维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0247-03

结肠癌中有丝分裂关卡基因 hsMAD2 表达的分析

施 琼[1,2],翁亚光[1,2],蒋洪彦[1],徐远久[1],刘子杰[1],刘青松[1],蔡 燕[1]

(1 重庆医科大学临床检验诊断学实验室,2 重庆医科大学基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究结肠癌组织中有丝分裂关卡基因 HsMAD2 的表达。方法:采用定量 real-time RT-PCR 方法检测 18 例结肠癌及正常结肠组织中 hsMAD2 基因表达水平。结果:以 hsMAD2 基因 mRNA 拷贝数/GAPDH 基因 mRNA 拷贝数比值为 hsMAD2 基因 mRNA 水平的相对定量值。结肠癌和正常组织中的 hsMAD2 基因 mRNA 拷贝数/GAPDH 基因 mRNA 拷贝数比值分别为 0.1235±0.0752 和 0.0312±0.0598。hsMAD2 基因的表达水平在结肠癌中显著高于正常结肠组织。结论:hsMAD2 基因在结肠癌组织中的高表达,可能与癌细胞的异常增殖有关,是结肠癌发生发展的原因,可为临床结肠癌的治疗提供有效的靶点。

【关键词】hsMAD2 基因;定量 RT-PCR;结肠癌

【中国图书分类法分类号】R735.35 【文献标识码】A 【收稿时间】2006-12-31

Analysis of expression of mitosis checkpoint gene hsMAD2 in colorectal cancer

SHI Qiong, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of mitosis checkpoint gene hsMAD2 in colorectal cancer. *Methods*: The expression of hsMAD2 gene mRNA in colorectal cancer and normal colorectal tissue of 18 cases was quantitatively detected by RT-PCR. *Results*: The ratio of hsMAD2 mRNA/ GAPDH mRNA in colorectal cancer and normal colorectal tissue were 0.1235±0.0752 and 0.0312±0.0598, respectively. The results suggested that the expression of hsMAD2 mRNA in colorectal cancer were significant higher than in normal colorectal tissue($P<0.05$). *Conclusion*: Compared with normal colorectal tissue, the expression of hsMAD2 mRNA in colorectal cancer was markedly increased. This probably indicated that to up-regulate the expression of hsMAD2 mRNA in colorectal cancer may be a very effective to abnormal proliferation of colorectal cancer cells. And hsMAD2 gene as a related gene to colorectal cancer can play an important role in colorectal cancer pathogenesis.

【Key words】 hsMAD2 gene; Quantitative RT-PCR; Colorectal cancer

MAD2 基因作为细胞有丝分裂监控体系最主要的关卡基因之一,参与细胞周期和细胞增殖的调控,在肿瘤的发生中有重要意义。MAD2 基因的异常表达会导致染色体畸变和基因组的不稳定,可以通过细胞异常增殖的发生来逃逸肿瘤细胞的凋亡。目前认为以 MAD2 基因为代表的这类基因可能控制着最初的癌变过程。有作者证实,人的 MAD2 基因(hsMAD2)或其同类基因与肿瘤相关。本研究应用定量 RT-PCR 方法,从基因水平对比研究 hsMAD2 mRNA 在结肠癌组织和正常结肠组织中的表达情况,为结肠癌的研究提供参考。

作者介绍:施 琼(1969-),女,博士生,
主要研究方向:细胞周期和染色体分离。

1 材料与方法

1.1 材料

标本收集:收集重庆医科大学附属第一医院病理科 2005 年 1 月~2005 年 6 月大肠癌切除组织 18 例,一分为二,其中一半用于病理形态学观察,另一半组织立即放入 -80℃冰箱保存,以备提总 RNA 用。18 例正常结肠组织取自结肠癌手术切除标本(距肿块边缘 5cm 以上,方法同上。本组病例所有患者术前均未接受过放射、化学或免疫治疗。用于病理形态学观察的组织常规 10%甲醛固定、石蜡包埋、4μm 厚连续切片、HE 染色,按 1981 年《全国大肠癌病理协作研究统一规范》诊断标准选取组织标本。其中高分化腺癌 5 例,中分化腺癌 8 例,低分化腺癌(包括黏液腺癌和印戒细胞癌)5 例。年龄 40~60 岁,男女各 9 例。

主要试剂和仪器:定量 PCR 所用探针由上海 Genecore 合成。omniscriptTM Reverse Transcriptase 试剂盒购自 QIA-

维普资讯 http://www.cqvip.com

GEN。platinum Taq polymerase 购自 invitrogen,life technologies。定量 Real-time PCR 仪为美国 ABI 公司生产的 7000 型。

1.2 RNA 的提取

采用异硫氰胍一步法提取组织总 RNA,所用试剂购自上海生物工程公司。将 -80℃冰箱保存的组织块碾碎后加入 1ml 裂解液冰浴中裂解,依次加入 1/10 体积的 2mol/L NaAc(pH4.0)、等体积饱和酚,1/5 体积氯仿 / 异戊醇(49:1),用力混匀,冰浴 15min;于 4℃低温高速离心机 12000r/min 离心 15min,去上清液加等体积冷异丙醇,混匀,于 -20℃冰箱放置过夜;然后置于低温高速离心机 12000r/min 离心 20min,弃上清液。自然干燥后,加入 30μl DEPC 水溶解 RNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性;用紫外分光光度计测量其含量。

1.3 反转录合成 cDNA 在 25μl 反应体系中依次加入 5× buffer;dNTP(10mmol/L);RNase(30U/μl);M-MLV 反转录酶,以 Oligo(dT)18 为引物进行反转录,加样量按说明书。42℃ 1h,冰浴 10min,放置于 -80℃备用。

1.4 用定量 real-time PCR 测定标本 hsMAD2 基因的 mRNA 水平

A hsMAD2 基因特异的引物和探针序列如下:(交由上海 necore 公司合成)

MAD2-FAM: CGAGTTCTTCTCATTCGG

MAD2-FP: GAGCAGGGAATCACCCTGC

MAD2-RP: CCACGCTGATATAAAATGCTGTTG

B 标准品用 T 载体构建(T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司),克隆序列如下:

TGTGGTTGCTGTCCGCCGGAGTGGAAGCGCGTGCTTTTG TTTGTGTCCCTGCCATGCCGCTGCAGCTCTCCCGGGAGCCA GGGAATCACCCTGCGGCGGGAGCGCCGAAATCCTGGCCCAG TTCTTCTCATTCGGCATCAACAGCATTTTATATCAGCGTGGC ATATATCCATCTGAAACCTTTACTCGAGTGCAGAAATACGG ACTCACCCTTGCTT

C 内参选用人的 GAPDH 基因,其探针和引物购自 Genecore 公司。

D 反应主混液及反应条件。

1.5 统计处理

应用 SPSS11.5 软件对结果进行统计学分析。采用方差分析比较结肠癌组织和正常组织的 hsMAD2 基因 mRNA 拷贝数 /GAPDH 基因 mRNA 拷贝数比值。

表 1 定量 PCR 主混液的配制

反应成分	浓度	体积
探针	10μmol/L	0.625
引物正义链	20μmol/L	1.125
引物反义链	20μmol/L	1.125
水		7.625
ABI TaqMan 2× PCR	2×	12.5
模板		2
总体积		25μl

表 2 定量 real-time PCR 循环条件

热链环	时间和温度			
	初始步骤		每一循环反应	
			融解温度	退火延伸温度
ABI PRISM 7900 Sequence Detector	HOLD	HOLD	CYCLE	
	2min	10min	15sec	30sec
	50℃	95℃	95℃	60℃

2 结 果

2.1 RNA 的鉴定

提取的组织总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性显示 18S 和 28S 条带清晰可见。紫外分光光度计检测 A260/A280 均在 1.8 ~ 2.0 之间,说明其纯度较高。

2.2 标本 hsMAD2 基因的 mRNA 水平的定量测定

MAD2 基因扩增标准曲线的 R2 为 0.99932。结肠癌和正常组织中的 hsMAD2 基因 mRNA 拷贝数 /GAPDH 基因 mRNA 拷贝数比值分别为 0.1235 ±

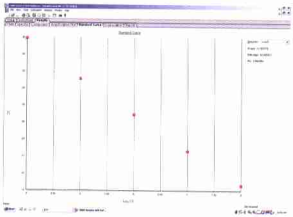


图 1 MAD2 基因扩增的标准曲线

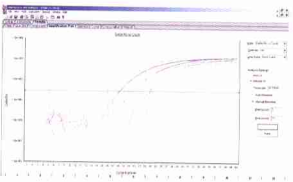


图 2 MAD2 基因扩增的荧光信号

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.0752 和 0.0312 ± 0.0598。应用 SPSS11.5 软件对两比值进行统计学分析,结果显示 $P<0.01$,差异具有统计学意义。说明结肠癌组织中的 hsMAD2 基因 mRNA 显著高于正常组织。

3 讨 论

细胞周期过程必须保证准确性和定时性,而这种时间和空间上的有序性是有一系列关卡来控制的[1]。MAD2 基因作为染色体分离监控系统的一个重要部分,在细胞正常分裂、细胞周期调控和细胞增殖中起着很重要的作用。MAD2 参与检测纺锤体形成过程中微管与染色体动粒结合。正常细胞在有丝分裂中,当动粒未与纺锤体微管结合时,动粒上的 MAD2 与 CDC20(cell division cycle)形成复合物,并不断释放到细胞质内,与 APC(anaphase promo- ting complex)结合而使后者失活,使 APC 不能降解阻遏细胞分裂周期前进的 cyclinB-CDK 复合物,最终使细胞周期停滞。当微管正确结合到动粒上时,可能改变 cenpE 的构象,从而影响 BUB1 等的活性,使 MAD2 失活,无法再抑制 APC,此时细胞进行染色体分离[2]。大量研究报导 MAD2 基因在人类高度保守,未发现其突变体。但 MAD2 表达量的异常能显著改变纺锤体检查点的功能。单独 MAD2 基因 mRNA 量的异常,足够引起纺锤体检查点控制失常,导致染色体不稳定性增加,染色体缺失的机率升高[3]。其机制可能是:MAD2 的异常导致纺锤体检查点的功能减弱或消失,无法监控肿瘤细胞内异常的动粒 - 微管结合,使染色体出现异常分离[4]。这一情况极有可能在有丝分裂后期发生姊妹染色体均被来自一极的纺锤丝微管俘获,分裂时一个细胞多一条或几条染色体,而另一个细胞少一条或几条染色体,造成细胞核型的非整倍体异常。

本研究利用定量 RT-PCR 方法分别对 18 例结肠癌和正常组织中的 MAD2 基因 mRNA 水平进行定量检测,结果发现结肠癌组织中 MAD2 基因 mRNA 水平显著高于正常组织。另外,Poelzl G 等研究表明,Mad2 蛋白与雌激素受体 β 或胰岛素受体的胞质结构域间存在相互作用,而雌激素受体 β 或胰岛素受体能调节细胞的生长,因此认为 Mad2 蛋白的表达对细胞增殖的调节是很重要的[5]。在细胞增殖旺盛的肿瘤组织中,肿瘤细胞胞质中的 Mad2 蛋白明显高表达,由此可推测 Mad2 蛋白可能提高雌激素受体 β 和胰岛素受体对细胞增殖的正性调节作用。当 Mad2 蛋白表达下降时,依赖以上两条通路激活的细胞增殖将受到抑制。在结肠癌癌细胞中 MAD2 基因的高表达也可能是结肠癌细胞增殖旺盛的原因之一[6]。综上所述,MAD2 基因 mRNA 的异常增高在结肠癌的发生、发展中起重要作用。

参 考 文 献

[1] Rieder C.L.,R.W.Cole.The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores[J].Cell Biol,1995;130(2):941-948.

[2] Pennisi E.Cell division gatekeepers identified[J].Science,1998;279(5350):477-479.

[3] Michel LS,Liberal V,Anupam Chatterjee,et al.Mad2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cell[J].Nature,2001;409(6818):355-359.

[4] Kops GJ,Kim Y,Weaver BA,et al.ZW10 links mitotic check point signaling to the structure kinetochore[J].Cell Biol,2005;169(1):49-60.

[5] Poelzl G,Kasai Y,Mochizuki N,et al.Specific association of estrogen receptor beta with the cell cycle spindle assembly checkpoint protein MAD2 [J].Proc Natl Acad Sci USA,2000;97(1):2836-2839.

[6] Gliozzo B,Sung CK,Scalia P,et al.Insulin-stimulated cell growth in insulin receptor substrate-1-deficient ZR-75-1 cells is mediated by a phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway[J].Cell Biochem,1998;70(6):268-280.