

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.11.012

OGFR mRNA 在乳腺浸润性导管癌中的表达

胡建功¹, 邢恩鸿², 李秀英¹, 王 宁¹

Expression of OGFR mRNA in Invasive Ductal Carcinoma of Breast

HU Jian-gong¹, XING En-hong², LI Xiu-ying¹, WANG-ning¹

1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China, 2. Research Center

Abstract: Objective To elucidate the features of OGFR mRNA expression in invasive ductal carcinoma of breast. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression of OGFR mRNA in benign epithelial proliferation and invasive ductal carcinoma tissues of breast. **Results** The expressing quantity of OGFR mRNA was significantly higher in benign epithelial proliferation than that in invasive ductal carcinoma tissues ($P < 0.01$). There was no significant difference between the expression of OGFR mRNA and patient's ages, volumes and grades of tumor, the expression of ER, PR, C-erbB-2 and lymphatic metastasis ($P > 0.05$). **Conclusion** The reduced level of OGFR mRNA may serve as a marker of breast invasive ductal carcinoma. The subnormal levels of OGFR mRNA may contribute to the progression of breast carcinoma.

Key words: Breast; Invasive Ductal Carcinoma; OGFRmRNA; RT-PCR

摘要:目的 探讨乳腺浸润性导管癌中 OGFR mRNA 的表达意义。**方法** 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测乳腺良性上皮增生、浸润性导管癌中 OGFR mRNA 的表达。**结果** OGFR mRNA 表达量在乳腺良性上皮增生组明显高于浸润性导管癌组 ($P < 0.05$);在浸润性导管癌中的表达与患者年龄、肿瘤体积、组织学分级、雌孕激素受体表达、c-erbB-2 表达及淋巴结转移无关 ($P > 0.05$)。**结论** OGFR mRNA 表达减少可以作为乳腺浸润性导管癌的标志;OGFR 在 mRNA 水平表达量减少,可能与乳腺癌的发生发展有关。

关键词: 乳腺; 浸润性导管癌; OGFRmRNA; RT-PCR

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)11-1258-03

0 引言

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一,近 15 年来,我国城乡妇女乳腺癌发病率、绝对患病人数及死亡率也呈明显上升趋势^[1]。

蛋氨酸脑啡肽(methionine5-enkephalin, Met⁵-enk),除具有信号转导与神经调节作用外,还有生长调节作用^[2]。Met5-enk 是通过其 ζ 受体发挥对生长的强效抑制作用,两者分别被命名为阿片生长因子(opioid growth factor, OGF)及阿片生长因子受体(opioid growth factor receptor, OGFR)。近年来,已有多篇文献报道 OGF-OGFR 在肿瘤发生中的作用^[2-5]。为探讨 OGFR 在乳腺癌发生中的作用,本研究检测了乳腺浸润性导管癌中 OGFR mRNA 的表达。

1 资料与方法

1.1 临床资料

所有病例为 2006 年 7 月 10 日—2006 年 12 月 30 日我院门诊及住院患者。切取术中冰冻送检病变组织及术后即刻送检组织,组织块厚度大于 4mm,标记后立即投入液氮中保存,所有标本均于手术后 20min 内切取。其中乳腺良性上皮增生 12 例、乳腺浸润性导管癌 26 例。乳腺癌患者平均年龄(41.53 ± 9.61)岁,其中 13 例为 50 岁以下,13 例 ≥ 50 岁。肿瘤体积 < 3cm 14 例, ≥ 3cm 12 例; I 级 5 例, II 级 16 例, III 级 5 例;雌激素受体(ER)阳性 21 例,阴性 5 例,孕激素受体(PR)阳性 18 例,阴性 8 例;c-erbB-2 阳性 8 例,阴性 18 例;无淋巴结转移 15 例,淋巴结低转移(≤ 3 个)7 例,高转移(> 3 个)4 例。病理诊断参照《乳腺及女性生殖器官肿瘤病理学和遗传学》标准^[6]。

1.2 材料与仪器设备

Trizol 试剂、异丙醇、乙醇;AMV 反转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒;琼脂糖、溴化乙锭(EB);超速

收稿日期:2009-09-25;修回日期:2010-03-02

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划资助项目(08276101D-30)

作者单位:1. 067000 河北承德,承德医学院附属医院病理科,2. 中心实验室

作者简介:胡建功(1971-),男,博士,副主任医师,主要从事肿瘤病理学研究

离心机、Bio-mini 全波段分光光度计、PCR 扩增仪、电泳仪、2020D 凝胶成像系统等。

1.3 实验方法

1.3.1 OGFR 总 RNA 提取 取已标记好的组织标本约 100mg, 按 Trizol 试剂盒说明书进行 RNA 抽提, 紫外分光光度法测定 RNA 的纯度 ($A_{260}/A_{280} > 1.6$) 和浓度。

1.3.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 逆转录 cDNA 按 AMV 逆转录试剂盒说明书进行。反应体系 20 μ l, 包括提取的 RNA 5 μ l, 5 \times 反应缓冲液 4 μ l, 去离子水 5 μ l, 充分混匀后, 12 000 r/min 离心 5s, PCR 仪上 70 $^{\circ}$ C 孵育 5min; 再加入 Oligo(DT)18 Primer(0.5 μ g/ μ l)1 μ l, RNA 酶抑制剂(20u/ μ l)1 μ l, dNTP(10mM)2 μ l, 充分混匀后, 12 000 r/min 离心 5s, PCR 仪上 70 $^{\circ}$ C 孵育 5min; 最后加入 AMV 逆转录酶(5u/ μ l)2 μ l。上述混合物充分混匀后, 12 000 r/min 离心 5s, PCR 仪上 42 $^{\circ}$ C 孵育 60min, 70 $^{\circ}$ C 10min, 立置冰上终止反应。

1.3.3 聚合酶链反应(PCR) OGFR cDNA 扩增的引物序列为 F: 5'-CAG AGT GCC TCA GAG GTG GAGA-3'; R: 5'-CTC AAC CCC GTT CTC ACT GTG-3', 目的基因片段为 300bp。内参照 β -actin 扩增的引物序列为 F 5'-CAT CCT GCG TCT GGA CCT-3'; R 5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3', 目的基因片段为 500bp。

操作过程参照 PCR 试剂盒说明书进行。OGFR cDNA 扩增反应体系: 在 PCR 试管中加入上述合成的 OGFR cDNA 2 μ l, dNTP (10mM) 4 μ l, 10 \times PCR Buffer 5 μ l, OGFR 上、下游引物各 3 μ l, Taq-pfu DNA 聚合酶(2u/ μ l)0.5 μ l, 再加入超纯水至 50 μ l。循环参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 34 个循环, 末次循环后 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10min。 β -actin 扩增反应体系同 OGFR cDNA, 循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 22 个循环, 末次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物取 10 μ l 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 于 2020D 紫外荧光数字成像仪获取目的条带, 并用其所带分析软件进行半定量分析, 以每例 OGFR 与 β -actin 扩增产物条带吸光度的比值作为 OGFR mRNA 的相对表达量。

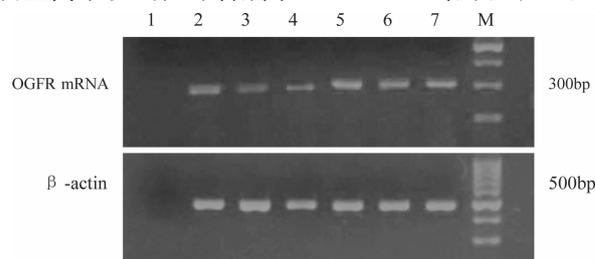
1.4 统计学方法

应用 SPSS11.5 软件进行数据处理, 进行独立样本 *t* 检验及多因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺良性上皮增生和浸润性导管癌中 OGFR mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示, 12 例乳腺良性上皮增生和 26 例浸润性导管癌中 OGFR mRNA 相对表达量分别为 (1.24 ± 0.49) 和 (0.74 ± 0.40) , 乳腺良性上皮增生明显高于浸润性导管癌中 ($P < 0.01$), 结果见图 1。



Lane 1: control; Lane 2~4: breast invasive ductal carcinoma tissues; Lane 5~7: benign epithelial proliferation tissues

图 1 OGFR mRNA 在乳腺良性上皮增生和浸润性导管癌中的 RT-PCR 表达图

Figure 1 The expression of OGFR mRNA in benign epithelial proliferation and invasive ductal carcinoma tissues of breast

2.2 乳腺浸润性导管癌中 OGFR mRNA 表达与临床病理特征之间的关系

统计结果显示, OGFR mRNA 在浸润性导管癌中的表达与患者年龄、肿瘤体积、组织学分级、雌孕激素受体表达、c-erbB-2 表达及淋巴结转移无关 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

3 讨论

许多研究表明, 肿瘤中 OGFR 表达减少。OGFR 表达减少, 会减弱 OGF-OGFR 对 DNA 合成的抑制作用, 导致肿瘤的生长加速, 而促进肿瘤的发生发展^[2-5,7]。McLaughlin 等^[8] 检测了头颈部鳞癌 (SCCHN) 中 OGFR mRNA 和蛋白的表达, 结果发现, 正常黏膜、癌旁组织、肿瘤组织中 OGFR 蛋白表达量依次减少, 而 OGFR mRNA 的表达量在几种组织中却没有差别。提示在 SCCHN 中, OGFR 表达减少是在翻译和翻译后的 OGFR 蛋白水平, 而不是在 OGFR mRNA 的转录水平。国内有研究发现, OGFR 蛋白在正常乳腺、乳腺腺病、导管上皮异型增生、浸润性导管癌中表达量依次减少^[9]。本研究采用 RT-PCR 方法检测了乳腺良恶性病变中 OGFR mRNA 的表达, 结果显示, 乳腺良性上皮增生和浸润性导管癌中 OGFR mRNA 相对表达量分别为 (1.24 ± 0.49) 和 (0.74 ± 0.40) , 乳腺浸润性导管癌中 OGFR mRNA 的表达量明显低于良性上皮增生组织 ($P < 0.01$)。表明乳腺癌中 OGFR 在 mRNA 的转录水平即出现了异常, 提示乳腺癌中可能存在着 OGF-OGFR 的相互作用, OGFR 表达减少可能与乳腺癌的发生发展有一定的关系。这对于

表 1 乳腺浸润性导管癌中 OGFR mRNA 表达与临床病理特征之间的关系

Table 1 Relationship between expression of OGFR mRNA and the clinicopathologic factors of breast invasive ductal carcinoma

Characteristics	n	OGFR mRNA($\bar{x} \pm s$)	t	P
Age (year)	26			
<50	13	0.62 ± 0.24	-0.604	0.551
≥50	13	0.69 ± 0.36		
Size of tumor (cm)				
<3	14	0.62 ± 0.37	-0.791	0.437
≥3	12	0.70 ± 0.19		
Pathological grade				
I	5	0.68 ± 0.28		
II	16	0.74 ± 0.44		0.773 [△]
III	5	0.84 ± 0.47		0.554 [△] 0.657 ^{△△}
ER				
+	21	0.63 ± 0.32	-0.646	0.524
-	5	0.73 ± 0.18		
PR				
+	18	0.56 ± 0.24	-2.662	0.14
-	8	0.66 ± 0.33		
C-erbB-2				
+	8	0.76 ± 0.37	1.275	0.215
-	18	0.60 ± 0.26		
Lymphatic metastasis				
No	15	0.69 ± 0.46		
Less (≤3)	7	0.71 ± 0.14		0.918*
More(>3)	4	1.01 ± 0.45		0.172* 0.246**

Note: [△]: vs. grade I, ^{△△}: vs. grade II; *: vs. no lymphatic metastasis, **: vs. less lymphatic metastasis

进一步认识乳腺癌的发生发展规律具有重要意义。

McLaughlin 等研究^[10]发现,OGFR 蛋白在 SC-CHN 中表达量与肿瘤的体积及分化程度有关。而 OGFRmRNA 的表达量却与肿瘤的体积及分化程度无关。Zagon 等^[11]发现,OGFR 在 mRNA 与蛋白水平表达量的变化均与胰腺癌、大肠癌体积和分化程度无关。本研究检测发现,OGFR mRNA 在浸润性导管癌中的表达与患者年龄、肿瘤体积、组织学分级、雌孕激素受体表达、c-erbB-2 表达及淋巴结转移无关。产生这些现象的原因还不清楚,但是这足以表明 OGFR 表达量的变化在不同肿瘤中是不同的,OGFR 的表达特点与肿瘤的类型有关。

本研究表明 OGFR 在乳腺癌的 mRNA 水平出现了异常,并与肿瘤的体积和分化程度等临床病理学参数无关。这与 McLaughlin 等^[8,10]在 SCCHN 中及 Zagon 等^[11]在胰腺癌和大肠癌中的研究结果不甚一致,提示 OGFR 在不同肿瘤中的表达存在差异,OGFR 表达量的变化取决于肿瘤的组织学类型。因此,每一种肿瘤中的 OGFR 的表达都需要进行评估。这对于了解肿瘤的发生机制以及预后的判断,可能都具有重要的参考意义。

参考文献:

[1] 杨玲,李连弟,陈育德.中国乳腺癌发病死亡趋势的估计与预测[J].中华肿瘤杂志,2006,28(6):438-440.
 [2] Goldenberg D, Zagon IS, Fedok F, et al. Expression of opioid

growth factor (OGF)-OGF receptor (OGFr) axis in human non-medullary thyroid cancer[J]. Thyroid,2008,18(11): 1165-1170.
 [3] Cheng F,McLaughlin PJ,Verderame MF,et al. Dependence on nuclear localization signals of the opioid growth factor receptor in the regulation of cell proliferation[J]. Exp Biol Med,2009,234(5): 532-541.
 [4] McLaughlin PJ,Kreiner S,Morgan CR,et al. Prevention and delay in progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck in nude mice by stable overexpression of the opioid growth factor receptor[J]. Int J Oncol,2008,33(4): 751-757.
 [5] Cheng F,McLaughlin PJ,Verderame MF,et al. The OGF-OGFr axis utilizes the p16INK4a and p21WAF1/CIP1 pathways to restrict normal cell proliferation[J]. Mol Biol Cell,2009,20(1): 319-327.
 [6] 程洪,戴林,郭双平. 乳腺及女性生殖器官肿瘤病理学和遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:6-15.
 [7] Molin L,Verna JM,Nissou MF,et al. Met-enkephalin receptors in human gliomas[J]. Neuroreport,1994,5(18): 2474-2476.
 [8] McLaughlin PJ,Stack BC Jr,Levin RJ,et al. Defects in the opioid growth factor receptor in human squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Cancer,2003,97(7): 1701-1710.
 [9] 胡建功,金小萍,谢朝辉,等. 乳腺浸润性导管癌中 OGF OGFR 的表达研究[J]. 中国肿瘤临床,2008,35(6):336-338,343.
 [10] McLaughlin PJ,Zagon IS. Progression of squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with down-regulation of the opioid growth factor receptor[J]. Int J Oncol,2006,28(6): 1577-1583.
 [11] Zagon IS,McLaughlin PJ. Opioid growth factor receptor is unaltered with the progression of human pancreatic and colon cancers[J]. Int J Oncol,2006,29(2): 489-494.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]