基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1138-03

骨桥蛋白在涎腺肿瘤中的表达及临床意义

曾明慧[1],曾志华[2],李 瑛[3],杨雪萍[4],杨志惠[5],黄学宽[6]

(1.重庆医科大学社区医疗中心口腔科,重庆 400016;2.重庆医科大学中医药学院针灸推拿教研室,重庆 400050;3.中国人民解放军第三二四医院口腔科,重庆 400020;4.重庆医科大学社区医疗中心,重庆 400016;5.泸州医学院病理学教研室,泸州 646000;6.重庆医科大学中医药学院中医基础教研室,重庆 400053)

【摘 要】目的:研究涎腺肿瘤中骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)mRNA 和蛋白表达水平与临床病理特征之间的关系。方法:应用荧光实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 OPN mRNA 和蛋白在 41 例恶性涎腺肿瘤和 21 例良性涎腺肿瘤及 10 例正常涎腺组织中表达量,分析 OPN mRNA 和蛋白表达量与涎腺肿瘤临床病理特征的关系。结果:OPN mRNA 和蛋白在恶性肿瘤中的表达量明显高于在良性肿瘤和正常组织中的表达量,差异具有统计学意义($P<0.05$)。OPN mRNA 表达水平与恶性涎腺肿瘤 TNM 分期和淋巴结转移密切相关,蛋白表达水平与 TNM 分期有关($P<0.05$),与发病部位、分化程度无明显相关性。结论:恶性涎腺肿瘤中 OPN mRNA 和蛋白表达量明显增高,并与临床病理特征密切相关。

【关键词】骨桥蛋白;涎腺肿瘤;实时荧光定量 RT-PCR;Western blot

【中国图书分类法分类号】R780.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-11

Expression of osteopontin and its clinico-pathological significance in salivary gland tumors

ZENG Ming-hui, et al

(*Department of Dental, Community Healty Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of osteopontin (OPN) mRNA and protein and its correlation with clinico-pathological features of salivary gland tumors. *Methods*: OPN mRNA and protein level were detected by fluorescent quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot in 41 cases of malignant salivary gland tumors, 21 of benign salivary gland tumors and 10 of normal salivary gland tissues. The relationship between the relative content of OPN mRNA and protein and clinico-pathological features of salivary gland tumors were analyzed. *Results*: The differences of OPN mRNA and protein expression levels in various tissues (malignant salivary gland tumors, benign alivary gland tumors and normal salivary gland tissues) were statistically significant, and the mRNA expression levels were correlated significantly with node metastasis and TNM stage, the expression levels of OPN protein were correlated significantly with node metastasis and TNM stage ($P<0.05$). *Conclusion*: OPN mRNA and protein were over-expressed in malignant salivary gland tumors, and they were correlated to the clinico-pathological features. Western blot tumors, benign alivary gland tumors and normal salivary gland tissues) were statistically significant, and the mRNA expression levels were correlated significantly with node metastasis and TNM stage, the expression levels of OPN protein were correlated significantly with node metastasis and TNM stage($P<0.05$).

【Key words】Osteopontin mRNA; Salivary gland tumors; Real-time RT-PCR; Western blot

骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)是一种重要的多功能细胞外基质蛋白,参与细胞与基底膜的粘附,促进局部基底膜以及细胞外基质的破坏。已有研究显示 OPN 与肺癌、胃癌等恶性肿瘤侵袭及转移关系密切。但其与涎腺肿瘤的相关研究报道国外较少,国内未见报道。本实验应用荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 方法检测涎腺肿瘤组织中 OPN mRNA 和蛋白表达水平,并分析其与涎腺肿瘤临床病理特征的关系,旨为涎腺肿瘤分子标志物的筛选及基因治疗打下基础。

作者介绍:曾明慧(1976-),女,主治医师,硕士,研究方向:口腔临床。

通讯作者:黄学宽,男,副教授,E-mail:xkhuang2002@163.com。

1 材料与方法

1.1 临床资料

所有样本均取自中国人民解放军第三二四医院口腔科,按照 WHO 涎腺肿瘤组织病理学分类标准诊断分型。其中正常对照 10 例,良性肿瘤 21 例(多形性腺瘤 14 例,腺淋巴瘤 6 例,基底细胞腺瘤 1 例),恶性肿瘤 41 例(腺样囊性癌 16 例,粘液表皮样癌 19 例,腺泡细胞癌 3 例,腺癌 1,恶性多形

性腺瘤 2 例)。恶性肿瘤中男 25 例,女 16 例;年龄 29 ~ 65 岁,平均 49.2 岁。分化程度:高、中、低分化分别为 20、12、9 例。按国际抗癌联盟(UICC)制定的口腔颌面部恶性肿瘤TNM 分期标准进行分期:Ⅰ期 15 例,Ⅱ期 14 例,Ⅲ~Ⅳ期 12 例。伴颈部淋巴结转移者 19 例,无颈淋巴结转移者 22 例。术中切除原发病灶后,即刻切取新鲜组织,生理盐水冲洗后,立即放入液氮中贮存备用。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量 RT-PCR 检测 OPN mRNA 的表达 TRIzol 法提取组织总 RNA,cDNA 合成按照逆转录酶试剂盒操作指示进行。反转录在 Bio-Rad 热循环仪中进行,条件为:30℃ 10 min,42℃ 30 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min。反应产物置 -20℃冰箱保存备用。根据 NCBI 基因序列,在线设计(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)引物。OPN 基因(NCBI:J04765)引物序列为:P1:5'- GCC GAG GTG ATA GTG TGG TT -3',P2:5'- ATT CAA CTC CTC GCT TTC CA -3',片段长度 125 bp;GAPDH 管家基因(NCBI:NM_002046)引物序列为:5'- CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT -3',5'- GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT -3',片段长度 130 bp。引物均由大连 TaKaRa 公司合成。20 μl 反应体系包括:2 × SYBR® Premix Ex TaqTM(大连宝生物公司)10 μl,cDNA 1 μl,1 mmol/L 引物各 0.4 μl,dH_2O 8.2 μl。反应在 Eppendorf 荧光定量 PCR 仪中进行,反应条件为:95℃预变性 10 min,95℃10 s,60℃5 s,72℃10 s,84℃10 s,40 个循环,84℃时检测荧光。扩增完毕后,进行熔解曲线分析。分析软件通过荧光强度得到样本中 OPN 和 GAPDH 的 Ct 值。将 cDNA 模板等比稀释做 OPN 基因及 GAPDH 基因的标准曲线。它们的相关系数均大于 0.98,拟合满意。用公式 Ex=101/-k 计算 OPN 基因和 GAPDH 基因的扩增效率,其扩增效率几乎相同,可用△Ct= Ct(目的基因)—Ct GAPDH (内参照基因) 表示基因的相对拷贝数,△Ct 值越低,实际拷贝数越高,基因表达量越高。

1.2.2 Western blot 检测 OPN 和内参 β-actin 蛋白的表达 各样本取 80 mg,用预冷 PBS 冲洗组织 3 遍,加裂解液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH 6.8,10% glycerol,5% mercaptoethanol,2% (w/v) SDS,1 mmol/L PMSF)冰上裂解,95℃变性 5 min 后 12 000 r/min 离心 20 min,取上清测定浓度后 -80℃保存备用。25 μg 细胞总蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离,完毕后将蛋白转移到 PVDF 膜上。膜用 5%脱脂奶粉封闭,后放入含一抗的 TBST 溶液,4℃过夜,洗膜,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗室温反应 1 h,目标蛋白质用 DAB 显色。计算机扫描,以 β-actin 蛋白做参照,分析处理。

1.3 统计学分析

OPN 基因表达量以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,t 检验及单因素方差分析进行统计,以 $P<0.05$ 具有统计学意义,用 SPSS11.5 统计学软件包完成。

2 结 果

2.1 OPN mRNA 在涎腺肿瘤中的表达及与临床病理特征的关系

OPN 和 GAPDH 基因荧光定量 PCR 产物经 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳如图 1、图 2,目的条带清晰,没有杂带,扩增片段长度与理论大小一致,说明扩增产物具有特异性。荧光定量 PCR 重复性与精密度好(图 3)。恶性肿瘤组 OPN mRNA 表达量(1.83 ± 0.93)明显高于其相应的正常组织(2.86 ± 0.84),2 组比较有显著性差异($P<0.01$)。良性肿瘤组表达量为 2.59 ± 0.69,显著低于恶性肿瘤组($P<0.01$),与正常组无显著性差异($P \geq 0.05$)。OPN mRNA 表达水平与涎腺恶性肿瘤发生部位、分化程度无关,但淋巴结转移组 OPN 表达量比无淋巴结转移组明显升高,差异具体统计学意义。随着 TNM 不同分期,恶性涎腺肿瘤病变进展和病程加重,OPN mRNA 表达有逐渐增高的趋势,TNM Ⅰ期病例表达水平明显低于 TNM Ⅲ~Ⅳ期病例,差异具有统计学意义,见表 1。

2.2 Western blot 检测 OPN 蛋白在涎腺肿瘤中的表达

恶性涎腺肿瘤组织中 OPN 蛋白条带深于正常涎腺组织、涎腺良性肿瘤,见图 4。OPN 在涎腺恶性肿瘤组织中均有过度表达(0.409 ± 0.0113),与正常涎腺组织(0.115 ± 0.013)、涎腺良性肿瘤 (0.219 ± 0.091) 相比,其差异有统计学意义($P>0.05$)。OPN 蛋白在恶性肿瘤中的表达水平与发生部位、分化程度和淋巴结转移无关,但因不同临床分期而有差异,Ⅰ期和Ⅲ~Ⅳ期 2 组间差异有统计学意义($P>0.05$),计算机量化后结果见表 1。



图 1 GAPDH 基因荧光定量 PCR 产物电泳图

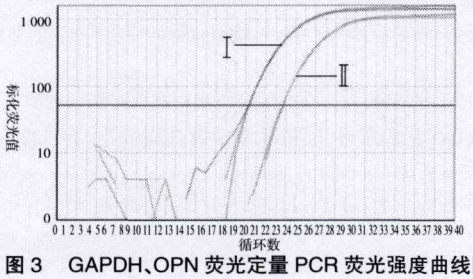


图 3 GAPDH、OPN 荧光定量 PCR 荧光强度曲线图

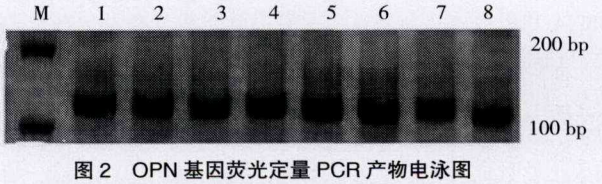
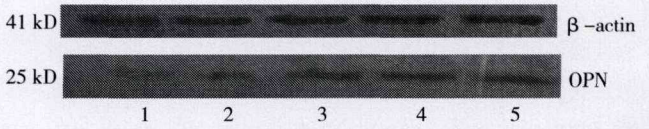


图 2 OPN 基因荧光定量 PCR 产物电泳图



1. 正常涎腺组织;2. 多形性腺瘤;良性涎腺肿瘤;3. 腺样囊性癌;4. 粘液表皮样癌;5. 腺泡细胞癌

图 4 涎腺肿瘤中 OPN 蛋白的表达

表 1 OPN mRNA 和蛋白表达水平与恶性涎腺肿瘤临床病理学特点的关系($\bar{x} \pm s$)

临床病理学特征	n=41	OPN mRNA 水平	OPN 蛋白水平
部位			
腮腺	18	1.94 ± 1.05	0.0.416 ± 0.105
颌下腺	6	1.42 ± 0.43	0.427 ± 0.153
舌下腺	5	1.87 ± 1.25	0.380 ± 0.089
小唾液腺	12	1.86 ± 0.83	0.403 ± 0.076
组织分化程度			
高	20	1.92 ± 1.00	0.435 ± 0.116
中	12	1.74 ± 0.91	0.362 ± 0.077
低	9	1.77 ± 0.90	0.416 ± 0.075
颈淋巴结转移			
有	19	1.24 ± 0.74▲	0.425 ± 0.109
无	22	2.35 ± 0.76▲	0.396 ± 0.093
TNM 分期			
Ⅰ期	15	2.35 ± 0.86▲	0.357 ± 0.094△
Ⅱ期	14	1.90 ± 0.75	0.424 ± 0.090
Ⅲ~Ⅳ期	12	1.09 ± 0.76▲	0.458 ± 0.097△

▲:OPN mRNA 表达水平在颈淋巴结转移组间和 TNM 分期组间差异有统计学意义;△:OPN 蛋白表达水平在 TNM Ⅰ期和Ⅲ~Ⅳ期 2 组间差异有统计学意义

3 讨 论

OPN 是一种分泌型、粘附性的钙结合磷酸化糖蛋白,在人体正常组织中广泛分布,表达比较低,但在肺癌、肝癌和大肠癌等[1-3]恶性肿瘤及其转移灶中表达量明显升高。研究发现 OPN 在体内外均能促进肺癌细胞增殖及血管生成[4],利用 SiRNA 技术下调 OPN 在胃癌细胞株的表达,可降低其增殖活性,减少细胞迁移及血管生成,并降低胃癌细胞在裸鼠体内致瘤能力和转移能力[5],这些结果提示 OPN 可能与肿瘤的生长、侵袭、转移密切相关,可能是很有应用前景的肿瘤标志物和肿瘤治疗的分子靶标。

本实验应用荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 技术对 41 例恶性涎腺肿瘤标本 OPN mRNA 和蛋白 检测结果表明,其在恶性涎腺肿瘤组织中的表达明显高于良性涎腺组织和正常涎腺组织($P<0.05$),提示 OPN mRNA 和蛋白表达上调可能与恶性涎腺肿瘤的发生有关。从临床病理特征分析,OPN mRNA 和蛋白表达与恶性涎腺肿瘤分化程度和发生部位无关,与淋巴结转移及 TNM 分期具有显著的相关性。有淋巴结转移者 OPN mRNA 表达水平比无淋巴结转移者明显升高($P<0.05$),在不同的 TNM 分期中,Ⅲ~Ⅳ期 OPN mRNA 和蛋白表达量明显高于Ⅰ期,差具有统计学意义($P<0.05$),这一结果与姜蕾和 Darling 等研究结果一致[6,7]。以上结果提示 OPN 在恶性涎腺肿瘤细胞中高表达,其可能通过各种机制促进细胞恶性转化、浸润、迁移、恶性增殖以及促进新生血管的形成等致使肿瘤生长转移。OPN mRNA 和蛋白表达水平可反应恶性涎腺肿瘤的临床病理学特征,这一研究结果可作为筛查涎腺肿瘤诊断分子标志物的参考。

本实验探讨了 OPN mRNA 在恶性涎腺肿瘤组织中的表达与临床病理特征的关系,提示 OPN 在恶性涎腺肿瘤发生、发展的病理过程中可能发挥了重要作用,OPN 可作为恶性涎腺肿瘤患者判断预后的一个较好的指标。但 OPN 在肿瘤发生发展中的机制及功能还不明确,仍需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Rohde F, Rimkus C, Friederichs J, et al. Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer[J]. Int J Cancer, 2007, 121(8): 1717-1723.

[2] Xie H, Song J, Du R, et al. Prognostic significance of osteopontin in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2007, 39(2): 167-172.

[3] Donati V, Boldrini L, Dell OM, et al. Osteopontin expression and prognostic significance in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(18): 6459-6465.

[4] Cui R, Takahashi F, Ohashi R, et al. Abrogation of the interaction between osteopontin and alphavbeta 3 integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice[J]. Lung Cancer, 2007, 57(3): 302-310.

[5] Tang H, Wang J, Bai F, et al. Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer[J]. Biochem Cell Biol, 2007, 85(1): 103-110.

[6] 姜 蕾, 姜晓钟, 何 金, 等. 骨桥蛋白在口腔鳞状细胞癌中的定量表达及临床意义[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(11): 1222-1225.

[7] Darling M R, Gauthier M, Jackson-Boeters L, et al. Osteopontin expression in salivary gland tumours[J]. Oral Oncol, 2006, 42(4): 363-369.

(责任编辑:张学颖)