论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0238-03

钙调素 mRNA 和蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义

黄 英,刘国祥,孙 瑜 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨钙调素(CaM)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达水平及其临床意义。**方法** 采用原位杂交及免疫组织化学技术检测 CaM 在 64 例非小细胞肺癌标本中的表达。**结果** 在 NSCLC 中 CaM mRNA 及 CaM 蛋白表达检测结果基本一致。CaM mRNA 的阳性表达率为 60.4%(39/64),而 CaM 蛋白为 65.6%(42/64);低分化的肿瘤标本中 CaM mRNA 阳性表达率(70.0%,21/30)显著高于中高分化的肿瘤标本(45.3%,15/34);Ⅲ~Ⅳ期 CaM mRNA 阳性表达率(81.8%,27/33)显著高于Ⅰ~Ⅱ期(51.6%,16/31);有淋巴结转移的 CaM mRNA 阳性表达率(64.0%,25/39)显著高于无淋巴结转移的肿瘤标本(28.0%,7/25)。CaM 的表达与患者性别、年龄及组织学类型无明显关系。**结论** CaM 在非小细胞肺癌中有着较高的表达率,且与肿瘤的分化程度、临床分期及淋巴结转移有一定的关系,提示钙调素表达的增高可能在促进肺癌的浸润转移中起重要作用。

关键词:非小细胞肺癌;钙调素

中图法分类号:R345;R394.2;R734.2 **文献标识码**:A

Expression of calmodulin and its clinical significance in non-small cell lung cancer

HUANG Ying, LIU Guo-xiang, SUN Yu (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression level of calmodulin (CaM) in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and its clinical significance. **Methods** The expression levels of CaM and CaM mRNA were detected in 64 human NSCLC samples by immunohistochemistry and *in situ* hybridization, respectively. **Results** The positive rates of CaM mRNA and CaM protein were 60.4% and 65.6%, respectively. The positive rates of CaM mRNA in low-differentiated samples were significantly higher (70.0%) than those in moderate- to well-differentiated samples (45.3%). The expression rates of CaM in Ⅲ - Ⅳ stages (81.8%) were significantly higher than those in Ⅰ - Ⅱ stages (51.6%) ($P < 0.05$). The expression rate of CaM in lymph node metastasis (64.0%) was significantly higher than that in non-lymph node metastasis (28.0%) ($P < 0.05$). The positive expression of CaM was not associated with sex and age of patients and the different tissue types of NSCLC. **Conclusion** High expression of CaM exists in NSCLC and it may be associated with cell differentiation and tumor-node-metastasis (TNM) stages and lymph node status of tumor. The results suggest that high expression of CaM may play an important role in the invasion and metastasis of lung cancer.

Key words: non-small cell lung carcinoma; calmodulin

钙调素(calmodulin, CaM)是真核细胞中普遍存在的钙离子受体蛋白,是细胞内 Ca^{2+} 信号转导途径中的主要信号转导分子,介导调控由 Ca^{2+} 引起的一系列生理生化反应,参与并调节细胞增生、分化、运动等基本代谢过程。研究表明,钙调素在正常细胞的生长发育及肿瘤细胞的增殖中起着重要作用,关于钙调素在肺癌中的变化,目前国内尚少见报道。我们采用原位杂交及免疫组化技术检测非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中钙调素的表达,并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我院 2001 年 1 月至 2004 年 7 月部分 NSCLC 手术切除

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371588)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371588)

作者简介:黄 英(1970-),女,四川省乐山市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肺癌的诊断及治疗方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68765679

收稿日期:2004-11-23;修回日期:2005-01-20

标本 64 例,标本均为石蜡包埋的肺癌组织块。患者术前均未接受放疗和化疗。64 例患者中,男性 44 例,女性 20 例;年龄 27～75 岁,平均 57.68 岁。按照 WHO 肺癌分型标准分类标准及 UICC1997 年新的国际肺癌分期标准进行分型、分期,其中鳞癌 28 例,腺癌 36 例。Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 21 例,Ⅳ期 12 例。

1.2　试剂

CaM mRNA 原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司。因常规标本中 mRNA 易被破坏,本研究选用多相寡核苷酸探针。多相寡核苷酸探针是针对同一基因不同区域的多个探针,可提高检测的敏感性。多相寡核苷酸探针序列为:①5′-AAGAA CAGAT TGCTG AATTC AAGGA AGCCT-3′;②5′-ATTCC GAGTC TTTGA CAAGC ATGGC AATGG-3′;③5′-CTATG AAGAA TTCGT ACAGA TGATG ACTGC-3′。2 ml 杂交液中含探针 3 μg。探针的标记采用 3′-末端地高辛标记。抗 CaM 多克隆抗体购自武汉博士德公司。SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3　原位杂交

原位杂交前将实验所用仪器进行灭活 RNA 酶处理,液体试剂均用 DEPE 水配置。石蜡切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2 室温 10 min,蒸馏水洗涤,0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 7.2)微波中档处理 5 min,室温冷却。恒温箱 38 ℃预杂交 2 h(每张切片滴加 20 μl 杂交液),滴加含多相寡核苷酸探针的原位杂交液,每张切片 20 μl,将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭开后,盖在切片上,恒温 42 ℃杂交 24 h,揭开盖玻片,2×SSC 洗涤 5 min×2 次,0.5×SSC 洗涤 15 min×2 次,PBS 洗涤。滴加封闭液,37 ℃ 20 min,不洗。滴加生物素化鼠抗地高辛,25 ℃ 20 min,0.5 mol/L PBS 漂洗 5 min×4 次。滴加辣根过氧化物标记的链霉亲和素,然后显色,水洗,乙醇脱水,透明,中性树胶封片。用不加探针的杂交液作为阴性对照。

1.4　免疫组化

切片脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭,复合酶(购自武汉博士德公司)修复 10 min,血清封闭 30 min,免疫组化步骤按 S-P 试剂盒说明进行。CaM 多抗浓度为 1∶100。

1.5　结果判定标准

光镜下 CaM mRNA 以细胞核或胞浆内有浅蓝－蓝紫色细颗粒为阳性杂交信号。免疫组化切片以肿瘤细胞胞浆或胞膜呈棕黄色者为阳性细胞,高倍镜下(×400)每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,共计 1 000 个,计算每张切片阳性细胞百分率,据切片中阳性细胞百分率将切片分为 4 级:阳性细胞百分率 < 10% 为阴性(－),11%～40% 为弱阳性(＋),41%～70% 为中度阳性(＋＋),> 70% 为强阳性(＋＋＋)。

1.6　统计学处理

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　CaM mRNA 及 CaM 蛋白在 NSCLC 中的表达

结果见图 1～4。在 NSCLC 中 CaM mRNA 及 CaM 蛋白主要在细胞浆表达,少数为细胞核表达,二者检测结果基本一致。本组 64 例中,39 例标本癌细胞 CaM mRNA 呈阳性表达,阳性率为 60.4%;其中 30.7%(12/39)为弱表达(＋),56.4%(22/39)为中等程度表达(＋＋),12.8%(5/39)为强表达(＋＋＋)。42 例 CaM 蛋白呈阳性表达,阳性率为 65.6%;其中 28.6%(12/42)为弱表达(＋),50%(21/42)为中等程度表达(＋＋),21.4%(9/42)为强表达(＋＋＋)。

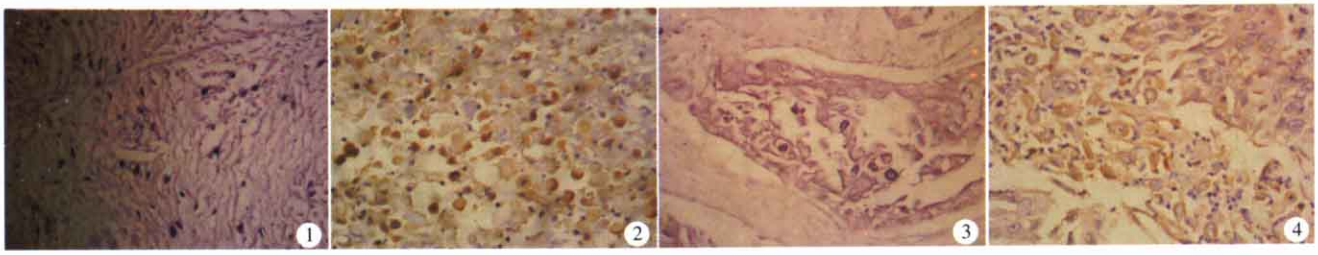


图 1　CaM mRNA 在腺癌中的阳性表达　(×400)

Fig 1　Expression of CaM mRNA in adenocarcinoma　(×400)

图 2　CaM 在腺癌中的阳性表达　(S-P×400)

Fig 2　Expression of CaM in adenocarcinoma　(S-P×400)

图 3　CaM mRNA 在鳞癌中的阳性表达　(×400)

Fig 3　Expression of CaM mRNA in squamous cell carcinoma　(×400)

图 4　CaM 在鳞癌中的阳性表达　(S-P×400)

Fig 4　Expression of CaM in squamous cell carcinoma　(S-P×400)

2.2　CaM 表达与 NSCLC 的生理病理特征的关系(表 1)

不同细胞分化程度的肿瘤组织间 CaM 的阳性表达率有显著性差异,其中低分化的肿瘤 CaM mRNA 及 CaM 蛋白阳性表达率显著高于中高分化的肿瘤($P < 0.05$)。在不同临床分期之间 CaM 的阳性表达率存在显著性差异,其中Ⅲ～Ⅳ期 CaM mRNA 及 CaM 蛋白阳性表达率显著高于Ⅰ～Ⅱ期($P < 0.05$)。出现淋巴结转移的肿瘤标本 CaM mRNA 及 CaM 蛋白阳性表达率显著高于无淋巴结转移的肿瘤标本($P < 0.05$)。

表1 CaM mRNA表达与NSCLC的生理病理特征的关系

Tab 1 Relationship of CaM expression with the clinicopathophysiological characteristics of NSCLC

Characteristics	n	CaM mRNA			P
		+	−	Positivity (%)	
Sex					
Male	44	29	15	65.9	>0.05
Female	20	12	8	60.0	
Age (year)					
≥50	42	30	12	71.4	>0.05
<50	22	12	10	54.5	
Histology					
Adenocarcinoma	31	20	11	64.5	>0.05
Squamous cell carcinoma	33	18	15	54.5	
Cell differentiation					
Moderate-well	34	15	19	45.3	<0.05
Poor	30	21	9	70.0	
Lymph node metastasis					
Yes	39	25	14	64.0	<0.05
No	25	7	18	28.0	
TNM stage					
Ⅰ~Ⅱ	31	16	15	51.6	<0.05
Ⅲ~Ⅳ	33	27	6	81.8	

3 讨论

钙调素(calmodulin, CaM)是细胞内信使钙的受体,它不仅对正常的细胞增殖起重要作用,而且与恶性肿瘤细胞生长有密切关系,然而,既往研究主要集中在CaM拮抗剂对肿瘤细胞的影响上[1,2],而对CaM本身在肿瘤中的表达研究并不多,在肺癌中的表达及其与转移、预后的关系更是缺乏,进一步研究并深入探讨CaM在非小细胞肺癌发生发展中的作用地位及其与肺癌侵袭转移的关系,将为肺癌侵袭转移的分子机制提供一个新的解释,有望为肺癌治疗提供新的更为有效的作用靶点。

在实体瘤中,由于肿瘤组织的恶性生物学行为,其过快的增殖生长与肿瘤细胞中的血管不成比例,肿瘤内部细胞存在乏氧情况。肿瘤细胞在乏氧的内环境中会发生一系列的生理生化代谢的改变。大量研究表明,乏氧会而且使肿瘤细胞更具有侵袭性,容易发生远处转移,导致治疗失败[3]。研究显示,细胞在乏氧微环境中一系列生物学行为的改变中,"钙超载"起着重要作用,细胞内Ca^{2+}浓度增加,CaM活性随之增高,Ca^{2+}/CaM稳态失衡,CaM系统代谢紊乱,由此影响一系列生物学行为的发生[4,5]。我们的研究结果显示,在NSCLC中,不同细胞分化程度以及在不同临床分期之间的肿瘤组织间CaM mRNA及蛋白阳性表达率均有显著性差异。其中低分化的肿瘤CaM的阳性表达率显著高于中高分化的肿瘤,Ⅲ~Ⅳ期CaM的阳性表达率显著高于Ⅰ~Ⅱ期,说明在非小细胞肺癌的发生发展中,存在着CaM代谢紊乱,钙调素在肿瘤细胞生长、分化调控中发挥作用。CaM的高表达可能在促进肺癌的浸润转移中起着重要作用。我们的实验结果发现,肿瘤组织间CaM mRNA及蛋白阳性表达率二者检测结果趋势基本一致,但在同一石蜡标本中mRNA表达阳性率低于蛋白阳性率,其原因可能系石蜡标本存放时间稍长后,组织mRNA丢失、破坏较多,加之做原位杂交所需温度较高,需要过夜,mRNA较蛋白更容易受到影响所致。

研究显示,钙调素能直接或间接地影响细胞的某些DNA复制和RNA表达,进而影响某些原癌基因及抑癌基因的表达,而后者的改变又可以影响肿瘤细胞的生长及生物学行为。CaM参与DNA合成和细胞增殖的调控作用,在促进肿瘤细胞的凋亡中,细胞内Ca^{2+}浓度的稳定、钙/钙调素的稳态平衡起着十分重要的作用,这种稳态一旦破坏,即可诱发或促进肿瘤的发展[6,7]。李晓军等[8]利用DNA体外重组技术构建高表达CaM载体,并将其转染到大鼠正常肾细胞和NIH3T3细胞中,得到稳定的高表达CaM细胞株,发现高表达CaM可促进细胞从G_1期向S期及G_2期向M期的进程,刺激DNA合成,并使细胞对培养基中的血清依赖性降低,在单层培养中出现接触抑制丧失的情况。我们的研究结果显示,CaM的表达与患者性别、年龄及组织学类型无明显关系,但与肿瘤的分化程度、有无淋巴结转移及临床分期有密切关系,肿瘤分化程度较低、出现了淋巴结转移及临床分期较晚的标本中CaM的表达率较高($P<0.05$),与文献[9]报道基本一致,CaM高表达的患者容易出现浸润转移,预后较差,提示CaM的表达可作为肺癌细胞分化程度及浸润、转移的重要分子标志,CaM对判断肺癌患者预后有重要意义。

参考文献:

[1] 梁华平, 王正国, 耿 波, 等. 创伤后活化T细胞内游离钙、钙调素、钙调素依赖的蛋白激酶的变化及其与T细胞功能的关系[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(3): 214-216.

[2] Tomohiko M, Takayoshi I. Static and kinetic studies of complex formations between calmodulin and mastoparan X[J]. Biochemistry, 2002, 41(5): 1618-1629.

[3] Spicer Z, Millhorn D E. Oxygen sensing in neuroendocrine cells and other cell types: pheochromocytoma (PC12) cells as an experimental model[J]. Endocr Pathol, 2003, 14(4): 277-291.

[4] Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary P M, *et al*. Apoptosis and lung cancer: a review[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(5): 885-898.

[5] Xu L, Meissner G. Mechanism of calmodulin inhibition of cardiac sarcoplasmicreticulum Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor)[J]. Biophys J, 2004, 86(2): 797-804.

[6] 张 弘, 柳惠图. 钙调素拮抗剂诱导人肺癌细胞PLA-801凋亡机理研究[J]. 科学通报, 1998, 43(5): 519-523.

[7] Cifuentes E, Mataraza J M, Yoshida B A. *et al*. Physical and functional interaction of androgen receptor with calmodulin in prostate cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(2): 464-469.

[8] 李晓军, 武建国, 郭大文, 等. 人钙调素基因Ⅲ表达载体的构建及在大肠杆菌中的高效表达[J]. 金陵医院学报, 1998, 11(4): 331-334.

[9] Liu G X, Sheng H F, Wu S. A study on the levels of calmodulin and DNA in human lung cancer cells[J]. Br J Cancer, 1996, 73(7): 899-901.

(编辑 薛国文)