

肺癌组织中 Endostatin mRNA 转录表达 与血清 Endostatin 水平关系的相关性研究*

摘要 目的: 探讨非小细胞肺癌患者肺癌组织中 Endostatin mRNA 转录表达水平与血清中内皮抑素(Endostatin)水平的关系以及两者水平与肺癌临床病理生理特征的关系。**方法:** 用 ELISA 法检测 46 例非小细胞肺癌患者血清中 Endostatin 的水平;用 RT-PCR 法检测其肺癌组织中 Endostatin mRNA 的转录表达水平。**结果:** 1) 肺癌患者血清中 Endostatin 水平为 $20.85 \pm 4.56 \text{ ng/ml}$;肺癌组织中 Endostatin mRNA 的转录表达产物的 OD 比值为 0.872 ± 0.071 。2) 肺癌患者血清中 Endostatin 水平及肺癌组织中 Endostatin mRNA 的转录表达水平均与肺癌原发肿瘤大小、有无远处转移、细胞分化程度和 P-TNM 分期等有密切关系 ($P < 0.05$),而与肺癌原发部位、淋巴结转移状态、组织学类型、患者性别、年龄和吸烟与否等均无明显关系 ($P > 0.05$)。3) 肺癌组织中 Collagen X VIII/Endostatin mRNA 的转录表达与血清中 Endostatin 水平呈非常显著正相关 ($r = 0.686, P < 0.01$)。**结论:** 肺癌患者肺癌组织中 Endostatin mRNA 的转录表达与血清 Endostatin 水平有非常显著正相关关系,且均与肺癌的发生、发展、远处转移和细胞分化不良有密切关系,非小细胞肺癌患者血清中 Endostatin 水平和肺癌组织中 Endostatin mRNA 的转录表达水平可能是预测肺癌恶性行为的有用指标。

关键词 肺肿瘤 内皮抑素 转录表达 逆转录-聚合酶链式反应 酶联免疫吸附测定

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8179(2006)12-0665-05

Correlation between Endostatin Serum Levels and Endostatin mRNA Transcription Levels in Lung Cancer Tissues

Liu Ying Zhou Qinghua Sun Zhilin et al

Department of Thoracic Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan

Abstract Objective: To study the correlation between the serum level of endostatin and the expression of Collagen X VIII/Endostatin mRNA in lung cancer tissues and to explore the relationship between these levels and the clinical and pathophysiological characteristics in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. **Methods:** The serum level of endostatin was detected in 46 patients with NSCLC using ELISA and the expression level of Collagen X VIII/ Endostatin mRNA was detected in the lung cancer tissues by RT-PCR. **Results:** a) The mean serum concentration of endostatin in the lung cancer patients was $20.85 \pm .56 \text{ ng/ml}$ and the expression level of Collagen X VIII/Endostatin mRNA in the lung cancer tissues was $0.872 \pm .071$. b) The serum concentration of endostatin and the transcription expression of Collagen X VIII/Endostatin mRNA were closely related to the P-TNM stages, presence of distant metastasis, grade of cell differentiation and the size of the primary tumor ($P < 0.05$), but not to the histological classification, type of tumor, lymph node status, age, sex of the patients or cigarette use ($P > 0.05$). c) The serum level of endostatin in lung cancer patients had a highly positive correlation to the

* 本文课题受国家自然科学基金资助(编号:30070333)

① 四川大学华西医院胸外科 ② 四川大学华西医学院分子生物学教研室

③ 四川大学华西医院肿瘤研究所

通讯作者:周清华 zhouqh@mail.sc.cninfo.net

expression of Collagen X VIII/Endostatin mRNA in lung cancer tissues ($r=0.686, P<0.01$). **Conclusion:** The serum level of endostatin in lung cancer patients has a highly positive correlation to the expression of Collagen X VIII/Endostatin mRNA in lung cancer tissues. The serum level of endostatin and the expression of Collagen X VIII/Endostatin mRNA in patients with NSCLC might be helpful for evaluating the biological behavior of lung cancer.

Key words Lung tumor Endostatin Transcription expression
RT-PCR ELISA

肿瘤的形成和发展大致可分为两个阶段,即肿瘤细胞的克隆性增殖阶段(血管前期)和继之而来的血管形成(血管期)促进肿瘤持续性生长阶段。实体瘤的生长和转移必须依赖于血管生成(angio genesis)^[1],而抑制其血管形成能够控制其生长和转移^[2]。肺癌和其它实体瘤一样,其生长和转移离不开新生血管生成。肿瘤血管生成是一个多基因、多因子参与的过程。只要阻断其中任何环节,都将阻止肿瘤血管生成。1997年发现的内皮抑素(Endostatin)被认为是迄今为止最有效的内源性血管生长抑制剂之一^[3],体外和动物实验已显示出 Endostatin 及其类似物在体外能有效抑制内皮细胞的生长、移行,在体内显著退缩和停滞原发瘤和转移瘤的生长,且无明显耐药现象,无毒副作用^[3,4]。文献报道 Endostatin 的表达水平与多种恶性肿瘤的进展和预后有关^[5]。为探讨非小细胞肺癌患者血清中 Endostatin 水平与肺癌组织中 Endostatin mRNA 转录表达水平的关系以及两者水平与肺癌临床病理生理特征的关系,本研究应用 ELISA 法检测了 46 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清中 Endostatin 水平,应用 RT-PCR 法检测了其肺癌组织中 Endostatin mRNA 的转录表达水平,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

2001年6月至2002年2月在四川大学华西医院胸外科行手术治疗的部分肺癌患者共46例,其中男性34例,女性12例;年龄37~74岁,平均60.39岁;腺癌21例,鳞癌21例,腺鳞癌4例;低分化癌21例,中分化癌19例,高分化癌6例;P-TNM分期(国际UICC1997分期标准),I+II期20例,III+IV期26例。

1.2 主要试剂和仪器

人 Endostatin Sandwich EIA 试剂盒,购自美国 Chemicon 公司;RT-PCR 试剂盒(Access RT-PCR System)购自美国 Promega 公司;DNA Marker (DL2000)购自成都天泰生命科技公司(大连宝生物工程股份有限公司生产)。美国 BIO-RAD Model 550 酶

标仪一台;Thermo Forma-80℃冰箱一台;Amersham 电泳仪一台;PCR 扩增仪一台(ThermoHybaid);美国 Beckman 公司低温高速离心机(JS-HS 型)一台及低温台式高速离心机(Microfuge 22R)一台。

1.3 标本的收集与保存

1.3.1 血清标本的收集与保存 所有肺癌患者均于手术前、术后1天和7天分别采用非抗凝管抽取外周静脉血5ml,室温放置30~60min后,5000rpm离心10min,分离血清,然后将血清分别放入2mlEppendorf管中,-20℃低温冷冻备用。

1.3.2 组织标本的收集与保存 肺组织标本均在离体15min内取1.0cm³左右,置于液氮中保存备用。

1.4 检测方法

1.4.1 ELISA 法检测血清中 Endostatin 水平 检测方法按试剂盒说明书进行,用 BIO-RAD Model 550 酶标仪测定结果,血清 Endostatin 检测波长为490nm。

1.4.2 RT-PCR 法检测组织中 Endostatin mRNA 的转录表达

1.4.2.1 组织 RNA 的提取 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取组织 RNA,经过1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,18S和28S条带清晰可见,并且无蛋白质及DNA污染,说明提取标本RNA无降解。紫外分光光度计检测提取RNA的OD值,OD260/OD280在1.75~1.90之间(图1)。

1.4.2.2 引物设计 Collagen X VIII/Endostatin 基因引物参照人 Collagen X VIII/Endostatin 基因序列(核酸序列4200-4219和4432-4451)^[6],扩增产物为252bp(GenBank 登录号 AF018081^[7])。β-actin 作为内参照标准,产物为154bp^[8]。引物序列见表1,由北京赛百盛生物工程公司合成。

1.4.2.3 RT-PCR 过程 建立逆转录-PCR 扩增体系共25μl,Endostatin 组和内对照组采用相同的反应温度和时间,均分别加入上、下游引物各25pmol。逆转录:逆转48℃45min,灭活94℃2min;PCR 循环:变性94℃1min,退火55℃45s,延伸68℃45s,共35次循环,最后68℃终延伸7min。

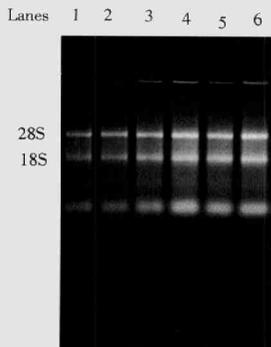


图1 总RNA的1%琼脂糖凝胶电泳图谱

表1 RT-PCR引物序列及扩增片段大小

基因	引物序列	片段大小(bp)
Endostatin	5'-TGCAGGACCTGTACAGCATC-3'	252
	5'-ACGTCTCACACTAGCTCTCG-3'	
β-actin	5'-CACTGTCTGGCGGTACAGGT-3'	154
	5'-TCATCAGCATTGGCAATGAG-3'	

1.5 结果判读

1.5.1 血清 Endostatin 结果判断 在半对数坐标纸上手工绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标(横轴为对数刻度), OD 值为纵坐标, 以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD490 值可在标准曲线上查出其浓度。

1.5.2 RT-PCR 反应产物结果判读 取 8μl 反应产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果, 以 DNA Marker 判断片段大小, 并将图像摄入 UVP 图像分析系统对扩增产物进行图像分析, 测出扩增产物带光密度值, 并与同一样本的内对照 β-actin 光密度值进行比值定量, 并进行分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件处理, 采用的统计学方法有 *t* 检验, *F* 检验、秩和检验和双变量相关性分析。

2 结果

2.1 肺癌患者血清中内皮抑素的水平

肺癌患者血清中内皮抑素水平为 $20.85 \pm 4.56 \text{ ng/ml}$ 。

2.2 肺癌患者血清中内皮抑素的水平与肺癌病理生理特征的关系

肺癌患者血清中内皮抑素的水平与肺癌原发肿瘤大小、有无远处转移、细胞分化程度和 pTNM 分期等均有密切关系 ($P < 0.05$), 而与肺癌原发部位、淋巴

结转移状态、组织学类型, 患者性别、年龄和吸烟与否等均无明显关系 ($P > 0.05$) (表 2)。

表2 肺癌患者血清中内皮抑素的水平与肺癌临床病理生理特征的关系 $\bar{x} \pm s$

临床病理特征	例数	Endostatin (ng/ml)	<i>P</i>
性别			0.748
男	34	20.72±4.09	
女	12	21.22±2.67	
年龄(岁)			0.504
≥55	32	21.15±5.05	
<55	14	20.16±3.24	
吸烟史			0.142
有	29	20.09±2.49	
无	17	22.14±6.69	
肿瘤位置			0.171
中心型	20	19.79±3.09	
周围型	26	21.66±5.35	
淋巴结转移			0.179
N ₀	25	21.68±5.39	
N ₁₋₃	21	19.85±3.17	
组织学类型			0.947
鳞癌	21	20.73±1.78	
腺癌	21	21.06±4.10	
腺鳞癌	4	20.32±4.56	
原发瘤大小			0.024
T ₁ +T ₂	32	21.84±4.86	
T ₃ +T ₄	14	18.59±2.77	
远处转移			0.035
M ₀	40	21.39±3.53	
M ₁	6	17.22±3.01	
细胞分化程度			0.005
低分化	21	19.45±2.24	
中-高分化	25	22.03±5.63	
pTNM 分期			0.006
I+II	20	22.89±3.47	
III+IV	26	19.28±2.97	

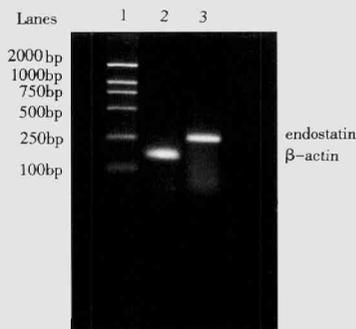
2.3 肺癌组织中 Collagen X VIII/Endostatin mRNA 的转录表达

所有从肺癌组织中提取的总 RNA 经过 RT-PCR 反应, 逆转录产物中都可以检测到 Collagen X VIII/Endostatin 基因序列的表达, 产物大小为 252bp。同时以相同条件检测 β-actin 基因的表达, 作为内对照, 产物大小为 154bp (图 2)。肺癌组织中 RT-PCR 反应产物 OD 比值为 0.872 ± 0.071 (图 3)。

2.4 肺癌组织中 Collagen X VIII/Endostatin mRNA 转录表达水平与肺癌临床病理生理特征的关系

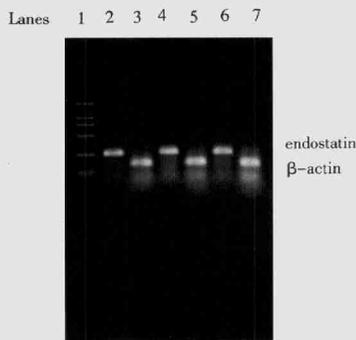
肺癌组织中 Collagen X VIII/Endostatin mRNA 转录表达水平与肺癌原发肿瘤大小、有无远处转移、细

胞分化程度和 pTNM 分期等均有密切关系 ($P < 0.05$), 而与肺癌原发部位、淋巴结转移状态、组织学类型、患者性别、年龄和吸烟与否等均无明显关系 ($P > 0.05$) (表 3)。



1. DNA Marker; 2. β -actin; 3. Collagen XVIII/Endostatin

图 2 肺癌组织中 collagen XVIII/Endostatin mRNA 和 β -actin mRNA 的 RT-PCR 电泳结果



1. DNA Marker; 2,4,6; Collagen XVIII/Endostatin; 3,5,7; β -actin

图 3 肺癌组织的 RT-PCR 电泳结果

2.5 肺癌组织中 Collagen XVIII/Endostatin mRNA 的转录表达与血清中 Endostatin 水平的关系

肺癌组织中 Collagen XVIII/Endostatin mRNA 的转录表达与血清中 Endostatin 水平呈非常显著正相关 ($r=0.686, P < 0.01$)。

表 3 肺癌组织中 Collagen XVIII/Endostatin mRNA 转录表达水平与肺癌临床病理生理特征的关系 $x \pm s$

临床病理特征	例数	Endostatin gene(OD 比值)	P
性别			0.235
男	34	0.864 \pm 0.073	
女	12	0.893 \pm 0.063	
年龄(岁)			0.690
≥ 55	32	0.874 \pm 0.071	
< 55	14	0.865 \pm 0.073	
吸烟史			0.349
有	29	0.861 \pm 0.066	
无	17	0.890 \pm 0.075	
肿瘤位置			0.156
中心型	20	0.855 \pm 0.077	
周围型	26	0.885 \pm 0.064	
淋巴结转移			0.335
N_0	25	0.881 \pm 0.072	
N_{1+2}	21	0.861 \pm 0.069	
组织学类型			0.793
鳞癌	21	0.878 \pm 0.054	
腺癌	21	0.868 \pm 0.090	
腺鳞癌	4	0.854 \pm 0.018	
原发瘤大小			0.043
T_1+T_2	32	0.886 \pm 0.071	
T_3+T_4	14	0.840 \pm 0.061	
远处转移			0.002
M_0	40	0.884 \pm 0.064	
M_1	6	0.790 \pm 0.061	
细胞分化程度			0.001
低分化	21	0.833 \pm 0.059	
中-高分化	25	0.904 \pm 0.064	
pTNM 分期			0.003
I+II	20	0.906 \pm 0.057	
III+IV	26	0.845 \pm 0.070	

3 讨论

O'Reilly 等^[3]研究发现某些肿瘤如 Lewis 肺癌, 能够抑制其远处转移瘤的生长, 在原发肿瘤切除后, 转移瘤开始迅速生长。这一发现使其提出一种新的假说, 即原发性肿瘤分泌两种相拮抗的因子, 分别抑制和刺激血管生成, 这一假说已由许多试验所证实。内皮抑素(Endostatin)是目前研究发现的作用最强、特异性最高的血管生成抑制因子之一, 为胶原 XVIII (collagen XVIII) C-末端非胶原蛋白特征结构域(NC1)中的一内源性片段, 由 184 个氨基酸组成, 分子量约 20Kd^[3]。Endostatin 基因定位于 Collagen XVIII 基因第 38-43 号外显子和部分 37 号外显子编码的

C 末端 NC1 结构域内; 为 Collagen X VIII $\alpha 1$ 链基因序列的 4040-4591 位, 共 552bp^[9], 编码 184 个氨基酸。目前内皮抑素的基因序列及其编码的氨基酸已经研究清楚, 国内、外也已经成功地转导内皮抑素 cDNA 进入各种表达载体, 并获得了具有生物活性的内皮抑素^[10,11]。胶原 X VIII 基因为内皮抑素基因的前体基因, 包含内皮抑素基因的序列, 直接关系到内皮抑素的表达。

本研究定量检测了肺癌患者血清中内皮抑素的含量, 其结果与 Suzuki 等^[12]用 ELISA 法研究非小细胞肺癌血清中内皮抑素含量的结果基本一致。Feldman 等^[13]发现软组织肉瘤患者血清内皮抑素含量明显增高, 而且与肿瘤的侵袭性及切除术后的复发率增高有关。本研究观察到非小细胞肺癌患者血清中 Endostatin 水平及肺癌组织中 Collagen X VIII/Endostatin mRNA 转录表达水平与肺癌原发肿瘤大小、有无远处转移、细胞分化程度和 P-TNM 分期等均有密切关系, 而与肺癌原发部位、淋巴结转移状态、组织学类型, 患者性别、年龄和吸烟与否等均无密切关系。即肺癌患者原发肿瘤越大, 细胞分化程度越低, P-TNM 分期越晚或伴有远处转移, 其血清中 Endostatin 水平及肺癌组织中 Collagen X VIII/Endostatin mRNA 转录表达水平就越低。同时还发现肺癌组织中 Collagen X VIII/Endostatin mRNA 转录表达水平与血清中 Endostatin 水平呈非常显著正相关。结果提示肺癌的肿瘤细胞在基因水平存在内皮抑素的高表达, 通过翻译过程产生高表达水平的内皮抑素蛋白, 或前体基因翻译后通过其他途径刺激机体产生大量的内皮抑素, 抑制肿瘤血管生成, 来对抗肿瘤细胞产生的 VEGF 的促血管生成作用, 达到肿瘤血管生成和抑制因子间的平衡。此外本研究结果亦从基因水平验证了肿瘤细胞可能是内皮抑素产生的重要来源。本研究结果还提示分期较晚或分化程度较低的肺癌患者, 其肿瘤局部内皮抑素基因或其前体基因的表达越低, 使得翻译后肿瘤局部内皮抑素蛋白的表达水平降低, 血清中内皮抑素的含量亦降低, 而 Ohta 等^[14]利用 RT-PCR 法研究 90 例原发性肺癌时发现, VEGF 基因的表达水平与 pTNM 分期、肿瘤细胞分化程度和淋巴结转移等密切相关, 分期越晚, 分化程度越低, 表达水平越高, 这样就使得肺癌血管生成促进因子和抑制因子间的平衡向着有利于肺癌新生血管生成的方向发展, 导致肺癌的进一步生长和侵袭转移, 这与临床实际发现的情况相吻合。

研究结果表明采用 RT-PCR 法检测肺癌组织中内皮抑素基因的表达, ELISA 法检测肺癌患者血

清中内皮抑素的含量有助于预测肺癌的恶性行为, 有助于研究内皮抑素在肺癌发生、发展及侵袭转移中的作用, 以及指导肺癌术后多学科综合治疗。

参考文献

- 1 Leung DW, Cachianes G, Kung WJ, et al. VEGF is a secreted angiogenic mitogen[J]. *Science*, 1989, 246 (1):1301-1312
- 2 Wu Z, O'Reilly MS, Folkman J, et al. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236(3): 651-654
- 3 O'Reilly MS. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997, 88(2):277-285
- 4 Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. *Nature*, 1997, 390(6658):404-407
- 5 Strik HM, Schluesener HJ, Seid K, et al. Localization of Endostatin in rat and human gliomas [J]. *Cancer*, 2001, 91 (5):1013-1019
- 6 Wu P, Yonekura H, Li H, et al. Hypoxia down-regulates Endostatin production by human microvascular endothelial cells and pericytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(5): 1149-1154
- 7 Saarela J, Ylikarppa R, Rehn M, et al. Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts[J]. *Matrix Biol*, 1998, 16(6):319-328
- 8 Nakajima S, Hamada H, Raddy P, et al. Molecular structure of the human cytoplasmic actin gene: Interspecies homology of sequence in the introns [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(18): 6133-6137
- 9 Rehn M, Hintikka E, Pihlajaniemi T, et al. Primary structure of the alpha 1 chain of mouse type XVIII collagen, partial structure of the corresponding gene, and comparison of the alpha 1 (XVIII) chain with its homologue, the alpha 1 (XV) collagen chain [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(19):13929-13935
- 10 Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of Endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9):4802-4807
- 11 卿志荣, 唐爱发, 蒋冬贵. 人 Endostatin cDNA 的克隆及其在 HT1080 细胞中的表达[J]. *湖南医科大学学报*, 2002, 27 (5):393-396
- 12 Suzuki M, Iizasa T, Ko E, et al. Serum Endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2002, 35(1):29-34
- 13 Feldman AL, Pak H, Yang JC, et al. Serum Endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma [J]. *Cancer*, 2001, 91 (8):1525-1529
- 14 Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1996, 2(8):1411-1416

(2005-06-10 收稿)

(2006-03-27 修回)

(董恒磊校对)