2.3 统计学处理 结果采用四川大学黄志勇主编的《中国医学百科全书·医学统计学》统计软件包 (第 3 版) 进行统计: t 检验 (方差齐) 或 t' 检验 (方差不齐), $P < 0.05$ 时有显著性差异。

3 结果

EMS 内异组织 Rho 家族重要成员 (RhoA, RhoB, RhoC) mRNA 的表达 异位内膜 RhoA, RhoC 的 CT 增加明显, 与在位内膜组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)。提示 EMS 内异组织 RhoA,

RhoC 的 mRNA 表达低于在位内膜的表达。而 RhoB mRNA 表达在两组间没有差异。说明 RhoA,

RhoC mRNA 低表达可能在 EMS 的发病中可能扮演重要角色。见表 1。

表 1 子宫内位异位症 Rho 家族重要成员 mRNA 定量表达($\bar{x} \pm s$)

CT

组别	n	RhoA	RhoB	RhoC	β -actin
异位内膜	5	27.457 \pm 0.846 ¹⁾	23.689 \pm 0.292 ¹⁾	32.799 \pm 0.317	23.524 \pm 0.259
在位内膜	3	25.170 \pm 0.696	23.106 \pm 0.620	27.235 \pm 0.569	24.082 \pm 0.889

注:与在位内膜组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

Rho 家族是细胞内重要的信号转导分子,主要参与张力丝和黏着斑的形成,在肌动蛋白骨架的构建、增殖、黏附变形、游走、细胞周期调控及包括基因转录在内的许多基础生命活动中起关键作用。Rho 基因家族的异常表达在肿瘤的发生发展中扮演重要角色,尤其是 Rho 亚家族及其下游的效应分子,通过多种信号转导通路,参与肿瘤的恶性转型、浸润转移及血管生成等多方面过程,它们已成为非常有希望的肿瘤治疗新靶点^[2,8]。在一些肿瘤细胞中,Rho 家族的表达升高。在乳腺癌中,RhoA,RhoB 的表达都是上调的^[9],而 RhoC 的表达与乳腺癌的侵袭能力成正相关^[10]。在肿瘤的不同发展阶段,Rho 家族成员有不同的作用。RhoA,RhoC 能促进肿瘤发生发展,在睾丸精原细胞癌、乳腺癌等许多肿瘤中过表达^[11],其上调或过表达与不良预后相关。RhoC 在表达水平较高时可能促进宫颈癌前病变的进展和宫颈癌的发生^[12]。RhoB 则在肿瘤中低表达或缺失,其可能是一种肿瘤抑制因子^[13]。

EMS 与恶性肿瘤具有相似的一些特征和生物学内涵。本研究作为大样本研究前的预实验,尝试探讨与恶性肿瘤有着密切关系的 Rho 家族与 EMS 之间的关系。实验结果表明,RhoA,RhoC mRNA 在异位内膜中的表达比在位内膜的表达低,而 RhoB mRNA 在异位内膜和在位内膜中的表达相似。初步推测,EMS 的发病甚至恶变可能与 RhoA,RhoC 的低表达有关。由于实验研究样本较少,结论尚需进一步验证。

[致谢] 广东省中医院中心实验室孙静老师给予技术指导。

[参考文献]

- [1] Thomas E J, Campbell I G. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner [J]. Gynecol Obstet Invest, 2000, 50 (Suppl): 2.
- [2] Sahai E, Marshall C J. Rho-GTPases and cancer [J].

Nature Reviews Cancer, 2002, 2(2): 133.

- [3] 潘阳林, 毕锋, 刘娜, 等. Rho 家族蛋白在胃癌细胞系中的表达及意义 [J]. 解放军医学杂志, 2003, 28 (6): 517.
- [4] Wu M Y, Ho H N. The role of cytokines in endometriosis [J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 49(5): 285.
- [5] 孙静, 张维彬, 韩凌, 等. Eotaxin/CCR3 在子宫内位异位症不孕小鼠的表达及中药莪朮胶囊的干预作用 [J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(4): 61.
- [6] 邓时贵, 张娴, 巫志峰, 等. 小鼠子宫内位异位症模型的建立及其异位内膜蛋白质的差异表达谱分析 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(7): 535.
- [7] 邓时贵, 巫志峰, 李伟英, 等. 子宫内位异位症大鼠孕娠状况及中药莪朮胶囊的影响 [J]. 现代医院, 2007, 7(3): 29.
- [8] 王艳芬, 田霞. Rho 家族蛋白与纤维化 [J]. 医学新知杂志, 2012, 22(1): 49.
- [9] Fritz G, Brachetti C, Bahirnsnn F, et al. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters [J]. Br J Cancer, 2002, 87(6): 635.
- [10] Kleer C G, van Golen K L, Zhang Y, et al. Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability [J]. Am J Pathol, 2002, 160(2): 579.
- [11] Kamai T, Arai K, Tsujii T, et al. Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumour [J]. BJU Int, 2001, 87(3): 227.
- [12] 陈嵘, 耿力, 杨京京, 等. RhoC, ROCK I 在宫颈癌前病变和宫颈癌中的表达及意义 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2011, 24(3): 141.
- [13] Chan Z, Sun J, Prsdines A, et al. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice [J]. J Biol Chem, 2000, 275(24): 17974.

[责任编辑 何伟]