

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0119-03

spp1 基因在肺癌组织中表达的定量检测及其意义

曹惠芳¹, 满晓波¹, 蒋 虹², 徐志飞², 唐 亮¹, 邱秀华¹, 谈冶雄¹, 吴孟超³, 王红阳¹(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院国际合作生物信号转导研究中心, 上海 200438; 2. 第二军医大学长征医院胸外科, 上海 200003; 3. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

[摘 要] 目的: 探讨定量检测骨桥蛋白编码基因在原发性肺癌中的表达及其意义。方法: 制备 24 例肺癌患者癌及癌周正常肺组织中总 RNA, 采用 RT-PCR 及实时荧光定量 PCR 技术分析 spp1 基因的 mRNA 表达水平。结果: 在所有 24 例肺癌中肺癌组织的骨桥蛋白表达高于相邻的癌周正常肺组织, 并且全部在 6 倍以上, 其中 7 例在 100 倍以上。结论: 肺癌组织中骨桥蛋白的表达明显升高, 是肺癌诊断的重要标志物。

[关键词] 肺肿瘤; 骨桥蛋白; 实时荧光定量 PCR; 基因表达

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A

Quantitative Detection of spp1 Expression in Lung Carcinoma

CAO Hui-fang¹, MAN Xiao-bo¹, JIANG Hong², XU Zhi-fei², TANG Liang¹, QIU Xiu-hua¹, TAN Ye-xiong¹, WU Meng-chao³, WANG Hong-yang¹(1. International Co-operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of Chest Surgery, Chang Zheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438)

[Abstract] Objective: To quantitatively detect the expression level of spp1 gene in lung carcinoma. Method: The RT-PCR and real-time fluorescence quantitative RT-PCR method was used. Result: The spp1 gene expressed higher in tumor tissue than that in normal tissue in all 24 cases of lung carcinoma. In 9 cases spp1 expression level was about or more than 100 times as that of normal lung tissue. Conclusion: The spp1 gene expressed higher in lung carcinoma tissue than that of normal lung tissue and indicated that it might be an important marker in the diagnosis of the lung cancer.

[Key words] lung neoplasms; osteopontin; real-time fluorescence quantitative PCR; gene expression

* 分泌磷酸蛋白 1(secreted phosphoprotein 1, spp1) 又称为骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、早期 T 淋巴细胞活性 1 (early T-lymphocyte activation 1, Eta-1)、骨唾液酸蛋白 I(bone sialoprotein I)和尿石蛋白(urinary stone protein), 是一种具有多种功能的分泌性酸性糖蛋白, 归类于细胞外基质 (extracell matrix, ECM), 可促进细胞的黏附和迁移。骨桥蛋白和肿瘤的关系已有一些研究, 但绝大部分应用的是定性或半定量的方法。实时荧光定量 PCR 是在极少量的细胞中基因表达定量检测的最准确方法, 本文采用了荧光定量 PCR 的方法定量分析 spp1 在原发性肺癌中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 肺癌组织

新鲜肺癌和癌旁肺脏组织来自上海长征医院肺脏

手术标本, 手术切除组织立即液氮冻存。

1.2 试剂

Trizol Reagent, SuperScript II 逆转录试剂盒、DNase I 购自美国 Invitrogen 公司, PCR 试剂购自上海申能博彩生物公司, 引物及荧光探针由上海申友生物合成, 其他试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.3 主要仪器

BIO-RAD iCycler iQ 荧光定量 PCR 仪。

1.4 组织总 RNA 制备

取冻存组织 100 mg, 加入 Trizol Reagent 1 ml, 匀浆后加入 0.2 ml 氯仿, 离心后吸取上清, 加入 0.5 ml 异

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30270686)资助
[作者简介] 曹惠芳(1963-), 女(汉族), 上海人, 主管技师, 主要从事细胞信号转导研究。

丙醇,离心沉淀后弃上清,70%乙醇洗沉淀,DNase I 酶解可能残余的基因组 DNA, RNA 溶于 DEPC 水,甲醛变性凝胶电泳和分光光度计检测浓度和纯度。

1.5 cDNA 第一链合成

每个总 RNA 样品取 5 μg ,加无 RNase 水至 4 μl ,加入 50 $\mu\text{mol/L}$ Oligo(dT) 1 μl ,70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min,室温放置 5 min 后,依次加入 RNase inhibitor 1 μl ,5 $\times$ RT buffer 4 μl ,2.5 mmol/L dNTP 2 μl ,0.1 mmol/L DTT 2 μl ,Super Script II -RTase 1 μl ,无 RNase 水补足 24 μl ,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 50 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min 中止反应。

1.6 定量 PCR

根据人 spp1 和 β -actin 的 cDNA 序列设计 PCR 引物和 TaqMan 探针:

hSPP1-F: 5' > AGA AGT TTC GCA GAC CTG AC

hSPP1-R: 5' > TTT CAG CAC TCT GGT CAT CC

hSPP1-TM: FAM 5' > CCA GTA CCC TGA TGC

TAC AGA CG 3' TAMRA

β -actin-F: 5' GCC AAC ACA GTG CTG TCT G;

β -actin-R: 5' CAC ATC TGC TGG AAG GTG G;

β -actin-TM: FAM 5' AGT ACT TGC GCT CAG GAG

GAG C 3' TAMRA

各组织 cDNA 分别以 spp1 及 β -actin 引物,加入对应的 TaqMan 探针进行定量 PCR 反应。反应在 96 孔 PCR 板中进行。反应体系为 50 μl :10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μl ,25 mmol/L MgCl_2 5 μl ,5 $\mu\text{mol/L}$ 5'和 3'引物各 1 μl ,5 $\mu\text{mol/L}$ TaqMan 探针 1 μl ,10 mmol/L dNTP Mix-

ture 2 μl ,模板 1.75 μl ,Taq 酶 1 μl ,去离子水 32.25 μl 。设定在每个循环的变性期结束后,程序自动记录上一循环最后 10% 时间的平均荧光值。荧光种类选择 FAM-490,程序将按照设定的激发和发射光谱选择滤镜组,分别为 490 nm 和 530 nm。所有设定保存后运行程序,输入正确的 PCR 体系的体积后开始运行。反应完成后,得到含所有标本的所有记录点曲线,默认分析模式称为 Background Substrated(背景扣除),选择 PCR Base Line Substrated(PCR 基线扣除)模式进行数据分析和修正。在调整 Baseline Cycles(基线循环)和计算 Threshold Value(域值)后,得出 Threshold Cycle(Ct 值)。相同组织中 spp1 和 β -actin 基因的初始模板量的比值为 $2^{\text{Ct}\beta\text{-actin}-\text{Ct}\text{spp1}}$,代表肺癌组织和癌旁肺组织中 spp1 基因表达水平。

2 结 果

2.1 spp1 基因的 RT-PCR 检测

spp1 在正常肺组织中经过 27 次循环基本没有或仅仅有很淡的扩增条带,说明 spp1 在正常肺脏中不表达或表达极低,在肺癌组织中扩增出很亮的 spp1 基因 PCR 条带,提示 spp1 在肺癌中表达明显升高(图 1)。半定量 RT-PCR 可以比较直观地显示基因表达水平,并通过 PCR 条带光密度定量比较可以计算同内参照基因的相对定量,但是其条件确定比较复杂,实验结果受 PCR 反应条件和 CCD 成像及分析软件限制,并且计算的是目的基因和内参照基因在不同循环数的相对定量,只有通过荧光实时 PCR 才能定量检测基因表达。

图 1 肺癌中 spp1 表达的 RT-PCR 结果

Fig.1 The result of spp1 expression in lung carcinoma by RT-PCR
L: Lung tissue; K: Lung cancer

2.2 肺癌和肺脏组织中 spp1 荧光定量 PCR 反应的实时检测

利用荧光值曲线和 Ct 值就可以计算 spp1 和 β -actin 的比值,进行 spp1 基因表达水平的定量比较。在 spp1 的 PCR 反应 Base Line 荧光值曲线图中,癌旁肺组织的 β -actin 在 spp1 之前到达线性期, β -actin 的 Ct 值小于 spp1,说明 β -actin 的表达高于 spp1,其中明显可见直至接近 29 个循环时才有 spp1 线性扩增,提示起始模板量极少,仅为 β -actin 的千分之一左右。肺癌组

织中 spp1 的曲线左移,说明 spp1 表达水平升高,在部分肺癌组织中 spp1 的表达接近 β -actin 的表达水平(图 2)。在 96 孔 PCR 板上同时进行的反应条件相同,根据每例标本的 β -actin 和 spp1 的 Ct 值和公式即可计算出肺癌和癌旁肺组织中的 spp1 表达。

2.3 spp1 在肺癌和癌旁组织中的表达差异

利用荧光定量 PCR 技术检测了 24 例肺癌中 spp1 的 mRNA 水平,结果发现在全部 24 例标本中肺癌组织中的 spp1 表达水平均比癌旁的肺组织高(图 3),而且

在所有的病例都在 6 倍以上。一般在基因芯片、Northern-blot 等研究中癌组织中基因表达高于非肿瘤组织的 2 倍即可判断为表达升高,所以在 24 例肺癌中 spp1 都是明显升高的。其中肺癌组织 spp1 表达水平接近和高于癌旁肺组织 100 倍以上的共 7 例。

图 2 病例 13 的 spp1 和 β -actin 的 Base Line 曲线
Fig.2 The Base Line curves of spp1 and β -actin in case 13

图 3 spp1 在肺癌中的表达
Fig.3 The expression of spp1 in lung carcinomas

3 讨 论

骨桥蛋白存在于人血、尿、乳汁等体液以及胃肠道、膀胱、胰腺、肺、支气管等组织中,骨桥蛋白含有的 GRGDS 序列和细胞的黏附作用有关^[1]。骨桥蛋白的表达同肿瘤的致癌作用和转移密切相关,提示骨桥蛋白可能作为肿瘤发生的一个标志物。在多种人肿瘤组织中特别是在有癌细胞侵袭的状况下,肿瘤组织中骨桥蛋白高度表达。在乳腺癌中,spp1 的表达强弱与乳腺癌的恶性程度相关,浸润性导管癌都表达 spp1^[2],正常组织与乳癌及其转移灶之间 spp1 表达出现显著差异^[3]。通过手术标本中 spp1 表达差异可以判定转移灶和复发灶的来源,通过血浆 spp1 的含量可以判断乳癌转移^[4]。spp1 在胃癌^[5]、食管癌^[6]、神经胶质瘤^[7]中异常表达,并且同恶性程度相关。有人通过基因芯片发现 spp1 基因在卵巢癌中高表达并确认,这一研究提供了这一分子标志物水平和卵巢癌关联的证据^[8]。

在以往的 spp1 表达的研究中,大部分的工作采用了免疫组织化学、RT-PCR 和 Northern-blot 方法,例如通过免疫组化发现肺癌中 OPN 染色阳性^[9],但是上述方法只能半定量分析,不能在 mRNA 水平定量准确检测表达。而应用荧光定量 PCR 技术可以对 mRNA 水平进行实时定量分析。采用普通的半定量 PCR 方法在没有对每一例标本进行线性期预实验的情况下可能会造成很大的误差,即使选取的循环数同时处于两种基因的 PCR 反应的肉眼观察的线性期内也会有误差。实时荧光定量 PCR 技术利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法,由 Ct 值计算所得的基因起始模板量最接近真实模板量。在配对的肿瘤组织和癌旁组织的特定基因 mRNA 定量分析中只要引入看家基因作为内参照通过公式就可以计算出肿瘤和癌旁组织中差异的定量比值。对 24 例肺癌的 spp1 基因的表达水平分析发现,肺癌中 spp1 的表达水平普遍升高,而且所有的肺癌组织中的 mRNA 水平是癌旁组织的 6 倍以上,7 例达到了 100 倍以上,说明 spp1 作为在肿瘤发生发展中的重要分子可能发挥了特殊的作用。表达上调不但具有普遍性,而且具有极为明显的差异,提示可以用作临床指标用于监测癌肿复发或转移。

[参 考 文 献]

- [1] Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(23): 8819-8823.
- [2] Gillespie MT, Thomas RJ, Pu ZY, *et al.* Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breast cancers[J]. Int J Cancer, 1997, 73(6): 812-815.
- [3] Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer [J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 95-100.
- [4] Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, *et al.* Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas[J]. Arch Pathol Lab Med, 1997, 121(6): 578-584.
- [5] Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, *et al.* Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer[J]. Int J Cancer, 1998, 79(2): 127-132.
- [6] Casson AG, Wilson SM, McCart JA, *et al.* Ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer[J]. Int J Cancer, 1997, 72(5): 739-745.
- [7] Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, *et al.* Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy[J]. Lab Invest, 1995, 72(1): 55-63.
- [8] Kim JH, Skates SJ, Uede T, *et al.* Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer[J]. JAMA, 2002, 287(13): 1671-1679.
- [9] Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, *et al.* Osteopontin expression in lung cancer[J]. Lung Cancer, 1996, 15(3): 311-323.