

## 骨桥蛋白基因在两种颅咽管瘤中的表达差异及意义

刘健刚<sup>1,2)</sup>, 罗 林<sup>1)</sup>, 游 潮<sup>2)</sup>, 冯忠堂<sup>1)</sup>, 徐建国<sup>2)</sup>

(1) 昆明医学院第三附属医院神经外科, 云南昆明 650118; 2) 四川大学华西医院神经外科, 四川成都 610041)

**[摘要]** **目的** 研究骨桥蛋白基因 (OPN mRNA) 在两种不同病理类型颅咽管瘤的表达差异及意义. **方法** 收集 41 例经手术切除的颅咽管瘤标本, 采用 SYBR 荧光实时定量 PCR 法检测 OPN mRNA 在肿瘤组织的表达, 并对表达结果进行统计学分析. **结果** 造釉细胞型颅咽管瘤 OPN mRNA 表达量为  $(42.38 \pm 5.41) \times 10^3$  copies/ $\mu\text{g}$ , 鳞状乳头型颅咽管瘤 OPN mRNA 表达量为  $(1.26 \pm 0.14) \times 10^3$  copies/ $\mu\text{g}$ , 造釉细胞型颅咽管瘤 OPN mRNA 表达量显著性高于鳞状乳头型颅咽管瘤 ( $P < 0.01$ ). **结论** 两种病理类型颅咽管瘤 OPN mRNA 表达存在显著性差异, 此差异性可能与两种病理类型颅咽管瘤的预后和复发风险有关.

**[关键词]** 荧光定量 PCR; 颅咽管瘤; 骨桥蛋白

**[中图分类号]** R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0095-04

## Difference and Significance of OPN mRNA Expression in Two Types of Craniopharyngioma

LIU Jian-gang<sup>1,2)</sup>, LUO Lin<sup>1)</sup>, YOU Chao<sup>2)</sup>, FENG Zhong-tang<sup>1)</sup>, XU Jian-guo<sup>2)</sup>

(1) Department of Neurosurgery, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118; 2) Department of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[ Abstract ] Objective** To investigate the difference of OPN mRNA ( OPN mRNA) expression in two types of craniopharyngioma and explore the significance of this difference. **Methods** The expression of OPN mRNA in 41 craniopharyngiomas samples was examined using SYBR real-time PCR and the results were evaluated by statistical analysis. **Results** The level of OPN mRNA expression was  $(42.38 \pm 5.41) \times 10^3$  copies/ $\mu\text{g}$  and  $(1.26 \pm 0.14) \times 10^3$  copies/ $\mu\text{g}$  respectively in adamantine epithelioma and squamous papillary craniopharyngiomas. The OPN mRNA level in adamantine epithelioma craniopharyngiomas was significantly higher than that in squamous papillary tumors ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** There is significantly different OPN mRNA expression between two types of craniopharyngioma. This difference of OPN mRNA expression in craniopharyngioma may be related to the prognosis of tumor and thus may be useful in predicting the risk of tumor relapse.

**[Key words]** Real-time PCR; Craniopharyngioma; OPN

骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 是一种含有整合素结合序列的分泌型磷酸化糖蛋白, 在多种腔道上皮(如消化道粘膜)中有少量表达, 可参与细胞的信号转导、促进细胞粘附和迁移. 近年研究发

现 OPN 与肿瘤细胞生长、增殖和侵袭、转移密切相关<sup>[1]</sup>. 颅咽管瘤属良性肿瘤, 多数学者认为颅咽管瘤存在一定的侵袭性. 但对不同病理类型颅咽管瘤肿瘤侵袭性生长的研究, 国内少见报道. 本

**[作者简介]** 刘健刚 (1977~), 男, 吉林辽源县人, 在读博士, 主要从事颅内肿瘤基础与临床研究工作.

研究采用 SYBR 荧光实时定量 PCR 法检测 OPN mRNA 在颅咽管瘤组织的表达, 探讨两种病理类型颅咽管瘤表达的差异及意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

所有标本均取自华西医院 2005 年 11 月至 2007 年 4 月手术切除的颅咽管瘤患者, 共 41 例, 其中男 24 例, 女 17 例; 年龄 3 ~ 69 岁, 平均 24.3 岁; 经病理诊断造釉细胞型颅咽管瘤 24 例, 鳞状乳头型颅咽管瘤 17 例。将手术中切除的颅咽管瘤标本组织块放入液氮冷冻保存备用。

### 1.2 主要试剂

OPN 扩增引物和探针由武汉博士德公司合成; SYBR 荧光实时定量 PCR 试剂盒购于美国 ABI 公司。

### 1.3 实验方法

(1) OPN 扩增引物和探针: OPN 扩增引物 F 为 5' - AGTTCTGAGGAA AAGC AGCTT-3', R 为 5' -TTACTTGGAAAGGGTCTCTTGT-3'; 探针 5'- FAM- CCTGACCC ATCTCAGAAGCAGA-3'。

(2) RNA 的提取和鉴定: 肿瘤组织约 50 mg 置入 1.5 mL 匀浆管, 加 Trizol 裂解液 1 mL, 超声电动匀浆 1 min, 肉眼观察无组织块后置入 1 mL EP 管, 静置 5 min, 加入氯仿 0.2 mL, 盖紧盖子, 用力振荡 15 min, 室温静置 3 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 0.5 mL 至新的 EP 管中, 加异丙醇 0.5 mL 混匀, 室温静置 10 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 75% 乙醇 1 mL 洗涤, 常温干燥 5 min, 加 100  $\mu$ L DEPC 水溶解, -20 °C 保存备用。电泳检查: 每样品取 5  $\mu$ L 提取的 RNA 置 1% 的琼脂糖凝胶 (Sigma 公司) 上电泳, 泳毕, 溴化乙锭染色 20 min, 置紫外灯下观察; 浓度计算: 每样品在紫外分光光度计 (日本 SHIMADZU UV mini 1240) 上测定波长为 260 nm 时的吸光度值。浓度计算公式: 浓度 (g/L) = OD 260  $\times$  稀释倍数  $\times$  40/1 000。

(3) 逆转录反应: 取 2  $\mu$ L RNA 模板做逆转录反应。仪器为 iQ 5 TM 多色实时荧光 PCR 仪, 反应体系如下: 5  $\times$  逆转录 Buffer 2  $\mu$ L, 下游

引物 (25  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, MMLV (10 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, DEPC 水 3.5  $\mu$ L, RNA 模板 2  $\mu$ L 反应条件: 37 °C、1 h, 然后 95 °C、3 min。

(4) SYBR 荧光实时定量 PCR 测定: 按以下反应体系进行: 5  $\times$  SYBR Green 1 Buffer (美国 ABI 公司试剂盒) 10  $\mu$ L, 上游引物 F (25  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 下游引物 (25  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, Taq 酶 2  $\mu$ L, cDNA 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L。反应条件: 95 °C、2 min, 然后 95 °C、20 min, 55 °C 30 min, 72 °C 50 min, 共 40 个循环, 最后是 72 °C、5 min 延伸。荧光定量仪: iQ5TM 多色实时荧光 PCR 仪 (Bio Rad 公司, 美国)。反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果, 根据每个标本的 Ct 值计算 OPN mRNA 表达量。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析, 数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 对不同病理类型颅咽管瘤 OPN mRNA 行 *t* 检验分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OPN 测定的阳性标准品实时荧光扩增动力学曲线和实时荧光扩增回归曲线

由图 1 可见阳性标准品的实时荧光扩增动力学曲线平滑, 每条曲线均有明显的指数扩增期; 根据循环阈值 (Ct), 经对数拟合做图, 得到定量标准曲线, 起始模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系。由图 2 所得标准曲线回归系数为 0.993, 显示出极好的线性关系, 说明定量结果准确、可靠。

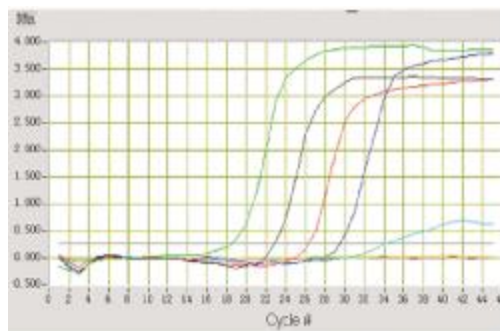


图 1 OPN 荧光实时定量阳性标准品扩增动力学曲线图  
Fig.1 SYBR amplifiable dynamic curve of OPN positive standard substance

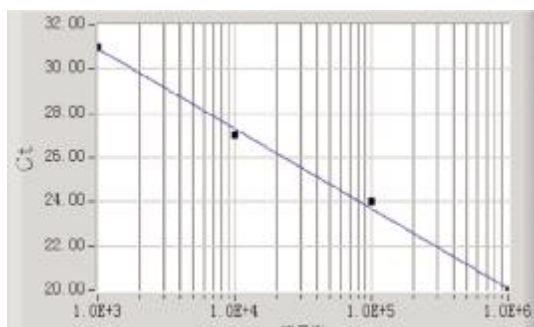


图 2 OPN 荧光实时定量阳性标准品扩增回归曲线图  
Fig.2 SYBR amplifiable regression curve of OPN positive standard substance

### 2.2 荧光实时定量 PCR 检测 OPN mRNA 表达量

41 例颅咽管瘤患者肿瘤标本 OPN 的荧光定量 PCR 动力学曲线分析显示: 造釉细胞型颅咽管瘤 OPN mRNA 表达量显著性高于鳞状乳头型颅咽管瘤 ( $P < 0.01$ ), 见图 3, 表 1.

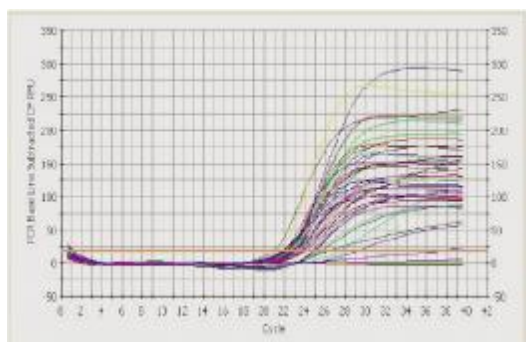


图 3 OPN 的荧光定量 PCR 动力学曲线  
Fig.3 SYBR amplifiable kinetics curve of OPN

表 1 OPN mRNA 颅咽管瘤各亚型中的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.1 Analysis on expression of OPN mRNA in subtypes of craniopharyngioma ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	OPNmRNA ( $\times 10^3$ copies/ $\mu$ g)
AE	24	42.38 $\pm$ 5.41 **
SP	17	1.26 $\pm$ 0.14

与 SP 比较, \*\* $P < 0.01$ ; AE: 造釉细胞型颅咽管瘤、SP: 鳞状乳头型颅咽管瘤。

### 3 讨论

人类骨桥蛋白基因定位于 4q13 上, 由 7 个外显子和 6 个内含子组成, 由于其启动子可受到许多调节因子的影响, 在体内主要以磷酸化和非磷酸化两种形式存在, OPN 的转录也受到许多因素的影响<sup>[2]</sup>. OPN 基因所编码的蛋白质含精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸序列 (Arg-Gly-Asp, RGD), 人体内存在着 RGD 序列依赖性和非依赖性两种作用方式<sup>[3]</sup>. OPN 具有多种生物学活性, 包括通过内部 RGD 序列促进细胞的趋化、粘附、迁移和增殖, 参与多种信号转导途径以及调节炎症过程等. 近来的研究表明, 骨桥蛋白的表达与肿瘤的生长、浸润及远处转移有关<sup>[4]</sup>. Saitoh 等<sup>[5]</sup>研究了骨桥蛋白在人脑神经胶质细胞瘤中的表达, OPN mRNA 的表达随着细胞组织学分级的增高而增强, III、IV 级神经胶质细胞瘤较 I、II 级神经胶质细胞瘤骨桥蛋白及其 mRNA 的表达均增加, 表明骨桥蛋白在神经胶质细胞瘤中的表达反映了肿瘤的恶性程度和临床分期, 肿瘤细胞所产生的 OPN mRNA 的确翻译成了骨桥蛋白, 发挥了作用. 体外实验研究发现, 许多人类癌细胞株和癌组织中均有骨桥蛋白高表达, 随着癌细胞株侵袭能力的增强, 细胞中骨桥蛋白 mRNA 的表达量也相应增加<sup>[6]</sup>, 证实 OPN 的表达水平与肿瘤侵袭转移的恶性表型有关. 本研究发现, 颅咽管瘤标本均有 OPN mRNA 表达, 但经统计学分析, 造釉细胞型颅咽管瘤 OPN mRNA 表达量显著高于鳞状乳头型颅咽管瘤 ( $P < 0.01$ ). 多数临床研究认为造釉细胞型颅咽管瘤和鳞状乳头型颅咽管瘤预后存在较大差异, 前者预后较差, 术后复发率较高, 本研究提示 OPN 在两种病理类型颅咽管瘤表达差异对判断其预后及复发风险有一定意义.

### [参考文献]

[1] WAI P Y, KUO P C. The role of osteopontin in tumor metastasis [J]. J Surg Res, 2004, 121 (2): 228-241

[2] KAZANECKI C C, UZWIAK D J, DENHARDT D T. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding [J]. J Cell Biochem, 2007, 102 (4): 912-924

[3] LEALID, MORONIE, BUSSOLINOF, et al. Osteo

- pontin overexpression inhibits in vitro re-endothelialization via integrin engagement [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (27): 19676-84
- [4] SUZUKI M, MOSE E, GALLOY C, et al. Osteopontin gene expression determines spontaneous metastatic performance of orthotopic human breast cancer xenografts [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171 (2): 682-92
- [5] SAITOH Y, KURATSU J I, TAKESHIMA H, et al. Expression of osteopontin in human glioma—its correlation with the malignancy [J]. *Lab Invest*, 2005, 72: 55-63
- [6] TAKAFUJIV, FORGUES M, UNSWORTH E, et al. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (44): 6361-6371  
(2007-11-11 收稿)

---

(上接第 61 页)

- [7] ZHANG Y W, DENHAM J, THIES R S. Oligodendrocyte progenitor cells derived from human embryonic stem cells express neurotrophic factors [J]. *Stem Cells Dev*, 2006, 15 (6): 943-952
- [8] YAN Q, ROSENFELD R D, MATHESON C R, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system [J]. *Neurosci*, 1997, 78 (2): 431-448
- [9] NGB K, CHEN L, MANDEMAKERS W, et al. Anterograde transport and secretion of brain-derived neurotrophic factor along sensory axons promote Schwann cell myelination [J]. *J Neurosci*, 2007, 27 (28): 7597-7603
- [10] VONBARTHELD C S. Neurotrophins in the developing and regenerating visual system [J]. *Histol Histopathol*, 1998, 13 (2): 437-459
- [11] TOBIAS C A, SHUMSKY J S, SHIBATA M, et al. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration [J]. *Exp Neurol*, 2003, 184 (1): 97-113
- [12] CUPPINI R, SARTINI S, AGOSTINI D, et al. BDNF expression in rat skeletal muscle after acute or repeated exercise [J]. *Arch Ital Biol*, 2007, 145 (2): 99-110  
(2007-09-18 收稿)