

文章编号:1005-6947(2006)04-0289-03

· 简要论著 ·

# 鸟氨酸脱羧酶在乳腺癌中的表达及其意义

梅玉<sup>1</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 刘贤锡<sup>2</sup>, 马榕<sup>1</sup>

(山东大学 1. 齐鲁医院 乳腺外科 2. 生物化学与分子生物学研究所, 山东 济南 250012)

**摘要:**为探讨鸟氨酸脱羧酶(ODC)基因表达在乳腺癌发生发展中的作用,笔者利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定20例乳腺癌组织及相应癌旁乳腺组织中ODC mRNA表达的相对水平,观察其与乳腺癌的发生发展及与乳腺癌临床分期的关系。结果显示乳腺癌组织中ODC的表达明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ ),乳腺癌组织中ODC的相对水平与临床TNM分期呈正相关趋势( $P < 0.01$ )。提示ODC在乳腺癌组织中呈高表达,并与临床TNM分期呈正相关,说明其在乳腺癌的发生发展中可能起重要作用。

**关键词:**乳腺肿瘤/病理学;鸟氨酸脱羧酶;肿瘤分期

**中图分类号:**R737.9; R730.26 **文献标识码:**B

鸟氨酸脱羧酶是细胞中控制多胺生成的关键酶之一,而多胺则是细胞增殖调控的重要因素,对肿瘤的发生发展起重要作用。实验证明,抑制ODC的活性可以减少多胺的生成,从而抑制肿瘤的生长,达到治疗的目的。本文检测20例乳腺癌组织及相应癌旁组织中ODC mRNA水平,以进一步验证ODC基因表达在乳腺癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源及处理** 20份乳腺癌及癌旁乳腺组织标本来自25~65岁的女性乳腺癌患者,其中14份由山东大学齐鲁医院普外科提供,6份由山东省肿瘤医院提供。组织标本均取自经组织病理学证实的乳腺癌组织及癌旁乳腺组织(离癌灶3cm以上),常规处理后液氮速冻,置于-80℃低温冰箱保存。标本的临床分期:I期3例,II期8例,III期9例。组织病理学类型均为浸润性非特殊性癌。

**1.1.2 试剂** Trizol试剂盒为美国GIBCO公司产品;RT-PCR试剂盒为大连宝生物公司产品。 $\beta$ -肌

动蛋白( $\beta$ -actin)引物序列按参考文献<sup>[1]</sup>设计,ODC引物序列为笔者设计,均由上海博亚公司合成。ODC cDNA上游引物为5'-GCAGGATCCACCATGAA CAACTTTGGTAA-3',下游引物为5'-GC-CGAGATCTCAGAAGAAGAAACTTC-3',均位于第三外显子,扩增片段为120bp。 $\beta$ -actin cDNA上游引物为5'-GCGGATGTCCA CGTCACACT-3',下游引物为5'-CCACTGGCATGTGA TGGAC-3',扩增片段428bp。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 组织总RNA的提取** 取100mg组织标本依据Trizol试剂盒的说明提取组织总RNA。琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取的组织RNA。分光光度计测定260nm与280nm的光密度值(OD)并据此推断RNA的浓度,-80℃保存。

**1.2.2 RT-PCR** 取5 $\mu$ gRNA,参照宝生物公司逆转录(RT)试剂说明书用oligo dT合成cDNA。其反应体系为:RNA(5 $\mu$ g)+双蒸水共9.5 $\mu$ L,oligo dT 1 $\mu$ L,10 $\times$ 缓冲液(buffer)2 $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ L,dNTP 2 $\mu$ L,RNA酶抑制剂0.5 $\mu$ L,AMV 1 $\mu$ L共20 $\mu$ L。PCR特异扩增ODC第三外显子,ODC与 $\beta$ -actin的PCR反应同管进行。反应体系为:cDNA 2.5 $\mu$ L,双蒸水 25.5 $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ L,10 $\times$ buffer 4.75 $\mu$ L,dNTP 3 $\mu$ L,Taq酶 0.25 $\mu$ L,exon3上下游引物各4 $\mu$ L, $\beta$ -actin上下游引物各1 $\mu$ L共50 $\mu$ L。于94℃预变性5min,30个循环(94℃ 40s,61℃ 40s,72℃ 1min),再于72℃ 7min后置4℃保存。PCR产物在

收稿日期:2005-10-13; 修订日期:2006-02-03。

**作者简介:**梅玉,男,山东淄博人,山东大学齐鲁医院硕士研究生,主要从事乳腺肿瘤方面的研究。

**通讯作者:**马榕 电话:0531-82169490; E-mail: malone@sdu.edu.com。

含  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  溴化乙锭 (EB) 的 2% 琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶成像分析系统 (smart view 2001) 对条带进行半定量分析;ODC 基因的表达量通过扩增的  $\beta$ -actin 的表达进行校正,即以 ODC/ $\beta$ -actin 比值作为 ODC 基因表达量。然后计算癌组织和相应癌旁乳腺组织 ODC 基因 mRNA 表达量的比值,并进行统计学分析。

1.2.3 统计学处理 结果以均数  $\pm$  标准差表示。利用 SAS8.2 统计学软件的两样本的配对  $t$  检验和秩相关分析对结果进行统计处理。

## 2 结果

### 2.1 提取组织总 RNA 的鉴定

组织总 RNA 的 OD260/OD280 值均大于 1.7,琼脂糖凝胶电泳可见 28s,18s,5s 3 条带 (图 1)。

图 1 组织 RNA 的琼脂糖凝胶 (含 1% 甲醛) 电泳图

### 2.2 ODC 在乳腺癌组织及癌旁乳腺组织中的表达水平

乳腺癌组织中 ODCmRNA 的表达水平普遍高于癌旁乳腺组织 (图 2,表 1)。

1,3,5:癌旁乳腺组织;2,4,6:乳腺癌组织

N:DNA 分子质量标准 DL-2000

图 2 RT-PCR 扩增产物 ODC 及  $\beta$ -actin 的琼脂糖凝胶电泳图

表 1 乳腺癌组织与癌旁乳腺组织中 ODC 相对表达水平比较

标本	样本量	ODC/ $\beta$ -actin	$P$ 值
癌旁乳腺组织	20	$0.99 \pm 0.08$	<0.05
乳腺癌组织	20	$1.31 \pm 0.18$	

### 2.3 乳腺癌组织中 ODC 的相对表达水平与临床 TNM 分期的关系

乳腺癌组织中 ODC 的相对水平与临床 TNM 分期呈正相关趋势,秩相关系数  $r_s = 0.6050$ ,  $P = 0.0047$  (表 2)。

表 2 不同 TNM 分期的乳腺癌组织中 ODC 的表达水平

TNM 分期	样本量	ODC/ $\beta$ -actin
I	3	$0.69 \pm 0.11$
II	8	$1.10 \pm 0.60$
III	9	$1.60 \pm 0.92$

## 3 讨论

本研究结果显示,ODC mRNA 在乳腺癌组织中的表达水平普遍高于癌旁乳腺组织,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );乳腺癌组织中 ODC 的相对水平与临床 TNM 分期呈正相关趋势 ( $P < 0.01$ )。另外 Love RR 等用免疫组化方法研究了越南 433 例用内分泌辅助治疗绝经前早期乳腺癌的女性患者,发现 ODC 的量与目前常用的乳腺癌指标无统计学意义上的联系,但其与肿瘤组织的恶性程度呈正相关<sup>[1]</sup>。以上信息表明 ODC 在乳腺癌的发生发展中起着重要作用,可能成为乳腺恶性肿瘤的基因诊断和基因治疗的新的靶标。

最近 Manni 等<sup>[2]</sup>通过二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 抑制 ODC 以减少细胞中的多胺,从而使体外乳腺癌细胞系的侵袭性降低,使小鼠体内的肿瘤生长减慢。这些结果间接证明 ODC 与肿瘤血管形成及侵袭力有关。近期国内已有研究证实 ODC 与多种肿瘤的发生发展密切相关,包括结直肠癌、胃癌、脑胶质瘤、肺癌、急性淋巴细胞白血病、卵巢癌及良性前列腺增生综合征等<sup>[3-6]</sup>。实验均表明 ODC 在肿瘤的发生发展中发挥极其重要的作用,本研究对于了解乳腺癌发生的分子机制及对其进行基因干预具有重要意义。近期国内有学者还对可能影响乳腺癌预后的基因进行了相关分析,发现人表皮生长因子受体 2 (HER2/c-erbB-2) 和多药耐药基因 (MDR 1) 的表达是影响预后的独立危险因素<sup>[7]</sup>,这对于我们将来可从多个环节对乳腺癌进行基因干预治疗提供了理论依据。

文章编号:1005-6947(2006)04-0291-04

· 简要论著 ·

# survivin 反义寡核苷酸对 MCF-7 乳腺癌细胞的生长抑制作用

杨策尧<sup>1</sup>, 段体德<sup>2</sup>, 刘德权<sup>3</sup>

(昆明医学院第一附属医院 1. 临床医学实验研究中心 2. 普通外科, 云南 昆明 650032; 3. 昆明医学院第三附属医院 乳腺病科, 云南 昆明 650106)

**摘要:**为研究 survivin 反义寡核苷酸对 MCF-7 乳腺癌细胞的生长抑制作用,以脂质体介导反义寡核苷酸组(ASODN/lip)、无义寡核苷酸组(NODN/lip)及 RPMI 1640 培养液的空白对照组(lip)转染人乳腺癌 MCF-7 细胞系。用 Hoechst 33258/PI 双重染色观察 MCF-7 细胞的形态学改变;透射电镜观察细胞超微结构;流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡的变化;DNA 凝胶电泳观察凋亡情况。结果示:转染后的细胞结构呈凋亡样改变;转染后细胞凋亡显著增加,并出现 G<sub>2</sub>/M 期阻滞现象;在 600 ng/mL 和 800 ng/mL ASODN/lip 组的电泳图谱上呈现明显的“梯状”条带。提示反义核酸技术能使乳腺癌细胞中的凋亡抑制基因 survivin 表达下调,诱导乳腺癌细胞发生凋亡;这可为 survivin 靶向治疗提供理论依据。

**关键词:**乳腺肿瘤/遗传学;细胞凋亡抑制基因;反义寡核苷酸

**中图分类号:**R737.9; Q343.1 **文献标识码:**B

survivin 是近年来发现的一个新的细胞凋亡抑制基因,能抑制肿瘤细胞凋亡,使肿瘤得以生存。本实验通过转染 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)技术抑制乳腺癌细胞 survivin 的表达,诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生凋亡,为乳腺癌的基因治疗提供理论依据。

**收稿日期:**2006-02-14; **修订日期:**2006-03-01。

**作者简介:**杨策尧,女,广东梅州人,昆明医学院第一附属医院博士研究生,主要从事胃肠、乳腺癌实验方面的研究。

**通讯作者:**段体德 E-mail:tdduan@163.com。

值得一提的是已有研究报道,通过构建表达 ODC 反义 RNA 的腺病毒载体,体外感染前列腺癌细胞系,可以明显观察到其对前列腺癌细胞增殖的抑制作用<sup>[8]</sup>,这对利用 ODC 作为靶标进行肿瘤的基因治疗打下了基础。

## 参考文献:

- [1] Love RR, Astrow SH, Cheeks AM. Ornithine decarboxylase (ODC) as a prognostic factor in operable breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 79(3): 329-334.
- [2] Manni A, Washington S, Griffith JW. Influence of polyamines on in vitro and in vivo features of aggressive and metastatic behavior by human breast cancer cells [J]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19(2): 95-105.

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

MCF-7 人乳腺癌细胞株由中国科学院上海细胞研究所提供。将 MCF-7 乳腺癌细胞加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液,镜下计数;调节细胞至约  $1 \times 10^6$  个/mL,分别将 MCF-7 接种于 30 mL 培养瓶、96 孔培养板及铺有盖玻片的 6 孔培养板中,37℃ 5% CO<sub>2</sub>,常规培养至 80% 汇片

- [3] 孙爱华,刘贤锡. 大肠癌鸟氨酸脱羧酶的表达和临床意义研究 [J]. 中国普通外科进展, 2004, 6(3): 150-152.
- [4] 栗世方. 多胺代谢、ODC 在脑胶质瘤研究中的进展 [J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2003, 30(1): 36-39.
- [5] 蒋滢,黄美英. 多胺代谢与癌肿的研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 32-34.
- [6] 刘贤锡,赵春华. 良性增生前列腺组织中 ODC 活性及多胺含量的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 1996, 12(2): 138.
- [7] 黄宝俊,徐惠绵,李凯等. 联合检测多基因在乳腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(4): 247-252.
- [8] 张岩,刘贤锡,张冰等. 鸟氨酸脱羧酶基因反义 RNA 对前列腺癌细胞生长的抑制作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 128-133.