

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.08.015

基膜聚糖基因在侵袭转移子宫内膜癌组织中的表达

张慧峰¹, 熊世禄¹, 李崇健², 杨 镇²

Expression of Lumican in Invasive and Metastatic Endometrial Carcinoma Tissues

ZHANG Huifeng¹, XIONG Shilu¹, LI Dongjian², YANG Zhen²

1. Department of Gynecology, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 2. Department of Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Abstract: Objective To explore the expression profiles of Lumican in invasive and metastatic endometrial carcinoma. **Methods** Forty-eight cases of endometrial carcinoma and paired normal endometrium tissues were applied for detecting the expression of Lumican. The mRNA and protein expression profiles of Lumican were analysed by RT-PCR and Western blot, respectively. SPSS 13.0 statistical software was adopted to analyze the expression difference of Lumican in endometrial carcinoma. **Results** Compared with the normal endometrium tissues, mRNA and protein expression of Lumican were down-regulated in endometrial carcinoma tissues [(0.54 ± 0.042) vs. (0.87 ± 0.035); (0.42 ± 0.026) vs. (0.83 ± 0.037)], respectively ($P < 0.05$). It was showed evidently difference of Lumican expression in 48 cases of endometrial carcinoma, including superficial invasive group (22 cases), deep invasive group (11 cases) /cervix invasive group (11 cases) and lymph metastatic group (4 cases). **Conclusion** Lumican was downregulated in endometrial carcinoma, Lumican expression was negatively related to the invasion and metastasis of endometrial carcinoma. Low expression of Lumican may be involved in the malignant biological behavior of invasion and metastasis in the endometrial carcinoma.

Key words: Lumican; Endometrial carcinoma; Invasion; Metastasis; Pathology

摘要:目的 探讨不同侵袭、转移性的子宫内膜癌组织中基膜聚糖基因(Lumican)的表达差异性。**方法** 选取 48 例子宫内膜癌以及正常内膜组织,采用半定量 RT-PCR 及 Western blot 分别检测 Lumican mRNA 及蛋白表达水平,SPSS 13.0 软件包统计分析 Lumican 在不同侵袭、转移性的子宫内膜癌组织中的表达差异性。**结果** Lumican mRNA 及蛋白在内膜癌组织中表达明显低于正常内膜组织[(0.54 ± 0.042) vs. (0.87 ± 0.035); (0.42 ± 0.026) vs. (0.83 ± 0.037)],且表达水平间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。48 例子宫内膜癌组织中,子宫浅肌层侵犯组(22 例)、子宫深肌层侵犯组(11 例)或宫颈及宫旁侵犯组(11 例)、淋巴结转移组(4 例)四组之间组织中 Lumican mRNA 及蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$);子宫深肌层侵犯与宫颈及宫旁侵犯组之间 Lumican 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Lumican 在子宫内膜癌组织中表达水平下调;Lumican 的表达与子宫内膜癌组织侵袭、转移性负相关。Lumican 的低表达可能参与子宫内膜癌的侵袭、转移恶性生物学行为过程。

关键词: 基膜聚糖基因;子宫内膜癌;侵袭;转移;病理

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A

0 引言

基膜聚糖基因(Lumican)定位于人常染色体 12q 21.3~q22,其产物属于小分子量富含亮氨酸的糖蛋白家族。近期研究表明,Lumican 参与组织稳

态的维持及调节细胞生物功能,包括细胞增殖、转移与分化。Lumican 在各种恶性肿瘤组织中的表达水平与肿瘤的生长、转移相关联,但其具体肿瘤发生机制尚不明确。本研究对 48 例子宫内膜癌组织及其周边正常内膜组织 Lumican 的表达进行检测,以探讨侵袭转移子宫内膜癌组织中 Lumican mRNA 及蛋白表达水平。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收稿日期:2012-09-04;修回日期:2013-01-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30901430)

作者单位:1. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院妇科;2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院外科

作者简介:张慧峰(1977-),男,硕士,主治医师,主要从事妇科恶性肿瘤的发病机制与诊疗的研究

48 例子宫内膜癌组织标本及其周围的正常内膜,取自 2009 年 4 月至 2011 年 4 月,湖北省肿瘤医院妇瘤科的手术标本。患者年龄为 39~73 岁,中位年龄为 54 岁。根据手术病理分期按侵袭程度不同将患者分为四组:浅肌层侵犯组(肿瘤侵犯肌层深度 <1/2 肌层)(22 例,45.83%)、深肌层侵犯组(肿瘤侵犯肌层深度 >1/2 肌层)(11 例,22.92%)、宫旁及宫颈侵犯组(11 例,22.92%)、淋巴结转移组(4 例,8.33%),分析以上四组患者内膜癌组织 Lumican mRNA 及蛋白表达水平差异性。

1.2 标本采集

去手术切除标本,立即分离内膜癌组织大小约为 1 cm×1 cm×1 cm,于距离癌组织边缘 2 cm 处取正常内膜组织大小约为 1 cm×1 cm×1 cm (作为对照)。所取标本放置于液氮保存备用。以上患者均有明确的病理组织病理诊断资料。

1.3 试剂仪器

抗人 Lumican 单克隆抗体(美国 Proteintech 公司)、抗人 β -actin 单克隆抗体(美国 Abzoom 公司)、HRP 标记羊抗兔-IgG(美国 Abzoom 公司);PCR 引物(上海英俊生物公司)、RT-PCR 检测试剂盒(美国 Promega 公司)、细胞裂解液(美国 Invitrogen 公司)、M-MLV、PCR Kit、1 bp DNA 标识、焦碳酸二乙酯水、Taq 酶、RNA seA 酶(日本 TaKaRa 公司);蛋白提取试剂盒(Beyotime 公司)、蛋白质预染标识(美国 Gibco 公司);DNA 定量测定仪(美国 Pharmacia Biotech 公司);PCR 仪:GeneAmp PCR 扩增系统 9600 (美国 Perkin Elmer 公司);凝胶成像分析系统 GD8000(英国 UVP 公司);Western blot 仪器(美国 Bio-Rad 公司);KODAK 多光谱荧光活体成像系统(北京东胜创新生物科技有限公司)。

1.4 基膜聚糖基因 mRNA 检测

采用半定量 RT-PCR 技术检测组织中 mRNA 表达水平,步骤如下:(1)采用 Trizol 法提取组织总 RNA,并测定总 RNA 浓度,行反转录;(2)引物设计: β -actin 引物序列:(303 bp) 5'-AGCAGAG-GAAATGGAGACG-3' (上游引物);5'-GCCAA-CAGAGCAGTAGGAC-3' (下游引物);Lumican 引物序列:(682 bp) 5'-TCTACAATGAGCTGCGT-GTG-3' (上游引物);5'-ATCTCCTTCTGCATC-CTGTC-3' (下游引物);(3)反应条件:95°C 5 min, 95°C 45 s, 退火 45 s, 72°C 50 s, 36 个循环, 72°C 10 min 退火温度: β -actin, 57°C;基膜聚糖基因, 60°C;反应体系为 25 μ l;(4)扩增检测:制备 1.2% 琼脂糖凝胶,取 15 μ l 扩增产物电泳,凝胶成像分析系统对 DNA 条带扫描分析,以目的基因扫描灰度

值/ β -actin 扫描灰度值的百分数(%)作为目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.5 基膜聚糖基因蛋白检测

采用 Western blot 方法检测组织中蛋白表达水平,步骤如下:(1)提取组织标本细胞总蛋白:按照蛋白提取说明书严格执行,并测定蛋白浓度;(2)制备 SDS-PAGE 凝胶:包括 8% 浓缩胶与 12% 分离胶;(3)上样电泳,50 μ g 蛋白质的上样量,起始电压 80 V,过浓缩胶后电压增大至 120 V 到底;(4)转膜孵育:转移至 PVDF 膜上,3% BAS 封闭 2 h,加入一抗(1:200),4°C 孵育过夜;(5)显色检测:TBST 洗后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:2 000),室温孵育 2 h。计算机扫描图像,测出各条带面积灰度值,与内参 β -actin 比较检测蛋白的相对含量。

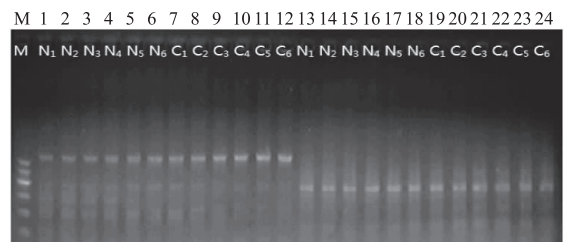
1.6 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验与单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lumican mRNA 在子宫内膜癌与正常内膜组织中表达差异性

半定量 RT-PCR 法检测 48 例内膜癌组织与正常组织 Lumican mRNA 表达分别为(0.54 \pm 0.042)与(0.87 \pm 0.035);内膜癌组织 Lumican mRNA 表达明显低于正常内膜组织,两者比较差异有统计学意义($t = 13.47, P < 0.05$),见图 1。



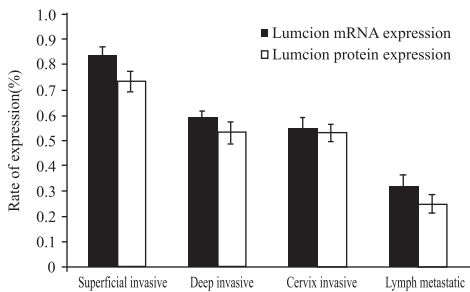
Lumican mRNA levels of endometrial carcinoma and normal tissues were detected by RT-PCR. From lane 1 to lane 12, the bands showed amplicon of Lumican with size of 682 bp. From lane 13 to lane 24, it showed amplicon of β -actin with size of 303 bp. M: marker, N: normal tissues, and C: endometrial carcinoma tissues. (In RT-PCR, β -actin was used as an equal loading control and relative value of band density was calculated)

图 1 不同侵袭、转移性的子宫内膜癌组织中基膜聚糖基因 mRNA 的表达

Figure 1 The mRNA level of Lumican in invasive and metastatic endometrial carcinoma tissues

2.2 Lumican mRNA 在不同侵袭、转移性的子宫内膜癌中的表达差异性

研究显示,不同侵袭、转移性的内膜癌组织 Lumican mRNA 表达存在差异性:肿瘤组织侵袭、转移性的程度越高,Lumican mRNA 表达越低,见图 2。子宫浅肌层侵犯组、子宫深肌层组或宫颈及宫旁组、淋巴结转移组等组织 Lumican mRNA 表达差异有统计学意义($P < 0.05$);子宫深肌层侵犯组与宫颈及宫旁侵犯组 Lumican mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。提示,Lumican mRNA 表达与子宫内膜癌组织侵袭、转移性负相关。



The levels of Lumican mRNA and protein in endometrial carcinoma tissues of superficial invasive group, deep invasive group, cervix invasive group, and lymph metastatic group were calculated and compared. The statistical significance was determined by SPSS software

图 2 基膜聚糖基因蛋白在侵袭、转移性子宫内膜癌组织中的表达($n = 3, \bar{x} \pm s$)

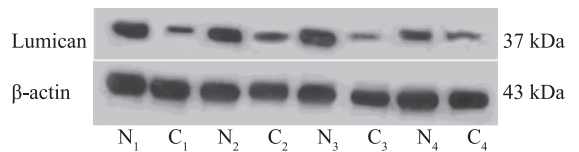
Figure 2 The expression of Lumican in invasive and metastatic endometrial carcinoma tissues shown by bar graph($n = 3, \bar{x} \pm s$)

2.3 Lumican 蛋白在子宫内膜癌与正常内膜组织中表达差异性

Western blot 法检测 48 例内膜癌组织与正常组织 Lumican 蛋白表达分别为(0.42 ± 0.026)与(0.83 ± 0.037)。内膜癌组织 Lumican 蛋白表达明显低于正常内膜组织,且两者比较差异有统计学意义($t = 15.81, P < 0.05$),见图 3。

2.4 Lumican 蛋白在不同侵袭、转移性的子宫内膜癌中的表达差异性

Western blot 法检测结果显示,不同侵袭转移程度的内膜癌组织 Lumican 蛋白表达存在差异性:子宫浅肌层侵犯组、子宫深肌层侵犯组或宫颈及宫旁侵犯组、淋巴结转移组 Lumican 蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$);子宫深肌层侵犯组与宫颈及宫旁侵犯组 Lumican 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。提示 Lumican 蛋白表达与子宫内膜癌组织侵袭、转移性呈负关联。



Lumican protein levels of endometrial carcinoma and normal tissues were detected by Western blot assay. Normal tissues and endometrial carcinoma tissues were represented as N and C. β -actin was used as an equal loading control and relative value of band density was calculated

图 3 子宫内膜癌组织中基膜聚糖基因蛋白的表达
Figure 3 The protein expression of Lumican in endometrial carcinoma tissues

3 讨论

Lumican 首先在鸡角膜中发现,其特征为角质素硫酸糖蛋白^[1]。早期研究发现,Lumican 属于小分子量富含亮氨酸的糖蛋白家族(small leucine-rich repeat proteoglycans, SLRPs),其组成非胶原细胞外基质蛋白的主要片段^[2]。Lumican 以糖蛋白形式广泛表达于人体各种组织^[3-4]。近期研究显示,Lumican 参与结缔组织、胶原纤维的生成调节,维持细胞外基质结构及功能完整性^[5-9],调节细胞增殖、黏附与转移生物特性^[10-13],参与肿瘤增殖、浸润及转移等恶性生物学过程。Lumican 在多种恶性肿瘤组织中的异常表达,且其表达水平与肿瘤的生长、转移相关联,但其具体肿瘤发生机制尚不明确^[14-16]。

研究表明,人乳腺癌中 Lumican mRNA 在肿瘤间质表达上调,且其表达水平与肿瘤高分期、低水平雌激素受体状态密切相关^[14,17];早期淋巴结转移的结直肠癌组织中 Lumican 高表达,其表达水平与淋巴结转移的范围和肿瘤浸润深度有关^[15];近期报道,Lumican 在胃癌组织中表达缺失,且与胃癌的淋巴结转移和 TNM 分期有关^[18]。

本研究采用半定量 RT-PCR 技术,结合免疫蛋白质印迹,对正常子宫内膜组织、不同侵袭转移性的子宫内膜癌组织中 Lumican 基因和蛋白的表达进行定量分析。结果显示:Lumican 在子宫内膜癌组织中的表达水平明显低于正常子宫内膜组($P < 0.05$);不同侵袭、转移性的子宫内膜癌组织 Lumican mRNA 与蛋白表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$),Lumican 的表达与子宫内膜癌组织侵袭、转移性呈负相关;然而,子宫深肌侵犯层组与宫旁及宫颈侵犯组 Lumican 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),其具体机制仍有待探究。因此,我们认为,内膜癌组织中 Lumican 的表达下调导致细胞外基质结构及功能完整性失衡,有利于癌细胞向深部肌层

及周围组织的浸润,进入血管或淋巴管的癌细胞游走向其他器官组织,进而发生远处转移。此外,Lumican 的表达下调导致形成胶原纤维的细胞外基质结构和(或)功能异常,诱导 P21^{WAF1} 基因表达下调而促进 P53 下游的转录激活、增加抑制细胞周期素依赖性底物的去磷酸化活动,解除细胞恶性转化的抑制作用,进一步促进肿瘤的发生和转移^[19-20]。

本研究发现,Lumican 在子宫内膜癌组织中表达下调,Lumican 的表达与子宫内膜癌组织侵袭、转移性负相关。Lumican 的低表达可能参与子宫内膜癌的侵袭、转移恶性生物学行为过程。

参考文献:

- [1] Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267 (29): 20613-9.
- [2] Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, *et al.* cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267 (1):347-52.
- [3] Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, *et al.* Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141 (5): 1227-86.
- [4] Funderburegh JL, Funderburgh ML, Mann MM, *et al.* Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(36): 24773-7.
- [5] Ping Lu Y, Ishiwata T, Asano G. Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells [J]. *J Pathol*, 2002, 196(3):324-30.
- [6] Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, *et al.* Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141 (5): 1277-86.
- [7] Chakravarti S, Peitroll WM, Hassell JR, *et al.* Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(11):3365-73.
- [8] Jepsen KJ, Wu F, Perngallo JH, *et al.* A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38):35532-40.
- [9] Chakravarti S, Paul J, Roberts L, *et al.* Ocular and scleral alterations in gene-targeted lumican-fibromodulin double-null mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(6):2422-32.
- [10] Ishiwata T, Fujii T, Ishiwata S, *et al.* Effect of morpholino antisense oligonucleotide against lumican mRNA in human embryonic kidney (HEK) 293 cells [J]. *Pathol Int*, 2004, 54(2): 77-81.
- [11] Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'Onofrio MF, *et al.* The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 296(2):294-306.
- [12] Nikitovic D, Berdiaki A, Zafiropoulos A, *et al.* Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells [J]. *FEBS J*, 2008, 275(2):350-61.
- [13] D'Onofrio MF, Br zllon S, Baranck T, *et al.* Identification of beta1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(2):266-72.
- [14] Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, *et al.* Expression of lumican in human breast carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(7):1348-52.
- [15] Troup S, Njue C, Klfewer EV, *et al.* Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans lumican and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1):207-14.
- [16] Lu YP, Ishiwata T, Kawahara K, *et al.* Expression of lumican in human colorectal cancer cells [J]. *Pathol Int*, 2002, 52 (8):519-26.
- [17] Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, *et al.* Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma [J]. *J Pathol*, 2000, 192(3):313-20.
- [18] Luo HR, Liu LX, Jiang HC. Expression of lumican mRNA in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Zhongguo Pu Wai Ji Chu Yu Lin Chuang Za Zhi*, 2007, 14(5):551-3. [罗海蓉,刘连新,姜洪池. 抑癌基因 Lumican 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2007, 14(5):551-3.]
- [19] Yoshioka N, Inoue H, Nakanishi K, *et al.* Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction; lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras [J]. *J Virol*, 2000, 74(2):1008-13.
- [20] Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslutti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin [J]. *Nature*, 1990, 346(6281):281-4.

[编辑校对:周永红]