

• 基础实验研究论著 •

实时荧光定量 PCR 检测鼻咽癌组织骨桥蛋白 mRNA 的表达^{*}

韩亚琴, 宣世海, 练向阳[△]

(南通大学附属东台医院检验科, 江苏东台 224200)

摘要:目的 通过检测鼻咽癌(NPC)组织的 OPN 的表达,探讨其表达和 NPC 临床病理特征的关系。方法 采用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 NPC 组织的 OPN mRNA,并分析 OPN 的表达和 NPC 临床病理特征的相关性。结果 NPC 组织中 OPN mRNA 的表达显著高于鼻咽部炎症组织($P<0.05$),OPN mRNA 的表达水平和 NPC 的 T 期、N 期及临床分期相关($P<0.05$)。结论 本研究结果显示,OPN 过量表达和 NPC 的转移和进展有关,OPN 可以作为 NPC 个体化治疗中一个有效的预后标志物。

关键词:骨桥蛋白; 鼻咽癌; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)22-2949-02

The mRNA expression of osteopontin in Nasopharyngeal carcinoma tissues by quantitative real-time fluorescence PCR^{*}

Han Yaqin, Xuan Shihai, Lian Xiangyang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Dongtai Hospital of Nantong University, Dongtai, Jiangsu 224200, China)

Abstract: Objective To detect the expression of OPN in Nasopharyngeal carcinoma (NPC), and to evaluate the correlation between OPN expression and clinicopathological factors. **Methods** Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) assay was performed to detect the expression of OPN in NPC tissue samples. The correlation between the OPN expression and clinicopathological factors was evaluated. **Results** In NPC tissues, the expression levels of OPN mRNA was significantly higher than those in the nasopharyngeal inflammation tissues ($P<0.05$), and the expression level were significantly correlated with T, N and clinical stage ($P<0.05$). **Conclusion** All these findings suggest that overexpression of OPN is closely associated with metastasis and progression of NPC. Therefore, we can speculate that OPN could be effective prognostic markers in the future for individualized treatment of patients with NPC.

Key words: osteopontin; nasopharyngeal carcinoma; polymerase chain reaction

骨桥蛋白(OPN)是一种由破骨细胞、巨噬细胞、淋巴细胞及肿瘤细胞分泌的细胞外基质蛋白^[1]。现有研究报道 OPN 高表达于胃癌、肺癌、乳腺癌、食管癌、卵巢癌及喉及下咽癌等多种肿瘤组织,且与肿瘤的发生及发展有密切关系^[2-7]。然而关于 OPN mRNA 在 NPC 组织中的表达报道却相对较少,为此,本研究建立了实时荧光定量 PCR 法检测 NPC 组织 OPN mRNA 的表达,以探讨其与 NPC 病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 52 例 NPC 组织和 16 例鼻咽部炎症组织取自于 2010 年 1 月至 2012 年 9 月在南通大学附属东台医院和南通大学附属医院就诊的 68 例患者,平均年龄 56 岁;男 42 例,女 19 例,均未接受过放化疗。所有患者均签署知情同意书,NPC 分期按照国际抗癌联盟第 6 版进行。活检组织置于 -30°C 冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 RNA 抽提使用 SV Total RNA isolation System(Promega,批号:18890),使用核酸紫外检测仪(U-0080D, Hitachi)检测的 RNA 的质量。RNA 逆转录使用 PrimeScript RT Master Mix kit (Takara,批号:1501),所有操作均严格按照说明书。PCR 扩增使用 Rotor-Gene Q 扩增仪(QIAGEN)。

1.3 方法 Real-time PCR 根据 OPN 基因序列(GeneBank NM_000582.2)使用 primer5.0 软件设计引物,上游引物:5'-AGT TCT GAG GAA AAG CAG C-3';下游引物:5'-CCC CTA CCG GAA CAT ACG-3'。扩增产物大约 193 bp。 β -actin 作为内参,其上游引物:5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3';下游引物:5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3',扩增产物大约 258 bp。PCR 扩增使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa,批号:1603),反应体系为 25 μL ,内含 2 μL cDNA,1 \times SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,灭菌蒸馏水 9.5 μL 。PCR 扩增循环参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s(β -actin, 58 $^{\circ}\text{C}$),72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。基因相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法,即 $-\Delta\Delta\text{CT} = -(\Delta\text{CT}_{\text{肿瘤组织}} - \Delta\text{CT}_{\text{正常组织}})$ 。

1.4 统计学处理 使用 SPSS16.0 进行数据统计分析,定量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,OPN mRNA 的表达差异采用 t 检验,OPN mRNA 表达和病理特征的相关性采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN 和 β -actin 的扩增效率 通过预实验对扩增体系的不断优化,用 OPN 和 β -actin 不同倍比稀释浓度分别进行扩

^{*} 基金项目:南通大学自然科学类研究项目(10Z093);盐城市医学科技发展计划(YK2010051)。 作者简介:韩亚琴,女,主管技师,主要从事肿瘤耐药基因研究。[△] 通讯作者,E-mail:zhouyugui_edu@163.com。

增,两组标准曲线斜率差小于 0.1,证明可以使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。

2.2 OPN 和 β -actin 的溶解曲线 OPN 和 β -actin 扩增产物经琼脂糖电泳后出现单一条带,无非特异性扩增,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。OPN 和 β -actin 的溶解曲线如图 2 显示(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),两者均为单峰,提示所扩增的产物特异性较好。

2.3 OPN 基因表达分析 对所获得合格的 48 例 NPC 和 13 例鼻咽部炎症组织 DNA 进行实时荧光定量 PCR 分析,结果如

表 1 显示 NPC 和炎症组织 OPN mRNA 的平均 ΔCT 分别为 (3.73 ± 1.05) 、 (6.54 ± 0.69) ,相对于炎症组织,NPC 组织 OPN mRNA 比炎症组织高 $7.01(3.39\sim 14.52)$ 倍,表达差异有统计学意义($P=0.000$)。OPN mRNA 在 $T_1\sim T_2$ 期的表达明显低于 $T_3\sim T_4$ 期($P=0.022$),有淋巴结转移组 OPN mRNA 的表达显著高于无淋巴结转移组($P=0.000$),临床分期中Ⅲ+Ⅳ期的 OPN mRNA 表达水平也明显高于Ⅰ+Ⅱ期($P=0.000$)。OPN mRNA 的表达在年龄、性别的比较差异无统计学意义,见表 2。

表 1 NPC 和炎症组织 OPN mRNA 表达

项目	<i>n</i>	OPN 平均 C_T	β -actin 平均 C_T	$-\Delta\Delta CT_{OPN-\beta-actin}$	$-\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	<i>P</i>
NPC 组织	48	21.84 ± 1.21	18.11 ± 0.45	3.73 ± 1.05	2.81 ± 1.05	$7.01(3.39\sim 14.52)$	
炎症组织	13	24.66 ± 0.59	18.12 ± 0.41	6.54 ± 0.69	0.00 ± 0.69	$1.00(0.62\sim 1.61)$	0.000

表 2 OPN mRNA 表达和 NPC 病例特征的关系			
项目	<i>n</i>	OPN	<i>P</i>
性别			
男	36	21.69 ± 1.20	
女	12	22.28 ± 1.19	0.156
年龄			
≤55 岁	21	21.85 ± 1.36	
>55 岁	27	21.83 ± 1.11	0.949
T 分期			
T_1/T_2	28	21.14 ± 1.44	
T_3/T_4	20	22.42 ± 0.60	0.022
N 分期			
N_0	16	22.97 ± 1.28	
N^+	32	21.27 ± 0.66	0.000
临床分期			
Ⅰ+Ⅱ	16	23.13 ± 1.09	
Ⅲ+Ⅳ	32	21.20 ± 0.61	0.000

3 讨 论

NPC 是一种多基因遗传性疾病,是最常见的头颈恶性肿瘤之一,其发病与遗传因素、EB 病毒感染、环境因素、饮食习惯等多种致癌因素有关^[8]。由于 NPC 早期易出现颈淋巴结转移且发生率较高,所以寻找肿瘤浸润、转移的特异性标志物将有助于 NPC 患者预后的判断。

OPN 属于小整合素结合配体 N 端联结糖蛋白家族,OPN 的氨基酸序列中包含的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列,可与细胞表面的受体如整合素(包括整合素 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$)或 CD44 变异亚型(包括 CD44v3、v6、v7)结合发挥不同的生理功能^[9]。OPN 与各种整合素受体的相互作用可以诱导不同的信号转导途径的激活,导致一系列的基因的表达,有助于改变细胞的生物学行为,包括迁移和浸润^[10]。

本研究通过实时荧光定量 PCR 法检测了 NPC 和鼻咽部炎症组织的 OPN mRNA 的表达,结果显示 NPC 组织 OPN

mRNA 表达比炎症组织高 $7.01(3.39\sim 14.52)$ 倍,OPN mRNA 在 $T_1\sim T_2$ 期的表达明显低于 $T_3\sim T_4$ 期,有淋巴结转移组 OPN mRNA 的表达显著高于无淋巴结转移组,在临床分期中,Ⅲ+Ⅳ期的 OPN mRNA 表达水平也明显高于Ⅰ+Ⅱ期,而 OPN mRNA 的表达在年龄、性别差异无统计学意义。本研究提示 OPN 在 NPC 的发生及转移起着重要作用。恶性肿瘤细胞的远处转移是一个多因素、多步骤的复杂过程。近年来众多研究表明,OPN 广泛参与多种恶性肿瘤的远处转移,并证实其在肿瘤浸润转移、血管形成、抑制凋亡等过程中发挥重要作用。Fong 等^[3]报道 OPN 在肺癌细胞中高表达,OPN 通过结合整合素 $\alpha v\beta 3$,激活了 FAK、 PI_3K 、Akt、ERK 和 NF- κB 通路,促进肺癌细胞迁移。Allan 等^[4]研究结果表明 OPN 作为一个关键的生物分子参与了乳腺癌的淋巴结转移。Kita 等^[5]调查了 175 例食管癌患者 OPN 和肿瘤预后之间的关系,OPN 表达与临床分期、淋巴结转移,淋巴管浸润相关。Lu 等^[7]研究结果显示在原发性喉及下咽癌和转移性癌组织中 OPN 的表达量显著高于正常组织,有淋巴结转移组 OPN 的表达量也显著高于无淋巴结转移组。众多研究表明 OPN 在肿瘤的发生、增殖、侵袭和转移等生物学行为中均具有重要作用。OPN 不仅可能作为一个肿瘤分子诊断的标记物,并且是一个潜在的分子治疗靶点^[11]。

总之,本研究结果表明,OPN 过度表达和 NPC 的转移和进展密切相关。因此,可以推测,OPN 可作为 NPC 患者个体化治疗的一个有效的预后标志物。然而,OPN 激活的信号转导机制及 OPN 和其受体的相互作用中,需要进一步的体外研究来证实。

参考文献

[1] Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2000, 11(3):279-303.

[2] Song G, Ming Y, Mao Y, et al. Osteopontin prevents curcumin-induced apoptosis and promotes survival through Akt activation via alpha v beta 3 integrins in human gastric cancer cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(12):1537-1545.

[3] Fong YC, Liu SC, Huang CY, et al. Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway(下转第 2953 页)

有细菌共有的遗传物质,又是介导脓毒症的主要病原分子。所以,对于脓毒症的预防乃至治疗,寻找出既可以拮抗 CpG DNA 又可以拮抗病原分子脂质 A 的天然无副作用药物具有重大的理论与现实意义。

PMB 对革兰阴性细菌具有广谱抗菌活性,是得到国际公认的脂质 A 的特异性配体。因此本实验以不同浓度 PMB 标准溶液与脂质 A 进行结合反应测定作为参照,通过软件计算出的两者结合的 KD 值,该值不仅符合 Thermo 公司提供的参考标准,而且与文献报道的 10~100 nmol/L 水平基本相符,表明建立的生物传感器筛选平台在脓毒症病原分子的配体筛选方面具有快捷和可靠的优势。

生物传感技术最大的特点在于光学共振镜的应用,即按照折光系数的动态变化数值,实时对传感器表面受体与其配体分子间的相互作用及亲和力予以反映^[4]。本课题组在前期的研究工作中,围绕脂质 A 为中心靶点,在赤芍的组分分离中,成功提取出拮抗内毒素的单体 1,2,3,4,6-O-5 没食子酰- β -D-葡萄糖 (PGG)^[5]。实验研究得出,有大量的带负电荷磷酸基团存在于脂质 A 双糖骨架上,诸如 PMB 这类具有拮抗 LPS 作用的天然生物分子,都是借助与 LPS 的活性中心脂质 A 的阴离子基团结合,实现拮抗作用^[6]。实验中脂质 A 疏水端经表面活性剂 OG 连接到非衍生板上,在样品池表面形成脂质 A 活性中心充分暴露的带负电荷的单分子层。而研究发现带负电荷的磷酸基团同时也存在于 CpG DNA 中,所以笔者推测,相较于脂质 A 分子,CpG DNA 在部分属性上与其类似,即其与中药活性物质的结合是通过电荷作用来实现的,这为 CpG DNA 建立靶点筛选抗炎中药提供了实验基础和理论依据。

本实验选用了碱基经硫代化修饰的免疫刺激作用增强型 CpG DNA 107 序列,其 5' 端被生物素标记后,CpG DNA 再经亲和素-生物素效应放大系统与样品池表面稳固连接,从而建立了可靠的靶点。在应用生物传感器技术检测过程中,由于药液(配体)浓度不发生改变,当样品池表面受体与配体进行结合后,其结合反映值的变化就是两者结合作用是否具有特异性及其亲和力的实时反映,其能直观、准确地提示与病原分子 CpG DNA 及脂质 A 结合的抗炎活性物质是否存在于中药中。基于此,本课题组设计了进一步对中药活性成分含量评估的定

量消耗实验,按照上述技术的特点实验选择了亲和值均高于 100 RU 的中药。因部分中药中的有效物质被定量的脂质 A 及 CpG DNA 所消耗,因而在定量消耗实验过程中,很多中药由于活性成分含量较低,在消耗后与病原分子结合能力明显降低,有的甚至丧失结合能力,如薄荷、草果等;但有的中药活性物质含量较高,即使在消耗后仍具有较高的结合能力。实验结果表明,侧柏叶等 8 种中药拮抗脂质 A 及 CpG DNA 的活性成分含量较高,拥有巨大的开发潜力。

本实验的检测靶点主要来源于革兰阴性菌的 2 种病原分子,在构建应用生物传感筛选技术平台的基础上进行交叉二次筛选,最终从 114 种抗炎中药中筛选出 8 种备选抗炎中药,为后续选择分离纯化的药物提供了实验依据。

参考文献

- [1] Targowski T. Possibilities of therapeutic intervention in severe infections[J]. Pol Merkur Lekarski, 2012,33(197):245-247.
- [2] Harjai M, Bogra J, Kohli M, et al. Is suppression of apoptosis a new therapeutic target in sepsis? [J]. Anaesth Intensive Care, 2013,41(2):175-183.
- [3] Brandenburg K, Schromm AB, Gutschmann T. Endotoxins: relationship between structure, function, and activity[J]. Subcell Biochem, 2010,53:53-67.
- [4] Concepcion J, Witte K, Wartchow C, et al. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2009,12(8):791-800.
- [5] Genfa L, Jiang Z, Hong Z, et al. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from Radix Paeoniae Rubra using affinity biosensor technology [J]. Int Immunopharmacol, 2005,5(6): 1007-1017.
- [6] Okazaki T, Mihara T, Fujita Y, et al. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation [J]. Theriogenology, 2010,74(9):1691-1700.

(收稿日期:2013-05-08)

(上接第 2950 页)

- [J]. Lung Cancer, 2009, 64(3):263-270.
- [4] Allan AL, George R, Vantyghem SA, et al. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer[J]. Am J Pathol, 2006, 169(1):233-246.
- [5] Kita Y, Natsugoe S, Okumura H, et al. Expression of osteopontin in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2006, 95(5):634-638.
- [6] Davidson B, Holth A, Moripen L, et al. Osteopontin expression in ovarian carcinoma effusions is related to improved clinical outcome[J]. Hum Pathol, 2011, 42(7):991-997.
- [7] Lu JG, Li Y, Li L, et al. Overexpression of osteopontin and integrin α v in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas associated with differentiation and metastasis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(11):1613-1618.

- [8] He ML, Luo MX, Lin MC, et al. MicroRNAs: potential diagnostic markers and therapeutic targets for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1):1-10.
- [9] Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(1):103-118.
- [10] Bachmann IM, Ladstein RG, Straume O, et al. Tumor necrosis is associated with increased α v β 3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas[J]. BMC Cancer, 2008, 8(1):362.
- [11] Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(2):79-87.

(收稿日期:2013-05-08)