

· 临床研究 ·

非小细胞肺癌组织中内皮抑素 mRNA 的 转录表达及临床意义

刘颖 周清华 孙芝琳 孙泽芳 刘伦旭 朱文 王艳萍 陈晓禾

【摘要】 背景与目的 肿瘤生长和转移依赖于肿瘤血管形成,抑制其血管形成能够控制其生长和转移。胶原 X VIII/内皮抑素(collagen X VIII/endostatin)是迄今为止最有效的内源性血管生长抑制剂之一。本研究拟探讨内皮抑素 mRNA 在非小细胞肺癌组织中的转录表达及其与肺癌临床病理生理特征的关系。方法 用 RT-PCR 法检测 46 例非小细胞肺癌组织和 14 例肺良性病变组织中内皮抑素 mRNA 的转录表达。结果 ① 肺癌组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平(0.872 ± 0.071)显著高于癌旁肺组织(0.717 ± 0.073)和肺良性病变肺组织(0.611 ± 0.026)($P < 0.001$),癌旁肺组织亦显著高于肺良性病变肺组织($P < 0.01$)。② 肺癌组织中内皮抑素 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明显关系。结论 肺癌患者肺癌组织中存在内皮抑素 mRNA 转录表达水平的升高,这种升高与肺癌的发生、发展、远处转移和细胞分化不良有密切关系,因而有助于预测肺癌的恶性行为。

【关键词】 肺肿瘤 内皮抑素 胶原 X VIII/内皮抑素 RT-PCR

【中图分类号】 R734.2;R730.51

Transcription expression of endostatin mRNA in non-small cell lung cancer tissues LIU Ying, ZHOU Qinghua, SUN Zhilin, SUN Zefang, LIU Lunxu, ZHU Wen, WANG Yanping, CHEN Xiaohu. Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology of Sichuan Province, Department of Thoracocardiac Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

Corresponding author: ZHOU Qinghua, E-mail: zhouqh@mail.sc.cninfo.net

【Abstract】 Background and objective It has been proved that tumor development and metastasis are dependent on angiogenesis. Suppression of tumor angiogenesis can inhibit tumor growth and metastasis. Collagen X VIII/endostatin is one of the most effective inhibitors of angiogenesis at present. The aim of this study is to study the relationship between transcription expression of endostatin mRNA and clinical and pathophysiological characteristics in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The transcription expression of endostatin mRNA was detected in 46 lung cancer tissues and paracancerous lung tissues, 14 benign pulmonary lesion tissues as control by RT-PCR method. **Results** ① The transcription expression of endostatin mRNA in lung cancer tissues (0.872 ± 0.071) was significantly higher than that in paracancerous tissues (0.717 ± 0.073) and benign pulmonary lesion tissues (0.611 ± 0.026) ($P < 0.001$). ② The transcription expression of endostatin mRNA in lung cancer tissues was closely related to P-TNM stages, distant metastasis, grade of cell differentiation and size of the primary tumors ($P < 0.05$), but not to location of tumor, lymph node status, histological classification, age and sex of the patients and smoking or not ($P > 0.05$). **Conclusion** The transcription expression of endostatin mRNA in NSCLC tissues is significantly higher than that in paracancerous tissues and benign pulmonary lesion tissues, and is closely related to P-TNM stages, distant metastasis, grade of cell differentiation and size of the primary tumors, hence it might be helpful to evaluate the biological behavior of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Endostatin Collagen X VIII/Endostatin RT-PCR

This work was supported by grants partly from Key Project of the National Natural Science Foundation of China (to ZHOU Qinghua) (No. 30430300) and from the National Natural Science Foundation of China (to ZHOU Qinghua) (No. 30070333).

本研究受国家自然科学基金重点项目(No. 30430300)和面上项目(No. 30070333)资助

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室、胸心外科(刘颖现在 250021 济南,山东省立医院胸外科)(通讯作者:周清华, E-mail: zhouqh@mail.sc.cninfo.net)

研究发现,肿瘤生长和转移依赖于肿瘤血管形成,抑制其血管形成能够控制其生长和转移^[1,2]。近年来,肿瘤血管生成及抑制的研究为阐明肿瘤发展及转移的生物学行为开辟了新的领域,并为肿瘤的治疗带来了曙光,预示了新的抗肿瘤时代的到来。1997 年发现的胶原 X VIII/内皮抑素(collagen X VIII/endostatin)是迄今为止最有效的内源性血管生长抑制剂之一,体外和动物实验已显示出内皮抑素及其类似物在体外能有效抑制内皮细胞的生长、移行,在体内它能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]。内皮抑素的表达水平与多种恶性肿瘤的进展和预后有关^[5~7]。为探讨肺癌组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平及其与肺癌临床病理生理特征的关系,本研究应用 RT-PCR 法检测了 46 例非小细胞肺癌(NSCLC)中内皮抑素 mRNA 的转录表达水平,分析其与肺癌患者临床病理生理特征的关系,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2001 年 6 月至 2002 年 2 月期间在本科行手术治疗的部分肺癌患者和肺良性病变患者,肺癌组共 46 例,其中男性 34 例,女性 12 例;年龄 37~74 岁,平均 60 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,手术前均未作放疗或化疗,行根治性手术,术后病理证实为肺癌,组织学分类明确。肺良性病变组 14 例,其中男性 8 例,女性 6 例;年龄 19~65 岁,平均 40 岁;支气管扩张 4 例,炎性假瘤 5 例,肺曲霉菌病 2 例,肺血管畸形、肺结核瘤及肺特发性含铁血黄素沉着症各 1 例。肺组织标本均在离体 15 min 内取 1.0 cm³ 左右,置于液氮中保存备用。

1.2 主要试剂和仪器 美国 Thermo Forma-80℃ 冰箱,美国 Beckman 公司低温高速离心机(JS-HS 型)及低温台式高速离心机(Microfuge 22R),Amersham 电泳仪,PCR 扩增仪(ThermoHybaid);RT-PCR 试剂盒(Access RT-PCR System)购自美国 Promega 公司;DNA marker(DL2000)由大连宝生物工程有限公司生产。

1.3 内皮抑素 mRNA 的转录表达

1.3.1 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 的光密度(OD)值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.75~1.90 之间(图 1)。

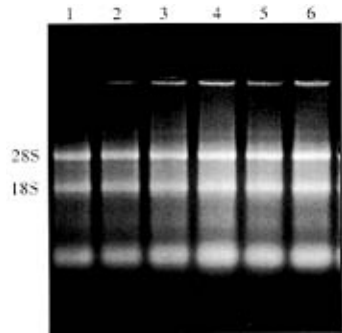


图 1 总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 1 1% agarose electrophoresis of total RNA

1, 2: Lung cancer tissue; 3, 4: Paracancerous tissue; 5, 6: Benign pulmonary tissue

1.3.2 引物设计 内皮抑素基因引物参照人内皮抑素基因序列(核酸序列 4200~4219 和 4432~4451)^[8],扩增产物为 252bp(GenBank 登录号 AF018081^[9])。β-actin 作为内参照标准,产物为 154bp^[10,11]。两者引物序列见表 1,由北京赛百盛生物工程公司合成。

表 1 RT-PCR 引物序列及扩增片段大小

Tab 1 Primers used in RT-PCR and the fragment size of PCR products

Gene	Primer sequence	Fragment size (bp)
Endostatin	5'-TGCAGGACCTGTACAGCATC-3'	252
	5'-ACGTCTCACAGTAGCTCTCG-3'	
β-actin	5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'	154
	5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'	

1.3.3 RT-PCR 建立 RT-PCR 扩增体系,共 25 μl,内皮抑素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 25 pmol。逆转录:逆转 48℃ 45 min,灭活 94℃ 2 min;PCR 循环:变性 94℃ 1 min,退火 55℃ 45 s,延伸 68℃ 45 s,共 35 次循环,最后 68℃ 终延伸 7 min。

1.3.4 RT-PCR 反应产物结果判读 取 8 μl 反应产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭显色,紫外灯下观察结果,以 DNA marker 判断片段大小,用 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 OD 值,并与同一样本的内对照 β-actin 光密度值进行比值定量。

1.3.5 统计学处理 t 检验、F 检验、秩和检验。

2 结果

2.1 肺组织中内皮抑素 mRNA 的转录表达 46 例肺癌患者的癌组织、癌旁组织及 14 例肺良性病变患者的肺良性病变肺组织中都可以检测到内皮抑素和 β -actin mRNA 的转录表达,产物大小分别为 252 和 154bp(图 2)。通过与 β -actin 内对照扩增条带 OD 值的比较,肺癌组织、癌旁组织及肺良性病变肺组织的比值定量分别为 0.872、0.717、0.611,经 F 检验三组间内皮抑素 mRNA 转录表达水平有非常显著的差异($P < 0.001$);两两比较:肺癌组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平显著高于癌旁肺组织和肺良性病变肺组织($P < 0.01$),癌旁肺组织亦显著高于肺良性病变肺组织($P < 0.01$)(表 2)。

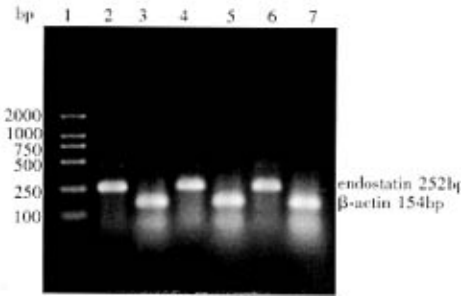


图 2 不同肺组织中内皮抑素和 β -actin mRNA 的 RT-PCR 电泳结果
Fig 2 The electrophoretic results of RT-PCR products of endostatin and β -actin mRNA in different pulmonary tissues
1: DNA marker; 2, 3: Lung cancer tissue; 4, 5: Paracancerous tissue; 6, 7: Benign pulmonary tissue

表 2 不同肺组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平的比较

Tab 2 Comparison of endostatin mRNA transcription expression in different lung tissues

Group	No. of cases	OD ratio $\bar{x} \pm s$	P
Lung cancer tissue	46	0.872 \pm 0.071	0.001
Paracancerous tissue	46	0.717 \pm 0.073	
Benign pulmonary tissue	14	0.611 \pm 0.026	

2.2 肺癌组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平与肺癌临床病理生理特征的关系 肺癌组织中内皮抑素 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($P < 0.05$),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)。

万方数据

表 3 肺癌组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平与肺癌临床病理生理特征的关系

Tab 3 The relation between endostatin mRNA transcription expression and clinical pathophysiological characteristics of lung cancer patients

Characteristic	No. of cases	OD ratio $\bar{x} \pm s$	P value
Sex			0.235
Male	34	0.864 \pm 0.073	0.690
Female	12	0.893 \pm 0.063	
Age			0.349
≥ 55	32	0.874 \pm 0.071	0.156
< 55	14	0.865 \pm 0.073	
Smoking history			0.335
Yes	29	0.861 \pm 0.066	0.793
No	17	0.890 \pm 0.075	
Location of the tumor			0.043
Central type	20	0.855 \pm 0.077	0.002
Peripheral type	26	0.885 \pm 0.064	
Lymph node metastasis			0.001
N0	25	0.881 \pm 0.072	0.003
N1-3	21	0.861 \pm 0.069	
Histological classification			0.001
Squamous cell carcinoma	21	0.878 \pm 0.054	0.003
Adenocarcinoma	21	0.868 \pm 0.090	
Adenosquamous cell carcinoma	4	0.854 \pm 0.018	
Size of primary tumor			0.002
T1+T2	32	0.886 \pm 0.071	0.002
T3+T4	14	0.840 \pm 0.061	
Metastasis			0.001
M0	40	0.884 \pm 0.064	0.001
M1	6	0.790 \pm 0.061	
Cell differentiation			0.001
Poor	21	0.833 \pm 0.059	0.003
Moderate-well	25	0.904 \pm 0.064	
P-TNM stage			0.003
I + II	20	0.906 \pm 0.057	0.003
III + IV	26	0.845 \pm 0.070	

3 讨论

内皮抑素基因定位于胶原 X Ⅷ 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,为胶原 X Ⅷ $\alpha 1$ 链基因序列的 4040~4591 位,共 552bp^[12,13],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^[14,15]。胶原 X Ⅷ 基因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。Musso 等^[16]研究发现,肝脏纤维化时胶原 X Ⅷ mRNA 的转录表达水平增高,肝癌组织中表达量最高。本研究发现,肺癌组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平显著高于癌旁肺

组织和肺良性病变肺组织,且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。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,其肺癌组织中内皮抑素 mRNA 转录表达水平就越低。

这些结果提示肺癌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,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,以对抗肿瘤细胞产生的血管内皮生长因子的促血管生成作用,达到肿瘤血管生成和抑制因子间的平衡。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的表达水平降低,而 Ohta 等^[17]利用 RT-PCR 法研究 90 例原发性肺癌时发现,血管内皮生长因子基因的表达水平与 P-TNM 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。

综上,本研究结果表明肺癌患者肺癌组织中存在内皮抑素 mRNA 转录表达水平的升高,这种升高与肺癌的发生、发展、远处转移和细胞分化不良有密切关系,采用 RT-PCR 法检测肺癌中内皮抑素基因的表达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 Zhou QH ed. Development of basic science study and clinical research on lung cancer. Beijing: Peking Science Press, 1999. 234-235. [周清华主编. 肺癌基础研究与临床治疗进展. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1999. 234-235.]
- 2 Wu Z, O'Reilly MS, Folkman J, et al. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236(3) : 651-654.
- 3 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *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. *Nature*, 1997, 390(6658) : 404-407.

- 5 Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. Angiogenic cytokines in serum and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2000, 25(6) : 570-576.
- 6 Strik HM, Schluesener HJ, Seid K, et al. Localization of endostatin in rat and human gliomas. *Cancer*, 2001, 91(5) : 1013-1019.
- 7 Liu Y, Zhou QH, Zhang SF, et al. Expression of endostatin and its relationship with the clinical pathophysiological characteristics in non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer*, 2002, 5(6) : 447-450. [刘颖, 周清华, 张尚福, 等. 内皮抑素在非小细胞肺癌中的表达及其与肺癌临床病理生理特征的关系. *中国肺癌杂志*, 2002, 5(6) : 447-450.]
- 8 Wu P, Yonekura H, Li H, et al. Hypoxia down-regulates endostatin production by human microvascular endothelial cells and pericytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(5) : 1149-1154.
- 9 Saarela J, Ylikarppa R, Rehn M, et al. Complete primary structure of two variant forms of human type X VII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. *Matrix Biol*, 1998, 16(6) : 319-328.
- 10 Noguchi S, Aihara T, Motomura K, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol*, 1996, 148(2) : 649-656.
- 11 Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, et al. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(18) : 6133-6137.
- 12 Mazzanti CM, Tandle A, Lorang D, et al. Early genetic mechanisms underlying the inhibitory effects of endostatin and fumagillin on human endothelial cells. *Genome Res*, 2004, 14(8) : 1585-1593.
- 13 Rehn M, Hintikka E, Pihlajaniemi T. Primary structure of the alpha 1 chain of mouse type X VIII collagen, partial structure of the corresponding gene, and comparison of the alpha 1 (X VIII) chain with its homologue, the alpha 1 (X V) collagen chain. *J Biol Chem*, 1994, 269(19) : 13929-13935.
- 14 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(9) : 4802-4807.
- 15 Qing ZR, Tang AF, Jiang DG, et al. Cloning and expression of human Endostatin cDNA in HT1080 cells. *Bulletin Hunan Med Univ*, 2002, 27(5) : 393-396. [卿志荣, 唐爱发, 蒋冬贵, 等. 人 Endostatin cDNA 的克隆及其在 HT1080 细胞中的表达. *湖南医科大学学报*, 2002, 27(5) : 393-396.]
- 16 Musso O, Rehn M, Saarela J, et al. Collagen X VIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology*, 1998, 28(1) : 98-107.
- 17 Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res*, 1996, 2(8) : 1411-1416.

(收稿: 2004-10-26 修回: 2005-01-04)

(本文编辑 张世雯)