

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.014

整合素 αv mRNA 在食管鳞状细胞癌组织的表达研究 *

傅庆萍 孙明忠 朱 蓉 周中卫 金 浩 居会祥[△]

(东南大学医学院附属盐城医院检验科 江苏 盐城 224001)

摘要 目的:检测食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma ESCC)组织整合素 αv (integrin αv ITGA V)的表达,分析 ITGA V 表达与临床病理因素之间的相关性,探讨 ITGA V 在 ESCC 的进展和预后中的作用。**方法:**采用实时荧光定量 PCR 法检测 72 例 ESCC 组织 ITGA V 的表达,并同时检测 33 例食管炎性组织为对照。分析 ITGA V 表达与 ESCC 癌临床病理因素之间的相关性。**结果:**ESCC 癌组织中 ITGA V 的 mRNA 表达水平明显高于炎症组织($P<0.05$),且表达水平与 T、N 和临床分期(P 均 <0.05)呈显著相关,而与患者年龄及性别无相关性。**结论:**ITGA V 的过度表达与 ESCC 的转移、进展有关,ITGA V 可能会成为 ESCC 患者个体化治疗有效的预后标志物。

关键词:ITGA V;食管鳞状细胞;转移

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)09-1659-04

A Study on Expression of Integrin αv mRNA in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*

FU Qing-ping, SUN Ming-zhong, ZHU Rong, ZHOU Zhong-wei, JIN Hao, JU Hui-xiang[△]

(Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Yancheng Hospital of Southeast University Medical college, Yancheng, Jiangsu, 224001, China)

ABSTRACT Objective: The study aimed to detect the integrin αv (ITGA V) mRNA expression in Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to evaluate the correlation between integrin αv mRNA expression and clinicopathological factors. **Methods:** From 2012 to 2013, 72 cases of tissue samples of ESCC patients as the research object, and the 33 esophageal inflammation tissues as control. Real-time PCR assay was performed to detect the expression of ITGA V in all tissue samples. The RT-PCR results were analyzed and the correlation between ITGA V expression and clinicopathological factors was evaluated. **Results:** In ESCC patients' tissues, the expression level of ITGA V mRNA was significantly higher than those in the inflammation tissues ($P<0.05$), and the expression level were significantly correlated with T, N and clinical stage (all $P<0.05$). **Conclusion:** All these findings suggest that overexpression of ITGA V is closely associated with metastasis and progression of ESCC. Therefore, we suppose that ITGA V could be an effective prognostic marker in individualized treatment of patients with ESCC.

Key words: ITGA V; Esophageal squamous cell carcinoma; Metastasis

Chinese Library Classification (CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1659-04

前言

整合素(Integrin)是一类广泛存在于细胞表面的粘附分子,其功能主要是介导细胞与细胞外基质之间的粘附,参与细胞侵袭、转移、血管生成及肿瘤细胞其它一些重要的生物学行为,整合素由 α 和 β 亚基组成,其中的 αV 亚基能与至少 5 种不同的 β 亚基相连接,因而其功能作用受到越来越多的关注^[1]。以往文献报道在肺癌、乳腺癌和胃癌等恶性肿瘤组织中已检测出整合素的过表达^[2-4]。然而关于整合素 αv (Integrin αv , ITGA V)在食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的表达却鲜有报道,本研究旨在检测 ITGA V mRNA 在

ESCC 的表达,评估 ITGA V 表达与临床病理因素之间的关系,探讨 ITGA V 在 ESCC 的进展和预后中的作用。

1 材料和方法

1.1 组织样本

组织标本采自 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在东南大学医学院附属盐城医院就诊的 105 例食管疾病患者,其中 ESCC 患者 72 例,其中男 41 例、女 31 例,平均年龄 66.8 岁;食管炎患者 33 例,男 19 例、女 14 例,平均年龄 64.6 岁,ESCC 及食管炎患者的年龄及性别间比较差异无统计学意义,所有 ESCC 患者均未接受过放化疗,ESCC 分期按照国际抗癌联盟第六版进

* 基金项目:盐城市科技局科技发展计划项目(YK2012055)

作者简介:傅庆萍(1970-),女,本科,副主任技师,主要研究方向:临床分子诊断

[△] 通讯作者:居会祥,电话:13605109369, E-mail: 2659661466@qq.com

(收稿日期:2014-10-22 接受日期:2014-11-18)

行。所有患者均签署知情同意书。活检组织置于 -80℃ 冰箱保存。

1.2 试剂与仪器

用 SV Total RNA isolation System(Promega)抽提 RNA,并用核酸紫外检测仪(U-0080D)检测抽提 RNA 的质量,使用 PrimeScript® RT Master Mix kit (Takara) 进行逆转录实验;PCR 扩增使用 Rotor - Gene Q 扩增仪(QIAGEN),所有操作均严格按照说明书。

1.3 实时荧光定量 PCR 扩增

根据 ITGA V (基因库 NM_002210) 基因保守序列使用 Primer 5.0 软件设计引物,引物序列分别为:正向引物 5'-CT-CATCGTTTCCATTCCACT-3';反向引物 5'-CTTCAGTC TCAGGGTCTCC-3',扩增产物大小为 198 bp。以 β -actin 为内参,其引物序列如下:正向引物 5'-AGAAGGC TGGGGCT-CATTTC-3';反向引物 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3',扩增产物为 258 bp。25 μ L PCR 扩增体系含 2 μ L 的 cDNA,

1 $\times$ SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa)12.5 μ L,0.5 μ L各引物和蒸馏水 9.5 μ L。扩增使用 Rotor - Gene Q 扩增仪,循环参数为:94℃ 5 分钟预变性;94℃ 30 秒,56℃ (β -actin,58℃) 30 秒,72℃ 30 秒,共 30 个循环;最终 72℃ 延伸 10 分钟。靶基因的相对表达使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法表示。

1.4 数据分析

所有数据均使用 SPSS16.0 软件进行统计分析。定量数据以均数 $\pm$ 标准差。独立样本 t 检验用于比较 ITGA V mRNA 的表达,卡方(χ^2)检验用于分析 ITGA V 表达与临床病理因素相关性。P 值 <0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 ITGA V 和 β -actin 的扩增效率

通过对扩增体系的不断优化,用 ITGA V 和 β -actin 不同倍比稀释浓度分别进行扩增,两组标准曲线斜率差小于 0.1 (图 1),证明可以使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。

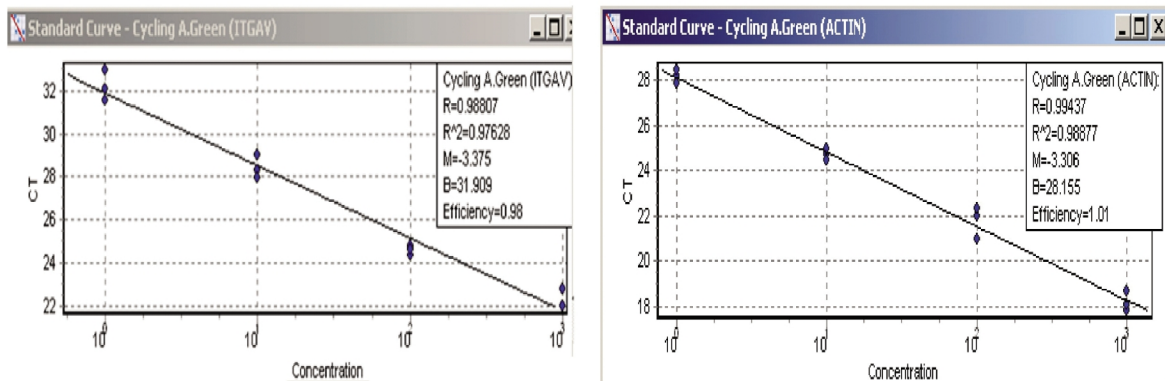


图 1 定量 PCR 检测 ITGA V 和 β -actin 标准曲线

Fig. 1 The standard curve for ITGA V and β -actin detected by qRT-PCR

2.2 ITGA V 和 β -actin 的溶解曲线

如图 2 示,ITGA V 和 β -actin 的溶解曲线均为单峰,提示

所扩增的产物特异性较好,无非特异性扩增。

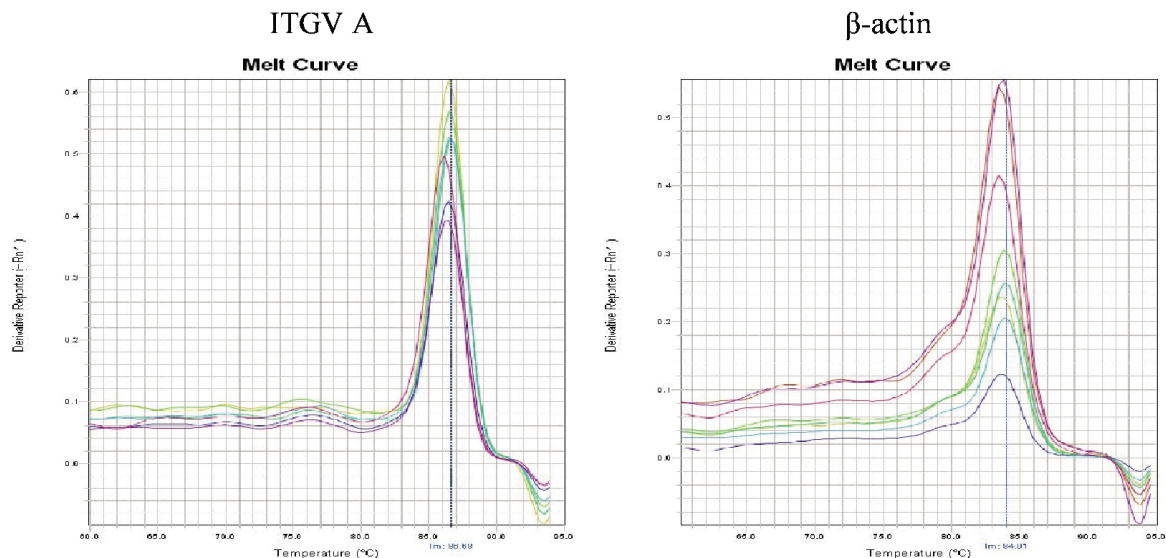


图 2 定量 PCR 检测 ITGA V 和 β -actin 溶解曲线

Fig. 2 The melt curve of ITGA V and β -actin detecting by qRT-PCR

2.3 ITGA V mRNA 在 ESCC 和炎症组织的表达

对 72 例 ESCC 和 33 例炎症组织 ITGA V mRNA 进行实时荧光定量 PCR 分析,结果(表 1)显示 ESCC 和炎症组织 IT

GA V mRNA 的平均 ΔC_T 分别为 3.82 ± 1.23 、 6.52 ± 0.85 ,相对于炎症组织,ESCC 组织 ITGA V mRNA 表达比炎症组织高 6.67(2.67~17.05)倍,表达有显著差异($P=0.000$)。

表 1 ITGA V mRNA 在 ESCC 和炎症组织的表达

Table 1 The mRNA expression levels of ITGA in ESCC and inflammatory tissues

Groups	n	αv	β -actin	ΔC_T	$-\Delta \Delta C_T$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$	P
		Average C_T	Average C_T	αv - β -actin			
ESCC tissue	48	21.98 ± 1.19	18.42 ± 0.56	3.82 ± 1.23	2.66 ± 1.23	6.67(2.67~17.05)	0.000
inflammatory tissues	13	24.63 ± 0.51	18.29 ± 0.48	6.52 ± 0.85	0.00 ± 0.85	1.00(0.56~1.78)	

2.4 ITGA V mRNA 与临床病理特征的相关性

72 例 ESCC 的 ITGA V mRNA 在 $T_3 \sim T_4$ 期的表达明显高于 $T_1 \sim T_2$ 期($P=0.000$),有淋巴结转移组(N_+) ITGA VmRNA 的表达显著高于无淋巴结转移组(N_0)($P=0.000$),临床分期中 III+IV 期的 ITGA V mRNA 表达水平也明显高于 I + II 期($P=0.000$)。ITGA V mRNA 的表达在年龄、性别组并无明显差异(表 2)。

表 2 ITGA V mRNA 与临床病理特征的相关性

Table 2 The correlation between ITGA V mRNA and clinicopathological features

Groups	Numbers	ITGA V	P
Gender			
male	36	22.31± 1.39	0.899
female	12	22.16± 1.12	
Ages (yrs)			
≤ 55	21	22.93± 1.29	0.797
>55	27	22.62± 1.39	
T staging			
T ₁ /T ₂	28	23.63± 1.53	0.000
T ₃ /T ₄	20	20.93± 0.49	
N staging			
N ₀	16	23.90± 1.28	0.000
N ₊	32	21.65± 1.51	
Clinical stages			
I +II	16	23.77± 1.16	0.000
III+IV	32	21.72± 1.53	

3 讨论

食管癌(esophageal cancer)是消化系统常见恶性肿瘤之一,《2012 中国肿瘤登记年报》最新统计资料显示,在中国排名前十位的恶性肿瘤中,食管癌以其发病率 22/10 万,位于第五位,而死亡率为 17/10 万,位列第四。尽管目前对食管癌的诊疗水平有所提高,但经过手术治疗和新的辅助治疗,食管癌 5 年存活率仍然仅有 5~15%,并且大多数病人在确诊后的一年内死亡^[5,6],因此目前对于探寻疗效观察和预后评估的生物学标志物显得尤为重要。

整合素是细胞外基质蛋白(extracellular matrix, ECM)的主要受体,其结合到 ECM 的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)基序发挥细胞粘附作用^[7]。当整合素受体与 ECM 作用后,各种信号转导途径被激活,相关基因表达发生变化,从而引起细胞生

物学行为变化,包括细胞迁移和侵袭^[8-10]。肿瘤细胞已被发现表达多种整合素,整合素的过度表达可导致某些信号通路的激活,导致肿瘤细胞增殖及迁移能力增加以及血管形成能力增强^[11-13]。有文献报道 ITGA V 在肿瘤转移和进展中发挥重要作用^[14,15]。

本次检测结果显示 ESCC 和炎症组织 ITGA V mRNA 的平均 ΔC_T 分别为 3.82 ± 1.23 、 6.52 ± 0.85 ,前者比后者高 6.67(2.67~17.05)倍。ESCC 组织中,ITGA V mRNA 在 $T_3 \sim T_4$ 期的表达明显高于 $T_1 \sim T_2$ 期($P=0.000$),有淋巴结转移组(N_+) ITGA V mRNA 的表达显著高于无淋巴结转移组(N_0)($P=0.000$),临床分期中 III+IV 期的 ITGA V mRNA 表达水平也明显高于 I + II 期($P=0.000$)。ITGA V mRNA 的表达在年龄、性别组并无明显差异。本研究结果提示 ITGA V 在 ESCC 的转移和发展中起着重要作用。有研究报道 ITGA V 在人眼睑鳞状细胞癌的高表达与肿瘤侵袭相关^[16]。Cui 等报道切断 ITGA V 和 ECM 蛋白的结合可降低人类肺癌细胞在小鼠肿瘤的生长^[17]。最近有研究显示喉和下咽鳞状细胞癌(LHSCC)组织中 ITGA V 的表达量明显高于正常组织,有淋巴结转移组 ITGA V 的表达显著高于无淋巴结转移组,ITGA V 的过度表达与肿瘤分化、转移密切相关^[18]。此外,ITGA V 在伤口修复、血管生成及肿瘤组织重塑过程起着重要作用^[19,20]。然而,关于 ITGA V 与 ECM 的相互作用激活信号转导机制,需要在体外进一步的研究来验证。

总之,我们的研究结果表明,ITGA V 的过度表达与 ESCC 的转移、进展相关,ITGA V 可能会成为 ESCC 患者个体化治疗的一个有效的预后标志物。

参考文献(References)

- [1] Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(3)
- [2] Song G, Ming Y, Mao Y, et al. Osteopontin prevents curcumin-induced apoptosis and promotes survival through Akt activation via $\alpha v \beta 3$ integrins in human gastric cancer cells [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(12): 1537-1545
- [3] Fong YC, Liu SC, Huang CY, et al. Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the $\alpha v \beta 3$ integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway [J]. Lung Cancer, 2009, 64(3): 263-270
- [4] Allan AL, George R, Vantyghem SA, et al. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer [J]. Am J Pathol, 2006, 169(1): 233-246
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA,

- Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249
- [6] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China [J]. Jpn J Clin Oncol, 2010, 40(4): 281-285
- [7] Legate KR, Wickström SA, Fassler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling [J]. Genes Dev, 2009, 23(4): 397-418
- [8] Xu GK, Yang C, Du J, et al. Integrin activation and internalization mediated by extracellular matrix elasticity: a biomechanical model [J]. J Biomech, 2014, 47(6): 1479-1484
- [9] Jean C, Gravelle P, Fournie JJ, et al. Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology[J]. Oncogene, 2011, 30(24): 2697-2706
- [10] Jülich D, Mould AP, Koper E, et al. Control of extracellular matrix assembly along tissue boundaries via Integrin and Eph/Ephrin signaling[J]. Development, 2009, 136(17): 2913-2921
- [11] Ohlund D, Franklin O, Lundberg E, et al. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop[J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 154
- [12] 向小芳, 杨桂芳, 杨倩, 等. 整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 和血管内皮生长因子在结肠直肠癌中的表达及临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(2): 199-201
- Xiang Xiao-fang, Yang Gui-fang, Yang Qian, et al. Expression and clinical significance of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma tissue [J]. Chin J Exp Surg, 2012, 29(2): 199-201
- [13] 杨再新, 王占平, 杨莉, 等. 整合素 $\alpha 6 \beta 4$ 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(8): 947-948
- Yang Zai-xin, Wang Zhan-ping, Yang Li, et al. Expression of integrin $\alpha 6 \beta 4$ in bladder carcinoma and its implication[J]. Chin J Exp Surg, 2007, 24(8): 947-948
- [14] Bachmann IM, Ladstein RG, Straume O, et al. Tumor necrosis is associated with increased $\alpha v \beta 3$ integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 362
- [15] Wong NC, Mueller BM, Barbas CF, et al. αv integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines [J]. Clin Exp Metastasis, 1998, 16(1): 50-61
- [16] Hsu A, Esmali B, Hayek B, et al. Analysis of αv integrin protein expression in human eyelid and periorbital squamous cell carcinomas [J]. J Cutan Pathol, 2011, 38(7): 570-575
- [17] Cui R, Takahashi F, Ohashi R, et al. Abrogation of the interaction between osteopontin and $\alpha v \beta 3$ integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice [J]. Lung Cancer, 2007, 57(3): 302-310
- [18] Lu JG, Li Y, Li L, et al. Overexpression of osteopontin and integrin αv in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas associated with differentiation and metastasis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(11): 1613-1618
- [19] Weis SM, Cheresh DA. αv integrins in angiogenesis and cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011, 1(1): a006478
- [20] Wang AG, Yen MY, Hsu WM, et al. Induction of vitronectin and integrin $\alpha v \beta 3$ in the retina after optic nerve injury[J]. Mol Vis, 2006, 12: 76-84

(上接第 1653 页)

- [11] Chen Y, Wang S, Bu S, et al. Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats [J]. Eur J Appl Physiol, 2011, 111(8): 1759-1767
- [12] Daans M, Luyten FP, Lories RJ. GDF5 deficiency in mice is associated with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(1): 208-213
- [13] Brisby H, Wei AQ, Molloy T, et al. The effect of running exercise on intervertebral disc extracellular matrix production in a rat Model[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35(15): 1429-1436
- [14] Scott JP, Sale C, Greeves JP, et al. The effect of training status on the metabolic response of bone to an acute bout of exhaustive treadmill running[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(8): 3918-3925
- [15] Liu Z, Aronson J, Wahl EC, et al. A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes [J]. Acta Orthop, 2007, 78(1): 46-55
- [16] Miazgowski T, Pynka S, Noworyta-Zietara M, et al. Bone mineral density and hip structural analysis in type 1 diabetic men [J]. Eur J Endocrinol, 2007, 156(1): 123-127
- [17] Melling CW, Gris  KN, Hasilo CP, et al. A model of poorly controlled type 1 Diabetes Mellitus and its treatment with aerobic exercise training[J]. Diabetes Metab, 2013, 39(3): 226-235
- [18] Rkel A, Sheehy O, Rahme E, et al. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes[J]. Diabetes Metab, 2008, 34(3): 193-205
- [19] Krinner A, Zscharnack M, Bader A, et al. Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation[J]. Cell Prolif, 2009, 42(4): 471-484
- [20] 赵剑. 有氧运动对 2 型糖尿病大鼠骨密度和骨生物力学指标的影响[D]. 上海体育学院, 2010
- Zhao Jian. Intensive Insulin Therapy and Bone Mineral Density in Type 1 Diabetes Mellitus [D]. Shanghai Physical Education College, 2010