

原发性乳腺癌SSTR1—3mRNA 分布特性的研究*

汪 静¹ 金河天² 王连刚¹ 武胜昔³ 邓敬兰¹

1 (第四军医大学西京医院 西安 710032)

2 (沈阳军区202医院 沈阳 110000)

3 (第四军医大学 西安 710032)

摘要 为研究生长抑素受体三种亚型(SSTR1—3)在原发性乳腺癌中的分布特性,以 $[\alpha-^{35}\text{S}]\text{dATP}$ 标记SSTR三种亚型的寡核苷酸为探针,运用原位杂交技术,检测10例乳腺癌组织中SSTR1—3mRNA的表达模式,并用Leica图像分析仪对表达密度作半定量分析。结果表明, SSTR1—3在乳腺癌中的表达模式以表达SSTR2为主(7/10);从SSTR1—3在乳腺癌中的表达密度看, SSTR2高于其它两种亚型(82.3 ± 1.4);与SSTR1、3相比, SSTR2为优势表达亚型($P < 0.01$)。说明SSTR3种亚型在乳腺癌中可同时表达,其分布模式呈异质性,其表达模式存在着较大的个体差异,从表达率及表达密度的半定量分析来看, SSTR2均为主要表达亚型,提示乳腺癌具有接受生长抑素类似物靶向药物治疗的乐观前景。

关键词 受体, 生长抑素, 乳腺癌, 分布

生长抑素受体(SSTR)不仅在多种APUD瘤(胺前体摄入脱羧瘤)中呈高密度表达,而且在原发性乳腺癌(以下简称乳腺癌)中也有其分布与表达的特性。本研究采用原位杂交组织化学技术,检测SSTR三种亚型在乳腺癌组织中的表达与分布特性,旨在为选择具有抑制乳腺癌增殖效应的、能特异结合SSTR某亚型的靶向药物奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 组织取材

来源于第四军医大学西京医院、唐都医院外科手术切除标本,均经病理组织学证实。共收集10例标本,标本用生理盐水清洗血迹,并迅速置于液氮中速冻,然后放置在 -80°C 中备用。

1.2 寡核苷酸探针的制备

所用3种寡核苷酸探针分别与SSTR1—3mRNA的一段相反义,并依次对应于SSTR1—3的第252—267、237—252、366—381氨基酸序列^[1,2],具体序列如下:

SSTR1: ATG GTG GCC CTC AAG GCC GGC TGG CAG CAG CGC AAG CGC
TCG GAG CGC;

SSTR2: TCC TCT GGA ATC CGA GTG GGC TCC TCT AAG AGG AAG AAG

* 国家青年自然科学基金资助项目(No.39500035)

收稿日期:1999-05-28

TCT GAG AAG;

SSTR3: CCG TGT GCG CAG CCA GGA GCC CAC TGT GGG GCC CCC GGA GAA GAC TGA。

上述探针由北京赛百盛(美国)生物工程公司(CyberSyn, BJ)的Applied Biosystems 381A型DNA合成仪合成。

1.3 寡核苷酸探针的标记

采用 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ ($>37\text{TBq/mmol}$, 由中国同位素总公司订购的英国Amersham公司的产品)为标记原料, 用3'-末端标记法对上述3种探针分别进行标记, 反应终止后用核苷酸纯化柱纯化产品^[3]。标记探针的放射性比活度为66.6—99.9GBq/mg。

1.4 原位杂交程序^[4]

将预先冻存的组织块移入恒冷箱切片机(德国Leica公司生产, CM1800型)中进行切片(10—15 μm), 并将所需的切片贴在经明胶处理的载玻片上。取快速干燥的组织切片, 置4%多聚甲醛固定20—30min, 用0.1mol/L PBS冲洗及杂交前处理液处理, 再经系列酒精、氯仿脱水、脱脂。杂交时将200 μL 杂交液、15 μL DTT及标记探针(5.92—8.88MBq)滴加到切片表面, 湿环境中孵育24h(37℃)。杂交后, 用 $1\times\text{SSC}$ 冲洗切片, 然后行脱水干燥。最后将Konica NR-M₂型核乳胶涂在切片表面, 置暗盒中曝光(4℃)。4—6周后用Kodak D19显影液显影, F-5坚膜定影液定影, 水洗后经硫堇复染、脱水、透明后, 用中性树胶封片, 在光镜下明、暗视野观察, 并用Leica图像分析仪处理结果。

为避免外源性RNase的污染, 在做杂交过程中采取了如下措施^[3]: 实验操作在专用的原位杂交实验室完成, 操作者戴口罩及手套; 玻璃器皿常规消毒后, 经DEPC浸泡处理—双蒸水漂洗—高压消毒去除DEPC—250℃烘烤4h以上; 塑料器材均使用一次性用品, 使用前进行高压消毒; 所有溶液加DEPC处理过夜—高压消毒处理($1.034\times 10^5\text{Pa}$, 15—30min); 所用的DTT试剂经0.2 μm 的微孔滤膜过滤除菌。

1.5 竞争性对照试验

随机抽取每例乳腺癌的部分切片经常规杂交前处理后, 用含过量的未标记探针的杂交液进行预孵育, 冲洗后, 再用含标记探针的杂交液进行杂交, 结果未发现阳性杂交信号, 说明本实验所用探针与预封闭的靶组织无非特异性杂交。

1.6 杂交信号图像分析

从10例乳腺癌组织标本中, 随机选取每种亚型的各4张切片, 运用Leica Q-500图像分析仪(Germany)对其透光度进行测量, 即同时在同一张切片上选取其本底区进行透光度测量, 以其透光度为100, 对各个切片的相对透光度进行统计分析。相对透光度的值越小, 表明杂交信号越强, 即SSTR亚型表达密度越高。

1.7 统计学分析

采用完全随机方差分析(ANOVA)对结果进行统计学处理。

2 结果

2.1 SSTR1—3在乳腺癌组织中的定性分布

SSTR1—3在乳腺癌组织中的定性分布见表1及图1。表1中, “+”表示细胞表面银颗粒密度高于本底5倍, 即表明mRNA-寡核苷酸杂交体的存在。

表1 SSTR1—3mRNA在乳腺癌组织中的分布
Table 1 Localization of SSTR1—3mRNA
in breast cancers

Numbers	SSTR1	SSTR2	SSTR3
1	-	+	+
2	-	+	+
3	+	+	-
4	-	-	-
5	+	+	+
6	-	-	+
7	-	+	+
8	-	-	-
9	+	+	-
10	+	+	-
Total	4/10	7/10	5/10

2.2 SSTR1—3在乳腺癌组织中表达密度的半定量分析

SSTR1—3在乳腺癌组织中表达的相对透光度($\bar{x} \pm s$):

SSTR1	SSTR2	SSTR3
90.5 ± 2.0	82.3 ± 1.4	97.7 ± 1.6

2.3 统计学分析

完全随机方差分析(ANOVA)结果见表2。

表2 乳腺癌SSTR1—3mRNA半定量结果组间比较
Table 2 Semi—quantitative analysis of
SSTR1—3 mRNA

组 Groups	P
SSTR1—SSTR2	<0.01
SSTR1—SSTR3	>0.05
SSTR2—SSTR3	<0.01

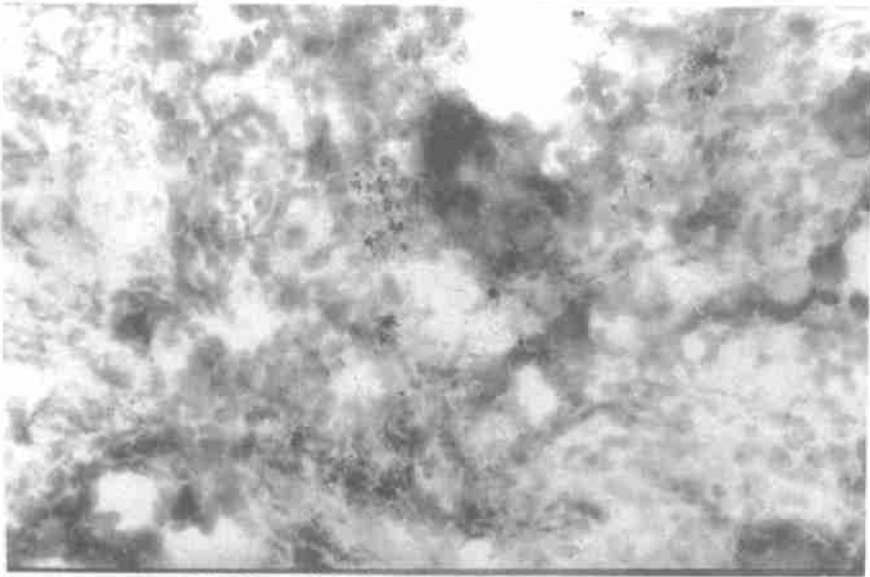


图1 SSTR2亚型在乳腺癌组织中的分布(图中深色细颗粒)
Fig.1 Localization of SSTR2 in breast cancers

3 讨论

生长抑素及其类似物通过SSTR相关亚型的介导具有多种多样的生理与药理作用，包括它在中枢神经系统内的神经递质或神经调节肽作用、外周组织中的激素样调节作用，以及通过直接或间接作用抑制肿瘤细胞的增殖和分化等。在1992年发现SSTR亚型以前国外的报告多采用放射自显影或活体闪烁显像技术，其所观察到的是标记SSA示踪总SSTR而非SSTR亚型的分布情况^[5]。90年代以来，国外学者在基因转录水平研究SSTR亚型的分布和表达，研究表明，SSTR不仅广泛存在于APUD瘤系统中，而且在非APUD瘤中，如乳腺癌、肺癌、淋巴瘤、垂体瘤等肿瘤中也有不同程度的分布与表达^[6,7]。1994年Reubi^[8]首次报道了

SSTR亚型在乳腺癌中的分布,并提出了SSTR2分布占优势的观点。本实验结果提示SSTR3种亚型在乳腺癌中可同时表达,其分布模式呈异质性,其表达模式存在着较大的个体差异,从表达率及表达密度的半定量分析来看,SSTR2均为主要表达亚型,且与SSTR1、3组相比,具有统计学意义上的差异。Reubi^[9]进一步研究认为乳腺癌高度表达SSTR的可能机理是:正常乳腺中含有极少量、难以用目前技术检出的低密度SSTR,当乳腺内那部分神经内分泌细胞发生癌变后,形成SSTR的“重新”表达,使其表达密度显著提高。明确乳腺癌组织中SSTR2亚型的优势表达,选择与之亲和力强、特异性高的SSA如Octreotide、RC-160等作为配体,并用放射性核素进行标记,就可对乳腺癌进行SSTR受体闪烁显像的定位诊断和/或受体介导的特异性靶向放射治疗。

参 考 文 献

- 1 Yamada Y, Post S, Wang K, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:251-255
- 2 Yamada Y, Reision T, Law S F, *et al.* Mol Endocrinol, 1992, 6:2136-2142
- 3 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社, 1993. 155-197
- 4 苏慧慈. 原位杂交. 北京:中国科学技术出版社, 1994. 59-90
- 5 Reubi J C, Kvols L, Krenning E, *et al.* Metabolism, 1990, 39(9)Suppl 2:78-81
- 6 Nielsen S, Mellemkjaer S, Rasmussen L M, *et al.* J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(8):2997-3000
- 7 Mato E, Matias G X, Chico A, *et al.* J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(7):2417-2420
- 8 Reubi J C, Schaer J C, Waser B, *et al.* Cancer Res, 1994, 54:3455-3459
- 9 Reubi J C. J Nucl Med, 1995, 36:1825-1835

Studies on mRNA expression of the somatostatin receptor family in breast cancer

WANG Jing JIN Hetian WANG Liangang WU Shengxi DENG Jinglan

(Xi jing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract

The objective of this paper is to investigate the characteristics of expression and distribution of 3 subtypes of somatostatin receptors (SSTR1—3) in breast cancer. With [α -³⁵S] dATP labeled oligonucleotide of the 3 SSTR subtypes as probe, using *in situ* hybridization, patterns of mRNA expression were detected in 10 breast cancer cases. Additionally, semi-quantitative analysis of the densities of the expression were estimated by a computerized image-analysis system. Patterns of SSTR1—3 expression in breast cancer were as follows: SSTR2 expression was dominant in 10 cases than that of the other 2 subtypes; Therefore, it has positive prospects for somatostatin analog-oriented agents to be used in treatment of breast cancers.

Key words Receptor, Somatostatin, Breast cancer, Localization