

基因及其蛋白在肿瘤中的表达

DOI: 10.11699/cyxb20130812

促凋亡基因程序化死亡因子 5 在非小细胞肺癌中的表达及意义

赵 青¹, 张明川², 梅同华¹

(1. 南昌大学第一附属医院呼吸科, 江西 330006; 2. 重庆市铜梁县人民医院呼吸内科, 重庆 402560)

【摘要】目的:研究程序化死亡因子 5(programmed cell death 5, PDCD5)基因在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达,探讨其在 NSCLC 中发生、发展中的作用。**方法:**随机选取 2011 年 7 月至 12 月南昌大学第一附属医院胸外科手术切除并经病理证实为 NSCLC 的 56 例患者的癌组织及癌旁组织标本,采用免疫组化及 real-time PCR 方法研究在 NSCLC 及癌旁组织中 PDCD5 蛋白和 mRNA 的表达。**结果:**免疫组化结果显示,癌旁肺组织中 PDCD5 阳性表达率高于 NSCLC 组织($\chi^2=16.406$, $P=0.000$)。与抽烟情况、肿瘤分化程度、肿瘤 TNM 分期及有无淋巴结转移密切相关,差异均有统计学意义,并随抽烟、分化程度的下降、TNM 分期的升高及淋巴结转移,其表达随之下降,同时染色强度也减弱。Real-time PCR 结果,PDCD5 mRNA 相对表达量在肺癌组织为 0.397 ± 0.266 ,癌旁组织为 0.807 ± 0.124 ,差异有统计学意义($t=10.795$, $P=0.000$)。**结论:**在 NSCLC 中 PDCD5 蛋白及 mRNA 表达均下调,在肺癌的发生、发展中可能起抑制作用。

【关键词】程序化死亡因子 5;非小细胞肺癌;免疫组化;实时荧光定量 PCR

【中国图书分类法分类号】R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-16

Expressions and significances of promoting apoptosis gene programmed cell death 5 in non-small cell lung cancer

ZHAO Qing¹, ZHANG Mingchuan², MEI Tonghua¹

(1. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Nanchang University;

2. Department of Respiratory Medicine, Tongliang People's Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective: To investigate expressions of programmed cell death 5(PDCD5) in non-small cell lung cancer(NSCLC) and to explore its role in NSCLC occurrence and development. **Methods:** Cancer tissue and adjacent cancer tissue samples of 56 patients with NSCLC who received thoracic surgery and pathology confirmation from July 2011 to December in the first affiliated hospital of Nanchang University were collected. Expressions of PDCD5 protein and mRNA were evaluated by immunohistochemistry and real-time PCR in NSCLC and adjacent cancer tissues. **Results:** Immunohistochemical results showed that PDCD5 positive expression rate was significantly higher in adjacent cancer tissues than in NSCLC tissues($\chi^2=16.406$, $P=0.000$). PDCD5 positive expression rate was closely related with smoking, tumor differentiation, tumor TNM stage and lymph node metastasis, with statistically significant differences. PDCD5 positive expression rate was decreased with the decline of smoking and differentiation degree and the elevation of TNM staging and lymph node metastasis; meanwhile, intensity of staining was also weaken. Real-time PCR results showed that PDCD5 mRNA relative expression was 0.397 ± 0.266 in NSCLC tissues and 0.807 ± 0.126 in adjacent tissues with statistically significant differences($t=10.795$, $P=0.000$). **Conclusions:** Expressions PDCD5 protein and mRNA are down-regulated, which may play an inhibitory role in NSCLC occurrence and development.

【Key words】programmed cell death 5; non-small cell lung cancer; immunohistochemistry; real-time PCR

2011年全球癌症统计数据显示^[1],全球新发肺癌患者中肺癌占 13%,约 160 万人,死亡患者中肺癌占 23%,约 140 万人。非小细胞肺癌(non-small cell

lung cancer, NSCLC) 占所有肺癌病例的 80%~85%,是肺癌死亡病例的主要组成部分^[2]。程序化死亡因子 5(programmed cell death 5, PDCD5)基因是由北京大学人类疾病基因中心 1999 年在国际上首先报道的 1 个人类新基因,后经国际人类基因命名委员会建议,命名 PDCD5,是一种具有促进凋亡和抑制增殖效应的重要基因^[3]。本研究通过免疫组化、real-time PCR 技术与方法研究 NSCLC 中 PDCD5

作者介绍:赵 青, Email: qingcao451708@126.com,

研究方向:肺部肿瘤。

通讯作者:梅同华, Email: mtonghua@163.com。

基金项目:江西省教育厅科学技术研究资助项目(编号:GJJ 11350);

重庆市医学科研计划资助项目(编号:2011-2-479)。

的表达,探讨 PDCD5 在肺癌发生、发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

采用完全随机抽样法随机选取 2011 年 7 月至 12 月南昌大学第一附属医院胸外科手术切除并经病理证实为 NSCLC 的 56 例患者的癌组织及癌旁组织标本(距肿瘤边缘 > 5 cm),所有患者采集标本前均未接受化疗、放疗。56 例 NSCLC 中,男性 39 例,女性 17 例;年龄 35~76 岁,平均年龄 54.8 岁,大于或等于 65 岁者 20 例,小于 65 岁者 36 例;抽烟者 37 例,不抽烟者 19 例;按病理类型,鳞癌 33 例,腺癌 23 例;按组织学分级,高分化 17 例,中分化 19 例,低分化 20 例;按 TNM 分期,Ⅰ期 23 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 14 例;按病理学或影像学检查证实淋巴结转移者 21 例,无淋巴结转移者 35 例。本研究获得南昌大学第一附属医院伦理委员会的批准,并获得患者的知情同意。

1.2 主要试剂

小鼠抗人 PDCD5 单克隆抗体购于北京宝赛生物技术有限公司,羊抗鼠多克隆抗体购于福州迈新公司,SP 试剂盒和 DAB 免疫显色试剂盒均购于北京中杉金桥生物有限公司。总提 RNA 试剂 Trizol 试剂,逆转录试剂盒购于 Invitrogen 公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 GeneCopoeia 公司,引物均由上海英骏公司生物技术有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化 一抗为小鼠抗人 PDCD5 单克隆抗体,质量浓度为 0.8 g/L,二抗为羊抗小鼠多克隆抗体,采用常规免疫组化 SP 法,PDCD5 抗体浓度为 1:100,以 PBS 液缓冲剂代替一抗作为阴性对照,以已知阳性切片作为阳性对照。各步骤均严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.2 Real-time PCR 分别提取置于 RNA 保存液中的肺癌及癌旁正常组织中总 RNA,检验 RNA 纯度及完整性,再逆转录合成 cDNA,以合成的 cDNA 为模板,配置 Real-time PCR 反应体系。PDCD5 上游引物:5'-CTGAGCAGACAGAGG-CTGGC-3',下游引物:5'-TTTCTGCTTCCTGTGCTTTG-3';GADPH 上游引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。反应条件:95 ℃ 10 min→95 ℃ 10 s→55 ℃ 20 s→72 ℃ 32 s,40 个循环→95 ℃ 15 s→60 ℃ 1 min→95 ℃ 15 s,由 ABI7500PCR 仪器自动分析结果,记录扩增曲线、溶解曲线及各样本的循环阈值(cycle threshold,Ct)值。

1.4 结果判断

1.4.1 免疫组化结果判定 在高倍镜下,对每张切片随机选择 5 个视野,双盲法观察切片。每个视野计数 20 个细胞,共计 100 个。凡是细胞浆内出现棕黄色颗粒的细胞均为阳性细胞。根据阳性细胞所占百分数定为 0~3 分,共 4 级:0% 为 0 分,<10% 为 1 分,10%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分。根据细胞染色深浅定为 0~3 分,共 4 级:0 分为胞浆上无棕黄色颗粒,与背景无区别;1 分为细胞质上有淡棕黄色颗粒,明显高于背景底色,也明显高于阴性对照;2 分为细胞质上有染色较

清晰的棕色颗粒介于强弱之间;3 分为细胞质上有大量的深棕色颗粒,阳性染色强性。综合 2 项评分之和,判定方法定为 4 级标准。0 分为阴性(-),2 分为弱阳性(+),3~4 分为中等强度阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.4.2 Real-time PCR 结果 采用相对定量法比较 mRNA 的表达差异,以 GADPH 为内参,通过 Ct 值显示,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表达目的基因 mRNA 的相对表达量, $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{实验组}) - \Delta CT(\text{对照组})$, $\Delta CT(\text{实验组}) = CT(\text{目的基因}) - CT(\text{内参基因})$ 。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若数据符合正态分布,方差齐性时,采用两样本 *t* 检验,若方差不齐时采用非参数检验;计数资料数据用率表示,率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 PDCD5 基因的蛋白水平检测

免疫组化结果显示,肺癌组织中 PDCD5 蛋白阳性表达率为 71.4% (40/56),相应的癌旁组织阳性表达率为 92.9% (52/56),差异有统计学意义 ($P < 0.005$);PDCD5 在癌组织中表达与患者的性别、年龄、肿瘤病理类型无关 ($P > 0.05$),而与抽烟情况、肿瘤分化程度、肿瘤 TNM 分期及有无淋巴结转移密切相关,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1),并随抽烟、分化程度的下降、TNM 分期的升高及淋巴结转移,其表达随之下降,染色强度也随之减弱。PDCD5 主要位于细胞质中,为棕黄色颗粒,在高分化癌中表达较强(图 1),低分化中表达较弱(图 2)。

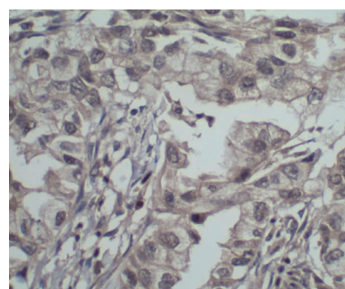


图 1 PDCD5 在高分化组中的表达 (SP, 400 ×)

Fig.1 Expressions of PDCD5 in well differentiated groups (SP, 400 ×)

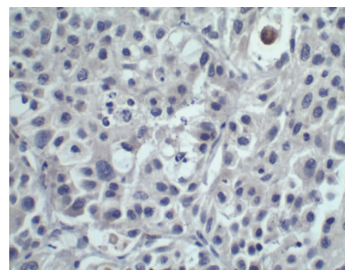


图 2 PDCD5 在低分化组中的表达 (SP, 400 ×)

Fig.2 Expressions of PDCD5 in poorly differentiated groups (SP, 400 ×)

表 1 PDCD5 蛋白在 NSCLC 中的表达

Tab.1 Expressions of PDCD5 protein in NSCLC

分组		例数(n)	PDCD5 的表达强度				阳性率(%)	χ^2 值	P 值
			-	+	++	+++			
性别	男	39	11	7	9	12	71.79	0.008	0.927
	女	17	5	3	3	6	70.59		
年龄(岁)	≥ 65	20	6	3	4	7	70.00	0.031	0.860
	< 65	36	10	7	8	11	72.22		
抽烟情况	抽烟	37	14	8	6	9	62.16	4.588	0.032
	不抽烟	19	2	2	6	9	89.47		
病理类型	鳞癌	33	11	6	6	10	66.67	0.893	0.345
	腺癌	23	5	4	6	8	78.26		
分化程度	高分化	17	1	1	5	10	94.12	11.660	0.003
	中分化	19	4	3	5	7	78.95		
	低分化	20	11	6	2	1	45.00		
分期(TNM)	I	23	2	3	6	12	91.30	13.250	0.001
	II	19	5	4	5	5	73.68		
	III	14	9	3	1	1	35.71		
淋巴结转移	转移	21	10	7	3	1	52.38	5.973	0.015
	无转移	35	6	3	9	17	82.86		

2.2 PDCD5 基因 mRNA 水平的表达检测

Real-time PCR 结果,肺癌组织中 PDCD5 mRNA 相对表达量为 (0.397 ± 0.266) , 癌旁组织表达为 (0.807 ± 0.124) , 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 2。图 3 为溶解曲线, PDCD5 基因荧光定量 PCR 产物的溶解曲线峰值在 83.8°C , 在反应曲线的其他位置未见波形, 提示扩增产物为特异性产物, 无引物二聚体及非特异性产物产生。

表 2 PDCD5 mRNA 在 NSCLC 及癌旁组织中的表达

Tab.2 Expressions of PDCD5 mRNA in NSCLC and adjacent tissues

组织	例数(n)	mRNA 相对表达 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	t 值	P 值
癌组织	56	0.397 ± 0.266	10.795	0.000
癌旁组织	56	0.807 ± 0.124		

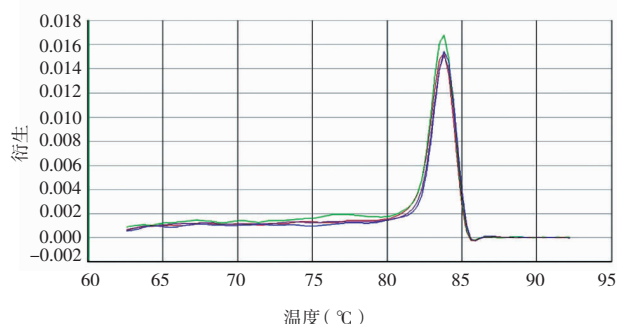


图 3 抑癌基因 PDCD5 real-time PCR 产物的溶解曲线
(温度: 83.8°C)

Fig.3 Dissociation curves of real-time PCR products of tumor suppressor gene PDCD5 (temperature: 83.8°C)

3 讨论

PDCD5 定位于染色体 19q12-q13.1, 包括 6 个外显子和 5 个内含子, 其外显子 6 可能是一个与促凋亡活性密切相关的功能结构域。该基因进化保守, 在人体 50 多种组织中均有表达, 参与调控细胞凋亡过程^[3]。其异常表达与人类多种疾病有关, Yang 等^[4]应用免疫组化、real-time PCR、免疫荧光等方法在蛋白和 mRNA 水平分别检测了胃癌及正常胃组织中的表达, 发现无论是在 mRNA 水平还是蛋白水平, PDCD5 在胃癌组织中明显低表达, 且与患者的预后有关, 表明 PDCD5 在胃癌中的表达水平对胃癌的早期诊断、判断胃癌的恶性程度及预后有重要意义。另外也有在前列腺癌^[5]、软骨肉瘤^[6]、卵巢上皮癌^[7]等方面的研究, 表明 PDCD5 表达失调与肿瘤有关, Wang 等^[8]通过体外研究表明, PDCD5 在多种肿瘤细胞系中均可促进肿瘤细胞发生凋亡, 并且对放、化疗起协同作用。PDCD5 是凋亡的增强剂, 而不是诱导剂^[9-12]。

本研究采用了免疫组化的方法在蛋白水平表明 PDCD5 阳性表达率在癌旁组织显著高于肺癌组织, 差别有统计学意义, 与相关研究结果一致^[4-7]。同时也采用了 real-time PCR 从 mRNA 水平研究 PDCD5 在癌旁组织及肺癌组织中的表达, 肺癌组织 mRNA 相对表达量为 0.397 ± 0.266 , 癌旁组织为 $0.807 \pm$

0.124。Spinola等^[13]在德国和意大利人群中研究 PDCD5 与肺癌及吸烟人群危险程度及预后的相关性研究中,肺腺癌组织中 PDCD5 mRNA 表达水平比正常肺组织低 2.4 倍,本实验与之相符。表明 PDCD5 在 NSCLC 而发生中起抑癌基因作用,由表 1 得知, PDCD5 在组织分级、临床分期及淋巴结转移过程中蛋白表达率差异均有统计学意义,且随肺癌病理分级降低、TNM 分期的上升及淋巴结转移而下降,同时染色强度也会随之减弱,表明 PDCD5 对 NSCLC 的恶性程度及远处转移可能有抑制作用。目前认为,吸烟是肺癌最主要的危险因素^[14]。本研究中,抽烟患者 PDCD5 阳性率低于非抽烟患者,表达强度也随之降低,表明 PDCD5 可用于对高危人群筛查。

由于肺癌早期缺乏特异性症状,大部分患者就诊时已是晚期,因此对 PDCD5 与 NSCLC 关系研究具有重要意义。实验表明,PDCD5 在 NSCLC 中的蛋白及 mRNA 水平的表达均下降,提示 PDCD5 可能参与肺癌早期的发生,可作为肺癌的恶性程度、局部浸润、远处转移及危险因素评估的指标。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 6(1): 69-90.
- [2] Molina J R, Yang P, Cassivi S D, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship[J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(5): 584-594.
- [3] Liu H, Wang Y, Zhang Y, et al. TFAR19, a novel apoptosis related gene cloned from human leukemia cell line TF-1 could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254(1): 203-210.
- [4] Yang Y H, Zhao M, Li W M, et al. Expression of PDCD5 gene involves in regulation of apoptosis in GC cells[J]. *Apoptosis*, 2006, 11(6): 993-1001.
- [5] Du Y J, Xiong L, Zheng S B, et al. Reduced expression of programmed cell death 5 protein in tissue of human prostate cancer[J]. *Chin Med Sci J*, 2009, 24(4): 241-245.
- [6] Chen C B, Zhou H, Ma Q J, et al. Prognostic significance of down-regulated expression of programmed cell death 5 in chondrosarcoma[J]. *J Surg Oncol*, 2010, 102(7): 838-843.
- [7] Zhang X, Wang X X, Zhang L N, et al. Clinical and prognostic significance of lost or decreased PDCD5 expression in human epithelial ovarian carcinomas[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(2): 353-358.
- [8] Wang Y, Li D, Fan H, et al. Cellular uptake of exogenous human protein[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34): 24803-24817.
- [9] Yin A, Jiang Y, Zhang X, et al. Transfection of PDCD5 sensitizes colorectal cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in vitro and in vivo[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1-3): 120-126.
- [10] Shi L, Song Q, Zhang Y, et al. Potent antitumor activities of recombinant human PDCD5 protein in combination with chemotherapy drugs in K562 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 224-230.
- [11] Chen C, Zhou H, Xu L, et al. Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcomas to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(7): 805-813.
- [12] 刘磊玉, 赵彬佳慧, 秦 玮, 等. 转染 PDCD5 基因促进顺铂诱导前列腺癌细胞的凋亡作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(1): 32-35.
- [13] Liu L Y, Zhaobin J H, Qin W, et al. Transfection of PDCD5 promotes effects of Cisplatin on apoptosis-inducing of prostate cancer cells[J]. *Cancer research on Prevention and Treatment*, 2012, 39(7): 32-35.
- [14] Spinola M, Meyer P, Kammerer S, et al. Association of the PDCD5 locus with lung cancer risk and prognosis in smokers[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(11): 1672-1678.
- [14] Prasad R, Ahuja R n C, Singhal S, et al. A case-control study of bidi smoking and bronchogenic carcinoma[J]. *Ann Thorac Med*, 2010, 5(4): 238-241.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

欢迎赐稿、订阅

网址: cyxb.alljournals.ac.cn

邮发代号: 78-132