

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001860

肾透明细胞癌尿液中锌指蛋白转录因子 4 的表达及临床意义

杨 林,熊 波,罗 军,王洪志,张成果,文 爽

(重庆市璧山区人民医院泌尿外科,重庆 402760)

【摘要】目的:探讨肾透明细胞癌尿液脱落细胞中锌指蛋白转录因子 4(Krüppel-like factor 4, KLF4)的表达及临床意义。**方法:**分别收集 58 例术后病理证实为肾透明细胞癌的肾癌患者及 40 例健康志愿者尿液。采用 RT-PCR 技术检测 KLF4 mRNA 的表达率,Western blot 检测 KLF4 蛋白的表达率;分析 KLF4 因子的表达与肾透明细胞癌患者临床病理参数的关系。**结果:**肾透明细胞癌患者尿液脱落细胞 KLF4 表达明显下调,肾透明细胞癌组 KLF4 表达阴性率为 87.9%(51/58),表达阳性率仅 12.1%;而对照组 KLF4 表达阴性率为 7.50%(3/40),表达阳性率为 92.5%,2 组表达阴性率比较有统计学差异($P<0.05$)。肾癌患者中 KLF4 表达下调与患者年龄($\chi^2=0.369, P=0.544$)、性别($\chi^2=0.705, P=0.401$)、肿瘤大小($\chi^2=3.481, P=0.062$)、肾透明细胞癌患者的临床分期($\chi^2=0.762, P=0.859$)、组织分化程度($\chi^2=0.064, P=0.996$)、淋巴结转移($\chi^2=0.301, P=0.583$)均无关。**结论:**检测尿液 KLF4 因子可能有助于肾透明细胞癌的诊断及术后监测。RT-PCR 为临床可行的检测方法。

【关键词】肾透明细胞癌;Krüppel 样转录因子类;早期诊断;术后监测;RT-PCR

【中图分类号】R730.23;R737.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-09-13

Expression and clinical significance of KLF4 in the urine of patients with clear cell renal cell carcinoma

Yang Lin, Xiong Bo, Luo Jun, Wang Hongzhi, Zhang Chengguo, Wen Shuang

(Department of Urology, People's Hospital in Bishan District)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and clinical significance of Krüppel-like factor 4 (KLF4) in the urine exfoliated cells of patients with clear cell renal cell carcinoma (CCRCC). **Methods:** Urine samples were collected from 58 patients pathologically confirmed to have CCRCC after operation and 40 healthy volunteers. The expression rate of KLF4 mRNA was determined by RT-PCR, and the expression rate of KLF4 protein was determined by Western blot. The relationship between the expression of KLF4 and the clinicopathological parameters of CCRCC patients was analyzed. **Results:** The expression of KLF4 in the urine exfoliated cells of CCRCC patients was down-regulated significantly. In the CCRCC group, the negative rate of KLF4 expression was 87.9%(51/58), while the positive rate of its expression was only 12.1%; in the control group, the negative rate of KLF4 expression was 7.50%(3/40), while the positive rate of its expression was 92.5%; there was a significant difference in the negative rate of KLF4 expression between the two groups ($P<0.05$). The down-regulation of KLF4 in CCRCC patients was not associated with age ($\chi^2=0.369, P=0.544$), sex ($\chi^2=0.705, P=0.401$), tumor size ($\chi^2=3.481, P=0.062$), clinical stage ($\chi^2=0.762, P=0.859$), degree of tissue differentiation ($\chi^2=0.064, P=0.996$), and lymph node metastasis ($\chi^2=0.301, P=0.583$). **Conclusion:** The detection of urine KLF4 may be helpful to the early diagnosis and postoperative monitoring of CCRCC, and RT-PCR is a feasible detection method in clinical practice.

【Key words】clear cell renal cell carcinoma; Krüppel-like factor 4; early diagnosis; postoperative monitoring; RT-PCR

肾透明细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)起源于肾小管上皮细胞,在我国发病率仅次于膀胱癌,位

作者介绍:杨 林,Email:284835248@qq.com,

研究方向:泌尿系肿瘤的诊治。

通信作者:熊 波,Email:1916404726@qq.com。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181012.1606.008.html

(2018-10-17)

居泌尿系肿瘤第二位。肾癌起病较为隐匿,临床上大部分肾癌通过体检偶然发现,而因“腰痛、血尿、腹部肿块”肾癌三联征发现的肾癌病例已越来越少^[1-2],且往往已发展至晚期。目前手术切除仍是治疗肾癌的最佳手段,但是仍有高达 30%~40% 的患者出现转移或复发^[3]。因此,寻找一种便捷、可靠的肾癌早

期诊断和术后复发监测的方法极为重要。研究表明,EGFR^[4]、HIF-1 α ^[5]等标志物在肾癌早期诊断及预后判定中具有一定的意义,但这些标志物的特异性和灵敏性仍有较明显欠缺。锌指蛋白转录因子 4 (Krüppel-like factor 4, KLF4) 是一种含有锌指结构的转录因子,与多种肿瘤的发生发展及预后都密切相关,但是关于 KLF4 在肾透明细胞癌尿液中的表达情况,目前尚不明确,国内外也无相关报道。研究发现^[6],KLF4 在肾透明细胞癌组织中的表达明显低于癌旁组织及正常组织,本研究拟通过对肾透明细胞癌患者尿液中 KLF4 因子进行检测,探讨尿液 KLF4 因子对肾透明细胞癌早期诊断及术后监测中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2016 年 8 月 5 日至 2018 年 1 月 31 日,XX 医院泌尿外科住院手术治疗的肾透明细胞癌患者 58 例,以及常规体检均正常的 40 例健康志愿者尿液,标本收集均经伦理委员会认可并征得研究对象同意。纳入标准:所有肾癌患者肿瘤均位于单侧;手术前未行放、化疗;所有肾癌患者均行外科手术;术后病理证实为均肾透明细胞癌(WHO 肾癌病理组织学分型)。排除标准:急性炎症,血管异常增生,自身免疫性疾病患者;肝肾功能障碍患者;合并有其他肿瘤患者;纳入的患者肿瘤直径 1.0~13.0 cm,平均直径(4.9 $\pm$ 2.1) cm。男性 41 例,女性 17 例,年龄为 33~81 岁,平均年龄(58.4 $\pm$ 4.6)岁。肾癌临床分期(2010 年第 7 版美国癌症联合委员会,AJCC):I 期 8 例,II 期 23 例,III 期 17 例,IV 期 10 例;转移情况(AJCC):12 例发现淋巴结转移,其余 46 例未见淋巴结转移。Furhman 肾癌组织学分级:G1 级 9 例,G2 级 32 例,G3 级 12 例,G4 级 5 例。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)、PCR 试剂盒(大连Takara 公司)。KLF4 兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥公司)。PVDF 膜(美国 Millipore 公司),胎牛血清、RPMI1640(美国 Gibco 公司),5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL 荧光检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

1.3 尿液处理

收集每个研究对象的新鲜清洁中段晨尿 100~150 mL,立即经 3 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 沉淀脱落细胞(肉眼血尿加入 0.5 mL 1% Triton $\times$ 100 先溶血再行离心)。用冷 PBS 洗涤尿沉渣 2、3 次,收集留取尿液沉渣 0.1~0.2 mL 于 1.5 mL 离心管中,置-80 $^{\circ}$ C 冻存备用或 Trizol 预处理冻存。所有标本冻存不

超过 7 d。

1.4 RT-PCR 分析

按 Trizol 试剂盒说明书提取尿液脱落细胞总 RNA,定量后逆转录,逆转录产物进行 PCR 反应,以 β -actin 为内参照。KLF4 引物序列:上游为 5'-CGGGAAGGGAGAAGACACT-3',下游为 5'-GAGTTCCTCAGCCCAACG-3',产物长度 62 bp。 β -actin 引物序列:上游为 5'-CAACGCCAAACTCTCCCTC-3',下游为 5'-ATCGGCAAAGGCGAGGCTCTG-3',产物长度为 272 bp。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 50 s,共 35 次循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 Western blot 分析

收集尿液脱落细胞 4 $\times$ 10⁶ 个,4 $^{\circ}$ C 加入 200 μ L 裂解液中作用 30 min,15 000 g 离心 30 min,取上清,Bradford 法定量蛋白。取 10 μ g 蛋白样品于凝胶上样孔内,电泳 3 h,然后在 250 mA 恒流下将蛋白质转移至 PVDF 膜。用含 5% 脱脂牛奶的 TBS-T (含有 0.1% Tween-20 的 TBS) 封闭 1 h,按 1:400 稀释一抗,将膜与一抗置于塑料袋中封闭,4 $^{\circ}$ C 过夜。TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温缓摇 1 h,ECL 法显色,于凝胶图像分析系统曝光,Image J 软件分析图像。

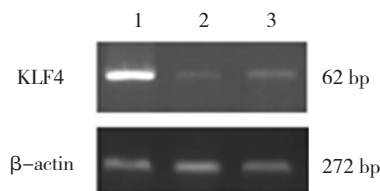
1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件处理实验数据。每次至少观察 3 个样本,计数资料以百分数表示,采用卡方检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

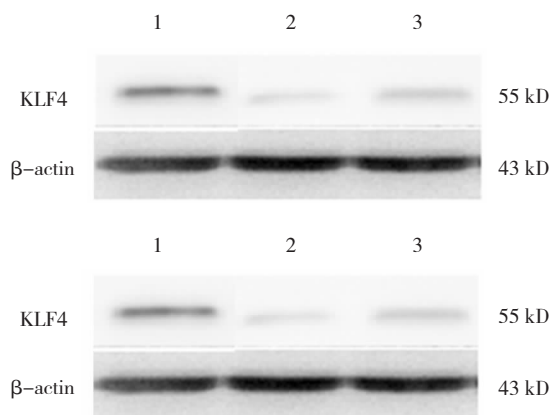
2.1 肾透明细胞癌患者及健康志愿者尿液脱落细胞 KLF4 mRNA、蛋白的表达

KLF4 的基因及蛋白的表达呈一致性。肾透明细胞癌患者尿液脱落细胞 KLF4 表达阴性率为 87.9%(51/58),表达阳性率仅 12.1%(7/58);而健康志愿者尿液脱落细胞 KLF4 表达阴性率为 7.50%(3/40),表达阳性率为 92.5%(37/40)。肾癌组 KLF4 表达阴性率明显高于对照组,2 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。因本组 58 例患者均术后病理证实为肾透明细胞癌,以术后病理诊断作为金标准,KLF4 检查的灵敏度为 87.9%,特异度为 100.0%(图 1、图 2)。



1: 为正常人尿液标本;2、3: 肾癌患者尿液标本

图 1 KLF4 mRNA 在正常人及肾癌患者尿液脱落细胞中的表达



1: 正常人尿液标本; 2, 3: 肾癌患者尿液标本

图 2 KLF4 蛋白在正常人及肾癌患者尿液脱落细胞中的表达

2.2 肾透明细胞癌患者尿液脱落细胞 KLF4 表达与临床病理特征的关系

不同年龄、性别、肿瘤大小肾癌患者尿液脱落细胞 KLF4 表达率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。不同组织学分级、不同临床分期及有无淋巴转移, 肾癌患者尿液脱落细胞 KLF4 表达强度比较, 差异也无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 1 不同年龄、性别、肿瘤大小的肾癌患者尿液 KLF4 表达率比较

分组	例数	KLF4 (n, %)		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
年龄 (岁)					
< 60	19	3 (15.8)	16 (84.2)	0.369	0.544
≥ 60	39	4 (10.3)	35 (89.7)		
性别					
男	41	4 (9.8)	37 (90.2)	0.705	0.401
女	17	3 (17.6)	14 (82.4)		
肿瘤直径 (cm)					
< 5	42	3 (7.1)	39 (92.9)	3.481	0.062
≥ 5	16	4 (25.0)	12 (75.0)		

表 2 不同病理特征肾癌患者尿液 KLF4 表达率比较

病理特征	例数	KLF4 (n, %)		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
组织分级					
G1	9	1 (11.1)	8 (88.9)	0.762	0.859
G2	32	3 (9.4)	29 (90.6)		
G3	12	2 (16.7)	10 (83.3)		
G4	5	1 (20.0)	4 (80.0)		
临床分期					
I	8	1 (12.5)	7 (87.5)	0.064	0.996
II	23	3 (13.0)	20 (87.0)		
III	17	2 (11.8)	15 (88.2)		
IV	10	1 (10.0)	9 (90.0)		
淋巴转移					
有	12	2 (16.7)	10 (83.3)	0.301	0.583
无	46	5 (10.9)	41 (89.1)		

3 讨论

大多数肾癌为体检偶然发现, 早期无明显症状, 当出现“血尿、腰痛、腹部肿块”三联征时, 30%~40% 的患者已出现转移征象, 组织学分级也将快速恶化^[7]。手术切除仍是治疗肾癌的最佳手段, 但是仍有高达 30%~40% 的患者出现转移或复发。目前肾癌的临床诊断、术后复查主要依靠影像学检查, 尚无更加简便快捷的方法投入临床应用。Morrissey 等^[8]研究发现, 尿液中的脂滴包被蛋白-2 (perilipin-2, PLIN2) 和水通道蛋白-1 (aquaporin-1, AQP1) 在诊断肾透明细胞癌及乳头状细胞癌具有极高灵敏度和特异度, 提示尿液中的一些特异生物标志物可能有助于肾癌进行早期筛查及术后监测。

KLF4 是一种含有锌指结构的转录因子, 又称胃肠富集 KLF, 在人体多种组织中广泛存在; 可参与调控细胞增殖、分化、凋亡等多种细胞的生物学行为, 在不同组织中可与不同的靶基因相互作用, 发挥抑癌或促癌作用^[9-10]。有研究表明 KLF4 在肾透明细胞癌组织中的表达明显低于癌旁组织以及正常组织^[6], 但与肾透明细胞癌患者尿液脱落细胞的关系国内外还未见相关研究。

本研究结果显示, 肾透明细胞癌患者尿液中 KLF4 基因和蛋白水平的表达率具有一致性, 即同一患者尿液脱落细胞 KLF4 mRNA 与蛋白同时下调, 两者的表达率均明显低于对照组, 且与肿瘤的临床分期、组织分化程度及淋巴结转移无相关性。提示 KLF4 可能是肾透明细胞癌患者尿液中的敏感指标, 其表达缺失或下调可能参与了肾透明细胞癌的发生发展, 促进癌细胞的增殖, 导致肾透明细胞癌患者预后不良。KLF4 表达下调与肾透明细胞癌患者的临床分期、组织分化程度、淋巴结转移均无关, 表明 KLF4 表达异常在肾癌的早期阶段即可检出, 且 KLF4 检查的灵敏度、特异度均较高, 可能是肾癌早期诊断的有效检测指标。

本研究发现, RT-PCR 与 Western blot 两种方法检测肾透明细胞癌患者尿液脱落细胞中 KLF4 表达结果一致, 而 RT-PCR 已广泛应用于临床检验, 因此可选择该方法进行检测。由于 mRNA 极易被降解, 目前研究均采用实时提取 mRNA 的方法以获得高质量的 mRNA, 因标本量较大, 预处理和保存问题成为该技术转为临床应用的关键。研究发现^[11]: -80 ℃低温冻存尿标本 7 d 或 Trizol 预处理冻存均对提取尿液沉渣细胞 RNA 数量和质量无影响。本

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001920

脾脏肿瘤与非肿瘤性病变的 CT 鉴别

何 双,冯 晴,张 竹,文 明

(重庆医科大学附属第一医院放射科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨脾脏肿瘤与非肿瘤性病变的 CT 表现及鉴别应用。**方法:**回顾性分析 69 例经临床确诊为脾脏病变的 CT 影像学资料,总结肿瘤性与非肿瘤性病灶影像特征及伴随征象,并采用卡方检验分析相关数据。**结果:**69 例脾脏病变中,肿瘤性病变 44 例,边界不清者 31.8%,出现包膜下积液者 4.5%,出现腹膜增厚者 2.3%;非肿瘤性病变 25 例,边界不清者 56.0%,出现包膜下积液者 60.0%,出现腹膜增厚者 24.0%,脾脏肿瘤与非肿瘤性病变在三者的影像表现均有统计学差异($P<0.05$)。**结论:**CT 可较清晰地显示脾脏病灶,通过对病灶的边界及伴随征象的分析,有利于对脾脏肿瘤与非肿瘤性病变的鉴别。

【关键词】脾脏肿瘤;脾脏非肿瘤性病变;计算机断层摄影术

【中图分类号】R445.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-22

Differentiation between tumorous and non-tumorous lesions in the spleen on computed tomography

He Shuang, Feng Qing, Zhang Zhu, Wen Ming

(Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the manifestations of tumorous and non-tumorous lesions in the spleen on computed tomography (CT) and the application of CT in their differentiation. **Methods:** A retrospective analysis was carried out on the CT data of 69 patients diagnosed with splenic lesions; the imaging characteristics of tumorous and non-tumorous lesions and their accompanying signs were summarized; the chi-square test was used to analyze related data. **Results:** Among the 69 patients with splenic lesions, 44 had tumorous lesions, and 25 had non-tumorous lesions,

作者介绍:何 双, Email: youyouyisheng@163.com,

研究方向:腹部影像诊断。

通信作者:文 明, Email: 13883669699@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.1016.036.html>
(2018-11-06)

研究结果与该观点一致。

综上所述,肾透明细胞癌患者尿液脱落细胞中 KLF4 表达下调,其低表达可能与肾透明细胞癌的发生发展有关。检测尿液脱落细胞 KLF4 因子可能有助于肾透明细胞癌早期诊断及术后监测。RT-PCR 为临床可行的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Lee CT, Katz J, Fearn PA, et al. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information[J]. Urol Oncol, 2002, 7(4): 135-140.
- [2] Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2003, 44(2): 226-232.
- [3] 赵 丽, 王 萍. 白介素-35 与心血管疾病关系研究进展[J]. 广西医学, 2017, 39(1): 84-86.
- [4] Dias F, Teixeira AL, Santos JI, et al. Renal cell carcinoma development and miRNAs: a possible link to the EGFR pathway[J]. Pharma-

cogenomics, 2013, 14(14): 1793-1803.

- [5] Lessi F, Mazzanti CM, Tomei S, et al. VHL and HIF-1 α : gene variations and prognosis in early stage clear cell renal cell carcinoma[J]. Med Oncol, 2014, 31(3): 840.
- [6] Liu YC, Zhang CC, Yin BD, et al. The correlation between the stem cell factors and clinical characteristics of renal cell carcinoma[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(23): 4623-4626.
- [7] Jemal A, Siegel R, Xu JQ, et al. Cancer Statistics[J]. Cancer, 2009, 59(4): 225-249.
- [8] Morrissey JJ, Mobley J, Figenschau RS, et al. Urine aquaporin 1 and perilipin 2 differentiate renal carcinomas from other imaged renal masses and bladder and prostate cancer[J]. Mayo Clin Proc, 2015, 90(1): 35-42.
- [9] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors[J]. Nat Genet, 2008, 40(5): 499-507.
- [10] 张洪典, 陈传贵, 唐 鹏, 等. Krüppel 样因子 4 蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达和意义[J]. 中华消化杂志, 2013, 33(8): 513-517.
- [11] 王洁敏, 向 芑, 顾乐怡. 不同预处理方法对提取尿液脱落细胞 mRNA 质量的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(4): 125-127.

(责任编辑:唐秋姗)