

· 基础研究 ·

非小细胞肺癌中半乳凝素 1 的表达及其临床意义*

薛春竹¹, 凌翔^{1△}, 雷琼琼²

(1. 南昌大学第一附属医院心胸外科, 南昌 330006; 2. 南昌大学医学院护理系, 南昌 330006)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中半乳凝素 1(Gal-1)mRNA 及蛋白的表达及临床意义。方法 采用 RT-PCR、蛋白质印迹技术分别检测 35 例 NSCLC 患者的癌组织、癌旁组织及远处正常肺组织(距癌组织边缘大于 5 cm)中 Gal-1 mRNA 及蛋白表达情况。结果 NSCLC 患者癌组织、癌旁组织以及有淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织中, Gal-1 mRNA 的表达水平均明显高于无淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织($P < 0.05$); NSCLC 患者癌组织、癌旁组织以及有淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织中, Gal-1 蛋白表达水平明显高于无淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织($P < 0.05$); NSCLC 患者癌组织中 Gal-1 mRNA 的表达与患者 TNM 分期及分化程度密切相关($P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、病理组织类型无明显相关性($P > 0.05$)。结论 Gal-1 表达与 NSCLC 的发生、发展、侵袭转移密切相关, 可作为一个潜在的 NSCLC 发病与转移的观察指标。

关键词: 半乳凝集素-1; 癌, 非小细胞肺; 肿瘤浸润

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)19-1954-03

The expression of galectin-1 in NSCLC tissues and their clinical significances*

Xue Chunzhu¹, Ling Xiang^{1△}, Lei Qiongqiong²

(1. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Nursing College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To study the expression of galectin-1(Gal-1) in non small-cell lung cancer(NSCLC) tissues and their clinical significances. **Methods** 35 patients with cancer were included, the difference expression of Gal-1 mRNA and protein in cancer tissues, adjacent tissues of patients with NSCLC and normal tissues of NSCLC patients(over 5 cm from cancer tissue) were detected with RT-PCR, Western blot. **Results** The expressions of Gal-1 mRNA in cancer tissues, adjacent tissues of patients with NSCLC and normal tissues of NSCLC patients with lymph node metastasis positive were higher than normal tissues of NSCLC patients with lymph node metastasis negative($P < 0.05$); The expressions of Gal-1 proteins had the same trends with the expressions of Gal-1 mRNA. The expressions of Gal-1 mRNA in cancer tissues were closely related to TNM stages, lymph node metastasis and differentiation($P < 0.05$), but not to sex, age, histological type of patients($P > 0.05$). **Conclusion** The expressions of Gal-1 were closely related to the occurrence and development of NSCLC, it can be as a observation index of NSCLC.

Key words: Galectin-1; carcinoma, non-small cell lung; neoplasm invasiveness

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数的 70%~85%, 多数患者发现已属晚期^[1]。寻找有效的生物标志物和基因治疗靶点, 对 NSCLC 患者的早期诊断和有效治疗十分重要。据相关国内外研究报道半乳凝素 1(galectin-1, Gal-1)在多种肿瘤中过表达^[2], 并参与细胞的生长、黏附和增殖、凋亡和炎症等多种生物学过程, 在多种肿瘤的发生、发展、侵袭转移和肿瘤的血管生成中起重要的作用^[3]。本研究采用 RT-PCR、蛋白质印迹技术研究 NSCLC 中的 Gal-1 mRNA 及蛋白表达情况, 分析 Gal-1 表达与 NSCLC 的 TMN 分期、发展、侵袭及转移的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料 随机选取 35 例 2009 年 1 月至 2010 年 7 月在南昌大学第一附属医院胸外科手术摘除的 NSCLC 患者的标本组织。男 22 例, 女 13 例; 平均年龄(55.20±9.1)岁; 其中鳞癌 19 例, 腺癌 16 例。采用美国联合癌症分类委员会(AJCC)和国际抗癌联盟(FIGO)2002 年制定的分期标准: I 期 8 例, II 期 11 例, III 期 13 例, IV 期 3 例; 高、中分化 14 例, 低分化 21 例; 无淋巴结转移 12 例, 有淋巴结转移 23 例。手术治疗

时取癌组织、癌旁组织以及远处的正常肺组织(距癌组织边缘大于 5 cm), 所有组织标本液氮冷冻保存待用。

1.2 实验试剂与仪器 TRIzol、琼脂糖、RT-PCR 试剂盒、1 500 bp DNA Marker 均购于北京天根生化科技有限公司, Gal-1 和 β -actin 引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成, MG96G-PCR 仪为 Long gene 产品, 电泳仪系统为上海天能产品, Js-680B 全自动凝胶成像分析仪为上海培清科技有限公司产品, 蛋白质电泳仪为北京六一公司产品, Gal-1 一抗购至 Santa Cruz 公司, 二抗均购自中杉金桥生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 按 TRIzol 说明书对 NSCLC 患者癌组织、癌旁组织和及远处的正常肺组织分别提取总 RNA, 以上述所得总 RNA 为模板, 应用 RT-PCR 试剂盒逆转录合成 cDNA。以此为模板用人 Gal-1 特异性引物对 cDNA 进行 PCR 特异性扩增(详细操作步骤参见说明书), 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 20 s, 53 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。采用 β -actin 作内参, 半定量 RT-PCR 方法对获得 RT-PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分离检

测。Gal-1 引物由 Primer 6.0 设计,NCBI Blast 验证,得到引物见表 1。

表 1 Gal-1 和 β -actin 引物序列

引物	序列	扩增长度 (bp)	温度 (°C)
Gal-1	上游 5'-CTC GGG TGG AGT CTT CT-3' 下游 5'-TGT CTT TGC CCA GGT TCA-3'	176	51
β -actin	上游 5'-GGC ATC CTG ACC CTG AAG TA-3' 下游 5'-GCC GAT AGT GAT GAC CTG ACC-3'	567	56

1.3.2 蛋白质印迹 定量取 100 mg 组织,液氮研磨打破细胞,按每 10 mg 组织加入 100 μ L RIPA 裂解液。取蛋白样品 20 μ L,加入 5 \times 上样缓冲液 5 μ L(体积比 4:1),煮沸 5 min 后上样。经 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶 40 V,40 min;分离胶 60 V,60 min。而后转膜,放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中,恒流 300 mA,2 h,将蛋白质转至 PVDF 膜。置于含 5%脱脂奶粉 20 mL 的 TBST 液中,室温摇床封闭 1 h,将 Gal-1 一抗用 TBST 按 1:300 浓度稀释至 3 mL, β -actin 一抗用 TBST 按 1:500 的浓度稀释至 5 mL,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日用 TBST 液洗膜 3 次,每次 10 min。羊抗兔二抗(1:3000)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。TBS 液洗膜 3 次,每次 10 min。使用 DAB 试剂盒显色。采用凝胶成像系统拍照,应用其自带 Gel Pro-Analyzer 3.1 软件进行密度定量分析。

1.3.3 成像与计算 经全自动凝胶成像系统拍照,SensiAnsys 软件分析 Gal-1 和 β -actin 扩增条带的光密度值(IOD),表达水平 = Gal-1 条带的灰度值/ β -actin 的灰度值 \times 100%,表达率 = 阳性例数/总数 \times 100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件进行处理,RT-PCR 组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 结果 总 RNA 电泳结果见图 1,各种组织 RT-PCR 电泳结果见图 2。NSCLC 患者癌组织和癌旁组织,以及有淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织中 Gal-1 mRNA 的表达水平均明显高于无淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织($P < 0.05$),见表 2。

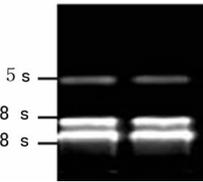
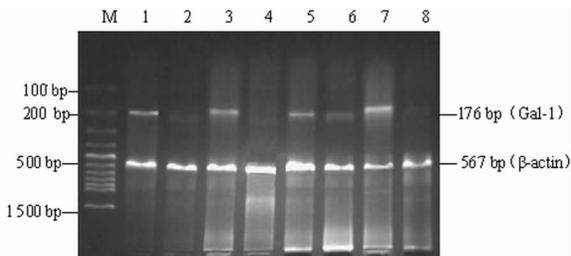


图 1 总 RNA 电泳结果



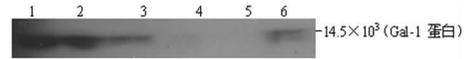
M:Marker;泳道 1:有淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织;泳道 2、4、8:无淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织;泳道 3、6: NSCLC 患者癌旁组织;泳道 5、7: NSCLC 患者癌组织。

图 2 各种组织 Gal-1 mRNA 表达电泳结果

表 2 各种组织 Gal-1 mRNA 的相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

组织类型	n	Gal-1 mRNA 的相对表达水平
无淋巴结转移的 NSCLC 患者癌组织	28	63.56 \pm 7.25
无淋巴结转移的 NSCLC 患者癌旁组织	25	46.18 \pm 6.74
有淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织	20	44.27 \pm 6.12
无淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织	7	5.59 \pm 1.32

2.2 蛋白质印迹结果 NSCLC 患者癌组织和癌旁组织,以及有淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织中 Gal-1 蛋白表达水平明显高于无淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织($P < 0.05$),与 PCR 结果基本一致,见图 3。



泳道 1:有淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织;泳道 2:NSCLC 患者癌组织;泳道 3:NSCLC 患者癌旁组织;泳道 4、5、6:无淋巴结转移的 NSCLC 患者正常肺组织。

图 3 各种组织 Gal-1 蛋白电泳结果

2.3 NSCLC 患者癌组织中 Gal-1 mRNA 的表达与患者的性别、年龄、病理组织类型、TNM 分期及分化程度的相关性 NSCLC 患者癌组织中 Gal-1 mRNA 的表达与患者 TNM 分期及分化程度密切相关($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄、病理组织类型无明显相关性($P > 0.05$),见表 3。

表 3 Gal-1mRNA 的表达与临床病理的关系

分类	Gal-1 mRNA 阳性表达情况	χ^2	P
性别[n(%)]		1.451	0.203
男性	18 (81.81)		
女性	10 (76.92)		
年龄[% (n/n)]		1.254	0.310
<60	85(17/20)		
\geq 60	73.33(11/15)		
病理组织类型[% (n/n)]		2.203	0.257
鳞癌	84.21(16/19)		
腺癌	75.00(12/16)		
TNM 分期[% (n/n)]		9.352	0.002
I~II 期	73.68(14/19)		
III~IV 期	87.50(14/16)		
分化程度[% (n/n)]		8.256	0.001
高~中分化	64.28(9/14)		
低分化	80.95(17/21)		

3 讨 论

Gal-1 为典型的细胞质蛋白,其相对分子质量为 14.5 \times 10³,定位在 22q13.1 上的单基因编码,常以同源二聚体的形式存在,其结构上包含有一段长约 135 个氨基酸的糖类识别区(carbohydrate-recognition domains,CRD)和对 β -半乳糖苷具有特殊亲和力的区域,根据其分子的结构分为原型、嵌合型及串联重复性三类,因能与 β -半乳糖苷特异性非共价结合并参与细

胞内信号转导,从而调节细胞的黏附、增殖、迁移能力等,可能参与了肿瘤病程的演进。据国内外相关研究报道 Gal-1 与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[4]。Paz 等^[5]发现 Gal-1 通过与癌基因 H-Ras 相互作用,为其提供膜锚定位点,增强 Ras 介导的信号转导过程,从而促进细胞向肿瘤细胞表型转化,Gal-1 还可导致 RAF-1 和 ERK 的持续活化并激活转录因子,促使细胞向肿瘤细胞转化。Rubinstein 等^[6]通过反义核酸技术靶向性抑制肿瘤细胞中 Gal-1 的表达后发现,封闭 Gal-1 基因会增强 T 细胞调节的抗肿瘤作用,也同样显示了 Gal-1 在促进肿瘤免疫逃逸中的作用。Gal-1 还与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移及分化程度密切相关,与多种肿瘤的侵袭和转移能力有一定的关系^[7]。Jung 等^[8]的研究中提示,乳腺癌组织中 Gal-1 在有淋巴结转移的患者中明显高表达。Den 等^[9]的研究显示,重组的 Gal-1 可剂量依赖性地增加肿瘤细胞对层连蛋白-1(laminin-1)或纤连蛋白(fibronectin)的黏附。另有实验显示 Gal-1 能增加前列腺癌和卵巢癌细胞对细胞外基质的黏附,Gal-1 可通过 MAC-2BP 蛋白调节同型的人黑色素瘤细胞的聚集。Gal-1 还能通过与整合素分子结合或调整合素分子的表达来调控肿瘤转移过程,肿瘤细胞通过分泌 Gal-1 削弱 T 细胞应答,使肿瘤细胞获得倾向于免疫抑制的生长环境,进而参与到肿瘤细胞的免疫逃逸。另外,Gal-1 可通过促进肿瘤血管新生而影响肿瘤细胞的生长。在 Gal-1 缺陷的小鼠中,由于血管新生受到抑制,肿瘤的生长也受到明显抑制,Gal-1 在肿瘤血管生长中起到基础性作用^[10]。

本研究发现 Gal-1 表达的改变与肿瘤细胞的发生、发展、侵袭及获得转移表型密切相关,可作为一个潜在的 NSCLC 发病与转移的观察指标。Gal-1 是一种分布广泛、作用复杂、调节精细的半乳糖结合蛋白,其参与肿瘤细胞凋亡、黏附的确切机制尚不清楚,深化其结构分析、信号转导和基因调控方面的研究,将为肿瘤、炎症和自身性免疫疾病的诊治提供新的策略。

参考文献:

- [1] Nomori H. Treatment for elderly patients with non-small cell lung Cancer [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2010, 37 (13):2833-2837.
- [2] Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, et al. Galectin-1: a small protein with major functions [J]. *Glycobiology*, 2006, 16(11):137-157R.
- [3] Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, et al. Galectins and gliomas [J]. *Brain Pathol*, 2010, 20(1):17-27.
- [4] Szöke T, Kayser K, Trojan I, et al. The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung Cancer in stage II [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007, 31(5):783-787.
- [5] Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, et al. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane Anchorage and cell transformation [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (51): 7486-7493.
- [6] Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5(3):241-251.
- [7] Wu MH, Hong TM, Cheng HW, et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(3):311-318.
- [8] Jung EJ, Moon HG, Cho BI, et al. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast Cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(11):2331-2338.
- [9] Den BL, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in Cancer: A critical review [J]. *Glycoconj J*, 2004, 19 (729):537-542.
- [10] Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(43):15975-15980.
- [11] 谭冠先, 刘敬臣, 黎乐群, 等. 中度急性等容血液稀释用于肝癌切除术对凝血功能的影响 [J]. *广西医学*, 2003, 25 (3):371-373.
- [12] Boldt J, Sch? llhorn T, Münchbach J, et al. A total balanced volume replacement strategy using a new balanced hydroxyethyl starch preparation (6% HES 130/0.42) in patients undergoing major abdominal surgery [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2007, 24(3):267-275.
- [13] Fenger-Eriksen C, Tønnesen E, Ingerslev J, et al. Mechanisms of hydroxyethyl starch-induced dilutional coagulopathy [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(7):1099-1105.
- [14] 司建洛, 宋绍团. 小剂量高渗氯化钠羟乙基淀粉 40 预扩容对全髋关节置换中凝血功能的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(17):3067-3070.
- [15] 王凌云, 黄开红, 闵军, 等. 胃癌患者外周血调节性 T 细胞的多重细胞因子水平的检测及其意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(11):1375-1377.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-02-22)

(收稿日期:2011-10-10 修回日期:2012-01-06)

(上接第 1953 页)

Oxygen metabolism during cardiopulmonary bypass in piglets [J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(5):1656-1663.