

SH3 结构域谷氨酸富集样蛋白 3 在非小细胞肺癌中的表达及意义

王巍伟, 王珊珊, 张曼

(首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038)

摘要: [目的] 评价 SH3 结构域谷氨酸富集样蛋白 3 (SH3BGRL3) 在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理特征的相关性。[方法] 选取 2014 年 10 月至 2017 年 12 月确诊并接受手术治疗的 46 例非小细胞肺癌患者的癌组织标本以及距离癌组织 5cm 以上的癌旁组织, 免疫组化染色检测 SH3BGRL3 相对表达量, 荧光定量 RT-PCR 检测 SH3BGRL3 mRNA 表达。[结果] 癌组织中 SH3BGRL3 相对表达量、SH3BGRL3 mRNA 表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。肿瘤体积 $\geq 5\text{cm}^3$ 、侵及浆膜、病理分期 III~IV 期、有淋巴结转移患者 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 相对表达量高于肿瘤体积 $< 5\text{cm}^3$ 、未及浆膜、病理分期 I~II 期、无淋巴结转移患者 ($P < 0.05$)。病理分期、SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达是影响非小细胞肺癌患者预后的主要危险因素。[结论] SH3BGRL3 在非小细胞肺癌中呈现异常高表达, 且与肿瘤体积、浸润程度、病理分期、淋巴结转移等临床病理参数具有一定相关性。SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达是影响非小细胞肺癌患者预后的危险因素。

关键词: SH3 结构域谷氨酸富集样蛋白 3; 非小细胞肺癌; 淋巴结转移

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0582-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B003

Expression of SH3BGRL3 in Non-small Cell Lung Cancer and Its Significance

WANG Wei-wei, WANG Shan-shan, ZHANG Man

(Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of SH3 domain-binding glutamic acid rich like protein 3 (SH3BGRL3) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its significance. [Methods] From October 2014 to December 2017, 46 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) were enrolled in the study. The expression of SH3BGRL3 protein and mRNA was detected by immunohistochemical staining and fluorescence quantitative RT-PCR in cancer tissue specimens and pericancerous tissue specimens, respectively. [Results] The expression of SH3BGRL3 protein and the SH3BGRL3 mRNA in cancer tissues were significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of SH3BGRL3 protein and mRNA in patients with lymph node metastasis, serosa invasion, tumor volume $> 5\text{cm}^3$ and pathological stage III~IV was higher than that in those without lymph node metastasis and serosa invasion, and with tumor volume $< 5\text{cm}^3$ and pathological stage I~II (all $P < 0.05$). Multivariate regression analysis showed that pathological stage, SH3BGRL3 mRNA and protein expression were independent risk factors affecting the prognosis of patients with non-small cell lung cancer. [Conclusion] SH3BGRL3 is highly expressed in non-small cell lung cancer, and it is correlated with tumor volume, invasion degree, pathological stage and lymph node metastasis. The expression of SH3BGRL3 and SH3BGRL3 is the risk factor affecting the prognosis of non-small cell lung cancer.

Subject words: SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3; non-small cell lung cancer; lymph node metastasis

早期诊断和改善预后, 寻求预防和控制非小细

胞发生发展的对策已经成为大多数专家学者的研究课题^[1]。SH3 结构域谷氨酸富集样蛋白 3 (SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3, SH3BGRL3) 作为 TRX 家族的一员, 能够抑制 STAT3 信号通路活化, 与血管生成以及细胞迁移密切相关。但是关于

基金项目: 2015 年北京市医院管理局“登峰”人才培养计划 (DFL20150701)

通信作者: 张曼, 主任医师, 博士; 首都医科大学附属北京世纪坛医院医学检验科, 北京市海淀区羊坊店铁路 10 号 (100038); E-mail: zhangman@bjsjth.cn

收稿日期: 2019-08-22; **修回日期:** 2019-09-23

SH3BGRL3 表达变化与非小细胞肺癌发生发展关系的研究还鲜有报道。本文研究收集非小细胞肺癌患者手术切除标本,检测 SH3BGRL3 的表达,旨在评价 SH3BGRL3 在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理特征的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 10 月至 2017 年 12 月于首都医科大学附属北京世纪坛医院确诊并接受手术治疗的非小细胞肺癌患者 46 例,其中男性 29 例,女性 17 例,年龄 45~70 岁,平均年龄(64.2±9.0)岁,病理分期:Ⅰ期 8 例,Ⅱ期 13 例,Ⅲ期 17 例,Ⅳ期 8 例。排除标准:病历资料不全;接受过放、化疗治疗;并发其他恶性肿瘤;合并心脑血管疾病;心、肾、肝等器官严重衰竭或功能不全。本研究获得医院伦理委员会批准[2014 年科研论审第 5 号(NO.5,2014)],患者及家属均知情,签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 标本制作

所有患者均接受手术,自手术切除标本中取癌组织标本以及距离癌组织 5cm 以上的癌旁组织,每个标本分为 2 份,一份标本放入 1.5ml EP 管,液氮保存,一份标本用 10%福尔马林对标本进行固定,并进行常规石蜡包埋,厚度为 4mm,连续切片作免疫组化标记。

1.2.2 免疫组化染色及 SH3BGRL3 相对表达量测定

待测标本进行脱蜡、水化等处理之后,进行高压修复,并在 3% H_2O_2 环境下进行培育,15min 后滴入山羊血清进行封闭,在 25℃~27℃环境下孵育 0.5h,之后将封闭液抽离,加入 1:100 的 SH3BGRL3 抗体(Abcam 公司),将其置于 4℃环境中过夜培养,次日加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(北京中山金桥生物技术),并在恒温箱中培养 0.5h(恒温箱温度 37℃),使用 PBS 液冲洗后进行 DAB 显色、脱水、封片处理。使用显微镜,根据反应产物的颜色深浅及面积对 SH3BGRL3 相对表达量进行半定量分析。

1.2.3 RT-PCR 检测 SH3BGRL3 mRNA 表达

提取 RNA:先将研钵、研磨棒、钥匙等物品高压消毒,浸泡在液氮中备用。在 1.5ml EP 管中加入 1ml Trizol。取大小约 0.5cm×0.5cm×0.5cm 组织块,放

入研钵,液氮中敲碎、研磨成粉末状,放入 Trizol 裂解液中,静置 10min。然后加 0.2ml 氯仿,剧烈震荡混匀,静置 5min,4℃,12 000r/15min 离心,将上层水相移至另一印管中,加等体积异丙醇,-20℃静置 10min,混匀 4℃,12 000r/10min 离心,弃上清,加入 75%乙醇 0.5~1ml 洗涤沉淀 2 次,4℃,12 000r/5min 离心,弃上清,空气中干燥 10min。再用适量(20μl)的无 RNase 水(DEPC 水)溶解沉淀。用 DEPC 水将 RNA 稀释 100 倍后,测 RNA 浓度。

逆转录合成 cDNA:20μg 体系中,加 2μg 总 RNA,1μl Oligo(dT)。用 DEPC 水补 8ml,70℃水浴 5min,冷却 1min 以上。然后加 5μl 5×RT buffer,5μl dNTPs,1μl 反转录酶,1μl RNA 酶抑制剂,42℃金属浴 60min,-80℃保存。RT-PCR:依次加入 10μl Mix,1μl 原液,0.4μl 上游引物和下游引物,最后加 DEPC 水配成总体积为 20μl 的反应体系混匀。严格按照定量 PCR 仪的操作说明书进行。94℃预变性 5min,然后 95℃反应 10s,60℃反应 10s,72℃反应 10s,共进行 40 个循环,重复最少 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算出 SH3BGRL3 mRNA 表达。

SH3BGRL3 引物序列:上游:5'CAGGCTCACAT-ATGAGCGGCCTGCG,下游:R-5'CTGGGTTA-CTCGA-GAGCCAGCTTCAGGAAC3'。

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述,两组间比较行独立样本 t 检验,多组间比较采用 F 值检验。多因素回归分析中,因变量为连续型变量时采用多重线性回归模型。因变量为二分类变量时采用 Logistic 回归模型。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SH3BGRL3 与 SH3BGRL3 mRNA 在癌组织、癌旁组织中的表达比较

癌组织中 SH3BGRL3 相对表达量显著性高于癌旁组织($P<0.05$);癌组织中 SH3BGRL3 mRNA 表达显著性高于癌旁组织($P<0.05$)(Table 1, Figure 1)。

2.2 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达与非小细胞肺癌病理特征的关系

肿瘤体积 $\geq 5\text{cm}^3$ 、侵及浆膜、病理分期Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移患者 SH3BGRL3 相对表达量高于于

瘤体积<5cm³、未及浆膜、病理分期 I ~ II 期、无淋巴结转移患者 ($P<0.05$); 肿瘤体积 $\geq 5\text{cm}^3$ 、侵及浆膜、病理分期 III ~ IV、有淋巴结转移患者 SH3BGRL3 mRNA 表达高于肿瘤体积 <5cm³、未及浆膜、病理分期

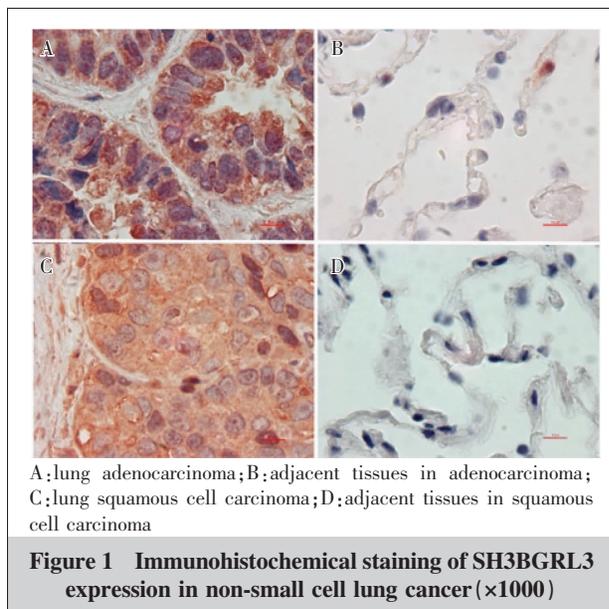
I ~ II 期、无淋巴结转移患者 ($P<0.05$)(Table 2)。

2.3 非小细胞肺癌预后因素分析

肿瘤体积、浸润程度、病理分期、淋巴结转移以及 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达为影响非小细胞肺癌患者预后的危险因素(Table 3)。

Table 1 Comparison of relative expression level of SH3BGRL3 and SH3BGRL3 mRNA in cancer tissues and adjacent tissues

Tissue	N	SH3BGRL3	SH3BGRL3 mRNA
Cancer tissue	46	1.05±0.12	0.94±0.10
Paracancerous tissue	46	0.73±0.06	0.59±0.05
<i>t</i>		16.180	21.229
<i>P</i>		0.001	0.001



3 讨论

SH3 结构域谷氨酸富集样蛋白 3(SH3BGRL3) 是氧化还原蛋白(thioredoxin, TRX)家族的一员, 是一种在机体组织中大量表达的小分子蛋白^[2-3]。有学者研究显示, SH3BGRL3 与机体心脏结构形态具有一定相关性, 与心脏病的发生发展具有密切联系。有学者研究认为, SH3BGRL3 是 miR-K6-3p 的靶蛋白, 能够直接与 STAT3 相结合, 起到阻止 STAT3 入核、下游基因转录的作用, 进而发挥抑制 STAT3 信号通路活化的作用。还有学者认为机体组织中 SH3BGRL3 表达出现异常变化时, STAT3 会出现异常表达、磷酸化, 血管生成因子与 MMPs 表达会出现明显的上升, 导致血管生成以及细胞迁移。本文研究结果显示, 非小细胞肺癌组织中 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达相对较高, 说明 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 在非小细胞肺癌中呈现异常高表达。由此, 我们猜测 SH3BGRL3 表达的变化可能与非小细胞肺癌发生发展具有一定相关性。

研究表明, 随着非小细胞肺癌病情的不断发展,

Table 2 Relationship between SH3BGRL3 and SH3BGRL3 mRNA and pathological characteristics in NSCLC($\bar{x}\pm s$)

Pathological feature		N	SH3BGRL3	<i>t</i>	<i>P</i>	SH3BGRL3 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
Tumor volume	<5cm ³	21	0.64±0.05	9.305	<0.001	0.51±0.04	13.680	<0.001
	$\geq 5\text{cm}^3$	25	0.81±0.07			0.72±0.06		
Infiltration degree	No serous membrane	20	0.62±0.04	10.931	<0.001	0.50±0.03	12.949	<0.001
	Invasion of serous membrane	26	0.79±0.06			0.69±0.06		
Stage	I ~ II	21	0.65±0.05	9.798	<0.001	0.52±0.04	5.309	<0.001
	III ~ IV	25	0.78±0.07			0.67±0.07		
Lymph node metastasis	Yes	24	0.81±0.07	7.423	<0.001	0.66±0.07	7.155	<0.001
	No	22	0.64±0.04			0.53±0.06		

Table 3 Multivariate regression analysis for prognosis of patients with non-small cell lung cancer

Indicators	β	SE	Wald	<i>P</i>	OR	95%CI
Tumor volume	1.16	0.35	6.15	0.03	2.16	1.62~3.24
Infiltration degree	1.19	0.39	6.23	0.03	2.25	1.67~3.31
Installment	1.41	0.56	7.83	0.01	3.45	1.85~4.05
Lymph node metastasis	1.22	0.41	6.43	0.02	2.33	1.65~3.29
SH3BGRL3	1.39	0.57	7.96	0.01	3.58	1.81~3.94
SH3BGRL3 mRNA	1.35	0.51	7.23	0.01	3.16	1.73~3.61

肿瘤体积也会不断增大^[4]。魏振强等^[5]研究表明,肿瘤体积大小与非小细胞肺癌患者的预后具有一定的相关性,是非小细胞肺癌患者预后的独立预测因子。本文研究结果显示,肿瘤体积较大的非小细胞肺癌患者 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达相对较高,说明肿瘤体积变化与 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达变化具有一定相关性。

大量临床研究表明,癌细胞浸润程度与病情恶化程度密切相关^[6]。本文对 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达与癌组织浸润程度相关性分析,侵及浆膜的癌组织 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达相对较高,说明 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达的变化与非小细胞肺癌组织浸润程度具有一定相关性。TNM 分期是评价非小细胞肺癌症状严重程度的重要指标^[7]。本文结果显示,TNM 分期 III~IV 期非小细胞肺癌患者 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达相对较高,说明非小细胞肺癌患者病情与 SH3BGRL3 表达具有一定相关性,SH3BGRL3 表达越高,非小细胞肺癌患者病情越严重。这一研究结果的原因可能是 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 异常高表达与非小细胞肺癌组织的恶性行为有关。恶性肿瘤淋巴结转移情况是判断患者预后主要指标^[8-11]。本文中对 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达与非小细胞肺癌淋巴结转移相关性进行分析,结果显示,出现淋巴结转移的患者 SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达相对较高,说明 SH3BGRL3 表达与非小细胞肺癌患者淋巴结转移具有一定相关性。本文通过多因素回归分析显示,病理分期、SH3BGRL3、SH3BGRL3 mRNA 表达是影响非小细胞肺癌患者预后的危险因素。

综上所述,SH3BGRL3 在非小细胞肺癌中呈现异常高表达,且与肿瘤体积、浸润程度、病理分期、淋巴结转移等临床病理参数具有一定相关性,与非小细胞肺癌发生和演进过程密切相关。

参考文献:

[1] Wang C, Li YW, Li Y, et al. Expression and clinical characteristics of LC-3 and p62 in non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2008, 21(6): 445-450. [王聰, 李永文, 李颖, 等. LC-3 和 p62 在非小细胞肺癌中的表达及其临床特征分析[J]. 中国肺癌杂志, 2008, 21(6): 445-450.]

[2] Chiang CY, Pan CC, Chang HY, et al. SH3BGRL3 protein as a potential prognostic biomarker for urothelial carcinoma:

a novel binding partner of epidermal growth factor receptor[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(24): 5601-5611.

[3] Chang SS. SH3BGRL3 protein as a potential prognostic biomarker for urothelial carcinoma: a novel binding partner of epidermal growth factor receptor[J]. J Urol, 2017, 198(1): 40-41.

[4] Ge HT. The effect of tumor volume and radiation dose on the prognosis of locally advanced non-small cell lung cancer[J]. China Emergency Medicine, 2017, 37(z1): 56-57. [葛含天. 肿瘤体积和放疗剂量对局部晚期非小细胞肺癌预后的影响[J]. 中国急救医学, 2017, 37(z1): 56-57.]

[5] Wei ZQ, Xie HJ, Su XD, et al. Study on the predictive value of tumor volume for the prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer after operation [J]. Chinese Medical Journal, 2018, 15(8): 104-107, 123. [魏振强, 谢昊均, 苏晓东, 等. 肿瘤体积对 I 期非小细胞肺癌术后患者预后预测价值的研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(8): 104-107, 123.]

[6] Wang Y, Lu HM, Chen LJ, et al. The infiltration degree of CD8 + T cells in gastric cancer tissue and its significance [J]. Journal of Clinical Laboratory, 2019, 37(4): 251-256. [王琰, 卢慧敏, 陈陆俊, 等. 胃癌组织中驻留 CD8+T 细胞的浸润程度及其意义[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(4): 251-256.]

[7] Liu JL, Ha MW. Differences in prognostic judgement of NSCLC patients by TNM staging of lung cancer in 7th and 8th editions[J]. Medicine and Philosophy, 2018, 39(8): 45-48. [刘俊伦, 哈敏文. 第 7 版、第 8 版肺癌 TNM 分期对 NSCLC 患者预后判断的差异[J]. 医学与哲学, 2018, 39(8): 45-48.]

[8] Deng WY, Wei C, Li N, et al. The relationship between lymph node metastasis and prognosis in patients with esophageal cancer after radical resection[J]. Chinese Journal of Medicine, 2016, 96(47): 3829-3832. [邓文英, 魏辰, 李宁, 等. 食管癌根治术后患者淋巴结转移与预后的关系[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(47): 3829-3832.]

[9] Chen K, Yang HJ, Deng XF, et al. The effect of lymph node metastasis on the prognosis of pancreatic cancer patients [J]. Chinese Journal of General Surgery, 2018, 33(6): 452-455. [陈凯, 杨洪吉, 邓小凡, 等. 淋巴结转移对胰腺癌患者预后的影响[J]. 中华普通外科杂志, 2018, 33(6): 452-455.]

[10] Zhou Y. The relationship between lymphatic vessel space infiltration and lymph node metastasis in early cervical cancer and its prognostic value[J]. Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2018, 34(2): 109-112. [周滢. 早期宫颈鳞状上皮癌淋巴管间隙浸润与淋巴结转移的关系及其预后价值[J]. 实用妇产科杂志, 2018, 34(2): 109-112.]

[11] Kong J, Zhao HW, Li H, et al. The effect of regional lymph node metastasis on the prognosis of hepatectomy patients with primary hepatocellular carcinoma [J]. Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery, 2017, 23(12): 809-813. [孔杰, 赵海旺, 李辉, 等. 区域淋巴结转移对原发性肝细胞癌肝切除患者预后的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2017, 23(12): 809-813.]