

抵抗素样分子 β 在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理特征的关系

吕 叶^{1,2}, 茅卫东², 苏 筠², 沈孝兵³, 姜 藻^{1*}

(¹东南大学附属中大医院肿瘤科, 江苏 南京 210009; ²东南大学附属江阴医院肿瘤科, 江苏 江阴 214400; ³东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:探讨抵抗素样分子 β (resistin-like molecule beta, RELM β)在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达及其与临床病理特征的关系。方法:应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法和蛋白免疫印迹检测 103 例 NSCLC 组织及癌旁正常肺组织(其中 65 例具有配对的淋巴结转移标本)中 RELM β 的表达情况,分析其表达与临床病理特征之间的关系。结果:RT-PCR 和蛋白免疫印迹结果均显示,RELM β 在 NSCLC 组织中的表达明显高于正常肺组织。RELM β mRNA 在肺癌组织中的表达(68.93%)显著高于癌旁组织(23.33%, $P < 0.05$)。不同肿瘤的分化程度、TNM 分期及淋巴结转移情况,RELM β 的表达强度不同,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:RELM β 在 NSCLC 组织中异常高表达,与肺癌临床病理学特征相关,可能促进 NSCLC 的恶性进程。

[关键词] 抵抗素样分子 β ; 非小细胞肺癌; 基因表达

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-823-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150612

Expression of RELM β in non-small cell lung cancer and the its relationship with clinicopathological features

Lü Ye^{1,2}, Mao Weidong², Su Jun², Shen Xiaobing³, Jiang Zao^{1*}

(¹Department of Medical Oncology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009;

²Department of Medical Oncology, Jiangyin Hospital Affiliated to Southeast University, Jiangyin 214400; ³Public Health School, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed to detect the expression of resistin-like molecule beta (RELM β) in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and its relationship with clinicopathological characteristics. **Methods:** We detected the expression levels of RELM β in 103 NSCLC tissues and the same patients' adjacent noncancerous tissues (including 65 with paired lymph node metastases) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, and then analyzed their correlation with clinical pathological parameters. **Results:** RT-PCR and Western blot showed that the expression level of RELM β in NSCLC tissues was significantly higher than that in noncancerous tissues. Compared with adjacent noncancerous tissues, the mRNA and protein expression levels of RELM β were significantly increased in lung cancer (23.33%, $P < 0.05$). The high expression of RELM β was closely associated with the degree of differentiation, TNM staging and lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion:** The positive expression of RELM β is associated with clinical pathological parameters of NSCLC. RELM β may promote tumor progression.

[Key words] resistin-like molecule beta; non-small cell lung cancer; gene expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 823-826]

抵抗素样分子家族(resistin like molecules, RELMs)是 2001 年被发现的一类具有独特半胱氨酸结构的基因家族,其成员之一 RELM β ,是一种肠杯状细胞分泌的蛋白^[1]。免疫组化表明 RELM β 蛋白

在结肠癌和胃癌组织中显著高表达,且与其临床病理特征密切相关,提示 RELM β 在胃肠道癌等肿瘤生物学行为调控方面具有重要作用^[2-3]。RELM β 在人肺组织内特异性分布,在肺动脉高压患者的肺组织、血管内皮和血管平滑肌细胞中高表达,提示其与肺部疾病关系密切,即能促进肺部炎症、诱导胶原沉积,还能促进

[基金项目] 国家自然科学基金(81172619)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:jiangzao@126.com

肺血管内皮细胞和平滑肌细胞有丝分裂,刺激成纤维细胞迁移等^[4]。有关 RELM β 与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的临床病理关系国内外鲜见报道。本研究利用 RT-PCR 和蛋白免疫印迹检测 RELM β 在 NSCLC、癌旁正常肺组织中的表达情况,探讨其与 NSCLC 临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

选取江阴市人民医院 2011 年 12 月~2013 年 12 月手术切除的 NSCLC 标本 103 例,对照组采用同一患者的癌旁组织(距肿瘤边缘>5 cm)。其中男 71 例,女 32 例,年龄 32~79 岁,中位年龄 58 岁。按照 UICC(International Union Against Cancer)2009 年修订的 TNM 分期标准: I 期 34 例, II 期 26 例, III 期 23 例, IV 期 20 例。按照 WHO 肺癌分类标准:鳞癌 72 例,腺癌 31 例;高分化 43 例、中分化 26 例、低分化 34 例;有淋巴结转移 65 例,无淋巴结转移 38 例。所有标本均经江阴市人民医院伦理委员会同意,取得患者或家属的知情同意。患者均经手术病理确诊且资料完整,术前均未接受过放疗或化疗。

1.1.2 试剂

TRIzol 试剂、RT-PCR 试剂盒、*Taq* 酶(Invitrogen 公司,美国);聚合酶链反应(PCR)引物(上海生工公司)。兔抗 RELM β 单克隆抗体及抗 GAPDH 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),哺乳动物组织蛋白抽提液、HRP 标记的羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测

组织标本剪碎、匀浆后,采用 TRIzol 试剂,按试剂说明书提取组织样本总 RNA,并经 Nanodrop ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪检测 RNA 浓度及纯度。按试剂盒说明,应用 MMLV 逆转录酶将总 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 扩增 RELM β 和内参 β -actin 基因。取 6 μ L 扩增产物用 1.5%琼脂糖电泳分离,用 tanonGIS 凝胶成像系统进行密度指数分析。以 β -actin 为内参照,RELM β mRNA 电泳条带密度指数与 β -actin 内参照密度指数之比来表示 RELM β mRNA 的相对表达量。

1.2.2 Western blot 检测

常规提取组织总蛋白,应用 Bradford 法测定总蛋白浓度,取 20 μ g/孔总蛋白以 10%SDS-PAGE 电

泳分离,4 $^{\circ}$ C 90 mA 恒流转膜过夜。结束后,取出 PVDF 膜在 5%脱脂奶粉溶液中室温封闭 1 h。将膜以适量兔抗 RELM β 单克隆抗体按 1:200 和抗 GAPDH 多克隆抗体按 1:1 000 稀释,室温下摇床孵育 2 h,以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 按 1:5 000 稀释,同条件孵育 1 h,每次孵育后以 TBS-T 漂洗 3 次,每次 10 min,用 ECL 发光剂显示阳性条带,采用凝胶图像处理系统分析条带并进行半定量分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数之间的比较采用单因素方差分析,RELM β 表达与患者临床病理因素的关系采用 χ^2 检验,RELM β 在原发灶与淋巴结转移灶表达的比较采用 McNemar 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RELM β mRNA 在肺癌组织中的表达

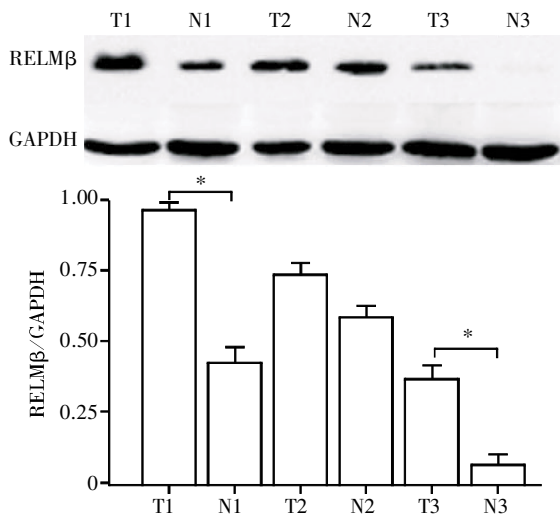
以各样本扩增产物与 β -actin 内参照电泳条带密度指数之比表示其相对表达量,以 RELM β mRNA 相对表达量 0.25 为参考,将标本分为表达和不表达两组。RELM β mRNA 在肺癌组织中的表达率为 68.93%(71/103),均明显高于癌旁组织的 23.33%(24/103),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 RELM β 蛋白在肺癌组织中的表达

为了验证基因检测的结果,应用 Western blot 检测了肺癌标本和相应癌旁正常肺组织中 RELM β 蛋白表达情况。肺癌组织 RELM β 蛋白表达的灰度均值(0.69 \pm 0.08)明显高于正常肺组织(0.23 \pm 0.07, $P < 0.05$,图 1)。

2.3 肺癌中 RELM β mRNA 表达水平与临床病理参数的关系

将 103 例肺癌患者的临床病理因素与相应的 RELM β mRNA 表达水平配对,经 χ^2 检验分析发现,RELM β mRNA 在低分化癌组织中的表达率为 85.29%(29/34),显著高于中分化组 57.69%(15/26, $P=0.017$) 和高分化组 62.79%(27/43, $P=0.028$)。RELM β mRNA 在 III~IV 期肺癌的阳性表达率为 81.40%(35/43),显著高于 I~II 期的 60.00%(36/60, $P=0.021$);在有淋巴结转移的病例中,RELM β mRNA 的阳性表达率是 76.92%(50/65),也明显高于无淋巴结转移病例的 55.26%(21/38, $P=0.022$)。然而,RELM β mRNA 的阳性表达与患者年龄、性别、组织类型均未见统计学相关($P > 0.05$,表 1)。



T: 肺癌组织; N: 癌旁组织。与相应癌旁组织比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 Western blot 检测 RELM β 在肺癌组织和癌旁组织中的表达

Figure 1 Western blot detection of RELM β expressions in NSCLC and adjacent

表 1 肺癌中 RELM β mRNA 表达与临床病理参数的关系

Table 1 Association of RELM β mRNA expressions with clinicopathological parameters in NSCLC

临床病理参数	例数	RELM β mRNA 阳性表达[n(%)]	P 值
年龄(岁)			0.195
≤ 57	58	43(74.14)	
> 57	45	28(62.22)	
性别			0.159
男	71	52(73.24)	
女	32	19(59.38)	
组织类型			0.864
鳞癌	72	50(69.44)	
腺癌	31	21(67.74)	
分化			0.038
高	43	27(62.79)	
中	26	15(57.69)	
低	34	29(85.29)	
TNM 分期			0.021
I~II	60	36(60.00)	
III~IV	43	35(81.40)	
淋巴结转移			0.022
无	38	21(55.26)	
有	65	50(76.92)	

2.4 RELM β mRNA 在淋巴结转移灶中的表达

65 例具有淋巴结转移的病例研究表明, RELM β mRNA 在淋巴结转移灶中的阳性表达率 84.6%(55/65), 明显高于其配对的原发灶 64.6%(42/65, $P = 0.015$, 表 2), 其相对表达量均值分别为 0.89 ± 0.11 和 0.63 ± 0.09 。

表 2 RELM β mRNA 在肺癌原发灶与配对淋巴结转移灶中的表达情况

Table 2 Expression of RELM β mRNA in primary tumors and paired lymph node metastases of NSCLC(n)

淋巴结转移灶	原发灶		P 值
	阳性	阳性	
阳性	35	20	0.015
阴性	7	3	

3 讨论

RELM β 是一种杯状细胞特异性蛋白, 与肠道上皮细胞分化、增殖、免疫和炎症反应密切相关^[5]。RELM β 在结肠癌和胃癌组织中显著高表达。RELM β 在人肺组织内特异性分布, 能促进肺部炎症、诱导胶原沉积, 对肺血管内皮细胞和平滑肌细胞具有促有丝分裂作用及刺激成纤维细胞迁移等功能, 提示其表达与肺部疾病关系密切^[6-7]。目前对 RELM β 在肺部疾病方面的研究主要集中在缺氧肺血管重构、哮喘及系统性硬化症所致肺动脉高压形成等过程中。然而, 关于 RELM β 在肺癌中的表达情况尚未见报道。

本研究通过检测 NSCLC 患者肺癌组织中 RELM β 的表达水平并分析发现, 其在肺癌组织中的表达高于同一患者相对应的癌旁组织。RT-PCR 和 Western blot 检测结果均显示, RELM β 在 NSCLC 组织中表达升高, 表明 RELM β 与 NSCLC 的发生发展密切相关。同时还发现 RELM β 表达与肺癌细胞的分化程度有关, 在低分化癌中的表达明显高于高中分化癌。本研究还发现 RELM β 表达与肿瘤的临床分期和淋巴结转移有关, 有淋巴结转移组 RELM β 的表达高于无转移组, 其在 III~IV 期肺癌中的表达水平远高于 I~II 期。RELM β mRNA 在淋巴结转移灶中的阳性表达率明显高于其配对的原发灶, 表明其与淋巴结转移状态密切相关, 研究推测出现此结果可能与 RELM β 促肿瘤转移的特性有关。

已有研究发现, RELM β 在结肠癌组织中的表达较正常结肠显著增强; 在 Barrett 食管肠化生上皮细胞和不典型增生细胞中表达增强^[8]; RELM β 在胃癌组织中的表达增强, 并且与其病理参数及预后有关, 而在正常胃黏膜无表达, 提示 RELM β 有可能存在促癌机制^[9]。Renigunta 等^[10]研究慢性缺氧对 RELM β 表达的影响, 发现 RELM β 表达于人肺血管平滑肌细胞、肺上皮细胞 A549 和肺动脉外膜的成纤维细胞, 并且对这些细胞具有明显的免疫和诱导增殖的活性。对肺血管内皮细胞和平滑肌细胞具有促有丝分裂作

用及刺激成纤维细胞迁移等功能^[11]。NSCLC 中新生血管形成,可促进肺癌及其他恶性肿瘤疾病进展和远处转移^[12]。本研究发现,RELM β 在肺癌中高表达,并且与其病理参数相关,这些证据表明 RELM β 参与肺癌发展,并且很可能影响肿瘤细胞的生物学活性。

今后将在肺癌细胞和分子水平进一步检测 RELM β 对肿瘤细胞生物学行为的影响,并深入探讨 RELM β 发挥促癌作用的分子机制。

[参考文献]

[1] Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family[J]. EMBO J, 2000, 19(15):4046-4055

[2] Zheng LD, Yang CL, Qi T, et al. Effects of resistin-like molecule β over-expression on gastric cancer cells *in vitro*[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(8):754-766

[3] Zheng LD, Tong QS, Weng MX, et al. Enhanced expression of resistin-like molecule beta in human colon cancer and its clinical significance[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(1):274-281

[4] Liu T, Baek HA, Yu H, et al. FIZZ2/RELM- β induction and role in pulmonary fibrosis[J]. J Immunol, 2011, 187(1):450-461

[5] Homer RJ. Airway remodeling and RELM-beta[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(2):303-304

[6] Angelini DJ, Su Q, Yamaji-Kegan K, et al. Resistin-like molecule-beta in scleroderma-associated pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(5):553-561

[7] Fang CL, Yin LJ, Sharma S, et al. Resistin-like molecule- β (RELM- β) targets airways fibroblasts to effect remodelling in asthma: from mouse to man[J]. Clin Exp Allergy, 2015, 45(5):940-952

[8] Mavi P, Niranjana R, Dutt P, et al. Allergen-induced resistin-like molecule- α promotes esophageal epithelial cell hyperplasia in eosinophilic esophagitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 307(5):G499-507

[9] Zheng LD, Weng MX, He J, et al. Expression of resistin-like molecule beta in gastric cancer: its relationship with clinicopathological parameters and prognosis [J]. Virch Arch, 2010, 456(1):53-63

[10] Renigunta A, Hild C, Rose F, et al. Human RELM beta is a mitogenic factor in lung cells and induced in hypoxia [J]. FEBS Lett, 2006, 580(3):900-903

[11] Neilson AP, Djuric Z, Land S, et al. Plasma levels of resistin-like molecule beta in humans [J]. Cancer Epidemiol, 2011, 35(5):485-489

[12] 张静渊, 尹 荣, 徐新宇. 非小细胞肺癌的脉管内侵犯与微转移、微血管密度关系的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(7):887-891

[收稿日期] 2015-01-19

(上接第 811 页)

[4] Aaltonen KE, Rosendahl AH, Ollsson H, et al. Association between insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) negativity and poor prognosis in a cohort of women with primary breast cancer [J]. BMC Cancer, 2014, 14(11):794

[5] 黄 颖, 邹天宁. 体质量指数、胰岛素与胰岛素样生长因子 1 在乳腺癌中相关性的研究[J]. 医学综述, 2010, 16(12):1802-1804

[6] Wubetu GY, Utsunomiya T, Ishikawa D, et al. Branched chain amino acid suppressed insulin-initiated proliferation of human cancer cells through induction of autophagy[J]. Anticancer Res, 2014, 34(9):4789-4796

[7] Miuma S, Ichikawa T, Arima K, et al. Branched-chain amino acid deficiency stabilizes insulin-induced vascular endothelial growth factor mRNA in hepatocellular carcinoma cells [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(10):3113-3121

[8] Lee JY, Lee NK. Up-regulation of cyclinD1 and Bcl2A1 by insulin is involved in osteoclast proliferation[J]. Life Sci, 2014, 114(2):57-61

[9] 吴勇军, 成细华, 吴 慧, 等. 降糖益肾方对高胰岛素诱导的人肾小球系膜细胞增殖及 IRS-1、PI-3K 蛋白表达的影响[J]. 中华中西医结合杂志, 2014, 34(5):597-601

[10] Zhang F, Zhang Z, Kong D, et al. Tetramethylpyrazine reduces glucose and insulin-induced activation of hepatic stellate cells by inhibiting insulin receptor-mediated PI3K/AKT and ERK pathways[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 382(1):197-204

[11] 邓小兰, 晋贞超, 王 健, 等. ERK 途径可能参与抗坏血酸诱导的神经干细胞向多巴胺能细胞分化[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(22):2430-2434

[收稿日期] 2015-01-12