

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.017.html>

ROR α 与 REV-ERB α 在人胃癌组织表达情况及其临床意义

王小山, 祁义军, 俞浩远, 梁 瑞, 汪正广

摘要 目的 研究维甲酸相关孤儿受体(ROR α)与孤儿核受体(REV-ERB α)在人正常胃组织和胃癌组织中的表达情况、相关性及其临床病理意义。方法 收集50例不同临床病理分期的胃癌患者的石蜡切片,运用免疫组织化学染色技术检测ROR α 与REV-ERB α 在人正常胃组织及不同临床病理分期胃癌组织中的表达,同时Western blot研究ROR α 与REV-ERB α 在人正常胃组织及不同TMN分期人胃癌组织中的表达情况。结果 免疫组织化学染色结果显示,ROR α 与REV-ERB α 在人胃癌组织中表达明显降低,同时ROR α 与REV-ERB α 的表达水平与胃癌患者TMN分期($P=0.013$ 、 0.010)及有无淋巴结转移($P=0.001$ 、 0.002)密切相关,与患者年龄、性别及肿瘤大小无相关性。McNemar检验显示ROR α 与REV-ERB α 在人胃癌组织中的表达呈正相关性($Kappa=0.377$, $P=0.007$)。同时Western blot结果显示ROR α 与REV-ERB α 在人胃癌组织中表达明显下降,且与TMN分期有显著相关性($P<0.05$)。结论 ROR α 与REV-ERB α 在人胃癌组织中表达降低与人胃癌组织的TMN分期及有无淋巴结转移有密切关联,并且ROR α 与REV-ERB α 可能在人胃癌组织中存在协同表达及调控,从而影响胃癌的发生与发展。

关键词 ROR α ; REV-ERB α ; 胃癌; TMN分期

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0411-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.017

胃癌是世界上常见的消化道恶性肿瘤,死亡率位居世界第三位,每年超过700 000例死于胃癌^[1-2],在我国,绝大多数患者在发现病情时均已失去手术根治的机会。因此,探讨胃癌的发生与发展机制有利于更好的预测及发现病情,并尽可能寻求更好的药物治疗方案。维甲酸相关孤儿受体(retinoid-related orphan receptors alpha, ROR α)与孤儿核受体(nuclear receptor nuclear receptor subfamily 1, group D member 1, REV-ERB α)在人体脂肪、骨骼肌

和大脑组织等呈高表达^[3],研究^[4]表明,ROR α 与REV-ERB α 调节葡萄糖代谢,炎症反应,癌症等多种疾病。国内外文献^[4]关于ROR α 与REV-ERB α 在乳腺癌、肝细胞癌、肺癌等均有研究,但在胃癌方面的研究比较少见。该研究此次运用Western blot和免疫组织化学染色技术检测ROR α 与REV-ERB α 在人正常胃组织及胃癌组织中的表达水平,同时分析两者之间的相关性及其临床病理意义,使ROR α 与REV-ERB α 有望成为胃癌治疗的靶点和研制化疗药物的理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集2014年行胃癌根治术的50例患者的病理资料及胃癌组织石蜡切片,作为对照,同时收集这50例患者正常胃组织的石蜡切片,该取材取自距离胃癌组织 ≥ 5 cm的正常胃上皮组织,患者当中男32例,女18例,年龄35~89(58.4 ± 10.8)岁,术前美国东部肿瘤协作组评分在0~2分,排除术前放化疗、精神系统疾病、内分泌功能紊乱、怀孕及肝肾功能疾病,所有参与实验的患者签署知情同意书,并获得安徽医科大学临床伦理委员会批准,其详细数据见表1。

1.2 试剂与材料 免单克隆抗体ROR α 与REV-ERB α 均购自美国Abcam公司;免疫组织化学染色使用的共轭抗体(PV6000)、DAB显色试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的二抗(羊兔抗)、 β -actin购自美国Santa Cruz公司;ECL发光显影剂购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 将收集的人正常胃组织及胃癌组织的石蜡切片脱蜡至水,用枸橼酸缓冲液(pH 6.0)95℃煮沸15 min后自然冷却至室温,用PBS冲洗3遍,每次5 min。用3%的H₂O₂孵育10 min阻断内源性过氧化物酶,分别加入ROR α 一抗、REV-ERB α 一抗室温孵育2 h。PBS洗涤3次,每次5 min后,滴加对应的共轭抗体(PV6000,兔抗),再次使用PBS洗涤3次(5 min/次),使用DAB

2017-11-17 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH182)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 王小山,男,硕士研究生;

汪正广,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: wang-zhengguang@ahmu.edu.cn

试剂盒显色 5 min, 后用苏木精复染 60 s。PBS 及自来水清洗各 1 次(3 min/次), 吹干。请病理科两位高年资医师采用双盲方式在光镜视野下找出细胞核, 核染色为棕黄色颗粒为阳性(+), 根据高倍镜下每个视野下染色强度进行半定量, 无染色为 0 分, 染色强度 $\leq 25\%$ 为 1 分, 染色强度为 $25\% \sim 50\%$ 为 2 分, 染色强度 $\geq 50\%$ 为 3 分, 0 ~ 2 分为阴性(-), 3 分为阳性(+), 具体统计数据结果见表 1。

1.3.2 Western blot 检测 将冻存在 -80°C 的人体正常胃组织及不同分期的胃癌组织取出, 分别剪碎取 0.1 g 放入匀浆器中, 再加入蛋白裂解液(Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton, 0.1% SDS, 5 mg/ml Leupeptin, 1 mmol/L PMSF) 1 ml 置于冰上研磨, 待研磨完全后将匀浆移至 1.5 ml 离心管中, 于 -80°C 及 4°C 中反复冻融 3 次, 使用低温高速离心机离心 30 min (4°C 、12 000 r/min), 离心后取上清液放入 1.5 ml 离心管中, 用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白提取液进行定量, 调整为同一浓度后加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液, 充分混匀后于沸水中煮 8 min, 放入 -80°C 冻存。取等量的蛋白提取液行 SDS-PAGE 电泳, 待所需目的条带跑至分离胶中间后将蛋白转移至 PVDF 膜上。室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 封闭完成后用含 0.05% Tween-20 的 TBS 液清洗 PVDF 膜 3 次(10 min/次), 分别加入 ROR α 与 REV-ERB α 兔单克隆抗体(1:500 稀释) 4°C 孵育过夜, 再次用含 0.05% Tween-20 的 TBS 清洗 PVDF 膜 3 次(10 min/次), 常温下用对应的含辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000 稀释)孵育 2 h, 用 ECL 发光显影剂检测结果, Quantity one 软件分析显影条带灰度值, β -actin 作为内参对照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行

数据分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数差异比较采用单因素方差分析, χ^2 检验检测 ROR α 与 REV-ERB α 两者之间相关性, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROR α 与 REV-ERB α 在人胃癌组织中的表达量差异 ROR α 与 REV-ERB α 在人正常胃组织及胃癌组织中的表达差异可以通过免疫组织化学染色技术显示, ROR α 在人正常胃组织中的表达明显高于人胃癌组织, 并且随着 TMN 分期增长, ROR α 在人胃癌组织的表达量逐渐减少。见图 1。REV-ERB α 在人正常胃组织中表达同样高于人胃癌组织, 并且 REV-ERB α 表达水平随着 TMN 分期增加逐渐减少。见图 2。

2.2 ROR α 与 REV-ERB α 的表达与胃癌的临床病理相关分析 ROR α 在人胃癌组织的表达量与不同患者的年龄、性别、肿瘤大小间差异无统计学意义, 但与患者肿瘤的 TMN 分期($P = 0.013$)及有无淋巴结转移($P = 0.001$)有密切关联。本研究显示 REV-ERB α 在人胃癌组织的表达量也与不同患者的年龄、性别、肿瘤大小间差异无统计学意义, 而与患者肿瘤的 TMN 分期($P = 0.010$)及有无淋巴结转移($P = 0.002$)有密切关联。见表 1。

2.3 ROR α 与 REV-ERB α 在人胃癌组织中表达的相关性 ROR α 表达强度为阳性(+), 而 REV-ERB α 表达强度为阴性(-)有 6 例, 相反 ROR α 表达强度为阴性(-), 而 REV-ERB α 表达强度为阳性(+)有 8 例, 两者表达强度同为阳性(+)及阴性(-)的患者则分别有 10 及 26 例, 应用 McNemar 检

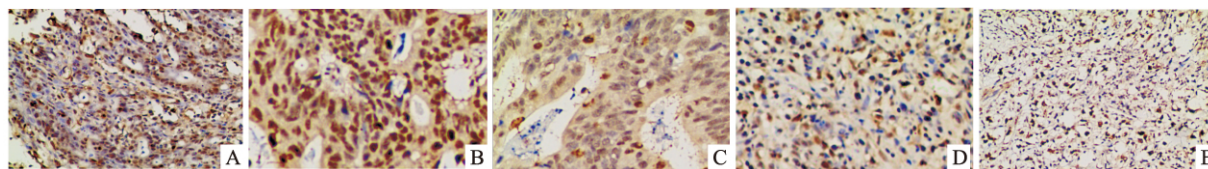


图1 ROR α 在人正常胃组织及 TMN I ~ TMN IV 分期胃癌组织的免疫组织化学染色表达 IHC 染色 $\times 200$
A: 人正常胃组织; B、C、D、E: TMN I、TMN II、TMN III、TMN IV 分期胃癌组织



图2 REV-ERB α 在人正常胃组织及 TMN I ~ TMN IV 分期胃癌组织的免疫组织化学染色表达 IHC 染色 $\times 200$
A: 人正常胃组织; B、C、D、E: TMN I、TMN II、TMN III、TMN IV 分期胃癌组织

表1 ROR α 与 REV-ERB α 的表达与胃癌的临床病理分析(*n*)

项目	<i>n</i>	ROR α 表达强度				REV-ERB α 表达强度			
		阳性(+)	阴性(-)	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性(+)	阴性(-)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别									
男	32	14	18	0.643	0.557	17	15	0.298	0.768
女	18	10	8			11	7		
年龄(岁)									
≤50	12	5	7	0.675	0.514	6	6	0.965	0.496
>50	38	21	17			25	13		
肿瘤大小(cm)									
≤5	24	11	13	1.936	0.254	10	14	0.349	0.584
>5	26	17	9			13	13		
TMN 分期									
I ~ II	11	8	3	7.219	0.013	7	4	7.598	0.010
III ~ IV	39	11	28			8	31		
淋巴结转移									
有	35	7	28	12.963	0.001	5	30	10.884	0.002
无	15	11	4			9	6		

测分析相关性, ROR α 与 REV-ERB α 在人胃癌组织的表达呈现正相关性(Kappa = 0.377, *P* = 0.007)

2.4 ROR α 与 REV-ERB α 在人胃癌组织中的表达差异 ROR α 与 REV-ERB α 在人正常胃组织及胃癌组织中的表达差异通过 Western blot 条带及柱状图显示(图 3A ~ C), ROR α 与 REV-ERB α 在人正常胃组织中的表达明显高于胃癌组织, 并且随着 TMN 分期增长, ROR α 与 REV-ERB α 的表达量逐渐减少(*P* < 0.05)。

3 讨论

胃癌是多因素参与下具有复杂发病机制的恶性肿瘤。ROR α 与 REV-ERB α 均属于核受体家族, 在人体骨骼肌、肝脏、大脑及脂肪组织等广泛表达^[1-2], 且在参与组织表达的过程中存在相似性, ROR α 与 REV-ERB α 利用特定的目的基因来调节相关的生理活动, 并且以特定的形式结合到靶基因的启动子反应元件上, 从而调控基因的表达^[4]。还可以与辅激活因子或辅抑制因子结合形成转录复合物, 通过组蛋白乙酰化或去乙酰化过程, 改变靶基因构象来调控靶基因转录^[5-6]。进一步研究^[6]表明, ROR α 至少能够识别 REV-ERBs 中的一种反应元件, 而且作为共转录因子一起存在于相同的组织里, ROR α 与 REV-ERB α 相互结合调节各组织节律性时, 可以通过竞争结合而相互拮抗, ROR α 常常起到转录激活作用, 而 REV-ERB α 起到转录抑制作用。研究^[7-8]表明, ROR α 与 REV-ERB α 均可以与生物钟基因(BMAL1)启动子上结合位点结合, 从而参与生命节律调节, 同时 ROR α 与 REV-ERB α 分别可影

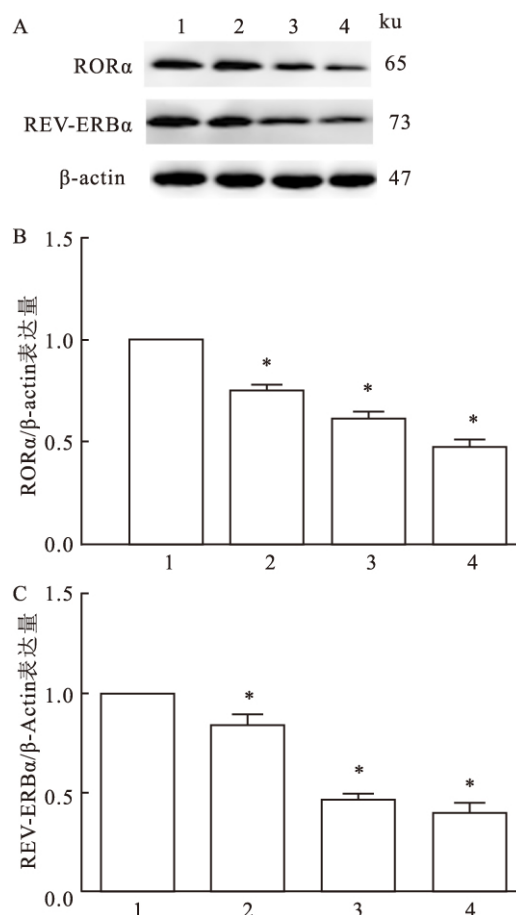


图3 ROR α 与 REV-ERB α 在人正常胃组织、不同分期胃癌组织的表达水平

A: Western blot 检测 ROR α 与 REV-ERB α 在人正常胃组织及胃癌组织中蛋白的表达; B: Quantity One 软件对 ROR α 条带进行灰度值分析; C: Quantity One 软件对 REV-ERB α 条带进行灰度值分析; 1: 人正常胃组织; 2: TMN I 分期胃癌组织; 3: TMN III 分期胃癌组织; 4: TMN IV 分期胃癌组织; 与人正常胃组织比较: * *P* < 0.05

响白介素-6、环氧化酶-2 炎症因子,纤溶酶原激活物抑制剂-1 蛋白酶抑制剂心功能调节因子,胆固醇、高密度脂蛋白及低密度脂蛋白等表达水平。增加免疫系统、糖尿病、脂质代谢、心血管疾病等发病的风险。

在肿瘤研究^[9]方面,RORs 核受体家族可调控 Th17 细胞的表达,当 RORs 活性发生改变,会明显影响 Th17 细胞的数量,Th17 细胞是自身免疫功能的关键因子,参与多种验证反应及免疫性疾病,对肝癌发病机制具有影响。ROR α 在可以诱导 SEMA3F 基因表达而影响乳腺癌细胞的侵袭能力^[10]。REV-ERBs 参与调控乳腺癌的侵袭并影响其预后^[11]。恶性肿瘤的发生与发展与癌基因及抑癌基因的表达有重大关联,机体内细胞恶性的增殖是恶性肿瘤的发病基础,REV-ERB α 可以参与内源性细胞凋亡途径,REV-ERB α 通过调控 BMAL1 和 COLCK 基因的表达,进而激活大量的 P73 凋亡蛋白,导致相关的凋亡因子(Caspase-3、Caspase-9、Bax 及 Bcl-2)表达,细胞凋亡呈不可逆性发展^[12]。ROR α 与 REV-ERB α 参与多种类型恶性肿瘤的发病机制,然而关于消化道恶性肿瘤的文献比较罕见,因此本研究推测 ROR α 与 REV-ERB α 共同参与胃恶性肿瘤的发生与发展,并调控其肿瘤细胞的凋亡。

通过免疫组织化学染色实验结果表明,ROR α 与 REV-ERB α 在人体胃癌组织中表达量明显减少,并且表达水平与人体胃癌组织的临床病理分化程度、淋巴结有无转移显著相关,与患者的年龄,性别,肿瘤大小间差异无统计学意义,表明 ROR α 与 REV-ERB α 的低表达可能参与胃癌的发病和疾病发展的过程。Spearman 相关分析示 ROR α 与 REV-ERB α 在人体胃癌组织中的表达呈现正相关性,表明 ROR α 与 REV-ERB α 在人体胃癌组织中可能存在协同的表达与调控机制。Western blot 条带从蛋白质水平进一步验证本研究的推测,ROR α 与 REV-ERB α 在人体胃癌组织中的表达量明显下降,并与肿瘤的 TMN 分期显著相关。

综上所述,可以表明 ROR α 与 REV-ERB α 的表

达与胃癌的发生与发展有密切关联,通过检测 ROR α 与 REV-ERB α 的表达情况可能有助于评估患者的胃癌恶性程度、侵袭程度及有无淋巴结转移情况。总之,ROR α 与 REV-ERB α 有望成为肿瘤标志物来进行胃癌的预后判断及研发新型的化疗药物。

参考文献

- [1] Peleteiro B,Severo M, La Vecchia C, et al. Model-based patterns in stomach cancer mortality worldwide [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2014,23(6):524-31.
- [2] 魏翔,陈绍龙,贾宁,等. 全反式维甲酸对人胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*,2017,52(8):1119-22.
- [3] Cho H,Zhao X,Hatori M, et al. Regulation of circadian behavior and metabolism by Rev- α and Rev- β [J]. *Nature*, 2012, 485(7396):123-7.
- [4] Kojetin D J,Burris T P. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*,2014,13(3):197-216.
- [5] 柴文,张宁,王艳青,等. 孤儿核受体 RORs 的病理生理作用及其调控机制 [J]. *生理科学进展*,2013,44(2):87-92.
- [6] 吴超,张金玲,杨盛力,等. 孤儿核受体 Rev-Erb α 功能与表达调控研究进展 [J]. *山东医药*,2013,53(30):98-101.
- [7] Ercolani L,Ferrari A,De Mei C, et al. Circadian clock: Time for novel anticancer strategies [J]. *Pharmacol Res*,2015,100:288-95.
- [8] Ferrell J M,Chiang J Y. Circadian rhythms in liver metabolism and disease [J]. *Acta Pharm Sin B*,2015,5(2):113-22.
- [9] Takahashi K,Yan I K,Kogure T, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of long non-coding RNA ROR modulates chemosensitivity in human hepatocellular cancer [J]. *Febs Open Bio*,2014,4:458-67.
- [10] Xiong G,Wang C,Evers B M, et al. ROR α suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression [J]. *Cancer Res*, 2012,72(7):1728-39.
- [11] Wang Y,Kojetin D,Burris T P. Anti-proliferative actions of a synthetic REV-ERB α / β agonist in breast cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*,2015,96(4):315-22.
- [12] Sancar A,Lindsey-Boltz L A,Gaddameedhi S, et al. Circadian clock,cancer,and chemotherapy [J]. *Biochemistry*,2015,54(2):110-23.

Expression and significance of ROR α and REV-ERB α in human gastric cancer tissues

Wang Xiaoshan, Qi Yijun, Yu Haoyuan, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To research the retinoid-related orphan receptor alpha (ROR α) and nuclear receptor

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.018.html>

NLR、LMR 和 PLR 与食管鳞癌患者预后的关系

杨 柳¹, 卢高峰¹, 刘宗文², 刘 超¹, 唐芙爱¹

摘要 目的 探讨中性粒细胞-淋巴细胞比值(NLR)、淋巴细胞-单核细胞比值(LMR)和血小板-淋巴细胞比值(PLR)预测食管鳞癌患者预后的价值。方法 回顾性分析接受治疗的1 061例食管鳞癌患者的临床资料,均经病理证实,计算初次诊断为食管鳞癌时NLR、LMR和PLR,分析NLR、LMR和PLR与临床病理特征和预后的关系。结果 以 $NLR=2.46$ 、 $LMR=200.26$ 和 $PLR=3.88$ 为界,高NLR组患者的5年生存率为19.10%,低NLR组的5年生存率为47.07% ($P<0.001$),高LMR组患者的5年生存率为57.00%,低LMR组的5年生存率为26.00% ($P=0.006$),高PLR组患者的5年生存率为40.15%,低PLR组的5年生存率为42.98% ($P=0.283$)。单因素分析显示性别、年龄、肿瘤标志物Cyfra21-1和鳞状细胞癌水平、食管癌分期、NLR水平、PLR水平、LMR水平均与患者预后显著相关 ($P<0.05$)。用这些因素进行多因素Cox回归分析显示,性别、年龄、NLR水平、LMR水平是影响患者总体生存率的独立预后

因素。结论 NLR和LMR是预测食管鳞癌患者预后的指标之一, $NLR\geq 2.46$ 、 $LMR<200.26$ 者生存期较短。

关键词 食管鳞癌; 预后; 中性粒细胞-淋巴细胞比值; 淋巴细胞-单核细胞比值; 血小板-淋巴细胞比值

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0415-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.018

食管癌是我国最常见的消化道肿瘤之一,死亡率为16.77/10万,居恶性肿瘤死亡率的第4位^[1]。我国食管癌病理类型以鳞癌为主,比例超过90%^[2]。人体的免疫状态和炎症反应与肿瘤的发生发展有关,较高的全身炎症反应往往是预后不良的标志,中性粒细胞-淋巴细胞比值(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)、淋巴细胞-单核细胞比值(lymphocyte-to-monocyte ratio, LMR)和血小板-淋巴细胞比值(platelet-to-lymphocyte ratio, PLR)是反应全身炎症反应的评价指标,已经被证实与多种癌症的预后有关^[3-7]。该文立足实际,以现有的医学研究文献为基础,用统计学方法,提高样本量,对既往关于外周血中NLR、PLR和LMR在食管鳞癌患者预后预测中的价值的研究进行证实、修订与完善。以求提高预后判断的准确性,指导其术后随访及治疗。

2017-11-27 接收

基金项目: 2014年度河南省医学科技攻关计划项目(省部共建项目)(编号: 201401009); 郑州市2013年第一批科技计划项目(科技创新团队)(编号: 131PCXTD628)

作者单位: 郑州大学第二附属医院¹ 消化内科、² 肿瘤科, 郑州450000

作者简介: 杨 柳,女,硕士研究生;

卢高峰,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: lugaofeng8@163.com

nuclear receptor subfamily 1, group D member 1 (Nr1D1, also known as REV-ERB α) expression, correlation and clinical pathological significance in human normal gastric tissues and gastric cancer tissues. **Methods** Collected 50 paraffin specimens with human normal gastric tissues and gastric cancer tissues. The expression of ROR α and REV-ERB α in human normal gastric tissues and different clinical pathological stages were detected by immunohistochemical staining and Western blot. **Results** The expression of ROR α and REV-ERB α in human gastric cancer tissues were reduced. They were significant in gastric cancer TMN stage ($P=0.013, 0.010$) and lymph node metastasis ($P=0.001, 0.002$), however, age, sex and tumor size had no statistical difference. Additional, there was a positive correlation between ROR α and REV-ERB α in human gastric cancer tissues by McNemar analysis (Kappa = 0.377, $P=0.007$). Western blot results demonstrated that the ROR α and REV-ERB α was reduced in human gastric cancer tissues with increased TMN stage ($P<0.05$). **Conclusion** ROR α and REV-ERB α are closely associated with TMN staging and lymph node metastasis in human gastric cancer tissues, and ROR α and REV-ERB α may be synergistically expressed and regulated in human gastric cancer tissues, which may affect the expression of ROR α and REV-ERB α in human gastric cancer occurrence and development.

Key words ROR α ; REV-ERB α ; gastric cancer; TMN stage