

半乳糖凝集素 3 在骨肉瘤患者血清及肉瘤组织中的表达研究

肖 易¹, 徐爱飞¹, 陈华燕¹, 颜欣心², 周雪松²

(1. 重庆市开县人民医院 中国重庆 405400; 2. 武汉大学医学院附属同仁医院, 中国湖北 武汉 430060)

摘要:通过检测骨肉瘤患者血清中半乳糖凝集素 3 (galectin-3)的水平以及骨肉瘤组织标本中 galectin-3 的表达情况,探讨其在骨肉瘤患者血清及肿瘤组织中的表达情况并分析其与骨肉瘤临床特征的关系。实验结果显示 galectin-3 在骨肉瘤患者血清中的表达水平与 Enneking 分期相关,且随着骨肉瘤组织临床分期及肿瘤发展,galectin-3 的表达呈上升趋势,这说明 galectin-3 与骨肉瘤的发生、发展密切相关,可能在其发生、发展过程中起着重要作用。

关键词:半乳糖凝集素 3;骨肉瘤;血清;表达

中图分类号:R738

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2015)04-0343-04

Expression of galectin-3 in Serum and Human Osteosarcoma Tissues

XIAO Yi¹, XU Ai-fei¹, CHEN Hua-yan¹, YAN Xin-xin², ZHOU Xue-song²

(1. Department of Orthopaedics, The People's Hospital of Kaixian County, Chongqing 405400, China; 2. Department of Orthopaedics, Tongren Affiliated Hospital of Medical School of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China)

Abstract: In order to investigate the expression of galectin-3 in serum and osteosarcoma tissues as well as the relationship with clinical and pathological characteristics, the expression of galectin-3 in serum of patients with osteosarcoma and in osteosarcoma tissues was detected. The results showed the expression level of galectin-3 in patients' serum was closely correlated with the phase of Enneking. In III stage tumor tissues, and the expression of galectin-3 was positively correlated with the development of osteosarcoma. It indicates that galectin-3 may play an important role in the processes of the occurrence and development of osteosarcoma.

Key words: galectin-3; osteosarcoma; serum; expression

(Life Science Research, 2015, 19(4): 343-346)

骨肉瘤是人类骨骼系统发病率居首位的恶性肿瘤。早期骨肉瘤患者(Enneking II A 期)一般临床症状轻微,但由于骨肉瘤发展迅速,所以多数骨肉瘤病人(约 75%)在初诊时已是中晚期(Enneking II B/III 期)。约有半数的患者将出现转移,90%以上的骨肉瘤首次转移是肺脏,一旦出现肺转移,5 年生存率仅 10%~15%左右^[1]。

凝集素(lectin)在植物及动物组织中被广泛发现,其特异结合糖类的特性,使得不同的凝集素可识别特定的糖结合物,提示凝集素可能通过参与或交联特异的糖结合物,在调节生理过程中扮演了很重要的角色^[2]。半乳糖凝集素(galectins)作为一类能结合含半乳糖成分的糖结合物的可溶性凝集素,已引起广泛关注^[3]。大量研

收稿日期:2014-08-19; 修回日期:2015-03-13

作者简介:肖易(1984-),男,重庆开县人,重庆市开县人民医院主治医师,主要从事骨科肿瘤相关研究,Tel:023-52663928, E-mail:479320094@qq.com。

究已经证实半乳糖凝集素 3 与肿瘤的发生发展密切相关,并可作为多种肿瘤的诊断及预后评判指标^[4]。但是,目前半乳糖凝集素 3 在骨肉瘤病人中的表达水平及其与骨肉瘤的发生发展的关系国内外鲜有报道,我们推测 galectin-3 在骨肉瘤的发生发展中扮演着一个重要的角色。本论文旨在研究半乳糖凝集素 3 在骨肉瘤患者血清及肿瘤组织中的表达情况,并分析其与骨肉瘤临床特征的关系,探讨 galectin-3 在骨肉瘤的发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 一般临床资料

标本来源于武汉某三甲医院住院骨科患者,患者均签署知情同意且在未接受治疗前收集标本,包括 76 例(57.58%)男性和 56 例(42.42%)女性的恶性骨肉瘤组织、周围恶性骨肉瘤组织及周围非恶性组织,132 例患者平均年龄为 18.7 岁(范围从 7~41 岁),病理证实所有标本均为骨肉瘤(OST EO),同时收集病人血液样本。184 例健康对照,对照组的平均年龄为 19.1 岁(范围从 12~43 岁),包括 101 例(54.89%)男性和 83 例(45.11%)女性。

1.2 试剂与仪器

引物按常规要求设计,galectin-3 P1:5'-TC-CACACTCTGAGAATGACCATCT-3' P2:5'-AGC-GTTTTGATGATTC-CTGTGTAG-3';QPCR 反应仪为 ABI 7500 (PE 公司);Real-time 反应试剂盒(美国 OMEGA 公司);逆转录试剂盒(美国 Sigma 公司);总蛋白提取试剂盒(上海贝博公司);ELISA 试剂盒(武汉伊艾博公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集

常规方式采集血液样本。无菌手术切除新鲜组织大小约 0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm,用生理盐水冲洗 2~3 遍,采用 Ep 管收集,-80 °C 冻存备用,以备总 RNA 和总蛋白提取。

1.3.2 血清中 galectin-3 水平检测

血清样品 1:4 稀释后,根据人 galectin-3 ELISA 试剂盒说明书测定 galectin-3 的浓度。每个样品分别进行 3 个重复。用 ELISA 法作 galectin-3 范围为 0~4 ng/mL 的标准曲线。通过测量各孔在 450 nm 处的 OD 值,并乘以稀释因子,根据所产生的标准曲线确定样品中 galectin-3 浓度。

1.3.3 肉瘤组织中 galectin-3 mRNA 的表达及 Western blot 分析

提取组织样本中总 RNA,反转录得 cDNA,以此为模板 Real-time PCR 检测,引物序列为 P1、P2 以及内参基因 GAPDH F:CGTGCCGCCTGGA-GAAACCTG;GAPDH R:AGAGTGGGAGTTGCTG-TTGAAGTCG。用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 实验。扩增的反应程序:94 °C 5 min,94 °C 40 s,50 °C 40 s,72 °C 50 s,40 循环。实验结果采用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行分析。提取样品总蛋白,确定蛋白样品的浓度后,加入等量样品到每个加样孔,进行 WB 检测,经曝光、显影及定影后,统计目的条带灰度值。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件完成统计学分析。计量资料结果采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)进行统计描述。计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用分析。以 $P<0.05$ 为差别有统计学意义,反之则为差别无统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 galectin-3 的水平情况

半乳糖凝集素-3 在骨肉瘤患者血清中的水平极显著高于健康正常对照血清中的水平($P<0.01$) (图 1)。骨肉瘤患者的临床特征与血清 galectin-3 水平之间的关系如表 1 所示。患者的平均血清半乳糖凝集素 3 在不同年龄组(≤ 20 岁和 > 20 岁)($P = 0.14$)与性别(男性和女性)($P=0.88$)之间以及转移发生(无转移;肺转移;转移到其他器官)($P=0.26$)均无显著差异。而观察患者不同临床分级的 galectin-3 的血清水平的平均值存在显著差异($P<0.01$)。结果显示更高的临床分级与血清中 galectin-3 ($P<0.01$)

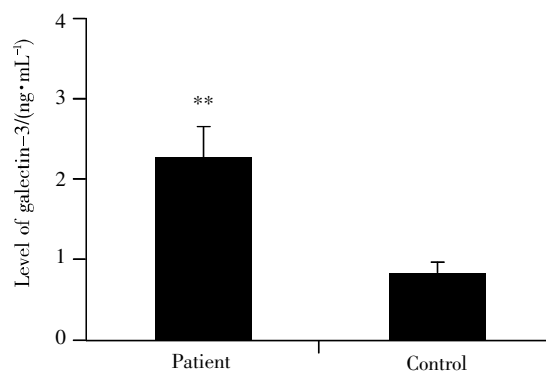


图 1 骨肉瘤患者与健康对照血清中 galectin-3 的水平比较
Fig.1 Galectin-3 serum level in osteosarcoma patients and healthy controls

表 1 骨肉瘤患者血清中 galectin-3 的水平情况

Table 1 galectin-3 serum level in osteosarcoma patients

Characteristic	galectin-3 serum level (ng/mL)	P
Age group		0.14
≤ 20 years	2.50 ± 0.92	
> 20 years	2.26 ± 0.87	
Gender		0.88
Male	2.34 ± 0.90	
Female	2.36 ± 0.91	
Enneking stage		< 0.01
II A	1.53 ± 0.93	
II B	2.24 ± 0.62	
III	3.08 ± 0.71	
Metastasis		0.26
No	2.29 ± 0.90	
Lung	2.47 ± 0.97	
Others	2.97 ± 0.06	

的较高水平阶段之间有显著的相关性。

2.2 肉瘤组织中 galectin-3 mRNA 的表达情况

由表 2 可见,随着临床分期的增加以及组织分化的进展,galectin-3 的表达明显增加:其在 III 的表达量高于 II A、II B 期($P < 0.05$);在周围非恶性组织中的表达显著低于 II B 和 III 肉瘤组织中的表达($P < 0.01$)。表中数据显示 galectin-3 在肉瘤组

表 2 骨肉瘤不同临床分期患者肉瘤组织 galectin-3 的表达比较

Table 2 The expression of galectin-3 in osteosarcoma patients with different clinical stages of sarcomatissue

Characteristic	The value of ΔCt	Comparative method	P
Osteosarcoma tissues of II A(a)	27.560±0.135	a:b	<0.05
Osteosarcoma tissues of II B(b)	24.075±0.079	b:c	<0.05
Osteosarcoma tissues of III(c)	20.410±0.128	a:c	<0.01
The surrounding non-malignant tissues (d)	29.240±0.157	d:a	>0.05
		d:(b,c)	<0.01

织中的高表达与其分期、组织分级密切相关。

2.3 肉瘤组织中 galectin-3 的 Western-blot 检测

周围非恶性组织组和 II A 组中 galectin-3 的表达水平均低于 III 和 II B 组;与 III 和 II B 相比差异显著, $P < 0.05$,有统计学意义;III 组中 galectin-3 的平均表达水平显著高于 II B 组中的表达水平, $P < 0.05$ 。表明随着骨肉瘤组织临床分期及组织分化的进展,galectin-3 的表达有上升的趋势,而较早的 II A 期中 galectin-3 的表达与周围非恶性组

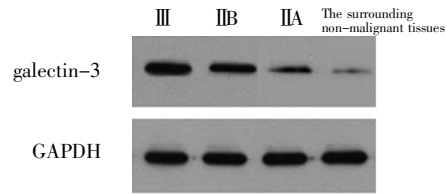


图 2 骨肉瘤患者肉瘤组织中 galectin-3 的 Western-blot 检测

Fig.2 galectin-3 expression in sarcomatissue of osteosarcoma patients by Western-blot

表 3 肉瘤组织中 galectin-3 的 WB 检测结果

Table 3 The results of galectin-3 expression in sarcomatissue by Western-blot

Characteristic	$(\bar{x} \pm s)$	
	galectin-3	GAPDH
Osteosarcoma tissues of II A	0.184±0.025	0.908±0.242
Osteosarcoma tissues of II B	0.414±0.054*	0.894±0.139
Osteosarcoma tissues of III	0.815±0.15*#	0.905±0.134
The surrounding non-malignant tissues	0.093±0.037	0.897±0.125

注:与周围非恶性组织组和 II A 组比较,II B 和 III 组均有显著性差异,* $P < 0.05$; II B 组与 III 组比较有显著性差异,# $P < 0.05$ 。

Notes: Compared with surrounding non malignant tissue group and II A group, the II B and III groups were significantly different, * $P < 0.05$; II B group and III group were significantly different, # $P < 0.05$.

织的表达无明显差异。

3 讨论

骨肉瘤已经成为严重危害青少年生命健康的主要“杀手”之一。寻找新的更为有效的方法治疗骨肉瘤已经迫在眉睫。通过干扰肿瘤发生发展中的关键蛋白分子的表达从而影响肿瘤的生长和转移,最终达到治愈肿瘤的目的,成为目前肿瘤研究中的一个热点方向^[5]。半乳糖凝集素 3 广泛表达于正常组织和肿瘤组织中,参与多种生理和病理过程,包括细胞生长和凋亡、细胞粘附及新生血管形成和肿瘤浸润与转移等。研究表明,通过转染 galectin-3 的反义核苷酸使细胞系 galectin-3 表达受抑制,可以使人类乳腺癌细胞的生长受到明显的抑制^[6]。galectin-3 的表达增高,有利于细胞抵抗由各种因素介导的细胞凋亡^[7]。同时,galectin-3 还参与肿瘤介导的血管形成^[8]。galectin-3 在体外刺激脐静脉内皮细胞形成毛细管,并且对其移动有趋化作用,在体内促进新生血管的形成^[9]。此外,研究表明 galectin-3 的表达水平与肿瘤的恶性程

度有密切关系。galectin-3 在体外明显刺激胶质母细胞瘤的移动。移植于裸鼠的胶质母细胞瘤的脑实质侵袭部分的 galectin-3 水平表达较非侵袭部分的高。这提示 galectin-3 可能与星形胶质细胞瘤侵袭有关^[10]。因此,半乳糖凝集素 3 在多种肿瘤的发生发展中起到重要作用,本研究检测并统计分析半乳糖凝集素 3 在骨肉瘤患者血清及肉瘤组织中的表达情况。

本文采用 ELISA 检测骨肉瘤患者血清中 galectin-3 水平以及 qRT-PCR 和 Western-blot 方法检测骨肉瘤组织标本中 galectin-3 的表达,结果显示肉瘤患者血清中 galectin-3 的水平极显著高于健康正常对照血清中的水平,且更高的临床分级与血清中 galectin-3 较高水平阶段之间有显著的相关性;Ⅲ期肉瘤组织中 galectin-3 的表达明显高于ⅡA、ⅡB 组和周围非恶性组织中的表达,且随着骨肉瘤组织临床分期及组织分化的进展,galectin-3 的表达有上升的趋势,galectin-3 在骨肉瘤组织中的高表达与其分期和组织分级密切相关。这些结果表明 galectin-3 在骨肉瘤的发生和发展过程中均起着十分重要的作用,但其具体的作用机制尚有待于更深入的研究。

参考文献(References):

- [1] NAGY N, LEGENDRE H, ENGELS O, *et al.* Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting[J]. *Cancer*, 2003, 97(8): 1849-1858.
- [2] HONJO Y, NANGIA-MAKKER P, INOHARA H. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells[J]. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7(3): 661-668.
- [3] HOYER K K, PANG M, GUI D, *et al.* An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas[J]. *American Journal of Pathology*, 2004, 164(3): 893-902.
- [4] CHOI J H, CHUN K H, RAZ A, *et al.* Inhibition of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in breast cancer cells by galectin-3[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2004, 3(5): 447-452.
- [5] OKA N, NAKAHARA S, TAKENAKA Y, *et al.* Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(17): 7546-7553.
- [6] NANGIA-MAKKER P, HONJO Y, SARVIS R, *et al.* Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis[J]. *American Journal of Pathology*, 2000, 156(3): 899-909.
- [7] YOSHII T, INOHARA H, TAKENAKA Y, *et al.* Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2001, 18(4): 787-792.
- [8] TAKENAKA Y, INOHARA H, YOSHII T, *et al.* Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3[J]. *Cancer Letters*, 2003, 195(1): 111-119.
- [9] BUTTERY R, MONAGHAN H, SALTER D M, *et al.* Galectin-3: differential expression between small-cell and non-small-cell lung cancer[J]. *Histopathology*, 2004, 44(4): 339-444.
- [10] MIYAZAKI J, HOKARI R, KATO S, *et al.* Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes[J]. *Oncology Reports*, 2002, 9(6): 1307-1312.