

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00513

人源幼虫巨大致死性基因 Hugl-1 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义

张 艳*, 满晓波, 白辰光, 惠 宁

第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨人源幼虫巨大致死性基因 Hugl-1 在卵巢癌中的表达及其临床意义。**方法** 利用实时荧光定量 RT-PCR 和原位杂交技术检测 31 例卵巢癌组织及其相应的癌旁组织中 Hugl-1 mRNA 的表达量,并结合卵巢癌的临床病理特点进行分析。**结果** Hugl-1 mRNA 在卵巢癌组织中的表达量高于癌旁卵巢组织 $[(0.051 \pm 0.029) \text{ vs } (0.026 \pm 0.043), P < 0.01]$ 。Hugl-1 mRNA 的表达量与卵巢癌患者的年龄、血清 CA125、肿瘤病理特征及临床分期无关。**结论** Hugl-1 在卵巢癌的发生发展中起着一定作用。

[关键词] 卵巢肿瘤; 人源幼虫巨大致死基因; 基因表达; 原位杂交

[中图分类号] R 737.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0513-03

Expression of human giant larvae-1 in ovarian cancer and its clinical significance

ZHANG Yan*, MAN Xiao-bo, BAI Chen-guang, HUI Ning

Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of human giant larvae-1 (Hugl-1) in ovarian carcinoma and its clinical significance. **Methods** Hugl-1 mRNA expression in 31 ovarian cancer and the corresponding adjacent tissues was examined by real-time fluorescence quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization. Moreover, analysis was done while taking into consideration of the clinicopathologic parameters of ovarian cancer. **Results** The expression of Hugl-1 mRNA in ovarian cancer tissue was significantly higher than that in the corresponding adjacent tissues $[(0.051 \pm 0.029) \text{ vs } [0.026 \pm 0.043], P < 0.01]$; and the expression was not related to patient age, serum CA125 status, pathological characteristics or clinical stages of tumors. **Conclusion** Hugl-1 may play a role in the development and progression of ovarian cancer.

[Key words] ovarian neoplasms; Hugl-1; gene expression; *in situ* hybridization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5): 513-515]

世界卫生组织(WHO)2009年的统计资料显示,卵巢癌发病率和病死率在女性生殖道恶性肿瘤中已经超过宫颈癌而居第1位。由于大部分的卵巢癌在早期都没有明确的症状,也无成熟的早期诊断方法且病程发展较为迅速,发现时70%~80%的患者通常都已经播散而进入晚期,治疗极其困难。确定卵巢癌相关基因及其参与卵巢癌转移的发病机制,有利于为卵巢癌个体化和预见性治疗提供基础,也为新的治疗方案提供靶点^[1]。果蝇幼虫巨大致死基因(lethal giant larvae, lgl)已被证实是抑癌基因。Hugl-1 是人的 lgl 同源基因,位于人的 17 号染色体近着丝粒区(17p11.2-12),近来研究显示这一区域可能存在与神经外胚层肿瘤相关的基因^[2]。目前国内外关于 Hugl-1 在人类肿瘤中的研究不多,特别在人卵巢癌中的研究尚未见报道。本研究采用实时荧光定量 RT-PCR 和原位杂

交技术分析其在人卵巢癌中的表达及临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 卵巢癌组织和相应的癌旁组织(距离肿瘤边缘 2 cm 处取材)各 31 例,均取自长海医院 2006 年 1 月至 2007 年 10 月间手术切除的标本。所有标本均在手术断血后 30 min 内置液氮保存。患者年龄 18~76 岁,中位年龄 55 岁。卵巢上皮性肿瘤 29 例(浆液性囊腺癌 18 例、黏液性囊腺癌 7 例、透明细胞腺癌 2 例、子宫内膜样癌 2 例),生殖细胞肿瘤 2 例(均为无性细胞瘤)。按 FIGO 2000 年制定的分期标准,Ⅰ期 6 例,Ⅱ期 4 例,Ⅲ期 15 例,Ⅳ期 6 例。患者术前均未行化疗,术前均抽取静脉血用电化学发光法检测 CA125 水平。

1.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测 Hugl-1 mRNA 的表达

[收稿日期] 2009-09-27 **[接受日期]** 2010-04-04

[作者简介] 张 艳, 硕士, 讲师、主治医师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873596, E-mail: zhangyan1126@gmail.com

1.2.1 总 RNA 的抽提 100 mg 组织加 1 ml TRIzol (Stratagene 公司)匀浆,加入 0.2 ml 氯仿,离心后取上清,加 0.5 ml 异丙醇,−20℃ 放置 1 h 以上,500 μl 75%乙醇洗沉淀,即得 RNA。将所得 RNA 融于焦碳酸二乙酯(DEPC)水中。甲醛变性凝胶检测 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。

1.2.2 RT-PCR 反应 使用反转录试剂盒(Stratagene 公司)制备 cDNA。PCR 试剂盒购自晶美生物工程有限公司,引物由上海申友生物技术有限责任公司合成,序列如下:Hugl-1-F 5'-TCT CTG GAC ATT AAC TGG CC-3',Hugl-1-R 5'-CAC CCA AGC TGA GCC AGG C-3',扩增片段 167 bp;β-actin-F 5'-GCC AAC ACA GTG CTG TCT G-3',β-actin-R 5'-CAC ATC TGC TGG AAG GTG G-3',扩增片段 185 bp。反应体系为 50 μl;10×PCR 缓冲液 5 μl,25 mmol/L MgCl₂ 5 μl,5 μmol/L 5'和 3'引物各 1 μl,5 μmol/L Taq Man 探针 1 μl,10 mmol/L dNTP Mixture 1 μl,模板 2 μl,Taq 酶 1 μl,去离子水 33 μl。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 采用 Bio-Rad iCycler iQ 荧光定量 RCR 仪,荧光探针由上海中科开瑞生物技术有限公司合成,序列如下:Hugl-1-TM 5'-GCT CCG GGG TGT CAG GTC-3',β-actin-TM 5'-FAM Agg AgC AAT gAT CTT gAT CTT CA-3'。PCR 反应条件:95℃ 5 min,95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 50 个循环。反应完成后进行数据分析,每例组织中 Hugl-1 和 β-actin 的初始模板量的比值(2^{ΔCt})代表原始模板中 Hugl-1 mRNA 表达水平。

1.3 卵巢癌组织 Hugl-1 的原位杂交

1.3.1 体外转录地高辛标记的 RNA 探针 采用 EcoR I 和 Hind III 分别酶切载体 pCDNA3-LGL(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所陈正军博士惠赠)作为制备反义和正义 RNA 探针的模板。体外转录体系:10× 转录缓冲液,100 mmol/L DTT,RNase A 1 U,rNTP (含地高辛标记的 CTP),线性化 DNA 模板,T7/SP6 RNA 聚合酶 1 U。混匀后,40℃ 温育 2 h,加 2 μl 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和 50 μl 无水乙醇,混匀后−20℃ 过夜,12 000×g 离心 15 min,75%乙醇洗后干燥,溶于 20 μl 无 RNase 的水中−20℃ 保存。

1.3.2 组织原位杂交 按常规方法石蜡包埋、制备切片(所有载玻片经涂赖氨酸处理)。切片经二甲苯脱腊,梯度乙醇复水。3 μg/ml 的蛋白酶 K 37℃ 处理前后分别用 PFA 固定,预杂交前 0.25% 乙酸酐常温处理 10 min 以降低非特异性。50℃ 预杂交 1~4 h 后,杂交过夜,杂交液中探针浓度为 0.5 μg/ml。

4×SSC 浸泡洗片 15 min×4 次,RNase A(20 μg/ml) 37℃ 消化处理 1 h,再分别用 2×SSC,0.1×SSC 洗 1 h。0.5% 的封闭液封闭 1 h,加碱性磷酸酯酶(AP)标记的抗地高辛抗体(武汉博士德生物工程有限公司),37℃ 温育 1 h。加入显影剂(BCIP/NBT),观察显影程度,适时终止显影。封片观察实验结果。

1.4 统计学处理 利用 SPSS 12.0 软件对 Hugl-1 mRNA 在卵巢癌组织和相应癌旁组织中的表达情况以及其在卵巢癌相关临床特征中的表达情况采用 *t* 检验或方差分析,Hugl-1 表达和 CA125 水平的关系采用相关性分析。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织与癌旁组织的 Hugl-1 mRNA 表达量分析 31 对标本中,卵巢癌组织与癌旁组织比较有 24 例(77.42%)Hugl-1 mRNA 表达上调,4 例(12.90%)与癌旁组织表达相当,3 例(9.68%)表达下调。Hugl-1 mRNA 在卵巢癌组织中的表达量(0.051±0.029)高于癌旁组织(0.026±0.043,*P*<0.01)。

2.2 Hugl-1 mRNA 表达与卵巢癌临床病理特征及 CA125 水平的关系 Hugl-1 mRNA 的表达在不同年龄、肿瘤大小、临床分期、分化程度中的表达量差异无统计学意义(表 1)。对 Hugl-1 在卵巢癌中的表达与血 CA125 水平进行相关性分析显示两者无相关性(*P*>0.05)。

表 1 Hugl-1 mRNA 的表达与卵巢癌相关临床特征的关系
Tab 1 Relationship between expression of Hugl-1 mRNA and clinical features of ovarian cancer patients

Clinical feature	<i>n</i>	Hugl-1 mRNA ($\bar{x}\pm s$)	Statistical method	<i>P</i> value
Age(year)				
≤40	7	0.054±0.034	Analysis of variance	0.478
41-50	4	0.055±0.029		
51-60	13	0.047±0.060		
≥61	7	0.021±0.014		
Tumor size d/cm				
≤15	18	0.042±0.023	<i>t</i> test	0.716
>16	13	0.063±0.029		
Clinical stage				
I-II	10	0.049±0.032	<i>t</i> test	0.143
III-IV	21	0.053±0.025		
Pathological differentiation				
Well	8	0.074±0.035	Analysis of variance	0.270
Moderate	11	0.053±0.059		
Poor	12	0.046±0.039		

2.3 卵巢癌组织 Hugl-1 原位杂交结果 结果(图 1)显示,杂交信号集中于卵巢癌细胞质和细胞膜中,癌

旁组织基本无信号,说明卵巢癌组织 Hugl-1 mRNA 转录水平明显上调,表达量明显高于癌旁组织。

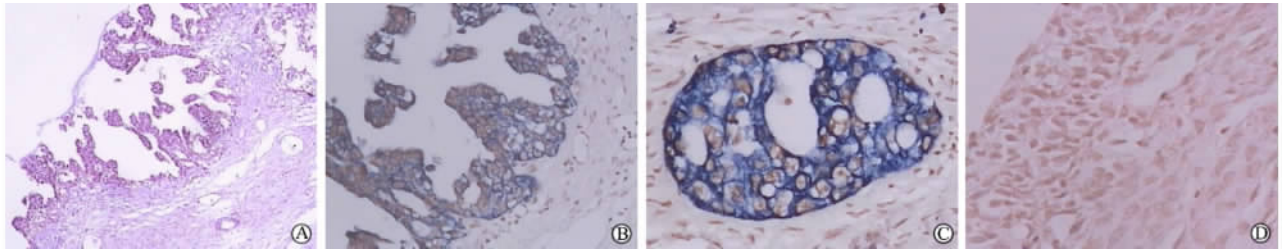


图 1 卵巢癌组织 Hugl-1 原位杂交结果

Fig 1 *In situ* hybridization for Hugl-1 in ovarian cancer

A: Ovarian serous and mucinous cancer (H-E staining); B,C: Probe sp6 *in situ* hybridization in ovarian cancer; D: Probe sp6 *in situ* hybridization in adjacent tissue. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

关于 Hugl-1 在卵巢癌组织中的表达情况,国内外目前尚未见报道。为探讨 Hugl-1 与卵巢癌发生发展的关系,本实验采用实时荧光定量 RT-PCR 的方法对 31 例卵巢癌标本及其癌旁组织中 Hugl-1 mRNA 的表达作了研究,结果表明 Hugl-1 mRNA 在卵巢癌中的表达高于癌旁组织 $[(0.051 \pm 0.029) \text{ vs } (0.026 \pm 0.043), P < 0.01]$ 。同时原位杂交结果亦从组织形态学上证明了 Hugl-1 基因在卵巢癌细胞中的 mRNA 表达水平上调,支持了定量 PCR 分析结果。这说明了 Hugl-1 在卵巢癌的发生中可能起着重要的调控作用。在对 Hugl-1 mRNA 与卵巢癌病例的临床相关特征进行分析后发现其与患者的年龄、肿瘤大小、临床分期、分化程度无关,与 CA125 无明显相关性。因本实验采用的是癌组织和癌旁组织直接配对比较,虽然病例数较少,但无论其表达是上调还是下调都具有客观准确性,因此实验结果更有意义。

目前已有报道显示 Hugl-1 在 75% 的结直肠癌、63% 的肺癌,76% 的乳腺癌,53% 的前列腺癌及 40% 的黑素瘤中表达下降或不表达^[3-5],尤其 Schimanski 等^[4]报道在结肠癌和黑素瘤中 Hugl-1 的表达缺失与肿瘤的分期、转移密切相关。因此传统意义上讲 Hugl-1 是抑癌基因,它在肿瘤中的表达一般是缺失或下降,而我们的实验结果恰恰相反,这是否预示着 Hugl-1 在卵巢癌中发生了突变,突变蛋白失去了抑癌的效能,导致上皮细胞极性紊乱、诱导这些细胞过度增殖,从而显现恶性肿瘤的特征呢?但目前并没有 Hugl-1 发生肿瘤特异性突变(基因突变导致许多抑癌基因特异性异常表达是在癌症发生发展中的重要作用特征)的相关报道。因此我们下一步的工作将在基因组水平上检测有无 Hugl-1 的突变情况、对其表达的影响以及对卵巢癌的发生发展的作用。其次,如果

确实存在 Hugl-1 的肿瘤特异性突变,是否存在突变型 Hugl-1 不仅不能发挥抑癌基因的效能,而且还在卵巢癌发生发展中扮演了癌基因的可能呢?近来有实验发现 lgl 和癌基因 Ras 协同作用可使果蝇原发灶显现类似转移的行为特征,突变的 lgl 促进了 Ras 基因的活性,而具有活性的 Ras 同时也提高了 lgl 突变组织的转移能力^[6],这可能预示着在人肿瘤中与果蝇 lgl 基因同源的 Hugl-1 起到了癌基因的作用,但该假设还需要进一步的相关研究来证明。

总之,Hugl-1 mRNA 在卵巢癌中高表达,其可能在卵巢癌的发生发展过程中起到了重要作用,其作用机制有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Olivier R I, van Beurden M, van' t Veer L J. The role of gene expression profiling in the clinical management of ovarian cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42: 2930-2938.
- [2] Scheurlen W G, Seranski P, Mincheva A, Kühl J, Sörensen N, Krauss J, et al. High-resolution deletion mapping of chromosome arm 17p in childhood primitive neuroectodermal tumors reveals a common chromosomal disruption within the Smith-Magenis region, an unstable region in chromosome band 17p11. 2[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, 18: 50-58.
- [3] Grifoni D, Garoia F, Schimanski C C, Schmitz G, Laurenti E, Galle P R, et al. The human protein Hugl-1 substitutes for *Drosophila* lethal giant larvae tumour suppressor function *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 8688-8694.
- [4] Schimanski C C, Schmitz G, Kashyap A, Bosserhoff A K, Bataille F, Schäfer S C, et al. Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of *Drosophila* tumour suppressor gene lgl, contributes to progression of colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24: 3100-3109.
- [5] Kuphal S, Wallner S, Schimanski C C, Bataille F, Hofer P, Strand S, et al. Expression of Hugl-1 is strongly reduced in malignant melanoma[J]. *Oncogene*, 2006, 25: 103-110.
- [6] Pagliarini R A, Xu T. A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior[J]. *Science*, 2003, 302: 1227-1231.

[本文编辑] 孙 岩