

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.008

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.008>

金属硫蛋白 1X 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

刘春玲¹, 张迪², 吕春秀³, 杨光华⁴, 韩晓晨⁵

- (1. 唐山市人民医院病理科, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院药剂科, 河北 唐山 063000;
3. 华北理工大学附属医院血液内科, 河北 唐山 063000; 4. 华北理工大学附属医院普外科, 河北 唐山 063000;
5. 唐山市人民医院头颈外科, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 探讨金属硫蛋白1X(metallothionein 1X, MT1X)在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的癌组织与癌旁组织中表达及临床意义, 分析MT1X与NSCLC预后的相关性。方法: 纳入68例肺癌患者, 采用实时定量PCR(RT-PCR)法及免疫组织化学(IHC)方法检测NSCLC患者癌与癌旁组织中MT1X mRNA及蛋白的表达情况。利用网上数据库(<http://kmplot.com/analysis/>)分析MT1X与NSCLC患者生存的相关性。结果: RT-PCR结果显示MT1X mRNA在癌组织中的相对表达量明显高于癌旁组织, 差异有统计学意义(0.057 ± 0.013 vs 0.011 ± 0.008 , $P < 0.01$); 免疫组织化学结果显示MT1X在NSCLC中的阳性表达率为67.6%(46/68), 明显高于癌旁组织的39.7%(27/68)。MT1X表达水平在NSCLC患者的不同pTNM分期、分化、有无脉管侵袭、有无淋巴结转移间存在显著差异, 而与患者的性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型、肿瘤位置无关。Kaplan-Meier生存分析结果显示MT1X高表达与NSCLC患者总生存期短显著相关($P < 0.001$)。结论: MT1X在NSCLC患者中阳性表达与患者术后生存期短显著相关, 可作为评估NSCLC患者预后的重要标志分子。

[关键词] 非小细胞肺癌; 金属硫蛋白1X; 临床病理参数; 预后

Expression of metallothionein IX in non-small cell lung cancer and its significances

LIU Chunling¹, ZHANG Di², LÜ Chunxiu³, YANG Guanghua⁴, HAN Xiaochen⁵

(1. Department of Pathology, Tangshan People's Hospital, Tangshan Hebei 063000; 2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei 063000; 3. Department of Hematology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei 063000; 4. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei 063000; 5. Department of Head and Neck Surgery, Tangshan People's hospital, Tangshan Hebei 063000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of metallothionein 1X (MT1X) in human non-small cell lung cancer (NSCLC), and its correlation with clinical significance as well as prognosis. **Methods:** A total of 68 patients with NSCLC were enrolled, the expression of MT1X mRNA and protein in tumor tissue and adjacent normal tissue were detected by real-time PCR and immunohistochemistry (IHC). The relationship between MT1X expression and clinicopathological features were statistically analyzed. Kaplan-Meier survival analysis for the relationship

收稿日期 (Date of reception): 2018-02-23

通信作者 (Corresponding author): 韩晓晨, Email: rmyy_hxc@163.com

between survival time and MT1X signature in NSCLC was done with an online tool (<http://kmplot.com/analysis/>). **Results:** The mRNA expression of MT1X in NSCLC was 0.057 ± 0.013 , which was higher than that in adjacent normal tissues (0.011 ± 0.008 , $P<0.01$). The expression of MT1X protein in NSCLC was also higher than that in adjacent tissues (67.6% vs 39.7%, $P<0.01$). In addition, MT1X expression had significant difference in pTNM, lymph node metastasis and poor survival time, but it did not show related with age, gender, histology, tumor size and the location of tumors. **Conclusion:** MT1X is frequently upregulation in NSCLC, and its overexpression is significantly correlated with poor prognostic, suggesting that MT1X could be used as a potential therapeutic target for the prevention and treatment of NSCLC.

Keywords non-small cell lung cancer; metallothionein 1X; clinicopathological factors; prognosis

肺癌是全世界病死率最高的恶性肿瘤之一。据报道, 仅2015年, 我国就有733 300例新发肺癌病例, 其中约610 200例死于肺癌相关疾病^[1]。就病理类型而言, 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌最常见的一种病理类型, 约占所有肺癌病例的80%。尽管近年来在肺癌早期诊断及靶向治疗方面取得了巨大进展, 但NSCLC术后5年生存率仍然极低, 这与人们对NSCLC的发病机制尚不了解有关^[2]。金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类在原核和真核生物中均保守表达的低相对分子质量、高巯基含量、能结合金属离子等独特性能的蛋白质, 在体内微量元素储存、运输、代谢等方面发挥重要作用^[3]。其可通过不同的信号通路在细胞的分化、增殖、癌变过程中也发挥重要作用, 对肿瘤的临床诊断、治疗、预后分析等具有重要参考价值, 可作为肿瘤细胞表面表达的一个生物标志物^[4-6]。MT1X是金属硫蛋白中的重要一员, 该基因3' UTR区T20重复变异是检测结直肠癌微卫星不稳定性一个敏感的分子标志物^[7]。同时在NSCLC细胞系中有研究^[8-9]发现敲降MT1X可逆转铂类耐药的发生。但目前关于MT1X与NSCLC临床病理参数及预后的相关研究较少, 因此本研究采用实时定量PCR(RT-PCR)及免疫组织化学(IHC)法检测MT1X在NSCLC癌与癌旁组织中的表达差异, 旨在分析其与临床病理参数及患者预后的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

选择2015年12月至2016年12月在唐山市人民医院行手术治疗的NSCLC患者68例, 留取部分癌组织及正常肺组织的新鲜标本, 其中男46例, 女22例, 年龄43~69(52.2 ± 8.3)岁; 腺癌45例, 鳞状

细胞癌23例。根据2009年UICC肺癌TNM分期标准^[10], I期15例, II期29例, III期18例, IV期6例, 其中21例有淋巴结转移, 47例无淋巴结转移。切取68例NSCLC石蜡切片及配对癌旁组织石蜡切片行免疫组织化学检测。所有患者术前未行放、化疗。本研究经唐山市人民医院伦理委员会审核批准, 患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

Trizol, PCR反转录试剂盒购于大连宝生物工程公司; PCR引物序列由上海英潍捷基贸易有限公司合成; 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水、异丙醇等试剂由唐山市人民医院中心实验室提供; PCR仪购自美国Perkin-Elmer公司。

1.3 方法

1.3.1 RNA样品的制备及RT-PCR

使用TRIzol试剂提取肺癌及癌旁组织中的RNA, 按照说明书进行操作。按照SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR反转录试剂盒说明将RNA反转录为cDNA, 按SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书进行配液及反应: 20 μ L反应体系中SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μ L, 上下游引物分别为0.8 μ L, ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。检测MT1X的引物序列为5'-CGCTGCGTGTTTTTCCTCTTG-3'和5'-AGGAGCAGCAGCTCTTCTTG-3'。以GADPH为内参, GADPH的引物序列为5'-GAAGGTGAAGGTTCGGAGTCAA-3'和5'-GCTCCTGGAAGATGGTGTATG-3'。PCR反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s, 然后95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环。每个标本中mRNA含量是指它与同标本中GAPDH的相对量, 由公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算获得。

1.3.2 免疫组织化学法

免疫组织化学法严格按到步骤操作, 抗原修复采用枸橼酸盐缓冲液高温高压修复, 一抗稀释浓度1:300, 阴性对照以PBS代替一抗。结果由2名经验丰富的病理医师进行判定。判定标准: MT1X蛋白的表达以细胞质或细胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞。依据镜下肿瘤细胞的染色范围分级: 细胞阳性率<5%为0分, 5%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~100%为3分。依据对每张切片阳性细胞的染色强度进行评定: 不着色为0分, 淡黄色细颗粒状为1分, 棕黄色颗粒状为2分, 棕褐色粗颗粒状为3分, 将两分数相乘得到的表达强度作为染色结果的评判标准: ≥ 3 分者为阳性, <3分者为阴性。

1.4 统计学处理

采用SPSS22.0统计软件进行数据分析, 所有计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 癌组织与癌旁组织中MT1X mRNA表达水平的比较采用两样本的配对t检验, MT1X蛋白表达水平与临床病理参数相关性比较采用卡方检验。MT1X在NSCLC中的生存信息利用数据库(<http://kmpplot.com/analysis/>)进行Kaplan-Meier生存分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MT1X在NSCLC及癌旁组织中的表达水平

在68例肺癌患者中, MT1X mRNA在癌组织中的相对表达量为 0.057 ± 0.013 , 明显高于对应癌旁组织(0.011 ± 0.008), 差异有统计学意义($P<0.01$)。其中在肺腺癌组织中, MT1X在癌组织中的相对表达量为 0.053 ± 0.009 , 而在癌旁组织中的相对表达量为 0.012 ± 0.010 ; 在肺鳞状细胞癌中, MT1X在癌组织中的表达为 0.057 ± 0.015 , 亦明显高于对应的癌旁组织(0.009 ± 0.003)。MT1X蛋白表达情况与之类似, 肺癌组织中MT1X阳性表达46例, 阳性率67.6%, 其中在肺腺癌组织中, MT1X的阳性表达28例, 阳性率62.2%; 而在肺鳞状细胞癌中, MT1X阳性表达23例, 阳性率为78.3%, 均明显高于癌旁组织(表1)。

2.2 MT1X表达与NSCLC临床病理参数的相关性

MT1X阳性表达在肿瘤患者的不同pTNM分期、分化、有无脉管侵袭、有无淋巴结转移关系间存在差异($P<0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型、肿瘤位置无关($P>0.05$, 表2)。

表1 NSCLC中MT1X蛋白的表达水平($n=68$)

Table 1 Expression of MT1X protein in NSCLC ($n=68$)

组织	MT1X表达/[例(%)]		P
	阴性	阳性	
癌组织	22 (32.4)	46 (67.6)	<0.01*
癌旁组织	41 (60.3)	27 (39.7)	

*配对 χ^2 检验。

* χ^2 test.

表2 MT1X蛋白表达与NSCLC临床病理参数的相关性

Table 2 Relationship between expression of MT1X and clinicopathological characteristics

参数	n	MT1X表达		χ^2	P
		阳性	阴性		
性别				0.172	0.678
男	46	29	17		
女	22	15	7		
年龄/岁				1.832	0.176
≤ 60	18	14	4		
>60	50	30	20		
肿瘤大小/cm				0.606	0.436
≤ 3	18	13	5		
>3	50	31	19		
组织学类型				2.796	0.094
腺癌	45	28	17		
鳞状细胞癌	23	18	5		
pTNM分期				8.439	0.004
I/II	44	23	21		
III/IV	24	21	3		
分化				6.469	0.011
高中	48	28	20		
低	20	18	2		
脉管侵袭				4.068	0.044
有	17	14	3		
无	51	28	23		
肿瘤位置				0.207	0.649
中心	28	19	9		
周边	40	25	15		
淋巴结转移				6.918	0.009
有	21	17	4		
无	47	22	25		

2.3 MT1X 在 NSCLC 中的预后分析

为进一步评估MT1X作为NSCLC生物标志物的可行性, 本研究利用网上数据库分析1 926例NSCLC患者MT1X的表达与患者总生存期的相关性, 结果显示: MT1X高表达的患者具有更短的生存期($P<0.001$, 图1)。考虑到不同的肺癌病理类型可能有不同的驱动机制, 本研究还分别评估了MT1X与肺腺癌和肺鳞状细胞癌患者的总生存情况, 结果显示: 在720例肺腺癌患者中, MT1X高表达患者的总生存期明显高于低表达患者($P<0.001$, 图2); 而对于524例肺鳞状细胞癌患者, MT1X的表达水平与总生存期并无关联($P=0.22$, 图3)。

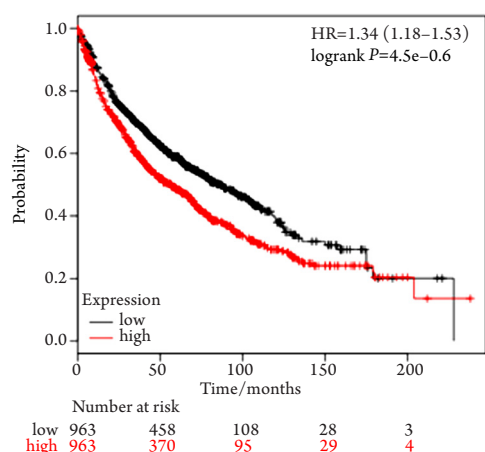


图1 MT1X表达水平与1 926例NSCLC患者总生存期的关系
Figure 1 Relationship between MT1X expression levels and overall survival of 1 926 NSCLC patients

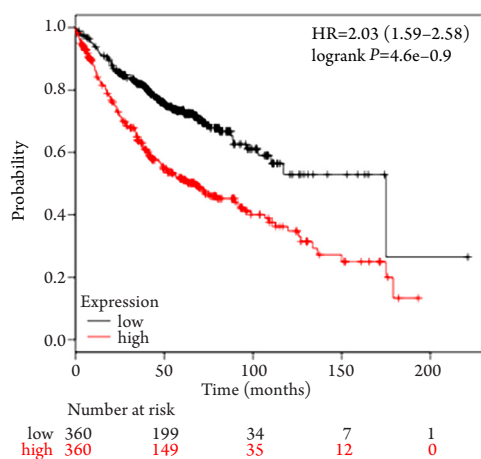


图2 MT1X表达与720例肺腺癌患者总生存期的关系
Figure 2 Relationship between MT1X expression levels and overall survival of 720 lung adenocarcinoma patients

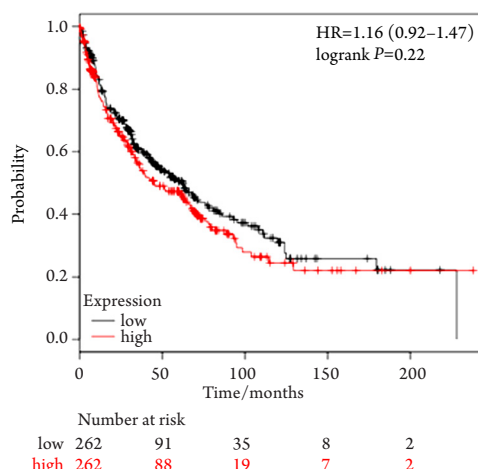


图3 MT1X表达与524例肺鳞状细胞癌患者总生存期的关系
Figure 3 Relationship between MT1X expression levels and overall survival of 524 lung squamous carcinoma patients

3 讨论

NSCLC是我国常见的一种恶性肿瘤, 随着人口老龄化、空气污染等问题日趋严重, 其患病率也逐年增加, 但其发生机制目前尚不明确。近年来有研究^[11]显示: 某些负责微量元素代谢的基因(如SLC39A6)在NSCLC的发生、发展中发挥重要作用。MT是一类可诱导的、富含半胱氨酸的低相对分子质量蛋白质, 人类MT基因包括10个功能性异构体: MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1X, MT2A, MT3和MT4^[12]。MT对维持人体内必需金属的代谢平衡及抵抗有毒金属毒性、清除自由基等均起重要作用^[13]。尽管MT家族蛋白在肿瘤的发生、发展中具有重要作用, 但其各个异构体的功能尚不明确。目前关于MT1X与肿瘤的相关研究较少, 因此本研究采用实时定量PCR及免疫组织化学的方法, 比较MT1X在NSCLC癌组织与癌旁组织中mRNA及蛋白的表达水平, 对其在肺癌发生发展中的作用进行初步探讨。

本研究采用RT-PCR法检测MT1X在45例肺腺癌组织及23例肺鳞状细胞癌中的相对表达水平, 结果显示: MT1X mRNA无论在肺腺癌还是肺鳞状细胞癌组织中的表达水平均明显高于配对的癌旁组织, 差异均有统计学意义。此外, 通过比较肺腺癌和肺鳞状细胞癌中MT1X的表达水平时发现: MT1X在肺鳞状细胞癌中的相对表达量略高于肺腺癌组织, 但差异无统计学意义(数据未列出)。

MT1X在鳞状细胞癌中的表达水平略高于腺癌组织中的表达水平。随后,本研究进一步采用免疫组织化学的方法检测该蛋白在癌组织及癌旁正常组织中的表达差异,其结果与RT-PCR结果类似:MT1X蛋白在肺腺癌和肺鳞癌中的阳性表达率亦明显高于配对的癌旁组织,差异有统计学意义。本研究相关分析显示:MT1X表达水平在不同肿瘤的分化程度、TNM分期、淋巴结转移之间存在差异,而与患者的性别、年龄无关。Liu等^[14]采用分子生物学方法分析MT1X对肺癌细胞系增殖迁移的促进作用,而本研究则从体内实验证实MT1X对肺癌发生及转移的作用。Liu等^[14]的研究结果或部分解释本研究的实验结果,而本研究则从另一方面进一步证实MT1X对肺癌发生发展的作用,提示MT1X可能是肺癌发生发展中的重要的分子标志物。

Kaplan-Meier生存分析对初步评估生物标志物的价值具有重要意义。Györfy等^[15-16]整合多个数据库的信息,先后分析了乳腺癌、NSCLC等常见肿瘤的影响预后的重要基因信息。为进一步明确MT1X作为NSCLC的有效的生物标志物的可行性,本研究采用网上数据库(<http://kmpplot.com/analysis/>)分析MT1X与NSCLC预后的关系,结果显示:MT1X高表达患者预后明显短于低表达患者;但在肺鳞状细胞癌中,MT1X的表达水平与患者的总生存期并无相关性。由此可见,MT1X是肺腺癌患者预后的有效标志物。

本研究仍存在一定的局限性:首先本研究为回顾性研究,且为小样本、单中心分析,因此尚需大样本、多中心的研究进一步确定MT1X在NSCLC发生发展的关键作用。

综上所述,MT1X可能是NSCLC发生和发展中的一个关键靶点,开发针对该靶点的药物或将会对NSCLC的治疗产生重要影响。

参考文献

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
2. Wen C, Dehnel T. China wrestles with lung cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(1): 15.
3. 牛焕国, 白岚, 邵焕庆. 金属硫蛋白与肿瘤发病机制研究进展[J]. *中国疗养医学*, 2012, 21(10): 885-886.
- NIU Huanguo, BAI Lan, SHAO Huanqing. Advance of metallothionein and tumor pathogenesis[J]. *Chinese Journal of Convalescent Medicine*, 2012, 21(10): 885-886.
4. Wojtczak B, Pula B, Gomulkiewicz A, et al. Metallothionein isoform expression in benign and malignant thyroid lesions[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(9): 5179-5185.
5. Brazão-Silva MT, Rodrigues MF, Eisenberg AL, et al. Metallothionein gene expression is altered in oral cancer and may predict metastasis and patient outcome[J]. *Histopathology*, 2015, 67(3): 358-367.
6. 鹿晓麟, 姜长杰, 张艳桥. 金属硫蛋白在癌症中的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2014, 23(3): 218-223.
- LU Xiaolin, LOU Changjie, ZHANG Yanqiao. Research progress of metallothionein in cancer[J]. *China Cancer*, 2014, 23(3): 218-223.
7. Morandi L, de Biase D, Visani M, et al. T[(20)] repeat in the 3'-untranslated regions of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2012, 27(5): 647-656.
8. 彭波, 董琳, 肖国华, 等. MT1XsiRNA对肺癌A549/DDP细胞顺铂敏感性的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41(5): 433-436.
- PENG Bo, DONG Lin, XIAO Guohua, et al. The effect of mt1x siRNA on cisplatin sensitivity in human lung cancer A549/DDP cells[J]. *Medical Science Journal of Central South China*, 2013, 41(5): 433-436.
9. Peng B, Gu Y, Xiong Y, et al. Microarray-assisted pathway analysis identifies MT1X & NF- κ B as mediators of TCRP1-associated resistance to cisplatin in oral squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51413.
10. Giroux DJ, Rami-Porta R, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: data elements for the prospective project[J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(6): 679-683.
11. Cheng X, Wei L, Huang X, et al. Solute carrier family 39 member 6 gene promotes aggressiveness of esophageal carcinoma cells by increasing intracellular levels of zinc, activating phosphatidylinositol 3-kinase signaling, and up-regulating genes that regulate metastasis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(8): 1985-1997.
12. 周宁, 薄爱华, 周晓丽, 等. 乳腺癌组织中金属硫蛋白(MT)和拓扑异构酶II(Topo II α)的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2007, 15(10): 1419-1420.
- ZHOU Ning, BO Aihua, ZHOU Xiaoli, et al. Expression and clinical significance of MT and Topo II α in breast cancer[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2007, 15(10): 1419-1420.
13. 侯新芳, 宋海岩, 刘文静, 等. 金属硫蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(10): 1236-1239.
- HOU Xinfang, SONG Haiyan, LIU Wenjing, et al. Expression and prognostic significance of metallothionein in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2012, 39(10): 1236-1239.

14. Liu Y, Liu L, Yu T, et al. Systematic analysis of mRNA expression profile in NSCLC cell lines to screen metastasis-related genes[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6): 5093-5103.
15. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(3): 725-731.
16. Györfy B, Surowiak P, Budczies J, et al. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82241.

本文引用: 刘春玲, 张迪, 吕春秀, 杨光华, 韩晓晨. 金属硫蛋白1X在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(6): 1184-1189. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.008

Cite this article as: LIU Chunling, ZHANG Di, LÜ Chunxiu, YANG Guanghua, HAN Xiaochen. Expression of metallothionein 1X in non-small cell lung cancer and its significances[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(6): 1184-1189. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.008