基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1341-03

AXL 在人脑胶质瘤及脑膜瘤中的表达及意义

吴佩涛,谢延风,孙晓川
(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 AXL 基因在颅内减压术切除组织、恶性胶质细胞瘤及脑膜瘤中的表达情况及其意义。方法:收集的 31 例人脑胶质细胞瘤标本,25 例人脑脑膜瘤标本,12 例颅内减压术切除组织标本。采用逆转录酶聚合酶链反应检测 AXL mRNA 的表达。结果:AXL 在颅内减压术切除组织和脑膜瘤中表达呈阳性,但二者表达无明显差异($P>0.05$),胶质细胞瘤中 AXL 的表达明显高于颅内减压术切除组织及脑膜瘤,具有显著性差异($P<0.05$)。结论:AXL 在人脑胶质细胞瘤中的表达水平较脑良性肿瘤中高,它的表达与肿瘤的性质有密切的关系。

【关键词】胶质细胞瘤;脑膜瘤;AXL
【中国图书分类法分类号】R739.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-02-25

Expreesion of AXL and its significance in human glioma and meningioma

WU Pei-tao, et al
(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of AXL in removed brain tissue of intracranial decompression, human gliomas, human meningiomas and the significance of AXL expression. *Methods*: 31 tissue samples of glioma, 25 tissue samples of meningioma patients and 12 removed brain tissue samples of intracranial decompression were collected and expressions of AXL in these tissue were detected using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Results*: The positive expressions of AXL was found in removed brain tissue of intracranial decompression and human meningiomas tissue and there was no significant difference in expression between them ($P>0.05$). The expression of AXL in human gliomas tissue was significantly higher than those in removed brain tissue of intracranial decompression and human meningiomas tissue ($P<0.05$). *Conclusion*: The expression of AXL in human brain malignant tumor is higher than in benign tumor, indicating that AXL expression may be closely related to the nature of tumor.

【Key words】Glioma; Meningioma; AXL

恶性胶质瘤到目前为止还是一种难治性的脑肿瘤,主要是由于瘤细胞呈弥漫性、侵袭性生长。这种侵袭性疾病所潜在的肿瘤基因学方面的机制到现在还不是很清楚。AXL 基因定位在 19 q13.1,在一些正常组织,恶变组织中均有表达,其具体的功能现在仍不清楚,从目前已有研究中发现可能在组织发育、细胞增殖、细胞黏附与识别、抗凋亡和恶性转化中有一定的作用[1]。AXL 在造血系统中所起的作用往往是人们研究的重点,而 AXL 在人脑胶质瘤及脑良性肿瘤中的表达情况以及相关的研究,国内尚未见报道。本实验运用逆转录酶聚合酶链反应(Reverse transcriptase polymerase chain reaction,RT-PCR)方法检测 AXL mRNA 在人脑胶质瘤细胞及脑膜瘤细胞中的表达水平,探讨 AXL 与肿瘤性质的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集重庆医科大学附属第一医院 2007 年 3 月至 2007 年 11 月间手术切除并经病理诊断证实的 31 例脑胶质细胞瘤标本,其中男性 17 例,女性 14 例,年龄 39~73 岁(平均年龄 49.6 岁);25 例人脑膜瘤标本,其中男性 12 例,女性 13 例,年龄 34~71 岁(平均年龄 47.1 岁);所有患者均为首次发病,术前未经其他抗肿瘤治疗。

另取脑外伤手术中作内减压切除的脑组织 12 例作为对照组。

所有组织标本均在手术中取出后立刻放入 -80℃液氮中保存。

1.2 样本细胞总 RNA 的提取

将超低温冻结的 RNA 提取样品称量后(约取 500 mg)

作者介绍:吴佩涛(1981-),男,硕士,
研究方向:颅脑损伤。
通讯作者:谢延风,男,教授,E-mail:xyf13032350893@yahoo.com.cn。

迅速转移至用液氮预冷的研钵中,不断加入液氮研磨成粉末状,然后加入 RNAiso Reagent 试剂(TaKaRa 公司,日本)1.2 ml 混匀,室温静置 5 min,后在转速 12 000 r/min,4℃条件下离心 5 min,吸取上清液,与 250 μl 氯仿混匀,震荡,室温静置 5 min 后,在转速 12 000 r/min,4℃条件下离心 15 min。上清液加入异丙醇 0.5 ml 室温静置 10 min, 后在转速 12 000 r/min,4℃条件下离心 10 min,后向沉淀中加入 1 ml 的 75% 乙醇清洗沉淀,在转速 12 000 r/min,4℃条件下离心 5 min 后弃去上清,将沉淀干燥后溶解于适量的 DEPC 处理水中。

1.3 AXL 基因 mRNA 的 cDNA 合成

cDNA 合成采用杭州博日有限公司的 cDNA 第 1 链合成试剂盒,加入样本 RNA 2 μl,5 × RTBuffer 2 μl,dNtp Mixture (10 mmol/L)Oligo-dT 0.5 μl,RNase inhibitor(40 U/μl) 0.5 μl, AMV Reverse Transcriotase 0.5 μl,Rnase free H_2O 3.5 μl,以上混合物在室温温育 10 min 后进行逆转录反应:42℃~60℃下 45 min,95℃下 5 min,然后冰浴 5 min,-20℃保存备用。

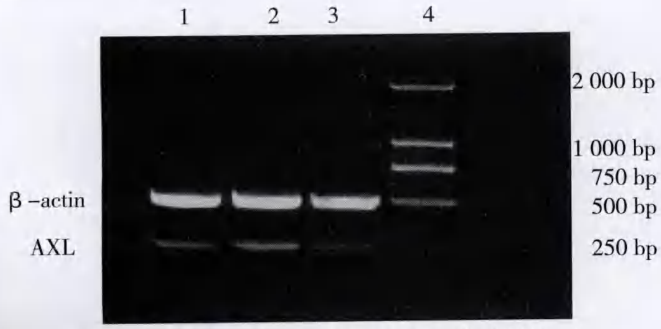
1.4 AXL 基因片段聚合酶链反应

AXL 基因全长 cDNA 为 3.2 kb。本实验引物自行设计,由重庆升博生物有限公司负责合成,AXL 上游引物序列为 5'-GGCAACCCAGGGAATATCACA-3'(280~300);下游引物序列为 5'-ACACGAAGGTCTGATGTCCCA-3'(527~547),产物长 268 bp。内参照 β-actin 上游序列为 5'-GTCCTGTG-GCATCCACGAAAC-3'(883~903);下游序列为 5'-GCTCCA ACCGACTGCTGTCA-3'(1363~1382),产物长 500 bp。

反应体系:逆转录产物 1 μl,AXL 引物各 1 μl,内参照引物各 1 μl,2 × Master Mix 12.5 μl,然后加入 ddH_2O 补至 25 μl,反应条件:94℃ 3 min 预变性,每个循环:94℃30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min, 扩增 30 个循环。在 72℃的条件下延伸 5 min。终止反应后取出 2 μl 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,然后在长波紫外灯下观测照相,电泳结果以 Quantity One (美国 Bio-Rad 公司) 图像分析系统进行电泳条带光密度分析,结果以 AXL 灰度值 / β-actin 灰度值表示,比值越大,表示 AXL 表达越强。

1.5 统计学分析

各组分光密度值与内参分光密度值之比以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS14.0 统计软件,组间差异的比较用 F 检验,以 $P \leqslant 0.05$ 示差异有统计学意义。



1. 脑膜瘤组;2. 胶质细胞瘤组;3. 正常对照组;4.DL2000 Marker

图 1 RT-PCR 检测 AXL 基因 mRNA 的表达,凝胶电泳图

2 结 果

2.1 AXL mRNA 在所取标本细胞中的表达

AXL mRNA 在颅内减压术切除组织,脑膜瘤以及脑胶质细胞瘤中均有表达。31 例胶质细胞瘤中 24 例 AXL 表达阳性(阳性率 77%);25 例脑膜瘤中 20 例 AXL 表达阳性(阳性率 80%);12 例颅内减压术切除组织中 10 例 AXL 表达阳性(阳性率 83%)(见图 1)。

2.2 正常对照组、脑膜瘤组和胶质细胞瘤组 AXL mRNA/β-actin mRNA 的比较

正常对照组、脑膜瘤组、脑胶质细胞瘤组 AXL mRNA/β-actin mRNA 的比值见表 1。统计学分析显示:脑膜瘤组 AXL mRNA/β-actin mRNA 的比值与正常对照组相比差异无统计学意义(P>0.05);脑胶质细胞瘤组 AXL mRNA/β-actin mRNA 的比值明显高于正常对照组及脑膜瘤组,差异有统计学意义(P<0.05)。

3 讨 论

3.1 AXL 的发现以及基因表达产物及其配体的结构特点

1991 年 O'Bryan 等[3]从 2 个慢性非白细胞性白血病患者体内分离出一种独特的基因,将其命名为 anexelekto(AXL),并对其进行了比较全面的描述。AXL 基因的表达产物为 AXL-受体酪氨酸激酶(简称 AXL)。AXL 结构比较特殊:胞膜外区与神经细胞黏附分子(NCAM) 结构很相似,包括 2 个免疫球蛋白样区(Ig)和两个纤连蛋白Ⅲ(Fn)样区,胞浆区具有酪氨酸激酶活性[4~6]。AXL 的分子结构决定了其既有黏附分子的特点,又具有酪氨酸激酶活性。GAS6 分子是 AXL 的配体,它是由 1 个叫做生长停滞特异性基因 6(Growth arrest-specific gene 6)所编码的蛋白分子,是 1 个维生素 K 依赖蛋白[7],最早是从血清饥饿法培养的 NIH3T3 细胞中发现并克隆的。GAS6 的功能集中在 2 个方面:①参与细胞的粘附和识别。②参与信号转导途径,与细胞的存活、增

表 1 正常对照组、脑膜瘤组和胶质细胞瘤组 AXL mRNA/β-actin mRNA 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	AXL mRNA/β-actin
正常对照组	0.2460 ± 0.018
胶质细胞瘤组	0.5458 ± 0.015▲
脑膜瘤组	0.2735 ± 0.023△

△:P>0.05,与正常对照组比较;▲:P<0.05,与正常对照组和脑膜瘤组比较

殖和恶性转化有关,这与 AXL 分子磷酸化有关[8]。

3.2 AXL 的表达与恶性肿瘤生物学特性的关系

自 AXL 被鉴定分离以后,有关 AXL 的文献报道相继出现。研究发现,AXL 在前列腺癌,卵巢癌,肾细胞癌,都呈高表达,并认为细胞的恶化性程度与 AXL 基因表达产物的酪氨酸激酶活性关系较为密切,这类分子所具有的黏附分子的性质在肿瘤的发展转移过程中可能起比较重要的作用[11-13]。Green 等[2]通过实验证明 AXL 的表达产物对上皮细胞恶化的潜在驱动力在细胞的存活、粘附和趋向性方面扮演着重要的角色。Lay 等[9]通过实验证明用磺胺吡啶来抑制 AXL 的磷酸化,可抑制肺腺癌的转移和其抗药性。而 Shieh[10]通过实验证明 AXL 的过度表达能够增强肺部癌细胞的侵袭力, 通过 RNA 干扰等手段则可有效的降低其侵袭力。Craven 等[3]在转移性结肠癌的研究中发现腹膜转移结节中 AXL 表达可以高出正常组织及原发癌 10 倍。这些结果表明 AXL 在恶性肿瘤的转移和侵袭中起着十分重要的作用。Maccloskey 等以 EGFR(表皮生长因子受体)的胞膜外区与 AXL 的胞浆区构成嵌合蛋白 EAK,在 32D-EAK 细胞中以 EGF 刺激可以引起 AXL 分子的磷酸化,促使 32D 细胞增殖,并且 EGF 处理 19 日后,细胞呈现不依赖细胞因子的生长,提示 AXL 在髓系细胞的恶性转化中可能起一定作用[3]。

AXL 与细胞凋亡也有密切关系。Shankar 等[14]通过一系列实验证明了 Gas6/AXL 信号转导系统通过激活磷脂酰肌醇-3 激酶的存活途径来保护神经胶质细胞免受肿瘤坏死因子所诱导的凋亡。Goruppi 等发现 GAS6 可保护缺乏血浆的 NIH3T3 细胞免于凋亡, 这种表达需要 NIH3T3 细胞表达的内源性 AXL 参与,没有 AXL 的参与,即使给予 GAS6,仍然表现凋亡,作者认为 AXL 高表达时 GAS6 具有分裂原活性,使细胞存活,抑制凋亡,这还需要磷脂酰肌醇-3 激酶的参与。Ballosta 等也认为低浓度的 GAS6 可抑制去除血浆引起的 NIH3T3 细胞凋亡。他们认为 AXL/GAS6 的作用是在不允许细胞增殖的环境中促进细胞的存活。因此对于恶性肿瘤而言, AXL 的高表达也是其性质的标志之一。

3.3 AXL 的表达与脑部肿瘤性质的相关性

AXL 在全身许多器官中都有表达,且在正常成年人脑细胞中呈低表达[15]。在本研究中,我们观察了 AXL-mRNA 在 31 例人脑胶质瘤标本,25 例膜瘤标本以及 12 例颅内减压术切除组织标本中的表达情况。结果表明,AXL-mRNA 在上述 3 种组织细胞表达阳性率均超过 50%,其中在脑膜瘤和颅内减压术切除组织中表达水平经过统计学分析,无明显差异,而在人脑胶质瘤中的表达较前两者,表达水平明显升高。以上结果表明,AXL 的表达水平与肿瘤的性质有着密切的关系,它的表达水平的升高可能导致其基因表达产物 AXL 的表达也升高。而 AXL 分子结构特点,决定了其在细胞的增殖、分化、侵袭、转移等方面起着极其重要的作用。此外,在脑膜瘤组织细胞和颅内减压术切除组织中 AXL 表达无明显差异,且表达水平较脑胶质细胞瘤组低,体现了脑部良性肿瘤的生物学特性,呈速度较慢的非侵袭性生长,而在脑胶质细胞瘤组体现出高表达,则体现了其恶性肿瘤的生物学特性,进一步证明 AXL 在恶性肿瘤的生长,恶化,侵袭,转移等方面起着重要的作用,其表达与肿瘤的性质关系密切。

脑胶质瘤是脑部恶性肿瘤中发病率最高的肿瘤类型,脑膜瘤是脑良性肿瘤中发病率最高的肿瘤类型。通过对 AXL 在上述肿瘤细胞中的表达的研究,我们可进一步了解其在脑部肿瘤恶化和侵袭的过程中的分子机制,有可能对治疗脑部恶性肿瘤有新的认识和启发。Vajkoczy 等[15]通过用一种显性负相受体突变体的过度表达来抑制 AXL 信号转导系统,从而达到了使经过颅内胶质瘤细胞移植后的小鼠长期存活的目的,这些都对我们今后治疗脑胶质瘤有很好的借鉴意义。

AXL 在脑膜瘤和胶质瘤中表达的研究对比也具有很重要的临床意义和科研意义,主要体现在:考虑将 AXL 在细胞中的表达作为判断颅内肿瘤性质的一个指标,为肿瘤早期的诊断,治疗提供依据;对 AXL 在恶性肿瘤中表达的研究,让我们了解了其在肿瘤生长分化,侵袭等方面的机制,为人们从分子水平治疗肿瘤提供了一个新的思维方向。

参 考 文 献

[1] Holland S J, Powell M J, Franci C, et al. Multiple roles for the receptor tyrosine kinase AXL in tumor formation[J]. Cancer Res, 2005, 65 (20): 9294-9303.

[2] Green J, Ikram M, Vyas J, et al. Overexpression of the AXL tyrosine kinase receptor in cutaneous SCC-derived cell lines and tumours [J]. Br J Cancer, 2006, 94(10): 1446-1451.

[3] 王涛锋,孙秉中.AXL 受体酪氨酸激酶家族的研究进展 [J]. 国外医学·分子生物学分册,1999,21(2):114.

[4] Gschwind A, Fischer O M, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(3): 361-370.

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1344-04

趋化因子受体 CXCR7/RDC1 在乳腺癌细胞株中的表达及意义

王元元,任国胜

(重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨趋化因子受体(Chemokine receptor CXCR7)在不同乳腺癌细胞株中的相对表达强度及意义。方法:采用 RT-PCR、Western Blot 等方法,检测 6 株乳腺癌细胞株中趋化因子受体 CXCR7 在 mRNA 水平及蛋白水平上的表达情况。结果:CXCR7 在 6 株乳腺癌细胞中的表达水平存在显著差异,其 mRNA 在 6 种人乳腺癌细胞株中均可检出,雌激素受体(Estrogen recepter,ER)(+)细胞株在蛋白水平上的表达明显高于 ER(-)细胞株($P<0.01$)。结论:CXCR7/RDC1 与乳腺癌的发生、发展及预后有一定的相关性。

【关键词】趋化因子受体;CXCR7/RDC1;乳腺癌

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-26

Expression and significance of chemokine's receptor CXCR7/RDC1 in human breast carcinoma cells

WANG Yuan-yuan, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and significance of CXCR7/RDC1 in human breast carcinoma cells. *Methods*: The mRNA and protein expressions of CXCR7 in human breast cancer cells (MCF-7, ZR-75-30, MDA-MB-435S, MDA-MB-453, MDA-MB-231, and HBL-100) were detected with the application of RT-PCR and Western-Blot, respectively. *Results*: The expression levels of CXCR7 varied significantly among six cell lines. CXCR7 mRNA can be detected in all of the six breast cancer cell lines, and CXCR7 protein expression was statistically prominent in ER positive cell lines and couldn't be detected in MDA-MB-231 breast cancer cell. *Conclusion*: CXCR7/RDC1 may play a key role in occurrence, development and prognosis of breast cancer.

作者介绍:王元元(1983-),女,硕士,
研究方向:乳腺癌的浸润、转移机制。

通讯作者:任国胜,男,教授,E-mail:rgs726@163.com。

【Key words】Chemokine's receptor; CXCR7/RDC1; Breast cancer

[5] Hafizi S, Dahlback B. Signalling and functional diversity within the AXL subfamily of receptor tyrosine kinases[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2006,17(4):295-304.

[6] Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, et al .A promiscuous liaison between IL-15 receptor and AXL receptor tyrosine kinase in cell death control [J].EMBO,2005,24(24):4260-4270.

[7] Munoz X, Sumoy L, Ramirez-Lorca R,et al. Human vitamin K-dependent GAS6:gene structure,allelic variation,and association with stroke [J]. Hum Mutat,2004,23(5):506-512.

[8] Sasaki T,Knyazev P G,Clout N J,et al.Structural basis for Gas6-AXL signaling [J]. EMBO J,2006,25(1):80-87.

[9] Lay J D, Hong C C, Huang J S, et al. Sulfasalazine suppresses drug resistance and invasiveness of lung adenocarcinoma cells expressing AXL [J].Cancer Res, 2007,67(8):3878-3887.

[10] Shieh Y S, Lai C Y, Kao Y R, et al. Expression of AXL in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression [J].Neoplasia, 2005, 7(12):1058-1064.

[11] Wu Y M, Robinson D R, Kung H J. Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2004,64(20):7311-7320.

[12] Sun W, Fujimoto J, Tamaya T.Coexpression of Gas6/AXL in human ovarian cancers [J]. Oncology,2004,66(6):450-457.

[13] Chung B I, Malkowicz S B, Nguyen T B, et al. Expression of the proto-oncogene AXL in renal cell carcinoma [J]. DNA Cell Biol, 2003,22 (8):533-540.

[14] hankar S L,O'Guin K,Kim M, et al.Gas6/AXL signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Aktl survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor alpha-inducedap optosis[J]. Neurosci,2006,26(21):5638-5648.

[15] Vajkoczy P,Knyazev P,Kunkel A.Dominant-negative inhibition of the AXL receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival[J]. Proc Natl Acard Sci USA, 2006,103 (15):5799-5804.

(责任编辑:冉明会)