

生长激素释放肽在非小细胞肺癌中的表达及意义

The Expression of Ghrelin in NSCLC and its Significance
XU Chun-hua, YU Li-ke, ZHANG Yu

徐春华, 于力克, 张宇 (南京市胸科医院, 江苏 南京 210029)

摘要: [目的] 探讨生长激素释放肽(Ghrelin)在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义。[方法] 应用免疫组织化学法检测 72 例肺癌组织及 30 例肺正常组织中 Ghrelin 的表达, 分析非小细胞肺癌不同临床病理特征组 Ghrelin 的表达差异。[结果] 在肺癌组织中 Ghrelin 阳性率为 58.33%, 显著高于正常肺组织的 13.33% ($P < 0.05$); Ghrelin 表达与患者性别、吸烟、分化程度、病理类型均无相关性 ($P > 0.05$), 与临床分期、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。[结论] 非小细胞肺癌组织中 Ghrelin 过度表达, 可能对肺癌的发生发展及侵袭转移起着一定的作用。

关键词: 非小细胞肺癌; 免疫组织化学; 生长激素释放肽

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)05-0371-03

生长激素释放肽(Ghrelin)是 1999 年由 Kojima 等^[1]发现的一种由 28 个氨基酸残基构成的小分子多肽, 是促生长激素分泌物受体 (growth hormone secretagogue receptor, GHS-R) 的第一个内源性配体。Ghrelin 主要由胃黏膜产生, 但在肠道、胰腺、下丘脑、垂体、肾、胎盘等多种组织中也有表达^[2-4], 并具有多种生理调节功能。本研究利用免疫组织化学方法观察 Ghrelin 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达, 并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

所有标本来源于南京市胸科医院 2007 年 9 月至 2009 年 12 月接受根治性手术治疗的 NSCLC 患者标本 72 例, 取同期手术的 30 例癌旁正常肺组织标本作为对照, 所有病例经病理 HE 染色确诊。72 例 NSCLC 中, 男性 42 例, 女性 30 例, 年龄 35~76 岁, 平均年龄 65.5 岁, 术前均未行化疗、放疗。其中鳞癌 42 例, 腺癌 30 例; 高分化癌 28 例, 中分化癌 22 例, 低分化癌 22 例; TNM 分期(2009 年肺癌国际

分期修订版), I~II 期 45 例, III~IV 期 27 例; 有淋巴结转移 32 例, 无淋巴结转移 40 例。

1.2 方法

1.2.1 试剂

纯化兔抗人 Ghrelin 抗体(一抗)购自美国 Phoenix 公司。二抗和三抗的 SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 其中包括内源性过氧化物酶阻断剂(3%双氧水)、封闭用的正常山羊血清工作液、生物素标记的山羊抗兔 IgG 工作液(二抗工作液)、辣根酶标记的链霉卵白素工作液(三抗工作液)、3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)试剂盒。

1.2.2 标本处理及组织切片

所有组织标本经 10%中性甲醛溶液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片厚度 5 μ m, 用涂有氨丙基-三乙氧基硅烷的胶片捞片。

1.2.3 免疫组织化学法检测

染色石蜡切片置于 60℃烤箱中烤 40 min, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化。室温下用 pH 7.4 的 PBS 液洗, 滴加 3%双氧水封闭, 室温 10min, 以去除内源性过氧化物酶。用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次, 每次 5min; 山羊血清封闭, 室温 15 min; 然后滴加 50 μ l 一抗溶液(按体积比 1:100 稀释), 4℃过夜。次日 PBS 冲

收稿日期: 2011-12-12
E-mail: xuchunhua74@163.com

洗3次,每次5min,滴加二抗溶液,37℃孵育30min;然后用PBS液冲洗3次,每次5min,滴加三抗溶液,37℃孵育30min;DAB显色,苏木素复染、脱水、透明、封片。光镜观察,每次染色均以0.01 mmol/L PBS代替一抗作空白阴性对照。

1.2.4 结果判断

采用双人双盲法进行独立观察和判断,将肿瘤细胞的胞浆内有棕黄色颗粒且染色强度显著高于非特异性背景者判断为阳性细胞。每例在显微镜下随机选择10个高倍视野($\times 400$),计算阳性细胞百分比,无阳性细胞或 $<10\%$ 为阴性,阳性细胞 $>10\%$ 为阳性。

1.3 统计学处理

应用SPSS13.0软件进行数据分析,采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

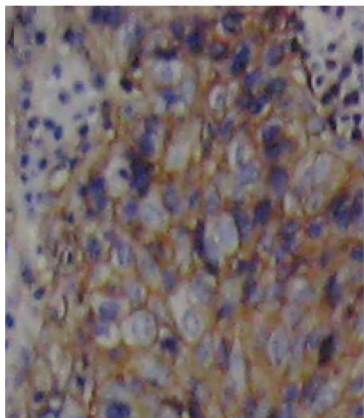
2 结果

2.1 Ghrelin 在肺癌组织中的表达

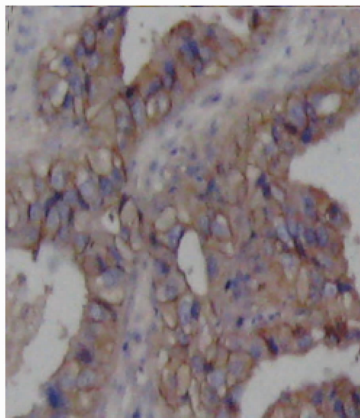
Ghrelin 阳性信号位于肺癌细胞浆内,呈棕黄色颗粒(图1)。30例肺正常组织中Ghrelin的表达阳性率为13.33%(4/30),明显低于肺癌组织的表达阳性率(58.33%,42/72),差异有显著性($P<0.05$)(表1)。

表1 肺癌组织与肺正常组织中Ghrelin表达

组别	例数	Ghrelin 表达		χ^2	P 值
		+	-		
肺正常组织	30	4	26	17.32	<0.05
肺癌组织	72	42	30		



Ghrelin 在肺鳞癌组织中表达($\times 400$)



Ghrelin 在肺癌伴淋巴结组织中表达($\times 400$)

图1 肺癌组织中Ghrelin表达

2.2 Ghrelin 表达与肺癌临床病理特征关系

Ghrelin 在肺癌组织中的表达与患者性别、吸烟、分化程度、病理类型均无关($P>0.05$),但与临床分期及淋巴结转移有关($P<0.05$),见表2。

表2 Ghrelin 表达与肺癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	Ghrelin 表达		χ^2	P 值
		+	-		
性别				0.06	>0.05
男性	42	24	18		
女性	30	18	12		
吸烟				0.77	>0.05
是	34	18	16		
否	38	24	14		
病理类型				0.06	>0.05
鳞癌	42	24	18		
腺癌	30	18	12		
病理分级				0.52	>0.05
G ₁	28	15	13		
G ₂	22	14	8		
G ₃	22	13	9		
淋巴结转移				29.73	<0.05
有	32	30	2		
无	40	12	28		
临床分期				20.86	<0.05
I~II	45	17	28		
III~IV	27	25	2		

3 讨论

Ghrelin 是一种 GHS-R 的内源性配体,1999 年由 Kojima 等^[1]利用免疫组化的方法从小鼠和人的

胃内分泌细胞以及下丘脑弓核中分离出来,因其能促进生长激素释放而命名。Ghrelin 是28个氨基酸组成的3位丝氨酸酰基化的多肽,主要由胃黏膜产生,但在肠道、胰腺、下丘脑、垂体、肾、胎盘等多种组织中也有少量Ghrelin分泌^[2-4];其受体在脑、心脏、肺、胰腺、肠、脂肪组织及肾脏中都有分布,并具有不同亚型^[5],广泛的受体分布决定了Ghrelin具有广泛的生物学效应。研究显示Ghrelin异常高表达能够促使细胞过度增

殖和恶性转化,与一些肿瘤的形成和发展有密切关系,但Ghrelin在肺癌中的作用目前尚不清楚。

大量研究显示许多肿瘤组织和癌细胞株中表达Ghrelin和GHS-R。如中枢神经系统的垂体瘤^[6];消化系统的胃癌、胃神经内分泌细胞增生和肠癌^[6];其他器官如乳腺癌组织和细胞株^[7]、甲状腺滤泡状癌、甲状腺癌细胞株^[8]。最近研究表明一些固醇类组织如睾丸、前列腺能表达Ghrelin^[9]。在前列腺癌细胞株(ALVA41、DU145、LNCaP和PC-3)中发现Ghrelin和GHS-R1a mRNA和蛋白同时表达^[10]。表明Ghrelin能够促进肿瘤的发生发展,起一种促癌基因的作用。但一些研究却认为Ghrelin能抑制乳腺癌、肺癌、甲状腺癌细胞株的增殖,可能起抑癌基因的作用。研究结果的差异可能与组织、细胞类型不同及实验方法差异有关。

有研究^[11]发现Ghrelin GHS-R1a mRNA在大多数无论是内分泌性或非内分泌性的肺癌有表达。Karapanagiotou等^[12]检测了101例不能手术的非小细胞肺癌患者、60例健康人血清Ghrelin后发现,肺癌患者体内Ghrelin水平显著高于健康人($P=0.017$),提示Ghrelin升高可能与肺癌发生有关。本组结果显示,肺癌组织中Ghrelin表达显著高于正常肺组织,表明Ghrelin表达增高、活性增强导致细胞周期加速、细胞增殖增加,从而参与肺癌的发生。有作者也认为Ghrelin激活后,其下游与细胞凋亡有关的抑癌基因p73等突变导致细胞凋亡障碍,是肺癌发病原因之一。此外,本组结果发现,Ghrelin表达与性别、吸烟和组织学类型无关,而与临床分期、淋巴结转移有关($P<0.05$),临床分期越晚,Ghrelin表达越高,有淋巴结转移的肺癌中Ghrelin表达较无转移者明显增高,说明Ghrelin可能与肺癌淋巴结转移相关。

综上所述,Ghrelin在肺小细胞肺癌中过表达,其可能在非小细胞肺癌的侵袭、转移过程中起到重要作用。

参考文献:

- [1] Kojima M, Hosoda H, Data Y, et al. Ghrelin is hormone releasing acylated peptide from stomach [J]. Nature, 1999, 402(6762): 656-660.
- [2] Gualillo O, Caminos JE, Blamco M, et al. Ghrelin, a novel placental derived hormone [J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 788-794.
- [3] Peino R, Baldell IR, Rodrigue-Garcia J, et al. Ghrelin induced growth hormone secretion in humans [J]. Eur J Clin Endocrinol, 2000, 143(6): R011-R014.
- [4] Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide ghrelin [J]. FEBS Lett, 2000, 486(3): 213-216.
- [5] Papatt IM, Ghe C, Casson IP, et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues [J]. Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(10): 3803-3807.
- [6] Korbonits M, Bustin SA, Kojim M, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(2): 881-887.
- [7] Cassoni P, Papotti M, Ghe C, et al. Identification, characterization and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(4): 1738-1745.
- [8] Kanamoto N, Akamim T, Hosoda H, et al. Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(10): 4984-4990.
- [9] Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC. Novel expression and functional role of Ghrelin in rat testis [J]. Endocrinology, 2002, 143(2): 717-725.
- [10] Jefery PL, Herinston AC, Chopin IX. Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines [J]. J Endocrinol, 2002, 172(3): R7-R11.
- [11] Dixit VD, Schafer EM, Pyle RS, et al. Ghrelin inhibits leptin and activation induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells [J]. J Clin Invest, 2004, 114(1): 57-66.
- [12] Karapanagiotou EM, Polyzos A, Dilana KD, et al. Increased serum levels of ghrelin at diagnosis mediate body weight loss in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients [J]. Lung Cancer, 2009, 66(3): 393-398.