

· 临床研究 ·

CCN1 基因在肾癌组织中的表达及其意义*

程 伟,张 雄[△],黄 捷,龚晋迁,周祥梅
(重庆市第九人民医院泌尿外科 400700)

摘要:目的 研究 CCN1 基因在人肾癌组织中的表达变化,初步探讨其与肾癌发生的关系。方法 对 42 例开放手术切除的肾癌组织标本进行免疫组织化学染色,应用 IPP 图像分析软件对染色结果进行定量分析;运用 RT-PCR 技术检测肾癌组织标本中 CCN1 mRNA 的表达,应用 Quantity one 图像分析软件对 RT-PCR 结果进行定量分析。18 例距离癌区 2 cm 以上的正常肾组织标本作为对照组,均经病理检查证实为正常组织。结果 免疫组织化学结果显示 CCN1 基因在肾癌组织及正常肾组织中均有表达,但其在肾癌组织中的表达强度显著高于正常肾组织($P < 0.01$)。RT-PCR 结果显示肾癌组织中 CCN1 mRNA 的表达显著多于正常肾组织($P < 0.01$)。结论 CCN1 基因在肾癌组织中表达增高,可能与肾癌的发生有重要关系。

关键词:肾肿瘤;免疫组织化学;CCN1 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.013

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)03-0244-02

Expression of CCN1 gene in kidney cancer*

Cheng Wei, Zhang Xiong[△], Huang Jie, Gong Jinqian, Zhou Xiangmei

(Department of Urology, the 9th People's Hospital, Chongqing 400700, China)

Abstract: Objective To study the expression change of CCN1 in kidney cancer. Methods Kidney cancer tissue specimens were produced from 42 patients undergoing surgical ablation, and 18 normal kidney tissue specimens got from the area far away from the tumor. Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of CCN1 in kidney tissue, and RT-PCR technique was used to detect the expression of CCN1 mRNA. Results The expression of CCN1 mRNA and protein in kidney cancer group were much higher than that in normal kidney tissue group ($P < 0.01$). Conclusion The expression of CCN1 gene is significantly increased in kidney cancer tissues, which may have an important role during the development of kidney cancer.

Key words: kidney neoplasms; immunohistochemistry; CCN1 gene

CCN1(Cyr61)是一种生长因子诱导的立早基因的产物,具有癌基因活性,可以介导细胞信号转导,促进细胞黏附,与血管形成和细胞外基质形成有关,在细胞间、细胞与基质间交流中起重要作用。最新研究表明 CCN1 在多种肿瘤中表达失调,并且与肿瘤血管生成以及肿瘤进程密切相关^[1-3]。本文通过分子生物学技术研究其在肾癌组织中的表达变化,初步探讨其与肾癌发生的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2007 年至 2008 年间肾癌石蜡包埋标本 42 例,其中男 30 例,女 12 例;年龄 37~79 岁,平均 52.5 岁。肿瘤细胞的分化程度按 Fuhrman 病理分级,包括 I 级 20 例、II 级 12 例、III 级 10 例;按 TNM 分期标准,分为 I 期 10 例、II 期 18 例、III 期 11 例、IV 期 3 例。所有患者均患有明显的泌尿系感染,均未行放疗和化疗。另取 18 例远离肾癌的正常肾组织作为对照组。

1.2 主要试剂 抗 CCN1 蛋白多克隆抗体购自美国 Santa-Cruz 公司。单抗工作浓度 1:100, DAB 为美国 Sigma 公司产品,购自北京中山生物技术公司。RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自大连宝生物公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法检测不同肾脏组织中 CCN1 的表达 所有标本均经 10% 甲醛固定,石蜡包埋常规脱水,每个石蜡切

片选取最佳切取部位切片 3 张,制成 4 μm 厚,备染色。采用 ABC 免疫组织化学染色,用已知肾癌标本切片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。采用 IPP 图像分析软件对各组织中 CCN1 的表达进行定量分析。结果判定,CCN1 表达均以细胞质呈棕黄色着色计为阳性,运用 IPP 计算其 IOD 值,IOD 值越大,表达越强。

1.3.2 半定量 RT-PCR 法检测不同肾脏组织中 CCN1 mRNA 的表达 Tripue (Promega) 常规提取各组织总 RNA。取各组总 RNA 各 2 μg 作为模板进行逆转录。CCN1 上游引物:5'-ACT TCA TGG TCC CAG TGC GC-3',下游引物:5'-AAA TCC GGG TTT CTT TCA CA-3',产物大小 106 bp。以 GAPDH 为内对照。循环参数:94 °C 5 min, 94 °C 45 s, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环, 72 °C 7 min。反应结束后行 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像后采用 Quantity one 图像分析软件进行定量分析,以 CCN1/GAPDH 比值表示 CCN1 的相对表达水平。

1.4 统计学处理 所有数据用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表达,采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学检测肾癌组织中 CCN1 的表达 CCN1 在肾脏组织中的免疫组化染色结果见封 3 图 1、2,从图中可以看

* 基金项目:重庆市卫生局基金资助项目(06-2-067)。△ 通讯作者, Tel:13883387218; E-mail:aaweich@yahoo.com.cn。

出,CCN1 的阳性反应定位于细胞质,在肾癌和正常肾脏组织中均可见到棕黄色阳性染色,呈散在分布。封 3 图 1 和图 2 分别为 CCN1 在肾癌组织和正常肾脏组织中的阳性染色结果,由图中可以看到,肾癌组织中 CCN1 棕黄色阳性染色强于正常肾脏组织。将上述免疫组织化学结果用 IPP 图像分析软件进行分析,结果显示,CCN1 在肾癌组织中的阳性表达显著强于正常肾脏组织($P < 0.01$),见表 1。

表 1 肾癌和正常肾脏组织中 CCN1 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	IOD 值
肾癌组织	56.875 + 2.458 *
正常肾组织	93.012 + 4.679

*: $P < 0.01$, 与正常肾脏组织比较。

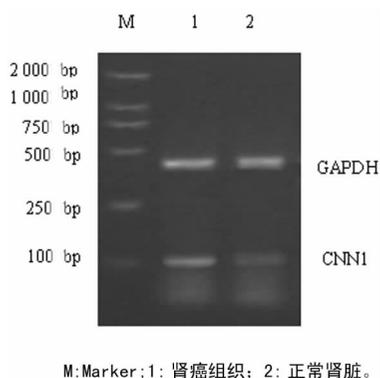


图 3 RT-PCR 检测肾癌和正常肾脏组织中 CCN1 mRNA 表达量

2.2 半定量 RT-PCR 检测 CCN1 mRNA 表达 图 3 为 CCN1 和内参 GAPDH RT-PCR 结果的凝胶成像,由图中可以看到 106 bp(CCN1)及 443 bp(GAPDH)处均有条带出现,106 bp 处的条带肾癌组较正常组明显。将上述凝胶成像结果用 Quantity one 图像分析软件进行分析,结果显示肾癌组 CCN1 mRNA 的相对表达量显著高于正常肾脏组($P < 0.01$),见表 2。

表 2 肾癌和正常肾脏组织中 CCN1 mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	CCN1 mRNA 表达量
肾癌组织	0.98 ± 0.07 *
正常肾脏组织	0.60 ± 0.05

*: $P < 0.01$, 与正常肾脏组织比较。

3 讨论

肾癌的关键治疗手段是根治性肿瘤切除术,但手术仅能治疗早期肿瘤,对中、晚期肾癌根治性手术并不能达到根治目标,因此,肾癌的早期诊断对肾癌治疗有重要意义。目前,仅靠影像学对早期肾癌诊断较为困难,迫切需要寻找一个肾癌的早期特异性癌标。

肾癌是一种高度血管化的肿瘤。肾癌组织中肿瘤细胞生长因子(VEGF)呈高表达,可以刺激新血管生成。CCN1 也称为血管形成因子,在体内具有内源性激活血管形成的活性,通过多种直接和间接机制,参与多个控制点调节血管形成^[4-8]。它可调节包括 VEGF 在内的许多血管形成分子的产生和激活,可能对肾癌的发生、发展和转移起着重要的作用,具有成为

肾癌早期癌标的潜在价值。

国外研究已经证实,CCN1 在多种肿瘤细胞中高表达,并与肿瘤侵袭性和血管形成有关^[9-13]。然而,CCN1 在肾癌组织中表达情况如何,其在肾癌的发生、发展及肿瘤血管形成中有什么作用,目前国内外均未见报道。

本实验是一项有关 CCN1 基因与肾癌关系的初步研究,探讨了其表达改变与肾癌的关系。研究表明,CCN1 在肾癌组织中的表达较正常肾组织显著增高,提示其可能在肾癌的发生、发展过程中具有重要的促进作用,但具体机制有待于进一步深入研究。CCN1 对于新生血管的形成具有重要作用,而肾癌是一种高度血管化的肿瘤,且肾癌组织中与血管形成关系密切的 VEGF 表达显著增加,二者之间是否具有某种因果关系? CCN1 是否通过调控 VEGF 来影响肾癌血管生成,进而调控肾癌的发生、发展? 此外,CCN1 具有调控细胞信号转导的作用,其表达改变对肾癌细胞信号转导有何影响? 这些问题对于肾癌的发生、肾癌进程、肾癌转移均具有重要意义,值得进一步深入研究。此外,本实验证实肾癌组织中 CCN1 表达显著增加,因此,CCN1 具有作为肾癌潜在特异性癌标的价值,对肾癌的早期诊断具有重要意义。

参考文献:

- [1] Zuo GW, Kohls CD, He BC, et al. The CCN proteins: important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis[J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(6): 795-806.
- [2] Goodwin CR, Lal B, Zhou X, et al. Cyr61 mediates hepatocyte growth factor-dependent tumor cell growth, migration, and akt activation[J]. *J Cancer Res*, 2010, 70(7): 932-941.
- [3] Leask A. A sticky situation; CCN1 promotes both proliferation and apoptosis of cancer cells[J]. *J Cell Commun Signal*, 2010, 4(1): 71-72.
- [4] Leask A. CCN1: a novel target for pancreatic cancer[J]. *J Cell Commun Signal*, 2011, 5(2): 123-124.
- [5] Hasan A, Pokeza N, Shaw L, et al. The matricellular protein cysteine-rich protein 61(CCNI/Cyr61) enhances physiological adaptation of retinal vessels and reduces pathological neovascularization associated with ischemic retinopathy[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(4): 542-544.
- [6] Espinoza I, Liu H, Busby R, et al. CCN1, a candidate target for zoledronic acid treatment in breast cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(5): 732-741.
- [7] Haque I, Mehta S, Majumder M, et al. Cyr61/CCN1 signaling is critical for epithelial-mesenchymal transition and stemness and promotes pancreatic arcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2011, 13(1): 10-18.
- [8] Goodwin CR, Lal B, Zhou X, et al. Cyr61 mediates hepatocyte growth factor-dependent tumor cell growth, migration, and akt activation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 932-941.
- [9] Chien M, Kumagai T, Miller CW, et al. Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells(下转第 248 页)

常,防止关节僵硬畸形,同时按摩小腿肌肉及足部以延缓失去神经支配的肌肉萎缩速度和程度,为神经损伤术后功能恢复奠定良好基础。术后 4 周拆石膏托。出院的患者在家进行肌肉按摩、理疗及练习行走等康复治疗。神经粘连松解术后 48 h 拆除石膏托,逐步锻炼下肢功能,同时按摩小腿肌肉及足部。康复期综合应用运动训练^[10]、物理治疗等^[11-14]方法,以促进坐骨神经功能恢复。

腓总神经损伤的病例数明显多于胫神经损伤的病例数^[15],可能与髋臼处神经的排列有关。术后神经功能的恢复与手术方式间似有一定的关系,神经外膜松解的效果最好,神经吻合的效果相对较差。作者以为,神经损伤的程度决定手术方式,神经功能恢复的程度决定于神经的原发损伤,而与手术方式的相关性有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 叶锋,张龙君,张建军. 髋臼骨折、后脱位合并坐骨神经损伤的临床分析[J]. 浙江创伤外科,2008,13(5):426-427.
- [2] 蒋康射. 髋臼后部骨折合并坐骨神经损伤 63 例治疗体会[J]. 现代中西医结合杂志,2008,17(21):3298-3299.
- [3] 陈展鹏,白波,陈明. 髋关节骨折脱位并坐骨神经损伤患者的手术治疗研究[J]. 临床医学工程,2011,18(8):1254-1255.
- [4] 谢颖涛,顾立强,林晓岗. 髋臼骨折、髋关节脱位合并坐骨神经损伤的临床分析[J]. 中华创伤骨科杂志,2005,7(7):660-663.
- [5] Siemionow M, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the cleveland clinic microsurgery laboratory[J]. Neurol Res,2004,26(2):218-225.
- [6] Jiao H, Yao J, Yang Y, et al. Chitosan/polyglycolic acid nerve grafts for axon regeneration from prolonged axotomized neurons to chronically denervated segment[J]. Bio-

materials,2009,30(28):5004-5018.

- [7] Giannoudis V, Grotz MR, Pakostidis C, et al. Operative treatment of displaced fractures of the acetabulum[J]. J Bone Joint Surg,2005,87(1):2-9.
- [8] 胡建华,张晓星,苟景跃. 前后联合入路治疗复杂髋臼骨折[J]. 创伤外科杂志,2011,13(4):297-299.
- [9] Gay DP, Desser DR, Parks BG, et al. Sciatic nerve injury in total hip resurfacing: a biomechanical analysis[J]. J Arthroplasty,2010,25(8):1295-1300.
- [10] 李光华,刘宏鹏,周旭,等. 运动训练对坐骨神经损伤小鼠神经形态和功能恢复影响的研究[J]. 中国康复医学杂志,2010,25(1):23-26.
- [11] Alrashdan MS, Park JC, Sung MA, et al. Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in a rat model [J]. Acta Neurol Belg,2010,110(2):168-179.
- [12] 俞红,白跃宏,赵娟,等. 超短波及电刺激联合神经生长因子治疗大鼠坐骨神经损伤的疗效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志,2011,33(4):245-249.
- [13] 赵娟,俞红,徐义明,等. 物理治疗促进坐骨神经损伤再生的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2011,25(1):107-111.
- [14] Ishiguro M, Ikeda K, Tomita K. Effect of near-infrared light-emitting diodes on nerve regeneration[J]. J Orthop Sci,2010,15(2):233-239.
- [15] 孙津民,李兆祥,林子蔚,等. 坐骨神经损伤多见腓总神经病变原因分析及临床意义[J]. 中国临床解剖学杂志,2006,24(2):163-165.

(收稿日期:2011-08-09 修回日期:2011-10-22)

(上接第 245 页)

- [J]. Bio Chem,2004,279(51):53087-53096.
- [10] Pilarsky CP, Schmidt U, Eissrich C, et al. Expression of the extracellular matrix signaling molecule Cyr61 is downregulated in prostate cancer[J]. Prostate,1998,36(1):85-91.
- [11] Tsai MS, Homby AE, Lakins J, et al. Expression and function of Cyr61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies[J]. Cancer Res,2000,60(20):5603-

5607.

- [12] Tsai MS, Bogart DF, Li P, et al. Expression and regulation of Cyr1 in human breast cancer cell lines[J]. Oncogene,2002,21(6):964-973.
- [13] Tong X, O'Kelly J, Xie D, et al. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway[J]. Oncogene,2004,23(28):4847-4855.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2011-11-22)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。