

Pax6 基因在视网膜母细胞瘤中的表达及临床意义

黄海东, 李莉洋, 郭颖, 赵兴, 康景佳, 管迪

作者单位: (110034) 中国辽宁省沈阳市, 武警辽宁省总队医院眼科
作者简介: 黄海东, 男, 主治医师, 主任, 研究方向: 眼视光、眼底病。
通讯作者: 黄海东. 424003641@qq.com
收稿日期: 2012-11-12 修回日期: 2013-06-18

Expression and clinical significance of Pax6 gene in retinoblastoma

Hai-Dong Huang, Li-Yang Li, Ying Guo, Xing Zhao, Jing-Jia Kang, Di Guan

Department of Ophthalmology, Liaoning Armed Police Corps Hospital, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Correspondence to: Hai-Dong Huang. Department of Ophthalmology, Liaoning Armed Police Corps Hospital, Shenyang 110034, Liaoning Province, China. 424003641@qq.com

Received: 2012-11-12 Accepted: 2013-06-18

Abstract

• AIM: To discuss the expression and clinical significance of Pax6 gene in retinoblastoma (Rb).

• METHODS: Totally 15 cases of fresh Rb organizations were selected as observation group and 15 normal retinal organizations as control group. Western-Blot and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were used to detect Pax6 protein and Pax6 mRNA expressions of the normal retina organizations and Rb organizations. At the same time, Western Blot method was used to detect the Pax6 gene downstream MATH5 and BRN3b differentiation gene protein level expression. After the comparison between two groups, the expression and clinical significance of Pax6 gene in Rb were discussed.

• RESULTS: In the observation group, average value of mRNA expression of Pax6 gene was 0.99 ± 0.03 ; average value of Pax6 gene protein expression was 2.07 ± 0.15 ; average value of BRN3b protein expression was 0.195 ± 0.016 ; average value of MATH5 protein expression was 0.190 ± 0.031 . They were significantly higher than the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Abnormal expression of Pax6 gene is likely to accelerate the occurrence of Rb.

• KEYWORDS: Pax6 gene; retinoblastoma; expression

Citation: Huang HD, Li LY, Guo Y, et al. Expression and clinical significance of Pax6 gene in retinoblastoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(7):1314-1316

摘要

目的: 探讨 Pax6 基因在视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 中的表达及临床意义。

方法: 选择我院 2001-01/2012-12 收存在眼科病理室的 15 例 Rb 组织切片设为观察组, 再选取 15 例正常视网膜组织切片设为对照组。应用 Western-Blot 及 RT-PCR (逆转录酶链反应) 法分别对正常视网膜组织及 Rb 组织中的 Pax6 蛋白和 Pax6 mRNA 的表达进行检测, 同时应用 Western-Blot 法对 Pax6 基因下游的 BRN3b 及 MATH5 促分化基因在蛋白水平的表达进行检测, 最后进行组间比较, 进而对 Pax6 基因在 Rb 中的表达及临床意义进行探讨。

结果: 观察组 Pax6 基因 mRNA 表达平均值为 0.99 ± 0.03 , Pax6 基因蛋白表达平均值为 2.07 ± 0.15 , BRN3b 蛋白表达平均值为 0.195 ± 0.016 , MATH5 蛋白表达平均值为 0.190 ± 0.031 , 均明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 异常表达的 Pax6 基因可能对 Rb 的出现起到促进作用。

关键词: Pax6 基因; 视网膜母细胞瘤; 表达

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.07.04

引用: 黄海东, 李莉洋, 郭颖, 等. Pax6 基因在视网膜母细胞瘤中的表达及临床意义. 国际眼科杂志 2013;13(7):1314-1316

0 引言

在威胁人类生命安全及健康的疾病中, 恶性肿瘤首当其冲, 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 属于原发性的眼内恶性肿瘤, 在儿童中多见, 不仅对患儿的视力造成影响, 还会对其生命造成威胁^[1]。目前认为 Rb 的发生机制不仅是局限于单纯的基因失活导致, 而且还存在其他的基因损伤而形成, Pax6 基因作为眼发育的调控基因, 认为其也参与 Rb 形成的过程。我们通过 Western-Blot 及 RT-PCR 检测 Pax6 基因, BRN3b 及 MATH5 在 Rb 中的表达, 现汇总如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择我院 2001-01/2012-12 收存在眼科病理室的 15 例 Rb 组织切片设为观察组, 再选取 15 例正常视网膜组织切片设为对照组。所有患者在手术之前并未进行化疗、放疗等治疗。所有标本均经中性福尔马林固定, 选择美国 Invitrogen 公司 (美国) 生产的 Trizol 试剂, 鼠抗人 Pax6 抗体由 CHEMICON 公司 (美国) 生产, MATH5 和 BRN3b 抗体均选择英国 Abcam 公司, BCA 蛋白定量试剂盒选自韩国 SUNBIO 公司, Taq DNA 聚合酶由 Takara 公司 (日本) 生产, 反转录试剂盒由 QIAGEN 公司 (美国) 生产。

1.2 方法

1.2.1 切片制作过程 用硫酸清洁液浸泡载玻片 24h, 再用蒸馏水反复冲洗, 再用配置好的稀释多聚赖氨酸液浸泡

1min,取出放入恒温箱(20℃)中备用。盖玻片同上,然后将所有标本进行切片厚度约4μm,再放入烤箱中烘烤(60℃),使组织与玻片紧密接触。

1.2.2 染色 对 Rb 组肿瘤组织切片进行苏木素-伊红(HE)染色,以确认 Rb 的病理形态并观察 Rb 中是否存在 Pax6。HE 染色病理切片表现的判定标准:未分化型:肿瘤细胞不呈菊花团排列;分化型:肿瘤细胞呈菊花团排列。

1.2.3 RT-PCR 检测 Pax mRNA 表达 提取 Rb 肿瘤组织、正常视网膜组织的总 RNA 按照 Trizol 操作说明书进行,然后对于 RNA 采用紫外分光光度计检测吸光度值,确定 RNA 浓度后进行逆转录合成互补 cDNA,其中 mRNA 的上样量定为 1μg,-20℃ 进行保存,再以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,其中 Pax6 引物分别为 5'-GCCTCATAAAGCGCGAAGAC-3' 和 3'-TCACTC-GCGTGTCACTGTTC-5',引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 操作步骤:10×缓冲液 2μL,MgSO₄ 1.8μL,dNTP 2.0μL,引物 0.25μL,dH₂O 30μL 加入 cDNA 4μL 中轻轻混合,然后按 94℃ 3min,94℃ 30s,57℃ 30s,72℃ 1min,72℃ 5min 的条件进行循环 30 次,最后取 PCR 产物 5μL 进行琼脂糖凝胶电泳。用 TanonGis(天能)凝胶图象分析系统进行分析,光密度确定 mRNA 的表达水平。以目的基因片断/GAPDH 片断的条带 OD 比值对其相对含量进行分析。

1.2.4 Western-Blot 检测 Pax 蛋白表达 取 RB 组织、正常视网膜组织各 20mg,冰上匀浆并置留 20min 予以充分裂解,然后在 4℃ 的环境下,以 12000r/min 的速度进行离心 10min,取上清于-20℃ 冻存,按照 BCA 操作法进行测定蛋白浓度。然后取总蛋白 50μg 进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后,用电转仪将蛋白转移到 PVDF 膜上,时间约 45min,然后将 PVDF 膜在 4℃ 环境下用 50g/L 脱脂奶粉封闭 1h,封闭后再脱洗 3 次,然后加入 Pax6 和 BRN3b 与 MATH5 抗体,4℃ 环境下过夜,次日再加入碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠抗体孵育 1h,然后再脱洗 3 次,最后用显色液显色定影。使用 LabWorks 软件对图像进行灰度分析,计算出三种蛋白的表达量。

统计学分析:统计学软件为 SPSS 13.0,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对数据进行独立样本 *t* 检验,Rb 组中 Pax6 和 BRN3b 与 MATH5 蛋白表达相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rb 组肿瘤组织分型 对 Rb 组肿瘤组织切片进行 HE 染色发现,观察组中 Rb 未分化型 7 例(图 1),分化型 8 例(图 2),并且在 Rb 肿瘤组织中发现 Pax6 基因表达(图 3)。

2.2 两组中 Pax6 mRNA 及蛋白的表达 比较两组中 Pax6 mRNA 及蛋白表达,结果在正常视网膜组和 RB 组中,均可检测出 Pax6,BRN3b 与 MATH5 蛋白的表达(图 4);RT-PCR 结果显示:在正常视网膜组织和 RB 组织中,均可检测出 Pax6 的表达(图 5),并且观察组 Pax6 mRNA 表达平均值为 0.99 ± 0.03 、蛋白表达平均值为 2.07 ± 0.15 ,均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

2.3 两组中 BRN3b 及 MATH5 蛋白表达 比较两组中 BRN3b 及 MATH5 蛋白的表达,结果观察组 BRN3b 蛋白表达平均值为 0.195 ± 0.016 ,MATH5 蛋白表达平均值为 0.190 ± 0.031 ,均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

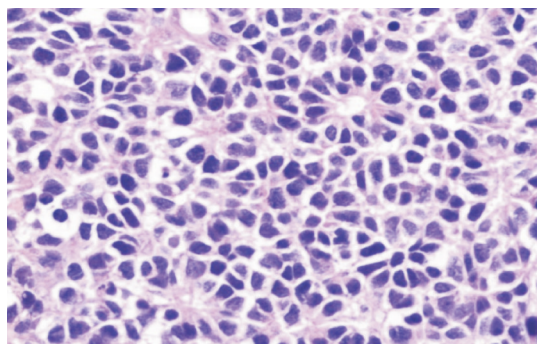


图 1 未分化型视网膜细胞瘤(HE×400)。

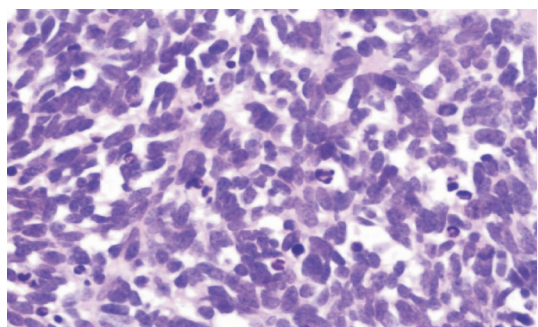


图 2 分化型视网膜细胞瘤(HE×400)。

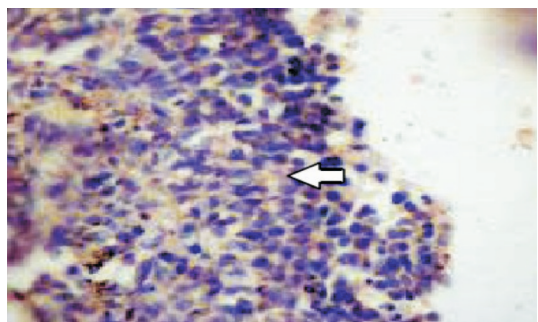


图 3 Pax6 在 Rb 组织切片中阳性表达(箭头所示)。

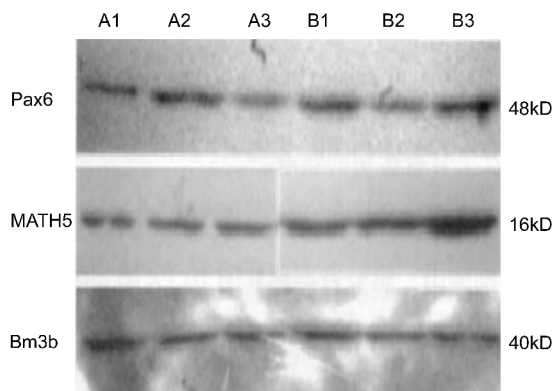


图 4 正常视网膜组织和 RB 组织中三种蛋白 A:正常视网膜组织;B:Rb 组织。

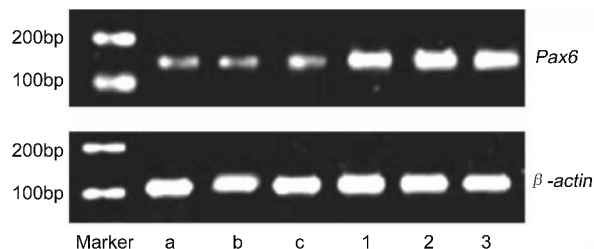


图 5 正常视网膜组织和 Rb 组织中 Pax6 的 RT-PCR 产物图 a~c:正常视网膜组织;1~3:Rb 肿瘤组织。

表1 两组中 Pax6 mRNA 及蛋白的表达 $\bar{x} \pm s$

分组	n(例)	Pax6 mRNA	Pax6 蛋白
观察组	15	0.99±0.03	2.07±0.15
对照组	15	0.66±0.04	1.72±0.11
<i>t</i>		5.345	5.241
<i>P</i>		0.042	0.040

表2 两组中 BRN3b 及 MATH5 蛋白的表达 $\bar{x} \pm s$

分组	n(例)	BRN3b 蛋白	MATH5 蛋白
观察组	15	0.195±0.016	0.190±0.031
对照组	15	0.123±0.007	0.114±0.005
<i>t</i>		5.024	5.012
<i>P</i>		0.0002	0.0005

2.4 Rb 组中 Pax6 和 BRN3b 与 MATH5 蛋白表达相关性分析 根据多元相关性分析显示:Rb 组中,Pax6 蛋白表达与 BRN3b 和 MATH5 蛋白表达呈正相关关系($r = 0.745, 0.736; P < 0.05$)。

3 讨论

迄今为止,Rb 的发病机制尚未完全明确,在以往的研究中发现,Rb 大部分起源于视网膜多克隆细胞混合体或者多能干细胞,经过诱导可以向视网膜细胞的多种类型方向进行分化^[2]。因此,在某种意义上 Rb 细胞可以被认定为尚未定型的视网膜细胞。与此同时,研究还发现视网膜在发育过程中 Rb 的基因失活与母细胞瘤的发生密切相关,失活的 Rb 基因能够将限制细胞周期的作用解除,因而出现细胞增殖失控^[3]。但随着医疗技术水平的发展,现在已认为对于其的发生并不是局限在单纯的基因失活方面,而且还存在其他的基因损伤而形成,在眼的发育中,Pax6 基因具有严格的时空顺序在视网膜发育的过程中,是十分重要的调控基因,引起越来越多眼科研究者的关注^[4]。

在研究 Rb 时,有学者发现与细胞周期有关的调控蛋白出现了异常表达,说明细胞周期的异常调控与 Rb 的发生密切相关^[5]。因此提示 Pax6 基因可能参与 Rb 形成的过程。结合本组研究表明,在 Rb 的肿瘤组织中检测到 Pax6 mRNA 的表达,Western-Blot 检测也表明有 Pax6 的蛋白表达,并且表达水平均高于正常视网膜组织。研究表明 Pax6 基因具有促进肿瘤细胞增殖和分化的作用,可能是通过对于 BRN3b 和 MATH5 基因表达的调控实施的,BRN3b 蛋白和 MATH5 蛋白在视网膜神经节细胞的分化过程中形成,为标志蛋白。今本研究显示:Pax6 与 MATH5 和 Brn3b 三种蛋白的表达均可在正常的视网膜组织中体现,明显低于 Rb 组织中三种蛋白表达的水平,并且三种蛋白的表达呈线性关系,因此在 Rb 的形成中可能是 Pax6 基因作为 Math5 和 Brn3b 的上游因子,促进其分化所致。

结合本研究表明,异常表达的 Pax6 基因可能对 Rb 的出现起到促进作用,但是由于本研究的样本量较少,尚不能足以说明问题,在今后的研究中我们会尽量完善,且对于 Pax6 基因是否可作为治疗 Rb 的新分子靶点等问题尚需要进一步的分子生物学研究来证明。

参考文献

- 1 钟秀凤,李永平,葛坚,等.人视网膜母细胞瘤干细胞的分离培养.中国病理生理杂志 2006;22:1177-1181
- 2 王慧娟,李彬,张浩,等.眼发育调控基因 Pax6 在视网膜母细胞瘤中表达的初步研究.眼科 2008;17(5):352-356
- 3 康前雁,刘勇,陈新林,等.人视网膜祖细胞和脑神经干细胞的体外培养和诱导分化研究.中华眼科杂志 2006;42(10):901-907
- 4 李彬,张浩,王慧娟.Pax6 基因在视网膜母细胞瘤发生发展中的作用.眼科 2009;18:137-138
- 5 申令,史季桐,李彬,等.PAX6 基因及其下游促分化基因在视网膜母细胞瘤分化过程中的作用.眼科 2011;20(6):408-411