

肿瘤组织的 BRCA1 突变情况。结果表明 BRCA1 基因外显子 2 和 20 上没有突变。我们的研究结果与柯玉雄等^[5]报道一致。贾卫华等^[6]对 30 例散发性乳腺癌患者杂合性缺失的研究表明, 中国人群的缺失 (6.12%) 明显低于欧美的研究结果 (30%~70%)。在日本进行的一项研究^[7]中发现该病并不与 BRCA1 位点连锁, 从而质疑 BRCA1 基因可能不是日本人的乳腺癌易感基因。以上研究结果均提示东西方女性在乳腺癌发生机理上可能存在差异。本次实验结果显示 BRCA1 基因在中国乳腺癌患者中不存在 Ashkenazi 犹太人群中常见的突变热点, 推测外显子 2 和 20 序列对中国散发性乳腺癌患者的致病影响不大。故尚需扩大样本和检测范围来进一步研究。

参考文献

1 Irminger - Finger I, Segel BD, Leung WC. The functions of

breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) product and its associated proteins[J]. *Biol Chem*,1999, 380(2): 117~128

2 Sakorafas GH, Tsiotou AG. Genetic predisposition to breast cancer:a surgical perspective[J]. *Br J Surg*,2000, 87(2): 149~162

3 Miki Y,Swensen J,Shattuck- Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. *Science*,1994, 266(5182): 66~71

4 许绍斌,陶玉芬,杨昭庆,等.简单快速的 DNA 银染和胶保存方法[J].*遗传*,2002,24(3):335~336

5 柯玉雄,王旭芬,丰美光,等.中国乳腺癌患者 BRCA1 基因突变的研究[J].*中华医学遗传学杂志*,2002,19(5):383~385

6 贾卫华,王继先,李 征.乳腺癌组织 BRCA1、BRCA2 基因区域杂合性缺失的研究[J].*肿瘤*,2000,20(3):177~179

7 Inoue R, Fukutomi T, Ushijima T, et al. Linkage analysis of BRCA1 in Japanese breast cancer families[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1994, 85(12): 1233~1239

(2006- 06- 01 收稿)

(韩豫生校对)

反义 ODN 对人卵巢癌细胞株 A2780 FSHR 表达的影响 *

沈 娅 朱长虹 甄 波 刘子龙

武汉市妇女儿童医疗保健中心 (武汉市 430016)

关键词 反义寡核苷酸 卵泡刺激素受体 卵巢肿瘤

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000- 8179(2007) 05- 0290- 03

卵巢癌占妇科恶性肿瘤死亡率首位, 常规治疗方法为手术和化疗, 但生存率较低。大量研究显示, 卵泡刺激素(Follicle stimulating hormone, FSH) 对卵巢癌的发生发展具有明显促进作用^[1]。FSH 生理作用的发挥是通过特异性 G 蛋白偶联受体 (Follicle-stimulating hormone receptor, FSHR) 所介导。近年, FSHR 在卵巢中的表达倍受关注。卵巢癌细胞有无 FSHR 过度表达, 恶性与良性肿瘤细胞间 FSHR 表达差异等问题, 目前尚不清楚。

20 世纪 80 年代发展起来的反义核酸技术以其全新的思路和分子生物学手段成为一门新兴的生命科学技术。反义寡脱氧核苷酸(ASODN) 是一段与 mRNA 或 DNA 特异性结合并阻断其基因表达人工合成的 DNA 分子, 通过封闭或阻断肿瘤细胞和病毒的关键编码基因特异抑制肿瘤细胞的增殖和病毒的复制^[2]。本工作通过研究 FSHR 反义 ODN 对人卵巢癌细胞 A2780 FSHR 基因表达的影响, 旨在为卵巢癌的基因治疗带来新的思路和实验依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞株 A2780 来源于美国 ATCC。FSHR 反义链、无义链由上海生工合成, 序列分别为: 5 —GAG CAA GCA AAG CAT TAT—3 ; 5 —ATC GTA AGT GAC ATA GAC—3, 其碱基均由硫代磷酸修饰。RPMI- 1640、胰酶购自 GIBCO 公司; 羊抗人 FSHR 多克隆抗体购自 Santa Cruz; HRP 标记的驴抗羊 IgG 为美国 Proteintech 公司产品; SP 试剂盒购自福州迈新生物公司; FSHR 原位杂交探针(地高辛标记) 由北京奥科生物公司合成, 序列为: 5 —ATG CGC TTG GCG ATC CTG GTG TCA CTA GAG GAG GAC ACG ATG TTG—3。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及制备细胞爬片 A2780 细胞在含有 10%胎牛血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml, Hepes 10mmol/L 的 RPMI- 1640 完全培养基中, 37 、5%CO₂ 相对湿度 90%条件下培养, 细胞贴壁生长。

取对数生长期细胞, 0.25%胰酶消化制成单细胞悬液, 接种于 24 孔培养板中, 板中事先放置多聚赖氨酸包被过的无菌 1×1cm 盖玻片, 37 、5%CO₂ 培养箱中培养。预培养 24h 后更换新鲜培养基, 加入反义

* 本文课题受湖北省卫生厅科研基金资助(编号: JX1B002)

华中科技大学同济医学院计划生育研究所

通讯作者: 刘子龙 liuzilong04@126.com

ODN 使其终浓度分别为 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 。每个浓度设 3 个复孔。作用 12, 24, 48h 时收集细胞爬片。相同条件下以无义 ODN 作为阴性对照, 未加处理的 A2780 细胞作为空白对照。于各个时间点收集爬片, 4%多聚甲醛(原位杂交含 1% DEPC)固定 15min, -20 保存或直接进行免疫细胞化学和原位杂交检测。

1.2.2 免疫细胞化学检测 3% H_2O_2 正常动物非免疫血清 滴加 FSHR 一抗 (1:100) 加生物素标记的二抗、HRP 标记的链霉菌抗生物素蛋白 DAB 显色 苏木素复染 常规脱水、透明、封片。以非免疫血清代替一抗作为阴性对照。

结果判断: 光学显微镜下, FSHR 阳性表达细胞的胞浆和(或)胞膜呈现特异性棕褐色。阳性表达率=(500 个细胞内阳性细胞数/500) $\times 100\%$ 。

1.2.3 原位杂交检测 原位杂交试剂盒购自博士德生物公司。程序为: 3% H_2O_2 20 μl 预杂交液 20 μl 杂交液 杂交后洗涤 滴加封闭液 加生物素化鼠

抗地高辛 加 SABC 加生物素化过氧化物酶 DAB 避光显色 苏木素复染 常规脱水, 透明, 封片。以预杂交液代替杂交液作为阴性对照。FSHR mRNA 阳性表达细胞胞浆着色呈棕黄色。

对 FSHR mRNA 表达水平进行图像分析, 每张玻片随机采集 5 个视野 ($\times 200$), 获得每个视野积分光密度值, 求出每张玻片平均灰度值(以 $\bar{x} \pm s$ 表示), 作为该样本染色强度代表值。

1.3 统计学方法

采用 t 检验, 应用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。

2 结果

光镜下, FSHR 阳性颗粒呈棕褐色定位于胞浆和(或)胞膜, 以胞浆为主。各浓度反义 ODN 作用后, 随着浓度增大, FSHR 阳性表达率逐步降低, 并呈时间依赖性。与空白对照组比较, 有显著差异 ($P < 0.05$); 无义 ODN 各处理组 FSHR 阳性表达率与空白对照组相比, 差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各浓度反义及无义 ODN 处理 A2780 细胞不同时间对 FSHR 表达率[$(\bar{x} \pm s)$ %] 的影响

组别	剂量($\mu\text{mol/L}$)	例数	处理时间(h)		
			12	24	48
空白对照组		6	67.1 \pm 0.89	67.1 \pm 1.42	70.1 \pm 1.78
反义 ODN 组	5	3	61.5 \pm 1.95*	60.3 \pm 0.81*	59.4 \pm 2.09*
	10	3	54.4 \pm 2.10*	52.3 \pm 1.79*	51.5 \pm 1.41*
	20	3	47.4 \pm 1.06*	46.9 \pm 0.61*	39.4 \pm 1.15*
无义 ODN 组	5	3	67.1 \pm 1.25	66.3 \pm 0.51	69.5 \pm 1.09
	10	3	66.1 \pm 1.10	65.7 \pm 1.07	68.6 \pm 0.45
	20	3	65.8 \pm 0.79	65.2 \pm 1.18	67.5 \pm 1.41

与空白对照组相比, * $P < 0.05$

FSHR mRNA 阳性表达定位于胞浆中, 呈特异性棕黄色。空白对照 A2780 细胞中可见 FSHR mRNA 呈阳性表达。10 $\mu\text{mol/L}$ 反义 ODN 作用细胞后, FSHR mRNA 平均吸光度值逐渐降低, 呈时间依赖性。各处理组 FSHR mRNA 表达水平与空白对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$); 无义 ODN 组与空白对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 10 $\mu\text{mol/L}$ 反义及无义 ODN 处理 A2780 细胞不同时间对 FSHR mRNA 平均吸光度值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	处理时间(h)		
		12	24	48
空白对照组	6	0.236 \pm 0.019	0.250 \pm 0.012	0.281 \pm 0.011
反义 ODN 组	3	0.183 \pm 0.007*	0.175 \pm 0.013*	0.158 \pm 0.017*
无义 ODN 组	3	0.229 \pm 0.016	0.247 \pm 0.004	0.271 \pm 0.013

与空白对照组相比, * $P < 0.01$

3 讨论

卵巢癌的发病机理目前尚不清楚。流行病学研究提示, 妊娠、哺乳和使用口服避孕药具有显著降低

卵巢癌发生的趋势。更年期和绝经后妇女体内高浓度 FSH 有可能诱发卵巢肿瘤^[3,4]。结果提示高水平促性腺激素对卵巢表面上皮(OSE)的作用是卵巢上皮癌发生发展的潜在因素^[5]。

FSHR 属于 G 蛋白偶联受体超家族中糖蛋白亚家族成员。人 FSHR 蛋白由 695 个氨基酸组成^[6], 分子结构由胞外区、跨膜区和胞内区组成。其中跨膜区由 7 个高度保守的 α 螺旋组成, 具有 G 蛋白偶联受体家族的共有特征。

20 世纪 80 年代, 有学者发现, 包括灵长类, 卵巢上皮组织中有丰富的 FSHR 分布^[7]。NaKano 等^[8]的研究表明, 许多卵巢癌细胞中也存在 FSH 结合的位点。本研究结果显示, 卵巢癌细胞株 A2780 中 FSHR 在核酸与蛋白水平均有表达, 结果具有一致性。结果提示 FSHR 较高水平的表达可能对卵巢癌的发病起到一定作用。

本实验用 FSHR 反义 ODN 作用于 A2780 细胞, 免疫细胞化学结果显示, 低浓度反义 ODN 作用

12h 至高浓度作用 48h, FSHR 蛋白阳性表达率从 61.5 ± 1.95 降至 39.4 ± 1.15。随着反义 ODN 浓度的增大和作用时间的延长, FSHR 阳性表达率逐步降低, 表现为时间与剂量依赖性。与空白对照组相比, 均有显著性差异 (P<0.05) (表 1)。原位杂交结果显示, FSHR mRNA 阳性表达颗粒呈特异性棕黄色, 定位于胞浆中。10 μmol/L 反义 ODN 作用不同时间后, FSHR mRNA 平均吸光度值显著降低 (P<0.01) (表 2), FSHR mRNA 表达水平明显减弱。说明反义 ODN 作用后, FSHR 在转录水平表达下调。但 ZHU 等用 pFSHR 反义 ODN 10 μmol/L 处理表达重组猪 FSHR 的 CHO 细胞系后, 用定量 RT-PCR 检测到 pFSHR mRNA 的表达明显上调 (P<0.05), 分析可能是由于 pFSHR 蛋白翻译受到抑制从而诱导 pFSHR mRNA 合成的上调^[9]。本实验结果与上述学者的报道相异, 可能与细胞间种属差异和被检物不同有关。

本实验中, 相同条件下用不同浓度无义 ODN 处理 A2780 细胞, FSHR 蛋白和 mRNA 表达水平与空白对照组相比, 无显著差异 (P>0.05), 说明 FSHR 反义 ODN 作用后可能特异性抑制了 FSHR 基因的表达。

本实验结果初步证实, FSHR 反义 ODN 通过封闭 FSHR 基因的表达, 抑制 FSHR mRNA 转录及蛋白的翻译, 导致特异性受体的结合降低。提示 FSHR 反义 ODN 可以作为基因治疗卵巢癌目的基因之一。最近, Kene 等^[10] 的研究表明人 FSHR 的胞外区 (ECD) 是激素选择性结合的重要决定簇, 285-300 和 297-310 氨基酸序列能有效抑制人 FSH 与 FSHR 的结合。针对这些序列设计特异性反义 ODN 能否更为有效地降低 FSHR 基因的表达及与激素的特异性结合, 从而减少卵巢癌的发生, 有待进一步的研究。

参考文献

1 Kraemer S, Jæger WH, Lang N. Growth regulation effects of go-

nadotropin induced steroidogenic response in human ovarian cancer[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(3B): 2005-2010

2 Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents—is the bullet really magical [J]. *Science*, 1993, 261(5124): 1004-1012

3 Shoham Z. Epidemiology, etiology, and fertility drugs in ovarian epithelial carcinoma: where are we today[J]. *Fertil Steril*, 1994, 62(3): 433-448

4 Syed V, Ulinski G, Mok SC, et al. Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(18): 6768-6776

5 Parrott JA, Doraiswamy V, Kim G, et al. Expression and actions of both the follide stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 172(1-2): 213-222

6 Albanese C, Christin- Maitre S, Suss PM, et al. Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 101(1-2): 211-219

7 Zachos NC, Billiar RB, Albrecht ED, et al. Developmental regulation of follide- stimulating hormone receptor messenger RNA expression in the baboon fetal ovary[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(5): 1911-1917

8 Nakano R, Kitayama S, Yamoto M, et al. Localization of gonadotropin binding sites in human ovarian neoplasms [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1989, 161(4): 905-910

9 Zhu C, Wang Y, Nixon MD, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibits expression of recombinant porcine follide- stimulating hormone receptor[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(2): 188-193

10 Kene PS, Nalavadi VC, Digne RR, et al. Identification of the structural and functional determinants of the extracellular domain of the human follide stimulating hormone receptor [J]. *J Endocrinol*, 2004, 182(3): 501-508

(2006-12-29 收稿)

(韩豫生校对)

遗传型甲状腺髓样癌 1 例分析

史景峰 刘金钢 赵海鹰 余 云

中国医科大学附属二院盛京医院第二胆道、微创外科 (沈阳市 110004)

关键词 遗传型 甲状腺髓样癌

中图分类号: R730.26 文献标识码: A 文章编号: 1000-8179(2007)05-0292-02

甲状腺髓样癌 (MTC) 是中等恶性程度的内分泌肿瘤, 其恶性程度高于甲状腺乳头状腺癌 (PTC) 和甲状腺滤泡状腺癌 (FTC), 但发病率低于二者。本病

例提示我们如有双侧甲状腺肿物的患者需要询问其家族史, 注意有无遗传性 MTC 情况。

1 临床资料