

乳腺癌组织中内皮素的表达及临床意义*

赖金国¹, 潘小平¹, 洪晓绿², 蔡高涛¹

(广东省广州市花都区人民医院:1. 检验科;2. 感染科 510800)

摘要:**目的** 检测内皮素(EDN)基因在乳腺癌组织中的表达情况,并分析其临床意义。**方法** 采用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 42 例乳腺癌组织(实验组)及 50 例正常乳腺组织(对照组)中 EDN-1 mRNA、EDN-2 mRNA 和 EDN-3 mRNA 的表达情况,并分析其与各临床特征之间的关系。**结果** 实验组 EDN-1 mRNA 和 EDN-2 mRNA 的表达量高于对照组,差异有统计学意义($t=3.015, P<0.05$; $t=4.732, P<0.01$),而 EDN-3 mRNA 在实验组中的表达低于对照组,差异有统计学意义($t=-8.2, P<0.01$);在各临床特征比较中,对于是否有区域淋巴结转移、远处转移、及肿瘤的大小,组间 EDN-1 mRNA 和 EDN-2 mRNA 的表达差异有统计学意义($P<0.05$),在患者年龄和肿瘤组织类型组间表达差异无统计学意义($P>0.05$),而 EDN-3 mRNA 表达在各临床特征之间的比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** EDN 与乳腺癌密切相关,EDN-1 mRNA 和 EDN-2 mRNA 与乳腺癌的发生、发展转移相关,而 EDN-3 mRNA 只与乳腺癌的发生相关,与其发展转移无关。

关键词:内皮素; 乳腺癌; 实时定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.032 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)14-1990-04

以往的研究中证实,内皮素-3(EDN-3)基因在乳腺癌组织中有较高的甲基化发生率,导致 EDN-3 mRNA 表达的减少^[1],然而内皮素家族的另外两个成员——EDN-1 和 EDN-2 在乳腺癌组织中的表达情况不得而知,且它们与 EDN-3 表达之间的关系也需要做进一步研究。所以,本研究采用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测在乳腺癌组织中,EDN 家族中的 EDN-1 mRNA、EDN-2 mRNA 和 EDN-3 mRNA 的表达,以探究其在乳腺癌组织中各临床特征之间表达量之间的关系,同时比较其表达的差异,为乳腺癌的发生机制的研究进一步提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 42 例 2013 年 1 月至 2014 年 10 月在本院经乳腺癌手术并经病理学证实的乳腺癌组织为实验组,年龄 32~68 岁,平均(52.2±10.1)岁,其中大于 50 岁 22 例,小于或等于 50 岁 20 例。以 WHO2003 标准作为乳腺癌分类标准^[2]:T₁ 27 例,T_{2~4} 15 例;小叶型 18 例,组织学分型导管型 24 例;淋巴结转移(N_{1~3})16 例,无淋巴结转移(N₀)26 例;远处转移(M₁)17 例,无远处转移(M₀)25 例。选取 50 例同期在本

院接受乳腺手术,且病理学证实为非乳腺癌的乳腺组织(包括乳腺囊性增生、乳腺管内乳头状瘤、乳腺囊内乳头状瘤、乳腺炎、乳腺纤维瘤)作为对照组,年龄 27~63 岁,平均(48.9±11.3)岁,组间比较年龄差异无统计学意义($t=0.82, P>0.05$),有可比性,实验用乳腺组织保存于-80℃条件下备用。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 仪(7300,ABI Group),PCR 仪(C1000 Thermal cycler, BIO-RAD Co. Ltd.),制冷机(AF100, Scotsman Co. Ltd.),Trizol[Invitrogen(9109)],DEPC(Sigma),DNase I [Promega(M610A)],PrimeScript™ RT 逆转录试剂盒[TaKaRa(RR047A)],SYBR RT-PCR 试剂盒[TaKaRa(RR820A)]。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 目的基因序列的查找参考 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>网站,引物设计使用 Primer express 2.0 软件,引物合成使用 ABI 3900 高通量 DNA 合成仪(Invitrogen Co. Ltd.),表 1 显示了实验用引物序列。

表 1 引物序列

碱基序列(5'~3')	基因编号	位置	产物大小(bp)
EDN-1			
上游引物:TCAACACTCCCGAGCACGT	NM001955.4	555~573	96
下游引物:CACGGTCTGTTGCCTTTGTG			
EDN-2			
上游引物:GACGTGTTCCAGACTGGCAA	XM006710400.1	289~308	101
下游引物:TGTTGTCGCTTGGCAAAGAG			
EDN-3			
上游引物:ACACTCCCGAACAGACGGTG	XM005260314.2	672~691	112
下游引物:TGTGGCCGATGTGAGAGCT			

* 基金项目:广东省广州市花都区医疗卫生科技计划项目(13-HDWS-006)。

1.3.2 RNA 提取及 cDNA 合成 总 RNA 的提取使用 Trizol 试剂,总 RNA 提纯使用 RNase-free 的 DNase I (Promega) 试剂。取 1 μL RNA 样品,稀释 50 倍,用紫外分光光度仪上测定,其 A260/A280 值为 1.8~2.0;取 1 μL RNA,于 80 V,1% 琼脂糖凝胶电泳下进行 20 min,随后在凝胶成像系统下观察,总 RNA 的 5S rRNA、18S rRNA 以及 28S rRNA 条带都清晰可见,RNA 提取较为完整。取 4 μL RNA,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min,随后在 85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s 的条件下,用 PrimeScriptTM RT 逆转录试剂和随机引物合成 cDNA,总体积为 20 μL ,保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3.3 RT-PCR 合成 在 93 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,93 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 25 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s,反应条件下共进行 40 循环。用染料法配制 RT-PCR 反应体系 25 μL :dNTPS 0.5 μL ,cDNA 2 μL ,Taq 酶 0.5 μL ,正向引物(10 pmol/ μL)0.5 μL ,10 $\times$ PCR 缓冲液(含 SYBR 染料)2.5 μL ,反向引物(10 pmol/ μL)0.5 μL ,水 18.5 μL 。溶解曲线:93 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,从 60 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢升至 93 $^{\circ}\text{C}$,每升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 检测 1 次荧光信号值,反应结束后检测系统自动生成每条曲线的 Ct 值及溶解曲线。各基因溶解曲线仅 1 条主峰,特异性好。

1.3.4 标准品与标准曲线的制定 随机选取对照组某一 RNA (浓度约 0.377 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),按照如上条件合成 cDNA,将此 cDNA 以 10 倍的倍比进行稀释,制成 1、10-1、10-2、10-3、10-4 cDNA 共 5 个浓度梯度,倍比稀释确保准确无误,以此 5 个浓度梯度作为模板,分别对 EDN-1 mRNA、EDN-2 mRNA 以及 EDN-3 mRNA 进行 RT-PCR,反应结束后自动生成 Ct 值。以 Ct 值为纵坐标、拷贝数的对数为横坐标,绘制标准曲线。实验条件经反复优化,当实验扩增如图 1~3 所示的曲线时(横坐标为 Ct 值,纵坐标为荧光信号强度),将此时的 5 个浓度梯度样本作为阳性定量标准品。拟合后 EDN-1 mRNA 曲线方程为: $Y=-3.29X+39.67,R^2=0.99$;EDN-2 mRNA 曲线方程为: $Y=-3.35X+41.18,R^2=0.99$;EDN-3 mRNA 曲线方程为: $Y=-3.48X+41.95,R^2=0.99$ 。每批次检测须包含上述 5 个阳性定量标准品,同一个 cDNA 样品做三个重复定量检测求平均 Ct 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EDN 在实验组与对照组中的表达比较 EDN-1 mRNA 在实验组中的表达量为 $(28.392\pm8.694)\times10^4$ copies/ μL ,高于对照组 $[(9.832\pm4.179)\times10^3$ copies/ μL],差异有统计学意义($t=3.015,P<0.05$);EDN-2 mRNA 在实验组中的表达量为 $(42.239\pm9.647)\times10^4$ copies/ μL ,高于对照组 $[(8.628\pm5.421)\times10^3$ copies/ μL],差异有统计学意义($t=4.732,P<0.01$);EDN-3 mRNA 在实验组中的表达量为 $(5.712\pm1.316)\times10^3$ copies/ μL ,低于对照组 $[(45.231\pm25.379)\times10^3$ copies/ μL],差异有统计学意义($t=-8.21,P<0.01$)。

2.2 乳腺癌各临床特征之间实验组 EDN 表达的组间比较 在年龄和肿瘤组织类型中,EDN-1 mRNA 和 EDN-2 mRNA 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。在是否有区域淋巴结转移、远处转移、肿瘤大小的比较中,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2、3。EDN-3 mRNA 的表达在不同年龄组、肿瘤组织类型和大小、是否有区域淋巴结转移、远处转移的比较中,

差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 2 EDN-1 mRNA 在不同临床特征乳腺癌患者中表达的比较 ($\times10^4$ copies/ $\mu\text{L},\bar{x}\pm s$)				
临床参数	<i>n</i>	EDN-1 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄				
≤ 50 岁	20	8.363 $\pm$ 3.596	1.735	0.142
>50 岁	22	27.522 $\pm$ 11.635		
组织类型				
导管型	24	52.238 $\pm$ 14.192	1.847	0.096
小叶型	18	32.2.8 $\pm$ 10.392		
肿瘤大小				
T ₁	27	8.263 $\pm$ 1.626	2.255	0.028
T _{2~4}	15	39.421 $\pm$ 11.831		
区域淋巴结转移				
N ₀	26	7.462 $\pm$ 2.105	2.712	0.031
N _{1~3}	16	35.852 $\pm$ 12.755		
远处转移				
M ₀	25	9.542 $\pm$ 5.632	2.872	0.003
M ₁	17	62.373 $\pm$ 16.314		

表 3 EDN-2 mRNA 在不同临床特征乳腺癌患者中表达的比较 ($\times10^4$ copies/ $\mu\text{L},\bar{x}\pm s$)				
临床参数	<i>n</i>	EDN-2 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄				
≤ 50 岁	20	28.712 $\pm$ 10.241	1.912	0.082
>50 岁	22	42.827 $\pm$ 8.170		
组织类型				
导管型	24	29.820 $\pm$ 13.636	1.884	0.097
小叶型	18	56.045 $\pm$ 6.227		
肿瘤大小				
T ₁	27	28.790 $\pm$ 12.564	2.463	0.018
T _{2~4}	15	72.142 $\pm$ 6.916		
区域淋巴结转移				
N ₀	26	21.528 $\pm$ 10.591	2.298	0.026
N _{1~3}	16	67.352 $\pm$ 8.011		
远处转移				
M ₀	25	32.482 $\pm$ 14.192	2.336	0.032
M ₁	17	78.709 $\pm$ 15.926		

表 4 EDN-3 mRNA 在不同临床特征乳腺癌患者中表达的比较 ($\times10^4$ copies/ $\mu\text{L},\bar{x}\pm s$)				
临床参数	总例数	EDN-3 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄				
≤ 50 岁	20	5.927 $\pm$ 1.523	3.098	0.129
>50 岁	22	5.059 $\pm$ 1.389		

续表 4 EDN-3 mRNA 在不同临床特征乳腺癌患者中表达的比较 (×10⁴ copies/μL, $\bar{x} \pm s$)

临床参数	总例数	EDN-3 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
组织类型				
导管型	24	5.901±1.147	1.412	0.597
小叶型	18	5.402±1.285		
肿瘤大小				
T ₁	27	5.712±1.586	1.109	0.822
T _{2~4}	15	5.743±1.702		
有否区域淋巴结转移				
N ₀	26	5.865±1.913	1.584	0.252
N _{1~3}	16	5.325±1.554		
远处转移				
M ₀	25	5.834±1.951	2.991	0.091
M ₁	17	4.786±1.737		

3 讨 论

EDN 作为一种细胞因子,广泛在结肠、小肠、脑、胰腺、骨骼肌、睾丸等组织中表达,包括 EDN-1、EDN-2 和 EDN-3^[3]。经前体蛋白翻译后,EDN 裂解出一种生物活性物质,含 21 个氨基酸。通过自分泌和旁分泌,它能与细胞表面的 EDNRA 和 EDNRB 受体相互作用^[4],从而参与细胞的生物功能,如诱导增殖、分化转移等^[5]。细胞的存活率可通过内皮素信号传导的异常而调节,此外,内皮素信号传导异常还能增强细胞侵袭力,导致组织器官的病变,以及肿瘤的发生^[6]。EDN 已被多个研究证实与多种肿瘤有关,如卵巢癌^[7]、前列腺癌^[8]、成骨细胞瘤等^[9]。

本文采用 RT-PCR 方法,检测了 42 例乳腺癌组织及 50 例正常乳腺组织中 EDN-1 mRNA、EDN-2 mRNA 和 EDN-3 mRNA 的表达水平,结果发现,乳腺癌组织中 EDN-1 mRNA 和 EDN-2 mRNA 的表达量较对照组显著性增加,这与 Kalles 等^[10]和 Grimshaw 等^[11]报道的相同,也与本研究结果 EDN-1 mRNA 和 EDN-2 mRNA 在乳腺癌患者外周血中均大量表达相一致,这说明 EDN-1 和 EDN-2 基因与乳腺癌密切相关。采用放射免疫分析法,苗瑞政等^[12]对 EDN-1 的水平进行了检测,肿瘤大小并无差异,这与本研究结果不同,其可能原因是由于采用了对乳腺癌不同的分类和检测方法。在相关临床特征比较中这种高表达在患者年龄和肿瘤组织类型之间差异均无统计学意义,在是否有区域淋巴结转移、远处转移以及肿瘤大小比较中,差异具有统计学意义,说明乳腺癌的发展和转移与 EDN-1 和 EDN-2 基因有关。

EDN-3 mRNA 在实验组的表达明显低于对照组,表明 EDN-3 基因与乳腺癌具有相关性,但在肿瘤组织类型和大小、是否有区域淋巴结转移或远处转移、年龄等特征之间比较,无统计学意义,说明乳腺癌的发展、转移与 EDN-3 基因无关,该结论也与乳腺癌患者外周血中的表达关系相一致。

无论在乳腺癌组织还是在乳腺癌外周血液中,EDN-3 mRNA 的表达均有所减少,这可能与其转录起始 CpG 岛的存在有关,在对 EDN-3 mRNA 测序时,Alanen 等^[13]发现,大量的 C、G 存在于约有 2 kb 长度区域,在 EDN-3 mRNA 转录起

始点距离 5'端 1 kb 到 3'端 1 kb 之间;该区域符合 G/C 比例超过 60%、CpG 岛的长度超过 200 bp、以及实际或预期的 CpG 率大于 0.6 的条件^[14];由此推测,CpG 岛可能存在于 EDN-3 基因转录起始位置,正因为该岛的存在导致 EDN-3 mRNA 表达量的减少。而转录起始 DNA 的甲基化与基因的 CpG 岛存在有关^[15]。但需要采用其他方法来证实此种推测,如甲基特异性 PCR(MS-PCR)来检测 EDN-3 基因转录起始甲基化情况。Mitaka 等^[16]研究表明,EDN-3 在动物体内能负性调节 EDN-1 的生物活性,在本研究中,EDN-3 mRNA 表达量减少,而 EDN-1 mRNA 和 EDN-2 mRNA 表达量增加,这种关系在人体组织或癌性组织中似乎也成立,该结论是否正确有待进一步研究。

综上所述,EDN 与乳腺癌密切相关,EDN-1 基因和 EDN-2 基因不但与乳腺癌的发生有关,而且与乳腺癌的发展转移相关,而 EDN-3 基因只与乳腺癌的发生相关,而与其发展转移无关。鉴于此,为了进一步认识乳腺癌发生发展的分子机制,可以在临床工作中通过检测 EDN 的表达水平实现。

参考文献

[1] 洪晓绿,潘小平,徐沛演. 内皮素-3 基因启动子甲基化及其表达在乳腺癌中的临床意义[J]. 现代医院,2015,15(11):19-21.

[2] Tavssoli FA,Devilee P. WHO Pathology&Genetics tumours of the breast and femal genital organ[M]. J Lyon: IARC Press,2003:10.

[3] Davenport AP,Barton M. Themed section: endothelin[J]. Br J Pharmacol,2013,168(2):279-282.

[4] Brandenstein M,Depping R,Shafer E,et al. Protein kinase C α regulates nuclear pri-microRNA 15a release as part of endothelin signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(10):1793-1802.

[5] Mattucci E,Maroni P,Bendineli P. Epigenetic control of endothelin-1 axis affects invasiveness of breast carcinoma cells with bone tropism[J]. Exp Cell Res,2013,319(12):1865-1874.

[6] Jewell AN,Swamydas M,Castilo CI,et al. The endothelin axis stimulates the expression of pro-inflammatory cytokines and pro-migratory molecules in breast cancer[J]. Cancer Invest,2010,28(9):932-943.

[7] Cianfrocca R,Tocci P,Semprucci E,et al. β-Arrestin 1 is required for endothelin-1-induced NF-κB activation in ovarian cancer cells[J]. Life Sci,2014,12(14):3205-3216.

[8] Shao N,WangY,Jiang WY,et al. Immunotherapy and endothelin receptor antagonists for treatment of castration-resistant prostate cancer[J]. Int J Cancer,2013,133(7):1743-1750.

[9] Bendimelli P,Maroni P,Mattucci E,et al. Microenvironmental stimuli affect Endothelin-1 signaling responsible for invasiveness and osteomimicry of bone metastasis from breast cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(4):815-826.

[10] Kalles V,Zografos GC,Provatooulou X,et al. Circulat-

ing levels of endothelin-1 (ET-1) and its precursor (Big ET-1) in breast cancer early diagnosis[J]. Tumour Biol, 2012,33(4):1231-1236.

[11] Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, et al. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion[J]. Cancer Res, 2004, 64(7): 241-2468.

[12] 苗瑞政, 吴泰璜, 刘乃青, 等. 乳腺癌手术前后血浆内皮素-1 的变化和临床意义[J]. 中国现代普外科进展, 2005, 8(6): 375-376.

[13] Alanen K, Deng DX, Chakrabarti S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma[J]. Histopathology, 2000, 36(2): 161-167.

[14] Naushad SM, Hussain T, Alattas OS, et al. Molecular in-
• 临床探讨 •

sights into the association of obesity with breast cancer risk: relevance to xenobiotic metabolism and CpG island methylation of tumor suppressor genes[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1/2): 273-280.

[15] Dadmehr M, Hosseini M, Hosseonkhani S, et al. DNA methylation detection by a novel fluorimetric nanobiosensor for early cancer diagnosis[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 15(60): 35-44.

[16] Mitaka C, Hirata Y, Ichikawa K, et al. Effects of TNF- α on hemodynamic changes and circulating EDNthelium-derived vasoactive factors in dogs[J]. Am J Physiol 1994, 267(4): 1530-1536.

(收稿日期: 2016-01-15 修回日期: 2016-03-28)

鱼腥草素钠联合聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜的作用^{*}

张家超, 查长森, 欧 翊
(广东省佛山市南海区第七人民医院 528247)

摘 要:目的 探讨鱼腥草素钠联合聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜的作用。方法 采用微量稀释法测定聚维酮碘、鱼腥草素钠及两药联用对铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度(MIC), 棋盘稀释法测定聚维酮碘、鱼腥草素钠及两药联用对铜绿假单胞菌生物被膜的最小抑膜浓度(SMIC)。结果 聚维酮碘对铜绿假单胞菌的 MIC 为 256 $\mu\text{g/mL}$, 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌的 MIC 为 512 $\mu\text{g/mL}$, 两药联合使用时, 聚维酮碘 MIC 为 64 $\mu\text{g/mL}$, 鱼腥草素钠 MIC 为 64 $\mu\text{g/mL}$; 分级抑菌浓度指数(FIC)为 0.285。在黏附期、早期生物膜期、成熟生物膜期(培养 1、3、7 d), 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜 SMIC₅₀ 为 128、128 和 56 $\mu\text{g/mL}$, SMIC₈₀ 分别为 512、512 和 512 $\mu\text{g/mL}$; 聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜 SMIC₅₀ 为 128、256 和 256 $\mu\text{g/mL}$, SMIC₈₀ 分别为 256、512 和 512 $\mu\text{g/mL}$, 两药联合使用时聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜 SMIC₅₀ 为 64、128 和 128 $\mu\text{g/mL}$, SMIC₈₀ 分别为 128、256 和 256 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 鱼腥草素钠对聚维酮碘的抑菌效果具有协同作用, 且能够增强聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制作用。

关键词:鱼腥草素钠; 聚维酮碘; 铜绿假单胞菌; 生物被膜

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.033 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)14-1993-03

1 材料与方法

1.1 材料来源

菌株: 铜绿假单胞菌(ATCC 27853)由本院细菌室提供。培养基: LB 细菌培养基(Sigma), 营养琼脂(北京陆桥技术公司)。药物: 鱼腥草素钠(中国药品生物制品鉴定所), 聚维酮碘消毒液(利尔康), 胰酶大豆肉汤, 米勒-海顿(MH)肉汤。硅胶片、96 孔板、24 孔板等。

1.2 方法

1.2.1 测定聚维酮碘、鱼腥草素钠对 PAE 的最小抑菌浓度(MIC)

将新鲜培养的 PAE 用胰酶大豆肉汤配制成 1.5×10^8 CFU 浓度菌液。聚维酮碘溶液和鱼腥草素钠分别用 MH 培养基对倍稀释成 10 个浓度梯度: 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 $\mu\text{g/mL}$, 分别加入 96 孔板中, 每个浓度 8 个复孔, 每孔的体积为 100 μL 。另设一列不含药物的培养基作为正常对照组, 菌液以比浊法调整到 0.5 麦氏浓度, 经 200 倍稀释后, 每孔加入 100 μL , 振荡, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后涂布血琼脂平板, 以无菌生长的最小稀释浓度为 MIC。

1.2.2 测定鱼腥草素钠、聚维酮碘溶液协同对 PAE 的 MIC

采用棋盘稀释法进行协同抗菌实验, 鱼腥草素钠、聚维酮碘溶

^{*} 基金项目: 广东省佛山市科学技术局文件(2014AB000482)。