

## · 短篇论著 ·

## 非吸烟肺腺癌中 GPC5 mRNA 的表达意义

伍达枢 梁祥森 廖绪强

**【摘要】目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)患者组织中磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC5)mRNA的临床意义。**方法** 采用RT-PCR法检测96例NSCLC组织(研究组,按是否腺癌分为腺癌组和非腺癌组,按是否吸烟分为吸烟组和非吸烟组)和18例良性病变肺组织(对照组)中GPC5 mRNA表达的相对水平,半定量分析其与临床组织病理学特征的关系。**结果** GPC5 mRNA的平均表达水平在NSCLC腺癌组低于对照组( $P < 0.01$ );腺癌组低于非腺癌组( $P < 0.01$ );非吸烟组低于吸烟组( $P < 0.01$ ),差异有统计学意义。非腺癌组、吸烟组、非吸烟组分别与对照组比较,GPC5 mRNA的表达差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。NSCLC组中GPC5 mRNA的表达水平与患者年龄、性别、肿瘤分化程度及临床分期均无关( $P$ 均 $> 0.05$ ),与吸烟和病理类型有关( $P$ 值均为0.003)。**结论** GPC5 mRNA表达的下调与NSCLC中非吸烟腺癌患者可能存在相关性。

**【关键词】** 癌,非小细胞肺; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖类; 烟草,非吸烟

磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC5)基因属磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican)家族,国外研究发现其与非烟民罹患肺癌密切相关,GPC5基因发生变异,活性降低,则罹患肺癌风险可能增高<sup>[1]</sup>。本实验采用RT-PCR法检测96例NSCLC组织和18例良性病变肺组织中GPC5 mRNA的表达水平,分析其表达与临床组织病理学特征的关系,为确立GPC5作为非吸烟者肺癌早期诊断指标以及治疗的新靶点提供科学依据。

## 一、材料与与方法

1. 标本来源:取我院2010年1月至2011年6月手术切除的NSCLC标本96例,所有患者术前均未进行放疗和化疗。另取18例手术切除的良性病变肺组织(8例肺大疱,4例炎性包块,4例肺结核,2例肺曲霉菌)作为对照,全部标本收集后立即于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,全部标本均有病理确诊。

2. 引物的设计与合成:由大连宝生物公司设计合成,见表1。

表1 各基因引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度(bp)
GPC5	F:5'-GGTCTACAACCACCTCATT-3'	128
	R:5'-CCATCTGTCCCATTACTCT-3'	
GADPH	F:5'-GACCTGACCTGCCGTCTA-3'	148
	R:5'-AGGACTGGGTCTCGCTGT-3'	

3. 方法:(1)总RNA的提取及cDNA的合成:按Trizol裂解抽提法进行总RNA的提取。通过测A260值检测RNA浓度,测A260/280值检测其纯度。1%琼脂糖凝胶电泳分析其完整性。按逆转录试剂盒提供的方法合成cDNA存放 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

(2)RT-PCR扩增:25  $\mu\text{l}$ 体系:PCR reaction mixture 12.5  $\mu\text{l}$ , 上、下游引物(10 pmol/ $\mu\text{l}$ )各1  $\mu\text{l}$ , cDNA模板1  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 25  $\mu\text{l}$ 。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min,95  $^{\circ}\text{C}$  45 s,58  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s,共30个循环;72  $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5 min。

(3)数据收集处理和分析:统计结果用灰度值表示,以GAD-

PH mRNA灰度值为参照,标化计算各样本数据进行半定量分析,从而获得GPC5 mRNA的相对模板数,即:GPC5/GADPH。

4. 统计学分析:采用SPSS 13.0软件进行统计分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,样本均数的比较用 $t$ 检验,GPC5 mRNA的表达与临床组织病理学特征的关系,采用良性病变肺组织对照组GPC5 mRNA表达的95%可信区间(CI)的上限(Mean $\pm 1.96\text{SD}$ )作为参考值,将NSCLC组织GPC5 mRNA的表达分为阳性和阴性表达组,采用卡方检验进行统计分析, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. 引物特异性:用2%琼脂糖凝胶电泳分析比对PCR产物长度并经测序确认与目的基因GPC5片段cDNA序列一致(图1)。

2. GPC5的表达比较:NSCLC中GPC5 mRNA的平均表达水平在腺癌组低于对照组(1.43 $\pm$ 1.02 vs. 3.12 $\pm$ 1.82),差异有统计学意义( $P < 0.01$ );腺癌组低于非腺癌组(1.43 $\pm$ 1.02 vs. 3.51 $\pm$ 1.44),差异有统计学意义( $P < 0.01$ );在非吸烟组低于吸烟组(1.52 $\pm$ 1.11 vs. 3.32 $\pm$ 1.56),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。非腺癌组、吸烟组、非吸烟组分别与对照组比较,GPC5 mRNA的表达差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。NSCLC组中GPC5 mRNA的表达水平与患者年龄、性别、肿瘤分化程度及临床分期均无关( $P$ 均 $> 0.05$ ),与吸烟和病理类型有关( $P$ 值均为0.003),见表2。

## 三、讨论

GPC5基因是迄今为止发现的第一个非烟民罹患肺癌的特定基因,约有1/3的非吸烟肺癌患者有此基因的变异。Handel等<sup>[2]</sup>研究发现与健康人相比,肺腺癌患者GPC5基因表达下调,其活性降低50%,提示GPC5表达的下调与肺癌的发生发展相关,可能起抑癌作用。此外相关报道<sup>[1,3,4]</sup>指出GPC5基因在肺腺癌中的表达明显降低,而其他病理类型的肺肿瘤,包括肺良性肿瘤、鳞癌、小细胞癌及大细胞癌等,其GPC5缺失率与在正常肺组织中的缺失均无明显差异,提示GPC5表达的下调与肿瘤病理类型有关,可能仅限于肺腺癌患者,本研究亦证实了这一点。进一步对GPC5与吸烟的关系探讨发现GPC5在非吸烟肺癌患者中的表达低于吸烟患者,提示GPC5表达的下调可能与患者是否吸烟有关。Landi等<sup>[5]</sup>指出在肺腺癌中,从不吸烟的患者GPC5



图1 GPC5琼脂糖凝胶电泳结果

表2 GPC5 mRNA 的表达与肺癌临床特征的关系[例, (%) ]

项目	例数	GPC5 mRNA 阴性 表达	$\chi^2$ 值	P 值
性别			0.345	0.557
男	56	45 (80.3)		
女	40	34 (85.0)		
年龄			0.002	0.966
<60岁	38	30 (78.9)		
≥60岁	58	46 (79.3)		
吸烟史			9.100	0.003
有	35	21 (60.0)		
无	61	53 (86.9)		
病理类型			8.884	0.003
腺癌	61	54 (88.5)		
非腺癌	35	22 (62.8)		
分化程度			1.329	0.515
高分化	19	15 (78.9)		
中分化	32	29 (90.6)		
低分化	45	39 (86.7)		
淋巴结转移			0.022	0.882
有	58	48 (82.7)		
无	38	31 (81.6)		
TNM 分期			1.240	0.265
I + II	58	47 (81.0)		
III + IV	38	34 (89.5)		

基因的缺失率远比吸烟者高,提示 GPC5 表达的下调或缺失可能增加非吸烟患者罹患肺癌的概率,对 GPC5 基因的进一步研究,将有可能阐明非吸烟患者罹患肺癌的相关机制。

本研究采用 RT-PCR 法检测 GPC5 的 mRNA 水平,对 mRNA 的检测可以提高实验数据的准确性,实验中内参 GADPH 在各检测样本中均持续阳性表达,提示样本质量良好,保证了实验数据的可靠性,但本实验检测的 mRNA 基于基因水平,进行的半定量分析,不如梁冠标等<sup>[6]</sup>采用实时荧光定量 PCR 具有高度的灵敏性,大多数的基因发挥作用是通过蛋白的表达,从 mRNA 到蛋白中间翻译、修饰过程中可能造成 mRNA/蛋白水平倒置现象,需后续实验进一步验证。GPC5 可促进分布在细胞表面分泌型糖蛋白配体 (Hedgehog) 及跨膜蛋白受体 (Ptched) 之间的相互作用,从而增强 Hh 通路信号的传导,Hh 信号通路在多种肿瘤组织与细胞系中异常激活,并与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生、侵袭转移等密切相关,阻断肿瘤细胞中 Hh 信号传导通路将为人类肿瘤的治疗提供一个新的有效手段<sup>[7-8]</sup>。由此我们推断,抑制 GPC5 的活性可能降低 Hh 通路信号的传导,从而起抑癌作用,但仍有待于进一步研究探讨。

综上所述,我们通过本课题得出结论:GPC5 mRNA 表达的下调与 NSCLC 中非吸烟腺癌患者可能存在相关性,GPC5 有可能是非吸烟者肺腺癌早期诊断指标,也是肺癌治疗潜在的新靶点,但其机制有待于后续研究进一步证实。

#### 参 考 文 献

- [1] Li Y, Sheu CC, Ye Y, et al. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. *Lancet Oncol*, 2010, 11:321-330.
- [2] Handel AE, Ramagopalan SV. GPC5 and lung cancer in multiple sclerosis. *Lancet Oncol*, 2010, 11:714.
- [3] Su LJ, Chang CW, Wu YC, et al. Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap resampling scheme. *BMC Genomics*. 2007, 8:140.
- [4] Talbot S G, Estilo C, Maghami E, et al. Gene expression profiling allows distinction between primary and metastatic squamous cell carcinomas in the lung. *Cancer Res*, 2005, 65:3063-3071.
- [5] Landi MT, Dracheva T, Rotunno M, et al. Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. *PLoS One*, 2008, 3:e1651.
- [6] 梁冠标,陈铭伍,洗磊,等. 乙酰肝素酶 mRNA 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012, 6: 2890-2894.
- [7] Capurro MI, Xu P, Shi W, et al. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell*. 2008, 14:700-711.
- [8] 顾红兵,李继坤. Hedgehog 信号通路与肿瘤的关系研究进展. 现代肿瘤医学, 2011(4):808-811.

(收稿日期:2012-08-30)

(本文编辑:张岚)