

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00416

• 研究快报 •

骨肉瘤乳腺癌特异基因、Bcl-2 及相关转录因子、雌激素受体 mRNA 的表达

雷 鸣¹, 缪明永², 徐卫东^{1*}

1. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

2. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨骨肉瘤乳腺癌特异基因 1(breast carcinoma specific gene 1, BCSG1)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关转录因子(Bcl-2-associated transcription factor, BTF)和雌激素受体(estrogen receptor, ER)基因表达水平及意义。**方法:**用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测 16 例低(未)分化骨肉瘤标本及成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株 BCSG1、BTF、Bcl-2、ER α 、ER β mRNA 的表达,分析各指标间的相关性。**结果:**骨肉瘤组织中 BCSG1、Bcl-2、ER α 、ER β 的表达明显高于成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株($P < 0.01$),BTF 表达两组无统计学差异;骨肉瘤组织 ER α /ER β 显著高于成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株($P < 0.01$);肿瘤瘤体大小、患者性别对 BCSG1、Bcl-2、BTF、ER α 、ER β 的表达未见显著影响;骨肉瘤组织中 BCSG1 与 ER α ($r = 0.696, P < 0.01$)、ER β 与 Bcl-2($r = 0.875, P < 0.01$)、ER α /ER β 与 Bcl-2 基因表达水平($r = -0.649, P < 0.01$)分别存在线性关系。**结论:**骨肉瘤组织中可能存在 BCSG1 增强 ER α 基因转录激活的作用,ER β 可能影响 Bcl-2 的表达。

[关键词] 乳腺癌特异基因; Bcl-2; 雌激素受体; 转录因子; 骨肉瘤

[中图分类号] R 738.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)04-0416-04

mRNA expression of BCSG1, BTF, Bcl-2, ER α and ER β in osteosarcoma and its significance

LEI Ming¹, MIAO Ming-yong², XU Wei-dong^{1*}

1. Department of Orthopedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Biochemistry & Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the mRNA expression of BCSG1(breast carcinoma specific gene, BCSG1), BTF(Bcl-2-associated transcription factor, BTF), Bcl-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) and two subtypes of estrogen receptors in osteosarcoma and their implication. **Methods:** The expression of BCSG1, ER α , BTF, ER β , and Bcl-2 mRNA were examined in 16 poorly differentiated osteosarcoma samples and a cell line hFOB 1.19 by quantitative RT-PCR. The relationship between their expression was analyzed. **Results:** The mRNA expression of BCSG1, Bcl-2 and two subtypes of estrogen receptors in the osteosarcoma tissues was significantly higher than that in the osteoblast cell line of hFOB 1.19; the expression of BTF was not significantly different. ER α /ER β in the osteosarcoma tissues was significantly higher than that in the hFOB 1.19 cells ($P < 0.01$). BCSG1, ER α , ER β , Bcl-2 and BTF expression was not associated with the tumor size or patients gender. Correlation analysis showed there was a linear relationship between expression of BCSG1 and ER α , ER β and Bcl-2, and ER α /ER β ratio and Bcl-2. **Conclusion:** BCSG1 may enhance the activation of estrogen receptor- α gene transcription, and ER β may influence the expression of Bcl-2 in osteosarcoma.

[KEY WORDS] breast carcinoma specific gene; Bcl-2; estrogen receptor; transcription factors; osteosarcoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4):416-419]

骨肉瘤(osteosarcoma)是最常见、高度恶性的骨肿瘤,起源于间叶组织的肉瘤性骨母细胞(即肉瘤性成骨细胞),与其增殖、凋亡、浸润行为相关的基因是

目前研究的焦点。骨肉瘤是激素相关性肿瘤。乳腺癌特异基因(breast carcinoma specific gene, BCSG1)在很多不同的激素相关性肿瘤组织(包括骨

[收稿日期] 2008-08-03

[接受日期] 2009-02-24

[基金项目] 上海市基础研究重点项目(04JC14028). Supported by the Major Project of Shanghai Basic Research Foundation(04JC14028).

[作者简介] 雷 鸣, 硕士生. E-mail: rafsam@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873393, E-mail: xuwdshanghai@126.com

肉瘤)中有异常高的表达率^[1-2],推测 BCSG1 可能与骨肉瘤的局部侵袭和转移密切相关。雌激素受体在造骨细胞有表达,其异常表达与肿瘤的低年龄高发病率有关。Martin 等^[3]研究发现 BCSG1 高表达与雌激素受体(estrogen receptor, ER) β 亚型相关。B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)是凋亡抑制因子, Bcl-2 相关转录因子(Bcl-2-associated transcription factor, BTF)是促凋亡因子,与 Bcl-2 相互作用,调控细胞凋亡^[4]。在骨肿瘤中,仅骨肉瘤和软骨肉瘤出现 Bcl-2 表达,且其表达与骨肉瘤的预后密切相关^[4],抑制 Bcl-2 的表达可以抑制肿瘤细胞生长。

为进一步探讨骨肉瘤中上述基因的表达及意义,本研究应用实时荧光定量 RT-PCR 技术对 16 例典型低(未)分化成骨肉瘤标本进行研究,为避免不同来源组织细胞 mRNA 的干扰,特选取正常人成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株作为对照,初步分析上述基因的表达及意义。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器 DEPC 购自 Sigma 公司, RT 试剂盒、引物、荧光定量 PCR 试剂盒、SYBR Green I 购自上海 ShineGene 公司, FTC-2000 型荧光定量 PCR 仪, 购自加拿大 Funglyn Biotech 公司。

1.2 细胞培养 成骨细胞系 hFOB 1.19 购自中国科学院上海细胞库, 用 DMEM 培养液(2.5 mmol/L L-谷氨酰胺, 15 mmol/L HEPES, 0.5 mmol/L 丙酮酸和 1.2 mg/L 碳酸钠的 DMEM 与 F12 培养基 1:1 混合, 90%; 0.3 mg/ml G418; 胎牛血清 10%) 于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 条件下培养, 细胞大致按 1.2×10⁴/cm² 密度接种, 隔日换液。分别取第 1、3、7 天、第 2、4、8 周传代培养的细胞标本。

1.3 标本获取 16 例(成)骨肉瘤标本(临床无明确转移)来自第二军医大学长海医院骨科骨肉瘤患者手术切除病理标本, 病理类型为低(未)分化成骨肉瘤; 年龄 12~20 岁; 7 例女性、9 例男性; 5 例瘤体直径 ≥5 cm, 11 例 <5 cm。标本切取后 -80℃ 冷藏。

1.4 Real-time PCR 检测 5 种骨肉瘤相关基因的表达

1.4.1 组织及细胞总 RNA 抽提 用 TRIzol 分别进行消化、裂解标本组织和培养细胞(6 孔板细胞每孔加 TRIzol 试剂 1 ml, 摇匀, 消化 5 min), 用 DEPC 处理 H₂O 溶解 RNA。上述处理好的 RNA 70℃ 预变性 5 min, 迅速置于冰浴以防 RNA 复性。用微量

加样器加入反应液、预变性的 RNA, 25℃ 10 min 40℃ 60 min, 70℃ 10 min。

1.4.2 引物设计及 PCR 反应 引物应用 Primer 5.0 设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列见表 1。合成引物后将引物用双蒸水溶解, 然后取 PCR buffer、SYBR Green I、上下游引物、水, 加入上述反应好的 cDNA, 然后放置在荧光定量 PCR 仪上做反应, 程序如下: 94℃ 4 min; 94℃ 20 s; 60℃ 25 s; 72℃ 30 s, 循环 35 次, 72℃ 检测信号。制作标准曲线, 得到各检测标本待测基因的相对表达数。

表 1 引物序列及扩增片段长度

Tab 1 Primer sequences and sequence length

Gene	Primer sequence(5'-3')	Length (bp)
BTF		
F	TGA TGC TCC CAT GCT CAG TAC	106
R	TCC AAC AGA ACC AGA CCC AGA	
ER α		
F	CCA CTC AAC AGC GTG TCT CC	115
R	TGG GCT CGT TCT CCA GGT AA	
BCSG1		
F	GTG ACC TCA GTG GCC GAG AA	188
R	TCT TTG GAT GCC TCA CCC TC	
Bcl-2		
F	TTT GAG TTC GGT GGG GTC ATC	192
R	CCA GGA GAA ATC AAA CAG AGG	
ER β		
F	CAA CAC CTG GGC ACC TTT C	199
R	TGA GCA TCC CTC TTT GAA CC	
β -actin		
F	TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG	205
R	CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG	

1.5 统计学处理 应用统计学软件 SPSS 13.0 进行数据分析, 组间检验采用 Student's *t* 检验; 回归分析采用 *F* 检验; 相关性分析采用 Excel 2007 数据处理软件进行分析。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织及细胞中各基因的表达 结果(图 1)表明: 骨肉瘤组织($n=16$)中 BCSG1、ER α 、ER β 、Bcl-2 的表达明显高于成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株($n=6$; $P<0.01$), BTF 表达两组无统计学差异。

2.2 骨肉瘤组织各基因表达与瘤体大小及患者性别的相关性 结果(表 2)表明: 不同肿瘤瘤体 BCSG1、ER α 、ER β 、Bcl-2、BTF 的表达无统计学差异; 男、女性肿瘤患者 BCSG1、ER α 、ER β 、Bcl-2 和 BTF 的表达亦无统计学差异。

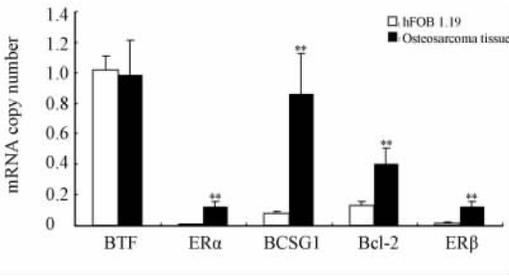


图1 骨肉瘤组织及细胞中各基因的表达差异
Fig 1 Differences in gene expression between osteosarcoma tissues and hFOB 1.19 cells

* * $P < 0.01$ vs hFOB 1.19; $n = 16$ (osteosarcoma tissue), $n = 6$ (hFOB 1.19), $\bar{x} \pm s$

表2 肿瘤瘤体大小、性别差异对的骨肉瘤组织基因表达的影响

Tab 2 Influence of tumor size and sexes on gene expression in osteosarcoma tissues

Index	N	BTF	ERα	BCSG1	Bcl-2	ERβ
($\bar{x} \pm s$)						
Tumor size						
≥5 cm	5	1.248 ± 0.318	0.146 ± 0.073	1.174 ± 0.589	0.410 ± 0.212	0.123 ± 0.051
<5 cm	11	0.869 ± 0.339	0.113 ± 0.029	0.719 ± 0.256	0.393 ± 0.164	0.123 ± 0.053
Sex						
Female	7	1.083 ± 0.269	0.116 ± 0.027	0.814 ± 0.205	0.491 ± 0.091	0.141 ± 0.042
Male	9	0.914 ± 0.400	0.129 ± 0.057	0.898 ± 0.541	0.326 ± 0.217	0.109 ± 0.064

BTF; Bcl-2-associated transcription factor; ER; Estrogen receptor; BCSG1; Breast carcinoma specific gene

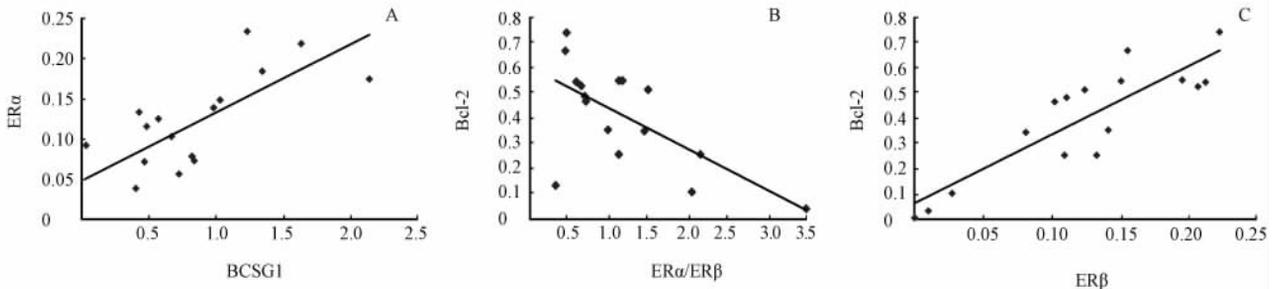


图2 骨肉瘤组织各基因表达的相关性分析

Fig 2 Correlation analysis of expression of different genes in osteosarcoma tissue

A: Linear relationship between BCSG1 and ERα; B: Linear relationship between ERα/ERβ and Bcl-2; C: Linear relationship between ERβ and Bcl-2

3 讨论

BCSG1在很多激素相关性肿瘤组织(包括乳腺癌、骨肉瘤等)中有异常高的发现率,其高表达与肿瘤分级相关,可作为乳腺癌预后标志物及其免疫治疗潜在的靶标^[5-6]。在先前的实验中我们应用免疫组织化学方法在蛋白水平证明了BCSG1与骨肉瘤相关;在本次实验中,我们从mRNA水平也证明了BCSG1与骨肉瘤的高度相关性;16例骨肉瘤标本中BCSG1表达明显高于成骨细胞系hFOB 1.19细胞株,而且患者性别和瘤体体积大小对其无明确影响。

2.3 骨肉瘤组织各基因表达的相关性分析 骨肉瘤组织BCSG1与ERα在mRNA水平的表达存在线性关系($r = 0.696, P < 0.01$),线性方程为: $y = 6.43x + 0.0652$ (图2A)。骨肉瘤组织ERα/ERβ值显著高于成骨细胞系hFOB 1.19细胞株(1.177 ± 0.581 vs $0.405 \pm 0.227, P < 0.01$);骨肉瘤组织ERα/ERβ值与Bcl-2表达存在线性关系($r = -0.649, P < 0.01$),线性方程为: $y = -0.1645x + 0.5998$ (图2B)。ERβ与Bcl-2在mRNA水平的表达存在线性关系($r = 0.875, P < 0.01$),线性方程为: $y = 0.2753x + 0.0138$ (图2C)。

基于在细胞分子水平及蛋白水平实验已取得了的相应进展,可以推测BCSG1在骨肉瘤的浸润、转移及耐药性等生物学行为上可能起着重要的作用。雌激素在激素敏感器官的肿瘤发展过程中起重要作用。ERα的异常表达与乳腺癌细胞的增殖有关,雌二醇可以通过ERα促进恶性肿瘤的浸润。在本实验中,16例标本ERα和ERβ表达均明显高于成骨细胞系hFOB 1.19细胞株,推测骨肉瘤的发生与发展与雌激素及ER亚型密切相关。

BCSG1可能通过HSP依赖信号通路激活ERα转录活性。由于本实验发现BCSG1与ERα在

mRNA水平的表达存在线性关系,而 ER α 在肿瘤浸润、转移及耐药性等生物学行为上起着至关重要的作用,可以认为在骨肉瘤中也存在 BCSG1 增强 ER α 基因转录激活作用的分子机制,并通过该途径对骨肉瘤的局部侵袭和转移产生影响,但尚不能证明在骨肉瘤中是否存在 BCSG1 刺激增强 ER α 信号的机制。也未发现 BCSG1 在 mRNA 水平的表达与 ER β 的相关性。

BTF 是促凋亡因子,与 Bcl-2 相关蛋白相互作用,其高表达促进凋亡。雌激素能在 ER α 存在的条件下刺激增强 BTF 的转录^[7-8],但确切机制仍不清楚。本实验中,ER α 表达明显高出成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株,BTF 表达却未见显著差异,据此推测,BTF 可能也是骨肉瘤细胞的凋亡负调控因子,对骨肉瘤细胞凋亡产生影响。由于 ER α 的表达几乎不与影响细胞凋亡的基因相关联,骨肉瘤的细胞凋亡机制很可能与 ER α 并不直接相关。在影响细胞凋亡的基因中,起着抑制细胞凋亡作用的 Bcl-2 占据着核心地位,不同组织中 Bcl-2 的表达水平不同。本次实验骨肉瘤标本 Bcl-2 表达明显高于成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株,联系前期蛋白水平研究的成果^[4],机体可能是通过调控 Bcl-2 的表达从而影响骨肉瘤细胞凋亡的。

Abdel-Fatah 等^[9]发现在肿瘤形成中 ER α /ER β 值和 Bcl-2 一样都是增高的,并认为在影响 Bcl-2 的表达上,ER α 与 ER β 的表达平衡可能很重要。Zeng 等^[10]亦认为 ER α 与 ER β 的表达失衡可能有助于肿瘤形成。本实验发现:虽然骨肉瘤标本 ER α 、ER β 的表达及其 ER α /ER β 值以及 Bcl-2 表达值均显著高于成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株,但 ER α /ER β 值与 Bcl-2 表达值却存在负线性相关;而乳腺癌标本中 ER β 和 Bcl-2 蛋白表达水平为正相关。本实验还发现:ER β 与 Bcl-2 在 mRNA 水平的表达存在线性相关,因而可以推测在骨肉瘤中,虽然 ER α 与 ER β 的表达值及其比值均显著增高,但仍然可能是 ER β 而非 ER α 在影响 Bcl-2 的表达。

总而言之,通过本实验我们发现在低(未)分化成骨肉瘤标本中,BCSG1、ER α 、BTF、ER β 、Bcl-2 在 mRNA 水平的表达与它们在蛋白水平的表达是一致的;BCSG1 与 ER α 、ER β 与 Bcl-2、ER α /ER β 与 Bcl-2 在 mRNA 水平的表达上分别存在线性关系;同时发现 BCSG1、ER α 、ER β 和 Bcl-2 的 mRNA 表达水平及 ER α /ER β 值均明显高于作为参照的成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株;性别和瘤体体积大小对

它们的表达无明确影响;而骨肉瘤组织 BTF 的表达则与成骨细胞系 hFOB 1.19 细胞株无明显差异。这些研究结果对骨肉瘤的生物学行为机制的研究可能具有一定的帮助,并可能对骨肉瘤的诊断、治疗及预后具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Liu H, Liu W, Wu Y, Zhou Y, Xue R, Luo C, et al. Loss of epigenetic control of synuclein-gamma gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:7635-7643.
- [2] 徐卫东,殷 辉,赵建国,焦 钢,王晓燕.原发性骨肉瘤中 γ -synuclein 的表达[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28:432-435. Xu W D, Yin H, Zhao J G, Jiao G, Wang X Y. Expression of γ -synuclein in primary osteosarcoma[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28:432-435.
- [3] Martin T A, Gomez K, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel R E, Jiang W G. Expression of breast cancer specific gene-1 (BCSG-1/gamma-synuclein) is associated with tumour grade but not with clinical outcome of patients with breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2006, 16: 207-212.
- [4] Kaseta M K, Khaldi L, Gomatos I P, Tzagarakis G P, Alevizos L, Leandros E, et al. Prognostic value of bax, bcl-2, and p53 staining in primary osteosarcoma[J]. *J Surg Oncol*, 2008, 97: 259-266.
- [5] Wu K, Quan Z, Weng Z, Li F, Zhang Y, Yao X, et al. Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 101: 259-267.
- [6] Guo J, Shou C, Meng L, Jiang B, Dong B, Yao L, et al. Neuronal protein synuclein gamma predicts poor clinical outcome in breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121:1296-1305.
- [7] Liu H, Lu Z G, Miki Y, Yoshida K. Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27:8480-8491.
- [8] Bianchini M, Martinelli G, Renzulli M, Gonzalez Cid M, Larripa I. cDNA microarray study to identify expression changes relevant for apoptosis in K562 cells co-treated with amifostine and imatinib[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007, 59:349-360.
- [9] Abdel-Fatah T M, Powe D G, Hodi Z, Reis-Filho J S, Lee A H, Ellis I O. Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family [J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32:513-523.
- [10] Zeng Q, Chen G G, Vlantis A C, van Hasselt C A. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells *via* an oestrogen receptor-ERK pathway [J]. *Cell Prolif*, 2007, 40: 921-935.