

YKL-40 和 IL-6 在结肠癌组织中表达变化的研究

杨 阳¹ 杨晶晶² 宁 宁³ 丁 毅¹ 金伟森¹

摘要 目的 探讨结肠癌组织中软骨糖蛋白 39 (YKL-40) 和白细胞介素-6 (IL-6) 蛋白的表达变化及其临床意义。方法 采用 Western blot、qRT-PCR 法检测 30 例接受根治性手术治疗的结肠癌患者的结肠癌组织标本及结肠癌旁组织中 YKL-40 和 IL-6 的表达变化。分析患者 YKL-40 和 IL-6 的表达与结肠癌的组织分化程度等临床病理学特征的关系。结果 Western blot 实验结果显示结肠癌组织中 YKL-40 和 IL-6 蛋白表达明显高于结肠癌旁组织 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 结果表明结肠癌组织中 YKL-40 和 IL-6 mRNA 表达明显高于结肠癌旁组织 ($P < 0.05$)。结肠癌组织中 YKL-40 与 IL-6 表达呈正相关性 ($r = 0.812, P < 0.05$)。此外, YKL-40 和 IL-6 表达与 TNM 分期、分化程度相关 ($P < 0.05$)。结论 YKL-40 和 IL-6 在结肠癌组织中呈高表达,可能与结肠癌的发生、发展有关。

关键词 结肠癌; YKL-40; IL-6

中图分类号 R 735.3+5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0727-04

结肠癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤,具有高度恶性生物学行为特性,常发生侵袭、转移^[1]。结肠癌的发生、发展是多基因表达异常所致,目前结肠癌的发病机制尚不明确。寻找结肠癌发生、发展的分子机制有重要的临床意义。人类软骨糖蛋白-39 (cartilage glycoprotein-39, YKL-40) 因其一条肽键氨基端的 3 个起始氨基酸为酪氨酸、赖氨酸和亮氨酸,3 个氨基酸的符号分别为 Y、K、L,故称为 YKL-40^[2]。Johansen et al^[3] 发现在胃肠道等正常组织中有 YKL-40 表达。文献^[4] 报道炎症反应与结肠癌发病密切相关。Rosling et al^[5] 发现 YKL-40 可能与细胞活力和细胞间黏附力有关,提示 YKL-40 可能与肿瘤细胞的侵袭和转移有关。此外,白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 作为前炎性细胞因子,

被认为在促进细胞生长、增殖和抗细胞凋亡机制中起重要作用^[6]。为了寻找新的特异性和敏感性较高的肿瘤标志物,该研究对结肠癌患者结肠癌组织标本的 YKL-40 和 IL-6 进行检测,联合分析结肠癌组织中 YKL-40 和 IL-6 蛋白的表达变化及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 兔抗人 YKL-40 和兔抗人 IL-6 购自英国 Abcam 公司;小鼠抗人 β -actin 购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 作用于 β -actin、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 作用于 YKL-40 和 IL-6 购自美国 Santa Cruz 公司;RT-PCR 试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix 购自加拿大 MBI Fermentas 公司;TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司;引物合成均由上海生工生物工程有限公司提供。

1.2 标本 收集 2013 年 7 月~2014 年 7 月在安徽医科大学武警总医院手术切除的 30 例原发性结肠癌标本,其中男 20 例,女 10 例,年龄 40~78 (59 ± 19) 岁。病例均经术后病理证实,术前均未行放、化疗。取肿瘤组织及距肿瘤边缘 5 cm 以上的癌旁组织,标本采集后迅速放至液氮速冻, -80°C 超低温冰箱保存。研究经本院医学伦理委员会批准,并与患者签署了知情同意书。

1.3 提取蛋白质 取 0.1 g 组织充分剪碎,加入蛋白裂解液 400 μl ,按 1 ml 裂解液加 10 μl PMSF 原则加入 PMSF 混匀,在摇床上冰浴 30 min。裂解完后,转移裂解液至离心管中, 4°C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液分装转移至新的离心管中。

1.4 提取 RNA 组织中加入 TRIzol 1 ml 后充分研磨;加入氯仿 0.2 ml,充分混匀,室温下孵育 10 min, 4°C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液至 EP 管;加入等体积异丙醇, -20°C 助沉 30 min, 4°C 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;75% 乙醇溶液 [含二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 水] 洗涤沉淀 1 次, 4°C 12 000 r/min 离心 5 min,弃乙醇层;真空干燥 5~10 min,加 DEPC 水振荡溶解 RNA 沉淀, -80°C 保存备用。

1.5 Western blot 检测 YKL-40、IL-6 的表达 采用 Western blot 法检测 YKL-40 表达。将提取的组

2015-01-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81201688)

作者单位:¹安徽医科大学武警总医院临床学院,合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院药学部,合肥 230601

³中国人民解放军总医院普外科,北京 100039

作者简介:杨 阳,男,硕士研究生;

金伟森,男,硕士生导师,责任作者,E-mail: wjwsj2013@

163.com

织蛋白定量,然后通过 SDS-PAGE 电泳分离, PVDF 转膜后封闭 3 h,加入 YKL-40 (1 : 1 000)、IL-6 (1 : 1 000) 和 β -actin (1 : 200) 一抗孵育过夜,然后加 YKL-40、IL-6 和 β -actin 二抗孵育 1 h,化学发光法显示蛋白条带,胶片显影、定影。成像结果采用 Quantity One V 4.6 软件分析,测定主带的吸光度值以计算 YKL-40、IL-6 蛋白表达水平,结果重复 3 次。

1.6 qRT-PCR 法检测 YKL-40、IL-6 的表达 采用 qRT-PCR 检测 YKL-40、IL-6 表达,采用 TRIzol 法提取各组组织总 RNA。反转录成 cDNA 并进行荧光定量 PCR。选用 β -actin 为内参基因。引物序列及扩增片段长度见表 1。每个反应设 3 个复管,反应结束后,荧光定量 PCR 仪自动分析各管的循环阈值(threshold cycle, Ct)。采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算各组组织中目的基因的相对表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算实验组目的基因表达相对于对照组表达的倍数。各组 ΔCt 值: Ct 目的基因 - Ct 内参基因, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 实验组 - ΔCt 对照组。引物序列如下: YKL-40 F: 5'-GAGGATGGAACCTTTGGGTCTC-3', R: 5'-TCATTTCC TTGATTAGGGTGGT-3'; IL-6 F: 5'-CCCTGAGAAAG GAGACATGTAA-3', R: 5'-TCTTTTTCAGCCATCTTTG GA-3'; β -actin F: 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3', R: 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;等级资料采用非参数秩和检验;各变量间相关性比较采用 Pearson 相关分析法。

2 结果

2.1 结肠癌组织及癌旁组织中 YKL-40、IL-6 mRNA 表达情况 qRT-PCR 结果显示结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 mRNA 表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。见图 1。

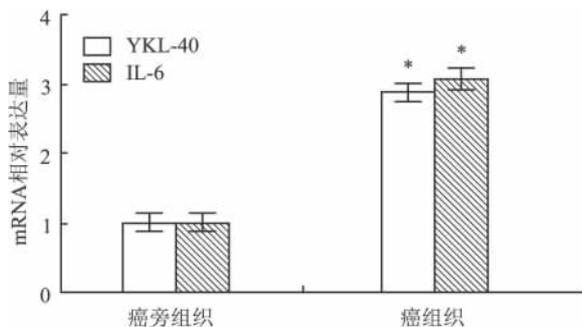


图1 qRT-PCR 检测结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 的表达与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

2.2 结肠癌组织及癌旁组织中 YKL-40、IL-6 蛋白表达情况 Western blot 检测结果显示结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 蛋白表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。见图 2。

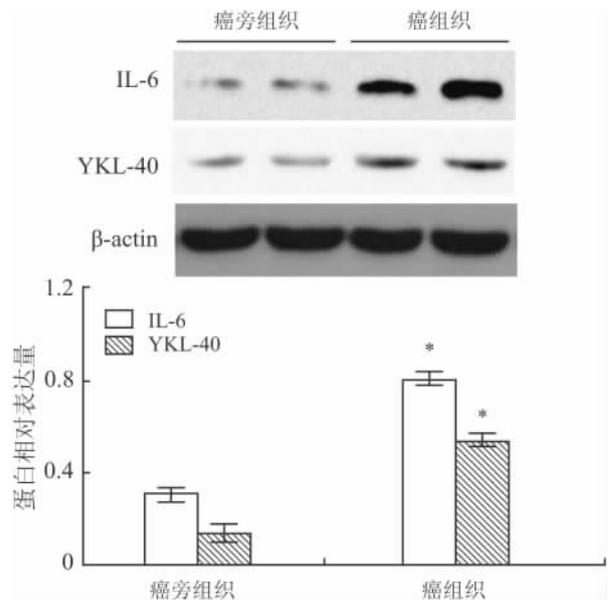


图2 Western blot 检测结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 的表达与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

2.3 YKL-40、IL-6 表达的相互关系 采用相关分析结果显示结肠癌组织中 YKL-40 与 IL-6 表达呈正相关性 ($r = 0.812, P < 0.05$)。见图 3。

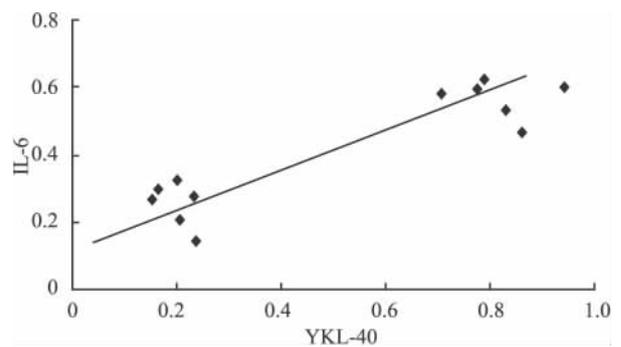


图3 YKL-40 与 IL-6 关系散点图

2.4 YKL-40、IL-6 表达与结肠癌 TNM 分期的关系

结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 的表达与肿瘤的分化程度相关,结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 的表达水平与临床 TNM 分期有显著相关性 ($P < 0.05$), TNM 分期越高, YKL-40 和 IL-6 的表达水平也越高。见表 1。

表1 YKL-40 和 IL-6 表达与结肠癌 TNM 分期的关系

TNM 分期	例数	YKL-40		χ^2 值	P 值	IL-6		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			阳性	阴性		
I ~ II	10	6	4	2.342	0.031	5	5	2.861	0.029
III ~ IV	20	17	3			14	6		

3 讨论

YKL-40 的完整氨基酸序列及 cDNA 序列公布于 1993 年,其含有 383 个氨基酸,属于哺乳动物 18 糖基水解酶家族^[6]。在炎症、坏死或肿瘤细胞抗原刺激下均可引起免疫细胞分泌 IL-6,使患者血清中 IL-6 增加。研究^[2]表明 YKL-40 的作用在于作为细胞增殖因子、细胞存活因子、血管生成因子和抗凋亡蛋白,参与组织重建。YKL-40 常见于各种炎症相关性疾病,特别是多种恶性肿瘤^[7]。

研究^[8-9]显示,血浆 YKL-40 水平与卵巢癌的预后相关,其水平越高卵巢癌患者的生存期则越短。研究^[10-11]表明血清 YKL-40 在早期诊断子宫内膜癌方面较 CA125 具有优势,肿瘤的结局也间接受 YKL-40 水平的影响。IL-6 可通过正调节抗凋亡和促血管形成蛋白促进肿瘤的生长,鼠类实验也证实 IL-6 抗体可抑制肿瘤生长。但有关 YKL-40 与 IL-6 在结肠癌中的表达及其临床意义,国内外至今尚罕见文献报道。

本研究采用 Western blot 法和 qRT-PCR 技术,检测了结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 mRNA 及蛋白的表达情况,显示结肠癌组织中 YKL-40、IL-6 mRNA 及蛋白过度表达,并且与结肠癌的临床分期呈显著正相关性,提示 YKL-40、IL-6 mRNA 和蛋白的表达上调在结肠癌进展中可能起重要作用。YKL-40、IL-6 蛋白在结肠癌组织中的表达上调,进一步说明可能通过增加肿瘤中组织周围炎症反应而促进肿瘤的发生与发展^[12]。此外,YKL-40、IL-6 作为细胞因子还可能介导胞内信号转导。因此,针对 YKL-40 和 IL-6 的抑制物有望成为结肠癌患者的有效治疗药物。

YKL-40 和 IL-6 在结肠癌发生发展中的分子作用机制还需进一步研究,同时也可将研究方向朝着抑制 YKL-40 和 IL-6 表达从而降低结肠癌风险或是

改善预后的改进,并以此提高结肠癌患者生存率和结肠癌的发生率。

参考文献

- [1] 胡若磊,韦晓,周青,等.褪黑素对结肠癌细胞系 RKO 增殖和凋亡的影响[J].安徽医科大学学报,2012,47(1):27-30.
- [2] 王敏,刘凤英.YKL-40 在肿瘤中的研究进展[J].实用医学杂志,2009,25(11):1902-3.
- [3] Johansen J S, Høyer P E, Larsen L A, et al. YKL-40 protein expression in the early developing human musculoskeletal system [J]. *J Histochem Cytochem* 2007, 55 (12):1213-28.
- [4] 李袁飞,赵和平,朱国强,等.炎症反应微环境对结肠癌细胞上皮向间质转化的作用[J].中华消化杂志,2014,34(3):164-9.
- [5] Roslind A, Balslev E, Kruse H, et al. Subcellular localization of YKL-40 in normal and malignant epithelial cells of the breast [J]. *Ultrastruct Pathol* 2008, 32(3):101-6.
- [6] Hakala B E, White C, Recklies A D. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family [J]. *J Biol Chem* 1993, 268(34):25803-10.
- [7] Johansen J S. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibrosis and cancer [J]. *Dan Med Bull* 2006, 53(2):172-209.
- [8] Høgdall E V, Ringsholt M, Høgdall C K, et al. YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:8-18.
- [9] 范江涛,司晓辉,廖雁.血清 YKL-40 在子宫内膜癌诊治中的临床价值[J].中国肿瘤临床,2011,38(17):1015-8.
- [10] 杨国奋,蔡鹏宇,李晓明,等.上皮性卵巢癌组织中 YKL-40 蛋白的表达及其临床意义[J].癌症,2009,28(2):173-7.
- [11] Johansen J S, Jensen B V, Roslind A, et al. Is YKL-40 a new therapeutic target in cancer? [J]. *Expert Opin Ther Targets* 2007, 11(2):219-34.
- [12] Yamaguchi M, Takai S, Hosono A, et al. Bovine milk-derived α -lactalbumin inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sodium sulfate-treated mice [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(4):672-9.

Experimental research of expression of YKL-40 and IL-6 in colorectal cancer tissues

Yang Yang¹, Yang Jingjing², Ning Ning³, et al

¹Clinical College of General Hospital of Armed Police Forces, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Pharmacology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

³Dept of Anorectal, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100039)

Abstract Objective To observe the changes of expression of cartilage glycoprotein-39 (YKL-40) and interleukin

RNA 干扰 ERCC1 基因表达对人卵巢癌耐药细胞 DDP、PGPIP 敏感性的影响

雷 婷 秦宜德 刘 琛 周 娟 赵梦静

摘要 目的 探讨 RNA 干扰核苷酸剪切修复偶联因子 1 (ERCC1) 基因表达对人卵巢癌耐药细胞 DDP、PGPIP 敏感性的影响。方法 实验分为空白对照组、特异性转染组和非特异性转染组。采用 MTT 法测定 PGPIP、DDP 对 3 组细胞的增殖抑制率,RT-PCR 法检测 PGPIP 对 3 组细胞乳腺癌易感基因 1 (BRCA1) 基因表达的影响。结果 MTT 法结果显示,PGPIP 作用人卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 48 h,对其增殖有一定的抑制作用,在浓度为 40、60 mg/L 时,与浓度为 0 mg/L 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);DDP、PGPIP 分别作用特异性转染组细胞 48 h,其增殖明显受到抑制,与 0 mg/L 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);RT-PCR 法结果显示,PGPIP 作用特异性转染组细胞 48 h,其 BRCA1 基因表达随着 PGPIP 浓度升高而明显降低,在浓度为 40、60 mg/L 时,与 PGPIP 浓度为 0 mg/L 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 PGPIP 对 SKOV3/DDP 细胞的增殖有一定的抑制作用,并且通过干扰 ERCC1 基因表达可以明显增强 SKOV3/DDP 细胞对 DDP、PGPIP 的敏感性,同时可增强 PGPIP 对 BRCA1 基因的下调水平。

关键词 RNA 干扰;ERCC1;卵巢癌;DDP;PGPIP

中图分类号 R 392.5; R 392.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)06-0730-05

2015-01-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472448)

作者单位:安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:雷 婷,女,硕士研究生;

秦宜德,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:qi-nyide@hotmail.com

2014 NCCN 指南^[1] 推荐卵巢癌的化疗药物仍以铂类、紫杉醇类化疗药物为主,但铂类耐药的存在很大程度上影响了卵巢癌患者对化疗的敏感性,因此,迫切需要新型的、有效的化疗方案。乳源免疫调节肽(Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn,PGPIP)是一组 3~9 个氨基酸残基短肽^[2],研究^[3-4] 结果表明,PGPIP 可以抑制 SKOV3 细胞的生长、侵袭及转移并可诱导其凋亡,然而,PGPIP 是否可抑制 SKOV3/DDP 细胞的生长,目前尚未有报道。有研究^[5] 表明,ERCC1 基因活性的高低可能直接影响细胞的耐药性。通过有效的 RNA 干扰,已经成为逆转肿瘤耐药的新策略。该研究旨在探讨 PGPIP 对 SKOV3/DDP 细胞生长的影响,并通过 RNA 干扰 ERCC1 基因表达,转染 SKOV3/DDP 细胞,建立稳定转染的细胞,观察通过 RNA 干扰 ERCC1 基因表达对 SKOV3/DDP 细胞 DDP、PGPIP 敏感性的影响,探索提高卵巢癌的化疗敏感性的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人卵巢癌耐药细胞株 SKOV3/DDP 购自中国医学科学院北京肿瘤医院,稳定转染 pLVX-shRNA-ERCC1 的 SKOV3/DDP 细胞和稳定转染 pLVX-shRNA-Negative control 的 SKOV3/DDP 细胞由安徽医科大学生物化学与分子生物学实验室合成。

6 (IL-6) in colon cancer tissues. **Methods** Colon tissues were isolated from 30 colon cancer patients who had received radical surgeries normal persons. Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of YKL-40 and IL-6. Analyzing the relationship between the expression of YKL-40 and tumor differentiation, the depth of tumor invasion, lymph node metastases and other clinical pathological characteristics. **Results** Compared with the colon tissue beside tumor tissue, Western blot showed that the protein expressions of YKL-40 and IL-6 were significantly increased in the model group ($P < 0.05$). qRT-PCR found that the mRNA expression of YKL-40 and IL-6 are significantly increased in the model group ($P < 0.05$). The intensive expression of YKL-40 was positively correlated to TNM stage and pathologic grade ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of YKL-40 and IL-6 in colon cancer is high and this may have relationship with tumor progression.

Key words colon cancer; YKL-40; IL-6