

[文章编号] 1000-1182 2006)06-0551-04

实时定量PCR分析脂肪酸合酶在 口腔鳞癌中的表达

王玉凤¹, 王晓毅², 高庆红², 杨晓勇², 王洪萍², 曾 磊²

(1.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学;

2.四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 利用实时定量PCR(RT-PCR)相对定量脂肪酸合酶(FAS)在口腔鳞癌、癌周以及正常口腔组织中的表达情况。方法 切取口腔鳞癌患者新鲜手术标本的癌组织、癌周组织及正常组织,将组织切剪成碎块,提取细胞总RNA,经寡聚脱氧胸腺嘧啶逆转录,实时定量PCR扩增,针对内参照GAPDH基因相对定量FAS的表达,比较FAS在3种组织中的表达。结果 FAS在癌组织中高表达,19例患者癌组织中的FAS mRNA表达水平皆高于正常组织,最高达16倍($P<0.001$)。13例癌旁组织表达水平较正常组织高($P<0.001$)。结论 口腔鳞癌组织和正常组织中的FAS表达有显著差异。实时定量PCR方法简便、快速、高效,并能相对定量内源性脂肪酸合酶在口腔鳞癌组织中的表达。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 实时定量PCR; 脂肪酸合酶

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A

Analysis of Gene Expression of Fatty Acid Synthase in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity by the Method of Real-time Quantitative PCR WANG Yu-feng¹, WANG Xiao-yi², GAO Qing-hong², YANG Xiao-yong², WANG Hong-ping², ZENG Lei². (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To relatively quantify the gene expression of fatty acid synthase in squamous cell carcinoma, adjacent tissue, and some normal oral tissues by real-time quantitative PCR. **Methods** The tissues were collected fresh from surgical specimens. The collected tissues were minced. Then the total RNA was extracted. The RNA was reversely transcribed into cDNA with random prime. And then the cDNA was amplified by real-time quantitative PCR to quantify the gene expression of FAS according to an internal control GAPDH. The difference of FAS gene expression was compared between squamous cell carcinoma, adjacent tissue, and some normal oral tissues. **Results** The expression of FAS of squamous cell carcinoma was notably higher than the other two ($P<0.001$). **Conclusion** Real-time quantitative PCR provides a method for monitoring the expression of fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma, adjacent and normal tissues.

[Key words] squamous cell carcinoma of oral cavity; real-time quantitative PCR; fatty acid synthase

脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)是内源性脂肪酸合成的关键酶,近年来,该酶在恶性肿瘤中的表达特性已成为研究热点。研究^[1-2]表明,脂肪酸合酶在肿瘤组织中高表达,而在正常组织中含量较低。该酶是一个相对分子质量为 2.5×10^4 的多功能

酶,可以表达于乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌和子宫内膜癌细胞。国内有人^[3]曾测定口腔鳞癌FAS的合成活性远高于其他组织,高出幅度达2~56倍。本实验通过设计特异引物和探针,利用荧光实时定量PCR技术从分子生物学角度进行测定FAS的表达,同时测定内参照磷酸甘油醛脱氢酶(gluceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)和FAS,设定适当参数,以GAPDH相对定量FAS,经过数值转换,测定FAS在口腔鳞癌、癌旁组织以及口腔正常组织的表达情况。

[收稿日期] 2006-02-04; [修回日期] 2006-06-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 30550002)

[作者简介] 王玉凤(1977-),女,江苏人,住院医师,硕士,现在南京市第一医院口腔科工作

[通讯作者] 王晓毅, Tel: 13708018949

1 材料和方法

1.1 标本

新鲜标本取自四川大学华西口腔医院头颈肿瘤外科2004年6月—9月的口腔鳞癌手术患者共20例。其中男12例，女8例，年龄30~75岁，平均52.4岁；舌癌8例、颊癌5例、牙龈癌4例、口底癌3例。患者纳入要求：术前均常规饮食，未曾接受过化疗、放疗或其他针对肿瘤的治疗，均经病理证实为鳞癌。标本要求：于新鲜的口腔鳞癌手术标本上切取一块约50 μg的鳞癌组织，不含坏死组织；于鳞癌组织边

沿肉眼观察正常的组织上切取一块50 μg为癌旁组织；于该患者新鲜手术标本旁切取口腔正常组织，大多数为肌组织。离体2 h之内保存于-80 °C冰箱备用。

1.2 试剂及仪器

FTC2000实时荧光定量基因扩增仪 枫岭公司，加拿大)。引物由大连宝生物工程公司合成，FAS和GAPDH引物和探针序列见表1。Trizol(Gibco公司，美国)。Taq DNA聚合酶和dNTP以及RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI公司，立陶宛)。

表 1 FAS和GAPDH引物和探针序列

Tab 1 The primer and probe sequence of FAS and GAPDH

基因	序列	片段长度 (bp)
FAS	Forward Primer 5'-GTGCTGGACCTCTTCCTGAA-3'	135
	Reverse Primer 5'-CGGATGCCCAAGGATGTGT-3'	
	Taqman® MGB probe 5'-FAM-CAGCACAAAGCTGCTCAGGAC-TAMRA-3'	
GAPDH	Forward Primer 5'-GGGTGTGAACCATGAGAAGT-3'	143
	Reverse Primer 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACCT-3'	
	Taqman® MGB probe 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	

1.3 方法

1.3.1 组织总RNA提取 剪取-80 °C冰冻保存的口腔癌、癌周以及正常组织各50 μg，加入1 mL Trizol试剂匀浆，室温放置5 min，匀浆液转移到EP管中，加氯仿，离心后吸取含总RNA的上层水相至新的离心管中。加0.5 mL异丙醇，室温沉淀离心，管底可见胶状RNA沉淀，弃上清。加冰冷乙醇1 mL洗涤RNA。离心去掉乙醇留沉淀。所得RNA溶于DEPC水中，取5 μL经琼脂糖凝胶电泳。其余的-20 °C保存。

1.3.2 逆转录得到模板cDNA 取2 μg上述总RNA，0.5 μL核糖核酸酶抑制剂 (ribonuclease inhibitor)，1 mL随机引物，10 nmol/L dNTP Mix 1 μL，70 °C保温5 min后，MmuLV Reverse Transcriptase 0.5 μL，小心混匀，瞬时离心，20 °C 10 min，42 °C 60 min，70 °C 5 min。冰上冷却，室温高速离心5 s，将所有溶液收集到管底。所得cDNA置于-20 °C冰箱保存。

1.3.3 实时定量PCR 根据美国国立生物技术信息中心提供的FAS基因序列和NCBI数据库中的GAPDH基因序列，设计荧光定量PCR的引物和探针 (用FAM荧光基团和TAMRA猝灭基团标记)。用一个样品的RT产物的梯度稀释后做GAPDH基因的定量PCR，以不同对数关系的稀释浓度和相应的域值循环数 (threshold cycle, Ct)为相应的X、Y轴制作标准曲线。将25 μL模板cDNA反应液加入0.2 mL无菌薄壁

PCR管中，探针的浓度100 nmol/L，引物的终浓度300 nmol/L。按次序加入下列试剂：3 μL 10×PCR Buffer，3 μL 25 mmol/L MgCl₂，0.36 μL 25 mmol/L dNTP Mix，1 μL 10 μmol/L FAS TM，1 μL 10 μmol/L MFAS R，1 μL 10 μmol/L MFAS F，0.3 μL Taq DNA Polymerase (5 U/μL)，加DEPC-H₂O使总反应体系为30 μL。然后在定量PCR反应仪上检测，扩增条件为：94 °C预变性2 min，94 °C变性20 s，56 °C复性30 s，60 °C延伸40 s，循环45次。循环结束后追加72 °C延伸5 min。每个样品的GAPDH和FAS在相同条件下进行扩增反应，每次反应均做空白对照 (不加模板的反应系统)排除污染可能。对脂肪酸合酶电泳阳性cDNA进行克隆和序列测定。

1.4 统计学分析

计算各样本平均Ct值，癌以及癌旁FAS Ct值减去GAPDH Ct值作为ΔCt值。Ct值反应了模板扩增到一定量拷贝数时 (处于指数上升期)所需反应循环数大小。Ct值越大，参与反应的起始的模板量就越小，反之则越大。用SPSS 11.0软件对数据进行统计分析，组间差异比较采用t检验，P<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 口腔鳞癌、癌周以及正常组织中FAS表达

以一个样品的对数关系浓度的RT产物作为模板

扩增GAPDH基因,以循环数Ct为纵坐标,以标准品的各稀释度的起始靶DNA拷贝数的对数值为横坐标做标准曲线(图1),标准曲线的相关系数为99%。

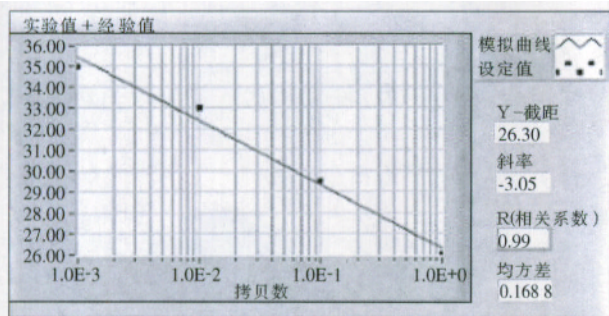
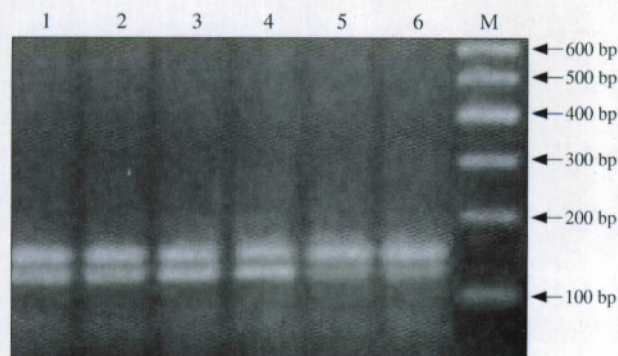


图1 实时定量PCR的标准曲线

Fig 1 The standard curve of the fluorescent quantitative-PCR

2.2 FAS基因片段的克隆

FAS基因片段的长度135 bp,经PCR证实,与基因库序列一致。而且癌组织、癌周组织和正常组织条带亮度依次递减(图2)。



M: 标准相对分子质量DL2000; 1~2口腔鳞癌癌旁组织; 3~4口腔鳞癌组织; 4~6正常组织

图2 RT-PCR检测FAS mRNA在口腔鳞癌组织中的电泳图

Fig 2 Electropherogram of FAS mRNA in oral squamous cell carcinoma by RT-PCR

2.3 FAS在口腔鳞癌、癌周以及正常组织中表达的差异

19例癌组织中的FAS mRNA水平比正常组织高,其中癌组织表达水平高于正常组织16倍的有8例($P<0.001$);17例癌组织比癌旁组织高,最高达8倍($P<0.001$);13例癌旁组织表达水平也较正常组织高,最高达16倍($P<0.001$)。GAPDH经过标化计算表明,口腔鳞癌FAS表达水平(5.000 ± 1.076)和相应癌旁组织的FAS表达水平(6.450 ± 1.063)显著低于正常组织FAS水平(7.625 ± 1.223)($P<0.001$),癌旁组织与正常组织FAS表达水平相比也存在显著性差异($P<0.001$)。说明FAS在鳞癌中的高表达具有普遍性。

3 讨论

正常细胞用于合成生物膜和细胞因子的脂肪酸大多来源于外源性。正常饮食情况下,除了肝脏、

脂肪组织、泌乳期乳腺和胎儿肺脏外,其他组织中的FAS受到饮食脂质的抑制及胰岛素、胰高血糖素、糖皮质激素、甲状腺激素等激素的调节,活性很低^[4]。近20年的研究^[5]表明,癌细胞的脂肪酸合成不同于正常组织细胞,人类癌细胞可自我合成其生长所需的脂肪酸,其依赖于内源性脂肪酸合成酶进行癌细胞的分裂和增殖。高水平的脂肪酸合成代谢也是恶性肿瘤的重要生化特征,本实验的结果也证实了上述观点。20世纪80年代末,人们发现FAS的表达与肿瘤的恶性程度密切相关,FAS表达高者往往在术后短期内出现复发,生存期明显缩短。

在口腔鳞癌方面,有关肿瘤细胞脂肪酸合成的研究相对开展较晚,但同样取得了令人鼓舞的成果。Krontiras等^[6]发现舌鳞状细胞癌FAS表达水平明显高于正常口腔黏膜上皮。在国内,学者研究也显示口腔鳞状细胞癌新鲜标本的脂肪酸合成水平明显高于癌周正常组织及颌面部其他正常组织。另有学者采用放射性同位素标记和液体闪烁测量方法,观察人鳞状细胞癌细胞株内源性脂肪酸表达水平,结果显示癌细胞脂肪酸合成活性明显高于正常人牙龈成纤维细胞,高出约5倍,与身体其他一些部位恶性肿瘤细胞的脂肪酸合成代谢情况相似。薄层色谱分离法显示,细胞总脂质提取液中90%以上的脂质是酰基甘油酯和磷脂。实验证实,¹⁴C标记的乙酰钠掺入上述脂质的量与¹⁴C标记的丙二酰辅酶A掺入脂肪酸的量直线相关,说明内源性脂肪酸合成与FAS活性一致。可以认为脂肪酸合成增加是口腔癌重要的营养代谢特征。

实时定量PCR技术是在普通的定性、半定量PCR的基础上发展起来的一种定量分析方法,原理是带荧光和猝灭基团标记的寡核苷酸探针,与目的基因表达逆转录cDNA片段结合,在PCR扩增中Taq酶外切作用下,扩增的同时使结合在模板上的荧光和猝灭基团分离而激发荧光,不同的波长荧光,可以在同一反应体系中同时检测不同的基因;荧光的强度和扩增的模板量相对应,经电脑软件处理,能够直观地监测PCR的全过程^[7]。国内外应用较多的检测脂肪酸合酶的方法是同位素标记脂质测量法,该方法利用组织中同位素渗入量检测FAS合成活性,能够有效反映组织中FAS表达水平的高低,但灵敏度较差,也无法做定量分析。本研究应用实时定量PCR技术,测量过程不仅简单、快捷、灵敏度高,而且能够定量各组织中FAS的拷贝数,从而为进一步的量化研究打下基础。

总之,本研究证实了脂肪酸合酶的表达水平与口腔鳞癌密切相关,可以作为检测口腔鳞癌的可靠

指标之一,为通过脂肪酸合成途径进行口腔鳞癌诊断、治疗方案的选择提供了依据。

[参考文献]

[1] Wang Y, Kuhajda FP, Chan DW. Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients[J]. Cancer Lett, 2001, 167(1):99-104.
[2] Wang Y, Kuhajda FP. Two-site ELISA for the quantitative determination of fatty acid synthase[J]. Clin Chim Acta, 2001, 304(1/2):107-115.
[3] Guo CB, Cui LH, Yu GY, et al. Endogenous fatty acid synthesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2000, 38(5):506-508.
[4] Weiss L, Hoffman GE, Schreiber R, et al. Fatty acid biosynthe-

sis in man, a pathway of minor importance: Purification, optimal assay conditions and organ distribution of fatty acid synthase[J]. Biol Chem Hoppe-Seyler, 1989, 367(9):905-912.
[5] Kuhajda FP. Fatty acid synthase and human cancer: New perspectives on its role in tumor biology[J]. Nutrition, 2000, 16(3):202-208.
[6] Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue [J]. Head Neck, 1999, 21(4):325-329.
[7] Apple FS, Wu AH, Jaffe AS, et al. European society of cardiology and American college of cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: How to use existing assays clinically and for clinical trials[J]. Am Heart J, 2002, 144(6):981-986.

(本文编辑 汤亚玲)

口腔外科新利器——赛特力公司超声骨刀

赛特力公司——压电陶瓷超声发生器的发明者,最新推出了用于口腔外科的超声设备:Piezotome™超声骨刀。

对于牙槽骨严重缺失的患者,治疗时必须采用多种骨充填手术。Piezotome超声骨刀可用于骨切开术、骨整形术、骨嵴扩张、韧带切开术或上颌窦提升等棘手的手术。与手动或电动设备相比,临床医师使用超声设备会更舒适、更安全。使用Piezotome超声骨刀,可以毫不费力地进行精细的切割手术并且不会损伤软组织,术后疼痛轻微,愈合迅速。此外,不用十分费力,即可获得清晰的切割刀口。

由于选定的频率在28~32 kHz之间,所以Piezotome超声骨刀只对硬组织有效,从而降低了软组织受损的危险。发生器间歇产生低幅值超声波振动,这种经调谐的超声切割可使组织放松并使其微结构得到最佳的修复,因而切割创面清晰整齐,有利于创口更好地愈合。

超声骨刀的工作尖坚固耐用,且振幅受到控制,因而切割精度非常高。另外,手柄操纵非常灵活、工作尖的设计符合解剖形态,所以易于进行棘手的手术。

Piezotome还对切割表面有止血作用。超声空化作用可以限制血液渗出且利于从工作区清除骨屑,使牙科医生能非常清楚地看到手术区,并可避免可能导致组织退化的术区温度升高。

得益于最尖端的双向动力超声发生器SP Newtron®技术的推动, Piezotome超声骨刀有如下出众的特性:①实时自动频率调节,可有效地感知手术操作;②推拉电路,功率强大并可准确连续控制工作尖振幅,以保护脆弱的组织;③应用反馈机制,使用和操作更轻松、精确。以上3个特点构成了巡航控制系统™,使临床医师可轻松控制局面,确保手术绝对安全。

Piezotome超声骨刀及其外设符合严格的安全和卫生要求:①带有一体盒的一次性使用无菌冲洗管;②连线 and 手柄可消毒;③机体光滑易清洁,无粗糙的边缘;④有多功能脚踏开关控制(在手术过程中无需触摸控制面板)。

Piezotome超声骨刀是进行预种植手术(骨切开术、上颌窦提升、拔牙)时的首选工具,还可用于传统的超声治疗。

本设备不但可以使用预种植外科手术所用的所有工作刀,而且可以使用传统超声治疗领域中的近80多个赛特力工作尖,这些治疗领域包括:①牙周病:牙周袋清创、牙根表面修整和肉芽组织清除、种植体保养;②牙髓病:根管冲洗、根管充填、根管再治疗;③牙体预防:牙间隙洁治、龈上和龈下治疗和色素去除;④修复治疗:嵌体/牙冠戴入、松动修复体修复。

Piezotome超声骨刀——口腔外科手术成功和安全的保证。

详尽产品信息请咨询:86-10-64657011/2/3/4,或发电子邮件:beijing@cn.acteongroup.com,网站:www.cn.acteongroup.com。

法国艾龙集团北京办事处 原法国赛特力-碧兰公司)