

PTEN 基因在哈萨克族食管癌组织中的表达及意义

郭文佳¹, 王洪江², 李卉¹, 庞作良², 陈艳¹, 刘玲¹, 李秀梅¹, 李惠武¹

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830000

2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 乌鲁木齐 830000

摘要 通过观察 *PTEN* 在哈萨克族食管癌组织及相应正常组织中的表达, 探讨 *PTEN* 基因在哈萨克族食管癌发生中的作用。采用 RT-PCR 方法检测 *PTEN* 基因 mRNA 在 36 例哈萨克族食管癌及相应正常组织标本中的表达, 选取 mRNA 水平差异组织标本, 采用 Western-bolt 方法检测其蛋白水平的表达情况。结果显示, *PTEN* 基因 mRNA 在 36 例癌组织中有 30 例表达, 阳性率为 83.33%。其中癌组织表达量高于相应正常组织 ($T>N$) 21 例, 占 70%; 癌组织表达量等于相应正常组织 ($T=N$) 4 例, 占 13.33%; 癌组织表达量低于相应正常组织 ($T<N$) 5 例, 占 16.67%。*PTEN* 基因 mRNA 在正常组织中表达仅有 9 例。癌组织与相应正常组织相比, *PTEN* 基因的表达量明显增高。*PTEN* 蛋白的表达在癌组织与相应正常组织中无明显差异。结果表明, *PTEN* 基因的异常表达主要在转录水平, 可能不是哈萨克族食管癌发生发展中的主导基因, 其对哈萨克族食管癌发生发展过程中的具体作用有待进一步研究。

关键词 哈萨克族食管癌; *PTEN* 基因; RT-PCR

中图分类号 Q354

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)01-0048-03

Expression and Significance of *PTEN* in Hazak's Esophageal Cancer

GUO Wenjia¹, WANG Hongjiang², LI Hui¹, PANG Zuoliang², CHEN Yan¹, LIU Ling¹, LI Xiumei¹, LI Huiwu¹

1. School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

2. The Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Abstract To study the significance of apoptosis-related gene *PTEN* in Hazak's esophageal cancer, the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Western-blotting are adopted. The expression of *PTEN* gene mRNA is detected in 36 cases of esophageal cancer tissues and tumor-adjacent normal tissues by RT-PCR. Then the expression of *PTEN* protein is detected in some samples with difference in transcriptional level by Western-blotting. Results show that the overall positive rate of *PTEN* gene mRNA expression in the 36 cases of esophageal cancer tissues is 83.33%, and that in tumor-adjacent normal tissues is 25%. The expression of *PTEN* protein level in tumor tissue sees no difference as compared with tumor-adjacent tissue. It is suggested that the abnormal expression of *PTEN* gene affects the occurrence of Hazak's esophageal cancer mainly in the transcriptional level, which warrants a further study.

Keywords Hazak's esophageal cancer; *PTEN* gene; RT-PCR

食管癌 (Esophageal Cancer, EC) 是世界上 6 大常见恶性肿瘤之一, 目前仍是引起人类死亡的主要原因之一^[1]。在新疆这一多民族地区, 哈萨克族食管癌的发病率高达 155.9/10 万, 高于同地区其他民族 (22.3/10 万)。其病死率比其他少数民族

地区高 2~31 倍, 比全国平均病死率高 2.3 倍^[2]。这提示: 深入研究民族遗传背景的差异或基因多态性与肿瘤发生发展的关系, 对肿瘤发病机制的阐明、诊断和治疗具有重要意义。

PTEN (phosphatase and tension homolog deleted on chromo-

收稿日期: 2009-11-09

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究与发展计划项目 (200810103)

作者简介: 郭文佳, 研究方向为肿瘤分子生物学, 电子信箱: aisa510@163.com; 李惠武 (通信作者), 教授, 研究方向为肿瘤分子生物学, 电子信箱: huiwuli1234@163.com

some ten) 为一抑癌基因, 又称 *MMA C1* (Mutated in Multiple Advanced Cancer 1) 和 *TEP1* (TGF β regulated and epithelial cell enriched phosphates 1) 基因, 是 J. Li 等^[3]1997 年从原发性乳腺癌、前列腺癌及胶质母细胞瘤细胞株克隆得到的、位于人类第 10 号染色体的一种具有双特异性磷酸酶活性的新型抑癌基因, 也是继 *p53* 基因后发现的人类肿瘤中最常发生突变的抑癌基因。近年研究发现, *PTEN* 基因及其蛋白表达与一些恶性肿瘤发生发展、生物学行为和肿瘤预后有密切关系。食管癌中 *PTEN* 基因研究起步较晚, 本实验采用 RT-PCR 和 Western-Blot 方法对食管癌组织中 *PTEN* 基因及蛋白表达进行研究, 旨在探讨 *PTEN* 基因在哈萨克族食管癌及相应正常组织中的表达, 明确其在哈萨克族食管癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

36 例哈萨克族食管癌组织及相应正常组织标本取自新疆医科大学第一附属医院 (2005—2009 年)。所有标本取出后做好标记, 立即置入液氮中保存。

1.1.2 实验材料

PTEN 引物 (大连宝生物工程有限公司), 经 Genebank 检索为特异性引物, 上游引物: 5'-CTC CAA TTC AGG ACC CAC ACG-3', 下游引物: 5'-GGT TTC CTC TGG TCC TGG TAT-3'。GAPDH 引物 (大连宝生物工程有限公司), 经 Genebank 检索为特异性引物, 上游引物: 5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3', 下游引物: 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'。RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (Promega 公司); PCR 即用试剂盒 (上海生物工程有限公司); 兔抗人多克隆抗体 GAPDH (proteintech) (北京西美杰科技有限公司); 兔抗人多克隆抗体 *PTEN*, 羊抗兔多克隆抗体 IgG HRP, ECM Kit (兔 IgG) (武汉博士德生物工程有限公司); HybondTM-C 硝纤膜 (HyClone 公司); 医用 X 射线胶片-TX (AERMEI 公司); BCA protein Assay Kit (Novage 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取、逆转录和 *PTEN* 基因 PCR 扩增

采用 TRIzol 试剂一步提取细胞总 RNA, RNA 提取物 1 μ g, 逆转录为 cDNA, 取以上样品 cDNA 2 μ L, 加入 2 $\times$ Buffer 10 μ L, *PTEN* 引物各 1 μ L, 加去离子水至 20 μ L, 以 20 μ L 体系进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件 *PTEN*: 95 $^{\circ}$ C, 5min; 95 $^{\circ}$ C, 30s; 53 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 30s; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 10min。GAPDH: 95 $^{\circ}$ C, 5min; 94 $^{\circ}$ C, 30s; 58 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 60s; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 20min。

1.2.2 提取组织蛋白

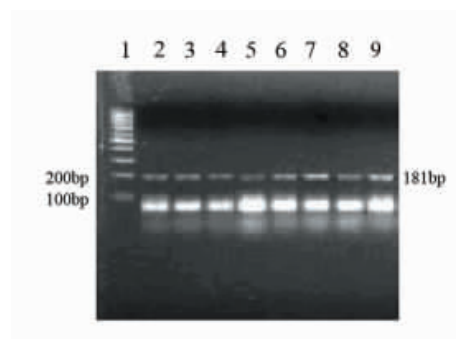
Western-blot 法检测 *PTEN* 蛋白: 取 0.01~0.04g 组织加入 10 倍体积全细胞裂解液, 置匀浆器上进行匀浆, 收集上清, BCA 法测定蛋白质含量, -70 $^{\circ}$ C 分装冻存。蛋白质等量样品与

2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液混合, 煮沸变性 5min; 上样蛋白 60 μ g, 12%SDS-PAGE 电泳 4h, 30V, 4 $^{\circ}$ C 电转移过夜转至硝酸纤维素 (NC) 膜; 丽春红 S 染色 10min 观察各电泳带蛋白质量是否一致; 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜 (封闭液: 5% 脱脂奶粉 + 1% BSA, 含 0.05% Tween-20); TBST 洗膜 30min, 加入用 TBS 稀释的一抗 *PTEN* (1:50), GAPDH (1:400) 4 $^{\circ}$ C 孵育 8h; TBST 洗膜 30min, 与结合有辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:6000) 室温孵育 4h, TBST 洗膜 30min; 加入 ECM 试剂, 暗室曝光, 显影, 定影, 对 X 胶片拍照保存。

2 结果

2.1 RT-PCR 方法检测 *PTEN* 基因 mRNA 表达结果

PTEN 基因 mRNA 在 36 例癌组织中有 30 例表达, 阳性率为 83.33%。其中癌组织表达量高于相应正常组织 ($T>N$) 21 例, 占 70%; 癌组织表达量等于相应正常组织 ($T=N$) 4 例, 占 13.33%; 癌组织表达量低于相应正常组织 ($T<N$) 5 例, 占 16.67%。正常组织中仅有 9 例表达, 阳性率为 25%。癌组织与相应的正常组相比, *PTEN* 基因的表达量均显著增高。*PTEN* 基因扩增电泳结果见图 1。



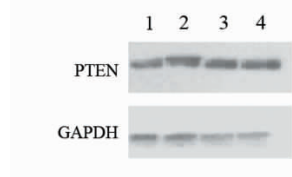
1: DNA 分子量标准; 2, 4, 6, 8: 肿瘤组织;
3, 5, 7, 9: 相应正常组织

图 1 *PTEN* 基因扩增电泳

Fig. 1 Electrophoregram of *PTEN* gene

2.2 Western-blot 法检测 *PTEN* 蛋白结果

以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH) 作为对照, 可见癌组织中的 *PTEN* 蛋白表达在癌组织与相应正常组织中差异不明显。*PTEN* 蛋白电泳结果见图 2。



1, 3: 相应正常组织; 2, 4: 肿瘤组织

图 2 *PTEN* 蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoregram of *PTEN* protein

3 讨论

PTEN 基因产物在诱导细胞周期阻滞、细胞凋亡和血管新生诸方面起着重要作用。其编码蛋白具有双重特异性磷酸酶活性,不仅加快磷酸酰肌醇 23,4,52 三磷酸(PIP_3)的 D3 位脱磷酸,拮抗磷脂酰肌醇 3 激酶($PI3K$)的磷酸化,减少 PIP_3 的聚集;而且促使蛋白激酶 B(Akt)磷酸酪氨酸、磷酸丝/苏氨酸去磷酸,降低 Akt 的磷酸化水平,引起细胞周期阻滞和诱导凋亡^[4-6],阻止肿瘤的恶性演变。正常血管生成中 PIP_3 通过 PKB/Akt 信号通路作用下游靶蛋白,促进血管内皮生长因子(VEGF)的合成,加速血管的形成,这种机制导致了肿瘤的发生。肿瘤是典型的血管依赖性病变,其发展过程中必然有血管的快速增殖及新生血管的形成。抑癌基因 *PTEN* 可直接使 PIP_3 的 D3 位去磷酸化,降低 PKB/Akt 的磷酸化水平,拮抗下游通路的转导及 $PI3K/Akt$ 信号途径,抑制 VEGF 的表达,阻碍血管的生成。*PTEN* 基因的丢失或突变可增强 VEGF 的表达,反之又促进肿瘤的浸润和转移。

大量研究^[7-9]表明,*PTEN* 基因缺失或突变在一些消化道肿瘤如胃癌、大肠癌、肝癌中常见,而一些恶性肿瘤中 *PTEN* 基因突变率虽不高,但却存在 *PTEN* 蛋白表达水平的明显下调。Hameed 等^[10-11]应用 Western 印迹和免疫组化方法检测 42 例食管癌及相应正常组织中 *PTEN* 蛋白的表达情况,表明 *PTEN* 基因通过 PIP_3 途径抑制了肿瘤的恶性演变,同时对正常血管、出生后血管和肿瘤血管的形成起到重要作用。

本研究显示,*PTEN* 基因 mRNA 在 36 例癌组织中有 30 例表达,阳性率为 83.33%。其中癌组织表达量高于相应正常组织($T>N$)21 例占 70%,提示 *PTEN* 基因可能不是哈萨克族食管癌发生发展中起主导作用的基因,或者由于肿瘤的发生反过来影响 *PTEN* 基因使其呈异常的高表达状态;癌组织表达量等于相应正常组织($T=N$)4 例占 13.33%,提示在这些癌及相应正常组织中 *PTEN* 呈正常表达状态;癌组织表达量低于相应正常组织($T<N$)5 例占 16.67%,提示 *PTEN* 的下调可能与哈萨克族食管癌的发生有一定关系。同时 *PTEN* 基因在正常组织中仅有 9 例表达。*PTEN* 基因的表达量明显高于相应正常组织,*PTEN* 蛋白的表达在癌组织与相应正常组织无明显差异。提示少部分哈萨克族食管癌的发生与 *PTEN* 基因表达水平下调可能有一定关系,*PTEN* 基因下调不是哈萨克族食管癌变过程中占主导地位的事件。这与李劲松等^[12]检测 60 例食管癌组织及相应正常食管上皮组织 *PTEN* 基因表达情况的结果不一致。这可能是:① *PTEN* 基因可能不是哈萨克族食管癌发生发展中起主导作用的基因;② 哈萨克族的民族遗传背景决定了 *PTEN* 基因的表达特点。具体的调控机制和 *PTEN* 基因对哈萨克族食管癌发生发展的影响有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Smith F M, Gallagher W M, Fox E, et al. Combination of SELDI-TOF-MS and data mining provides early-stage response prediction for rectal

- tumors undergoing multimodal neoadjuvant therapy [J]. *Ann Surg*, 2007, 45(2): 259-266.
- [2] Zhang Y, Wang Y. *p53* polymorphism in human papillomavirus associated Kazakh's esophageal cancer in Xinjiang, China [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10: 2775-2778.
- [3] Li J, Yen C, Liaw D, et al. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, 275(5308): 1943-1947.
- [4] Waite K A, Eng C. Protein *P1N*: From and function[J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70: 829-844.
- [5] Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis related gene expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 95: 1938-1945.
- [6] Hu T H, Huang C C, Lin P R, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene *PTEN/MMAC1/TEP1* in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2003, 97: 1929-1940.
- [7] Gomes C P, Andrade L A. *PTEN* and *p53* expression in primary ovarian carcinomas: Immunohistochemical study and discussion of pathogenetic mechanisms[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(1): 254-258.
- [8] Verhagen P C, van Duijn P W, Hermans K G, et al. The *PTEN* gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion[J]. *J Pathol*, 2006, 208(5): 699-707.
- [9] Sansal I, Sellers W R. The biology and clinical relevance of the *PTEN* tumor suppressor pathway[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(14): 2954-2963.
- [10] Hameed M, Harridge S D, Goldspink G, et al. Sarcopenia and hypertrophy: A role for insulin-like growth factor-1 in aged muscle [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2002, 30(1): 15-19.
- [11] Hameed M, Lange K H, Andersen J L, et al. The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-I mRNA expression in the muscles of elderly men[J]. *J Physiol*, 2004, 555(Pt1): 231-240.
- [12] 李劲松, 杨琨, 王建军. *PTEN* 蛋白在食管癌中的表达及临床意义[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2006, 35(5): 623-629.
- Li Jinsong, Yang Kun, Wang Jiangjun. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2006, 35(5): 623-629.

(责任编辑 王芷)

2009 年第 24 期“好玩的数学”答案

我们使用反证法。即假设可以把数 1、2、3、4、5 分成甲、乙两组,使每一组中的任何两数之差都不与同组中的一个数相等。我们准备由此假设推出矛盾。

首先,按照假设,数 2 和 4 不可能含在同一组中,因为 $4-2=2$,而 2 已经在同一组中。这样,我们可以设 2 在甲组中,而 4 在乙组中。进一步,我们可以确定 1 不在甲组。因为 $2-1=1$ 。这样,1 只能属于乙组。至此,甲组中含有 2,乙组中含有 1、4。同样道理,3 只可能属于甲组(因为 $4-1=3$,所以乙组中不能含有 3)。

于是,在我们的假设下,可得到甲组中含有 2、3,乙组中含有 1、4。最后还剩下数 5。若把数 5 归入甲组有 $5-2=3$,若把数 5 归入乙组则有 $5-1=4$ 。无论归入哪一组,都不可能满足假设的条件,都会引出矛盾。因此,假设不成立。原命题得证。