

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002897

早期停育胚胎组织 Bcl-2、c-Myc 癌基因和 P53、P16 抑癌基因的表达

谢远志,王正尧,蔡晶晶,曹 辉,陈 静,吴金香
(福建医科大学附属第二医院生殖医学科,泉州 362000)

【摘要】目的:探索早期停育胚胎组织与正常发育的早期胚胎组织癌基因、抑癌基因表达差异。**方法:**应用免疫组化法分析 56 例早期正常发育清宫的胚胎组织和 68 例早期停育胚胎组织 Bcl-2、c-Myc 癌基因及 P53、P16 抑癌基因表达差异。**结果:**Bcl-2、c-Myc 癌基因在早期正常发育清宫的胚胎组织和早期停育胚胎组织中的阳性率分别为 53.57%(30/56)、30.36%(17/56) 和 77.94%(53/68)、45.59%(31/68);P53、P16 抑癌基因在早期正常发育清宫的胚胎组织和早期停育胚胎组织中的阳性率分别为 39.29%(22/56)、73.21%(41/56) 和 27.94%(19/68)、47.06%(32/68)。**结论:**癌基因、抑癌基因在调控早期胚胎分化发育过程中起重要作用。

【关键词】胚胎停育;肿瘤;胚胎发育;细胞凋亡

【中图分类号】R714.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-04-19

Expression of Bcl-2 and c-Myc oncogenes and P53 and P16 anti-oncogenes in early development-arrest-embryo tissue

Xie Yuanzhi, Wang Zhengyao, Cai Jingjing, Cao Hui, Chen Jing, Wu Jinxiang

(1. Department of Reproductive Medicine, The Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the differential expression of oncogenes and anti-oncogenes in early development-arrest-embryo tissue and normal early embryonic tissue. **Methods:** The expression of Bcl-2 and c-Myc oncogenes and P53 and P16 anti-oncogenes in chorionic tissue were analyzed by immunohistochemical method from 56 cases of normal early embryonic tissue and 68 cases of early development-arrest-embryo tissue. **Results:** The positive rates of Bcl-2 and c-Myc oncogenes in normal early embryonic tissue and early development-arrest-embryo tissue were 53.57%(30/56) vs. 30.36%(17/56) and 77.94%(53/68) vs. 45.59%(31/68) respectively. The positive rates of P53 and P16 anti-oncogenes in normal early embryonic tissue and early development-arrest-embryo tissue were 39.29%(22/56) vs. 73.21%(41/56) and 27.94%(19/68) vs. 47.06%(32/68) respectively. **Conclusion:** The balanced expression of oncogenes and anti-oncogenes plays an important role in early embryonic development.

【Key words】embryo development arrest; tumor; embryonic development; apoptosis

成功妊娠的关键取决于早期胚胎着床,这一过程涉及囊胚与同步发育至接受态期的子宫内膜之间紧密而又复杂的相互作用。随着国家二孩政策开放,孕龄妇女的生育要求,特别是高龄妇女的生育需求日趋强烈,在我国孕龄人群中不孕不育的患病率约 25%,流产率约 70%^[1]。有研究表明,约 75%的

妊娠失败发生在妊娠早孕阶段^[2],25%的流产会对后续妊娠造成不利影响,超过 90%影响妊娠的早期阶段^[3]。可见,早期妊娠阶段是生命孕育的关键时期。因此,解析早期妊娠丢失的病因和病理生理机制以防治早期妊娠丢失是确保成功妊娠的关键。

一般妊娠前 12 周称为早期妊娠,早期妊娠涉及早期胚胎发育,囊胚与接受态期子宫内膜互作、植入,母胎免疫豁免,胚胎继续分化发育等重要过程。每个关键节点出现问题均可导致早期妊娠失败。胚胎的一半遗传物质来自父源,作为半异质体的胚胎在母体内必须免受母源免疫系统攻击,从而有序分化

作者介绍:谢远志, Email: yuanzhi821026@163.com,

研究方向:早期胚胎发育。

通信作者:吴金香, Email: pursuer@163.com。

基金项目:泉州市科技计划资助项目(编号:Z[2014]0104)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210918.1520.012.html>

(2021-09-18)

发育成一个成熟的个体。近年来,胚胎停止发育的发生率在临床上呈现不断上升的趋势,不仅严重影响妇女身心健康,同时给家庭带来巨大的伤害^[4]。导致胚胎停育的病因非常复杂,甚至是多因素造成的结果。遗传因素、自身感染性疾病、生殖道结构异常、免疫功能异常、内分泌失调、环境污染、食品安全、辐射等因素造成的细胞增殖与凋亡的失衡,均可导致胚胎发育不良,而引起胚胎停止发育的诸多社会因素与癌症发生的诱因极为相似^[5-6]。

肿瘤形成、增殖、侵袭和转移等相关因素及机制引发对早期胚胎发育的启示。癌基因、抑癌基因在调节胚胎发育方面起重要作用,绝大多数原癌基因的表达开始于胚胎时期,调控胚胎的分化发育^[7-8]。抑癌基因在控制细胞生长、增殖及分化过程中起十分重要的负调节作用。它与癌基因相互制约,维持正负调节信号的相对稳定。然而,目前对癌基因和抑癌基因在早期不良妊娠的研究较少。P53 是一种肿瘤抑制基因,在所有恶性肿瘤中,50%以上会出现该基因的突变^[9]。由该基因编码的蛋白质是一种转录因子,控制细胞周期的启动。当细胞受损又不能得到修复时,P53 蛋白将参与启动过程,使细胞凋亡^[10]。近年来国外研究者认为 P53 抑癌基因多态性与早期反复流产密切相关^[11]。Uzunlar AK 等^[12]认为 P53 抑癌基因在自然流产的滋养细胞中表达明显降低。P16 基因是细胞周期中的一种基本基因,直接参与细胞周期的调控,负调节细胞增殖及分裂,在人类 50% 的肿瘤细胞株中发现有纯合子缺失、突变,认为它是比 P53 更重要的一种新型抗癌基因。有研究者报道,早期自然流产与 P16 基因甲基化异常相关^[13]。B 淋巴细胞瘤-2 基因简称 Bcl-2,是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一^[14]。Bcl-2 与 Bax 相互协调,共同决定细胞的命运。高表达的 Bax 会抑制 Bcl-2,从而诱导凋亡;反之,Bcl-2 表达增高会抑制 Bax,使细胞得以生存^[15]。Bcl-2 与 Bax 两者均参与胚胎的早期发育,被认为是监测早期正常和异常妊娠的前景靶标^[16]。Myc 基因参与多种生物学过程。Claveria C 等^[17]研究发现,Myc 水平在早期哺乳动物胚胎的上皮细胞之间异质表达有助于细胞的谱系分化。c-Myc 基因是 Myc 基因家族的重要成员之一,在介导细胞增殖和早期胚胎发育方面起重要作用^[18]。

综上,胚胎免受母体免疫系统攻击从受精卵有序地发育成个人的过程类似于肿瘤逃逸体内免疫防疫系统而有序地增殖过程,且肿瘤发生与早期妊娠丢失的诱因极为相似。为揭示有序发育与无序增殖之间的差异与联系,本研究采用早期正常发育清宫的胚胎组织和早期停育胚胎组织为研究对象,选取与肿瘤和早期胚胎发育均有相关性的 Bcl-2、c-Myc 癌基因和 P53、P16 抑癌基因进行检测与分析,以期提供导致早期妊娠丢失的可能分子基础。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集福建医科大学附属第二医院 2017 年 7 月至 2019 年 7 月门诊妇科经超声检查提示早期宫内正常妊娠、胎心良好并自愿行人流手术的患者 56 例;超声检查提示“胚胎停育”并自愿行人工流产的患者 68 例临床资料。平均年龄为 (30.4 ± 5.3) 岁,平均终止妊娠的天数为 (65.18 ± 10.43) d,均为单胎。所有孕妇在此次孕期均无衣原体、支原体、巨细胞病毒等感染病史。

1.2 实验方法

收集早期停育胚胎以及自愿行人工流产的绒毛组织,标本均在无菌条件下常规负压吸引,并迅速置生理盐水中漂洗,其中部分组织用 10% 的甲醛溶液固定,常规乙醇脱水,石蜡包埋,采用 SP 法进行免疫组化染色。另一部分组织至 RIPA 裂解液中破碎,并冻存于 -80°C 冰箱以备后续蛋白印迹实验。一抗为兔抗人 Bcl-2、c-Myc、P16 和 P53 蛋白的单克隆抗体,购自 Abcam 公司。阳性结果判断标准:Bcl-2 在细胞质出现棕黄色颗粒,c-Myc 和 P53 在细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性表达,P16 在细胞核和(或)细胞质中出现棕色信号为阳性表达。高倍镜下(400 倍)取 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性细胞数 $<25\%$ 为阴性, $25\% \sim 50\%$ 为弱阳性(+), $50\% \sim 75\%$ 为阳性(++), $\geq 75\%$ 为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理

本研究数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。所得数值均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本均数比较用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Bcl-2 和 c-Myc 癌基因的表达

在早期正常发育人工流产的胚胎组织和早期停育胚胎组织中 Bcl-2、c-Myc 癌基因表达的阳性率分别为 53.57% (30/56)、30.36% (17/56) 和 77.94% (53/68)、45.59% (31/68)。卡

方检验结果显示,Bcl-2 癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率明显高于人工流产组,差异有统计学意义($\chi^2=124.000$, $P<0.001$);c-Myc 癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率明显高于人工流产组,差异具有统计学意义($\chi^2=124.000$, $P<0.001$)(图 1、图 2,表 1)。

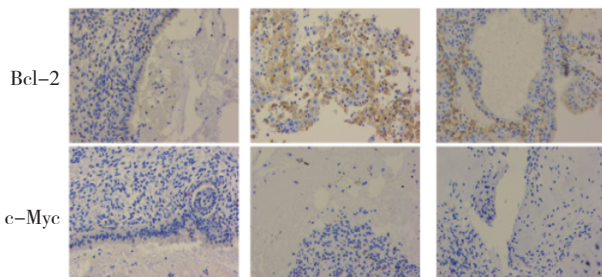


图 1 Bcl-2、c-Myc 癌基因在早期人工流产组织中的表达

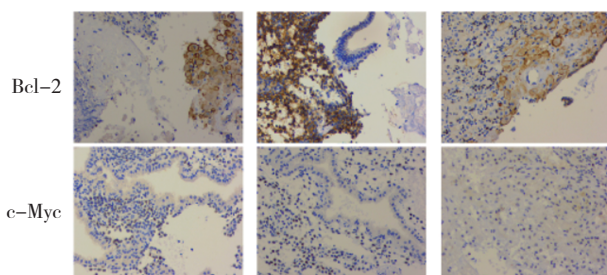


图 2 Bcl-2、c-Myc 癌基因在早期胚胎停育组织中的表达

2.2 P16 和 P53 抑癌基因的表达式

在早期正常发育人工流产的胚胎组织和早期停育胚胎组织中,P53、P16 抑癌基因表达的阳性率分别为 39.29%(22/56)、73.21%(41/56)和 27.94%(19/68)、47.06%(32/68)。卡方检验结果显示,P53 抑癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率低于人工流产组,差异有统计学意义($\chi^2=124.000$, $P<0.001$);P16 抑癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率明显低于人工流产组,差异具有统计学意义($\chi^2=122.000$, $P<0.001$)(图 3、图 4,表 2)。

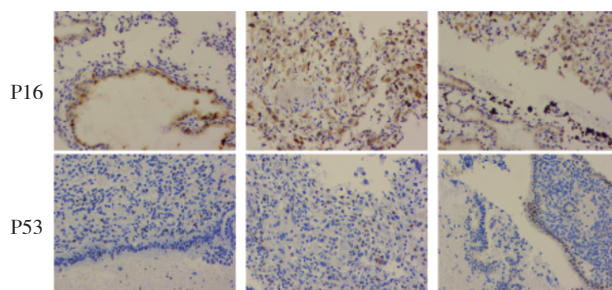


图 3 P16、P53 在早期人工流产组织中的表达

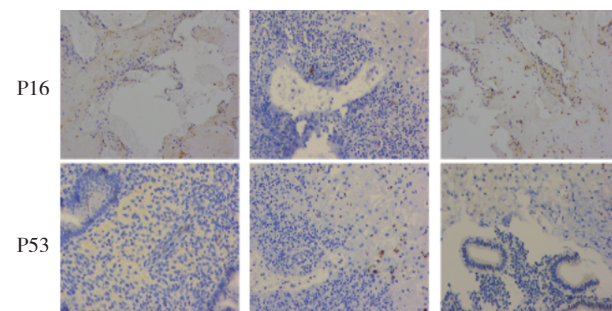


图 4 P16、P53 在早期胚胎停育组织中的表达

2.3 Bcl-2、c-Myc 和 P16、P53 在 2 组之间表达的定量分析

应用蛋白印记法分析早期正常发育人工流产和早期停育胚胎组织中 Bcl-2、c-Myc 和 P16、P53 蛋白表达差异。Western blot 结果显示,以蛋白 Marker 为参照,GAPDH 为内参,采用 Image Lab 3.0 软件定量分析各因子的蛋白表达水平。统计学分析结果显示,Bcl-2 蛋白在早期停育胚胎组织中表达明显高于人工流产组,差异有统计学意义($t=4.057$, $P=0.03$);同样,c-Myc 蛋白在早期停育胚胎组织中表达明显高于人工流产组,差异有统计学意义($t=3.254$, $P=0.005$)(图 5)。而早期停育胚胎组织中 P16、P53 的表达均明显低于人工流产组,差异有统计学意义($t=-13.339$, $P=0.029$; $t=-12.128$, $P=0.002$)(图 6)。

表 1 早期人工流产胚胎组织和早期停育胚胎组织中 Bcl-2、c-Myc 癌基因表达

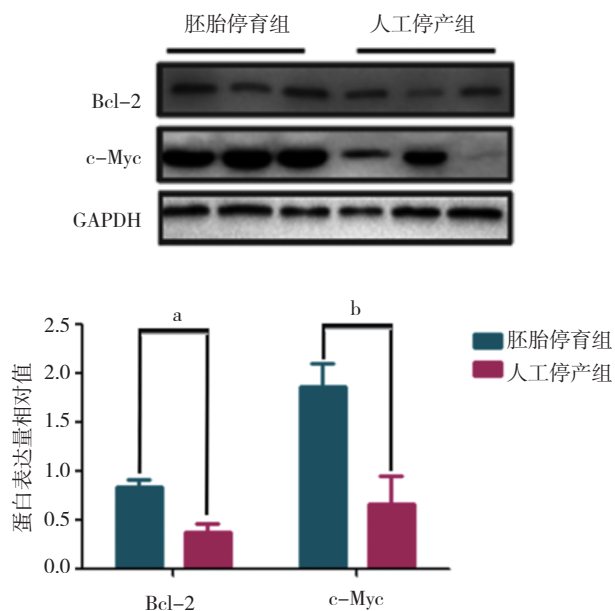
组别	Bcl-2			阳性率 /%	c-Myc			阳性率 /%
	+	++	+++		+	++	+++	
胚胎停育组 (n=68)	12	8	33	77.79 ^a	13	7	11	45.59 ^b
人工流产组 (n=56)	11	15	4	58.93	10	3	4	30.36

注:a,与人工流产组相比,Bcl-2 癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率明显增高, $P<0.001$;b:与人工流产组相比,c-Myc 癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率明显增高, $P<0.001$

表 2 早期人工流产的胚胎组织和早期停育胚胎组织中 P53、P16 抑癌基因表达

组别	P53			阳性率 /%	P16			阳性率 /%
	+	++	+++		+	++	+++	
胚胎停育组 (n=68)	12	6	1	27.94	16	9	7	47.06
人工流产组 (n=56)	11	8	3	39.29 ^a	12	16	13	73.21 ^b

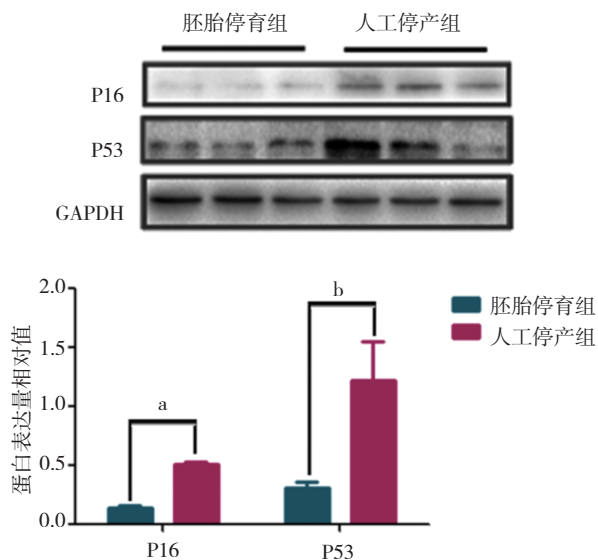
注:a,与人工流产组相比,P53 抑癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率明显降低, $P<0.001$;b:表示与人工流产组相比,P16 抑癌基因在早期停育胚胎组织中表达阳性率明显降低, $P<0.001$



注:a, 胚胎停育组与人工流产组 Bcl-2 相对表达量的差异, $P=0.03$;

b: 胚胎停育组与人工流产组 c-Myc 相对表达量的差异, $P=0.005$

图5 Bcl-2、c-Myc 蛋白在正常发育人工流产和早期停育胚胎组织中的定量分析



注:a, 胚胎停育组与人工流产组 P16 相对表达量的差异, $P=0.029$;

b: 胚胎停育组与人工流产组 P53 相对表达量的差异, $P=0.002$

图6 P16、P53 蛋白在正常发育人工流产和早期停育胚胎组织中的定量分析

3 讨论

新生命的孕育起源于配子发生,历经精卵结合(受精)、早期胚胎发育,而后必须植入子宫(胚胎植入)并和母体建立功能性联系(胎盘发生),才能继

续发育直至分娩。早期胚胎停止发育严重困扰育龄夫妇,同时给家庭和社会带来巨大的伤害。其病因复杂,机制不详,制订完善有效的预防和治疗措施是研究和关注的热点。早期胚胎停止发育的诸多社会因素与癌症发生的诱因极为相似。2013 年 Nieto MA^[19]在 *Science* 杂志从细胞的增殖、迁移及植入以及上皮间质细胞转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)和间质上皮细胞转化(mesenchymal to epithelial transition, MET)过程等多方面生物学行为详细阐述了早期胚胎干细胞与肿瘤干细胞的众多相似之处,并指出研究早期胚胎的正常发育形态为肿瘤的治疗策略提供方向和依据。癌基因和抑癌基因调控细胞的增殖和凋亡,胚胎停育与癌基因和抑癌基因的多态性及异常表达相关^[16,20]。

鉴于肿瘤形成、增殖、侵袭和转移等相关因素及机制引发对早期胚胎发育的启示。癌基因、抑癌基因在调节胚胎发育方面起重要作用,绝大多数原癌基因的表达开始于胚胎时期,调控胚胎的分化发育。抑癌基因在控制细胞生长、增殖及分化过程中起十分重要的负调节作用。它与癌基因相互制约,维持正负调节信号的相对稳定。本研究采用早期正常发育清宫的胚胎组织和早期停育胚胎组织为研究对象,选取较为经典的与肿瘤发生相关的 Bcl-2、c-Myc 癌基因和 P53、P16 抑癌基因进行检测与分析,发现早期停育胚胎组织中 Bcl-2、c-Myc 癌基因表达明显高于正常发育胚胎组织,而 P53、P16 抑癌基因表达明显低于正常发育胚胎组织,差别具统计学意义。现有资料表明,在许多肿瘤组织中,癌基因发生突变或被异常激活,或抑癌基因发生突变、缺失或失活时可引起细胞恶性转化而引发肿瘤的发生。本实验结果提示,在早期正常发育的胚胎组织中, Bcl-2、c-Myc 癌基因表达较弱, P53、P16 抑癌基因表达较强,癌基因和抑癌基因在早期胚胎发育过程中相互制约,维持正负调节信号相对稳定,共同调控早期胚胎的正常分化发育。这预示早期正常发育的胚胎组织中癌基因和抑癌基因的表达有别于癌症组织,可能是半异质体的胚胎在母体内免受母源免疫系统攻击,有序分化发育成成熟个体的一个原因。基于此,今后可以利用细胞系结合基因敲除动物模型进一步验证早期胚胎发育过程中癌基因和抑癌基因的表达异常与早期胚胎不良发育之间的

因果关系及可能的参与机制。此外,尽管本研究发现早期停育流产组织和正常发育清宫组织之间 Bcl-2、c-Myc 癌基因和 P53、P16 抑癌基因表达存在差异,但是不能代表所有的癌基因和抑癌基因,有待更多的研究数据支持与扩充,以便揭示更多早期胚胎发育过程中潜在的分子调控机制,为早期胚胎发育不良的临床诊治提供帮助。

癌基因、抑癌基因在调节肿瘤发生与胚胎发育方面起重要作用,胚胎停育与肿瘤发生不仅在探讨病因学方面相似;胚胎的发育、植入子宫等生理过程也与癌症的增殖与侵袭转移相似。通过本实验,本课题组认为胚胎发育与癌症发生之间在病理生理学与机制方面可互相渗透,从而为探究早期胚胎停育的相关机制及防治早期胚胎停育提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Zhou Z,Zheng D,Wu H,et al. Epidemiology of infertility in China: a population-based study[J]. BJOG,2018,125(4):432-441.
- [2] Norwitz ER,Schust DJ,Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy[J]. N Engl J Med,2001,345(19):1400-1408.
- [3] Regan L,Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage[J]. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol,2000,14(5):839-854.
- [4] Pinar MH,Gibbins K,He M,et al. Early pregnancy losses:review of nomenclature,histopathology,and possible etiologies[J]. Fetal Pediatr Pathol,2018,37(3):191-209.
- [5] Balch C,Ramapuram JB,Tiwari AK. The epigenomics of embryonic pathway signaling in colorectal cancer[J]. Front Pharmacol,2017,8:267.
- [6] Callan AC,Milne E. Involvement of the IGF system in fetal growth and childhood cancer:an overview of potential mechanisms[J]. Cancer Causes Control,2009,20(10):1783-1798.
- [7] Quenby SM,Gazvani MR,Brazeau C,et al. Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester human fetal gonadal development[J]. Mol Hum Reprod,1999,5(8):737-741.
- [8] Faucherre A,Taylor GS,Overvoorde J,et al. Zebrafish pten genes have overlapping and non-redundant functions in tumorigenesis and embryonic development[J]. Oncogene,2008,27(8):1079-1086.
- [9] Courtade-Saïdi M,Aziza J,d'Aure D,et al. Immunocytochemical staining for p53 and Ki-67 helps to characterise urothelial cells in urine cytology[J]. Cytopathology,2016,27(6):456-464.
- [10] Liu HC,Ma F,Shen Y,et al. Overexpression of SMAR1 enhances radiosensitivity in human breast cancer cell line MCF7 via activation of p53 signaling pathway[J]. Oncol Res,2014,22(5/6):293-300.
- [11] Tang WR,Zhou XH,Chan Y,et al. p53 codon 72 polymorphism and recurrent pregnancy loss:a meta-analysis[J]. J Assist Reprod Genet,2011,28(10):965-969.
- [12] Uzunlar AK,Yilmaz F,Bayhan G,et al. Expressions of p53,proliferating cell nuclear antigen,and Ki-67 in gestational trophoblastic diseases[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2002,23(1):79-83.
- [13] Park HM,Shin SJ,Choi DH,et al. Association between folate metabolism-related gene polymorphisms and methylation of p16(INK4A) and hMLH1 genes in spontaneously aborted embryos with normal chromosomal integrity[J]. Fertil Steril,2008,90(5):1605-1610.
- [14] Griffin NI,Sharma G,Zhao XS,et al. ADA3 regulates normal and tumor mammary epithelial cell proliferation through c-Myc[J]. Breast Cancer Res,2016,18(1):113.
- [15] Cvejic D,Selemetjev S,Savin S,et al. Changes in the balance between proliferation and apoptosis during the progression of malignancy in thyroid tumours[J]. Eur J Histochem,2009,53(2):65-71.
- [16] Michita RT,Zambra FMB,Fraga LR,et al. The role of FAS,FAS-L,BAX,and Bcl-2 gene polymorphisms in determining susceptibility to unexplained recurrent pregnancy loss[J]. J Assist Reprod Genet,2019,36(5):995-1002.
- [17] Clavería C,Giovinazzo G,Sierra R,et al. Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo[J]. Nature,2013,500(7460):39-44.
- [18] Lemaitre JM,Buckle RS,Méchal M. c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development[J]. Adv Cancer Res,1996,70:95-144.
- [19] Nieto MA. Epithelial plasticity:a common theme in embryonic and cancer cells[J]. Science,2013,342(6159):1234850.
- [20] Fraga LR,Dutra CG,Boquett JA,et al. p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss[J]. Mol Biol Rep,2014,41(3):1871-1877.

(责任编辑:唐秋姗)