



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.014
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3850.shtml

· 基础研究 ·

Pleiotrophin 的表达及其在血清水平与结肠癌的关系

陈南征, 孙学军, 贺赛, 郑见宝, 周培华, 魏光兵, 王晖, 姚建锋, 张立, 禄韶英, 杜俊凯

(西安交通大学医学院第一附属医院 普通外科, 陕西 西安 710061)

摘要

目的: 探讨 pleiotrophin (PTN) 的表达及其血清水平与结肠癌的关系。

方法: 应用 real time-PCR、Western blot 方法检测 46 例结肠癌组织及其对应癌旁组织中 PTN mRNA 及蛋白表达水平; ELISA 方法检测 76 例结肠癌患者和 58 例健康体检者血液样本中的 PTN 表达水平。

结果: PTN mRNA 在结肠癌组织中表达量以及 PTN 蛋白的阳性表达率均明显高于癌旁正常组织, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 无论是 PTN mRNA 表达水平还是蛋白阳性率均与患者年龄、肿瘤组织类型无关 (均 $P > 0.05$), 而与肿瘤的分化程度呈负向关系、与 TNM 分期呈正向关系 (均 $P < 0.05$)。结肠癌患者血清 PTN 水平明显高于正常人群 ($P < 0.05$)。

结论: PTN 在结肠癌组织中表达增高; 血清 PTN 水平检测可作为诊断结肠癌参考指标之一。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(4):473-477]

关键词

结直肠肿瘤 / 诊断; Pleiotrophin

中图分类号: R735.3

Relation of pleiotrophin expression and its serum level with colorectal cancer

CHEN Nanzheng, SUN Xuejun, HE Sai, ZHENG Jianbao, ZHOU Peihua, WEI Guangbing, WANG Hui, YAO Jianfeng, ZHANG Li, LU Shaoying, DU Junkai

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: SUN Xuejun, Email: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

ABSTRACT

Objective: To investigate the relations of pleiotrophin (PTN) expression and its serum level with colorectal cancer.

Methods: The PTN mRNA and protein expression in tumor tissue specimens of 46 cases of colorectal cancer and in their adjacent tissue was determined by real-time PCR and Western blot, respectively, and the PTN level in the blood samples from 76 patients with colorectal cancer and 58 subjects undergoing health maintenance examination was measured by ELISA assay.

Results: Both the PTN mRNA expression level and PTN protein positive expression rate in colorectal cancer tissue were significantly higher than those in the adjacent normal tissue (both $P < 0.05$), and

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81101874; 81172359; 81172362); 陕西省科学技术研究发展计划资助项目 (2011K12-19)。

收稿日期: 2013-07-05; **修订日期:** 2014-02-25。

作者简介: 陈南征, 西安交通大学医学院第一附属医院住院医师, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床方面的研究。

通信作者: 孙学军, Email: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

either the PTN mRNA expression level or PTN positive rate was not associated with age of the patients or histological type of the tumor (all $P > 0.05$), but showed a significantly negative relation with TNM classification (all $P < 0.05$). The serum PTN level in colorectal cancer patients was significantly higher than that in normal subjects ($P < 0.05$).

Conclusion: PTN expression is increased in colorectal cancer tissue and serum PTN level may be used as one of the diagnostic tests for colorectal cancer. [Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(4):473-477]

KEYWORDS Colorectal Neoplasms/diag; Pleiotrophin

CLC number: R735.3

结直肠癌的发生是多基因共同参与、多因素阶段累积的结果^[1]。近年来由于饮食习惯的改变、环境、基因突变、错配等因素，致使其发病率逐年升高，且具有低龄化趋向^[2]。在我国目前结直肠癌居恶性肿瘤发病率第 4 位，传统的治疗手段虽然使早、中期结直肠癌患者的生存率有所提高，但晚期结直肠癌的生存期仍很低^[3-4]。因此寻求结直肠癌早期检测指标，对于改善结直肠癌患者预后及生存具有重要意义。pleiotrophin (PTN) 基因作为具有促血管生成作用的多效生长因子，参与了多种实体肿瘤的生长、侵袭和转移^[5-7]。但其在结直肠癌中的研究甚少，为了明确 PTN 在结直肠癌中的作用，本实验通过 real-time PCR、Western blot 和 ELISA 方法，检测 PTN 在结直肠癌组织及患者血清中的表达水平，旨在探讨 PTN 在结直肠癌中表达的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2007 年 3 月—2008 年 3 月于西安交通大学医学院第一附属医院普通外科行结直肠癌手术切除的结直肠癌组织标本 46 例，所有标本均经组织病理学明确诊断。46 例结直肠癌患者中，男 26 例，女 20 例；年龄 30~69 岁，中位年龄 43 岁；直肠癌 32 例，结肠癌 14 例（左半结肠癌 6 例，右半结肠癌 8 例）；TNM 分期：I~II 期 18 例，III~IV 期 28 例；淋巴结转移者 21 例，无淋巴结转移者 25 例；病理组织学分级：低分化 20 例，中分化、高分化 26 例。并同时收集 46 例对应癌旁组织（均来源于距肿瘤标本 5 cm 以上的正常黏膜组织）。

本研究同时收集 2009—2012 年于西安交通大学医学院第一附属医院就诊的 76 例未接受输血、

放化疗的结直肠癌患者（均经病理检查明确诊断）的血液样本；另取 58 例无已知肿瘤、无新近创伤或外科手术、无妊娠或月经来潮的门诊健康体检者的血液样本（男 34 例，女 24 例）。

1.2 试剂与仪器

人 PTN 细胞因子购自德国 R&D 公司（产品目录号：252PL）；PTN 单克隆抗体购自德国 R&D 公司（产品目录号：AF-252-PB）；PTN (C-19) 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司（产品目录号：sc-1394）；无水乙醇、碱性磷酸酯酶显色试剂盒等均购自西安沃尔森生物科技有限公司；PTN 探针、引物由上海生物工程有限公司合成。YWY781 型医用微波仪（250 W，50 Hz）购自浙江临安电子器材厂；Leica 光学显微镜（DM3000）购自德国 Leica 仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 real time PCR 检测 取液氮冻存结直肠癌组织 20 mg，Fast 200 试剂盒提取组织 RNA，逆转录为 cDNA（-80 °C 保存），稀释 10 倍后用于荧光定量 PCR 反应。配制 PCR 反应液（冰上操作）。SYBR Premix Ex Taq TM II (2 ×) 10 μL；PCR Forward Primer (10 μM) 0.8 μL；PCR Reverse Primer (10 μM) 0.8 μL；RT 反应液（cDNA 溶液）2 μL；ddH₂O（灭菌蒸馏水）6.4 μL；Total 20 μL。两步法 PCR 扩增标准程序：预变性、95 °C 3 min；PCR 反应、95 °C 10s、55 °C 30s。

1.3.2 Western blot 检测 RIPA（加蛋白酶及磷酸酶抑制剂）裂解液裂解 10 mg 液氮冻存组织，BCA 法测蛋白浓度，5 × Buffer 加样缓冲液混合，变性蛋白（100 °C 5 min），每条 10% SDS-PAGE 凝胶泳道上样 25 μg 蛋白，电泳 110 V 2.5 h，转 PVDF 膜 0.1 mA 1.5 h，含 10% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h，加 PTN 一抗（1:300），β-actin 一抗（1:8 000）。4 °C 过夜，鼠二抗（1:5 000）

室温 1 h, ECL 显影, 凝胶成像系统扫描。

1.3.3 血液标本的采集 于晨起空腹静脉采血, 不抗凝 5 mL, 静置 30~60 min, 4 000 r/min, 4 ℃ 离心 5 min。新鲜分离血清后置 -80 ℃ 保存待测, 血清无溶血、脂浊。

1.3.4 ELISA 检测 PTN 的单克隆抗体 TBS 稀释到 1 mg/mL, 稀释的抗体 100 μL 量滴加到 96 孔板 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次 (5 min/次)。封闭液 (TBST 含 1% 牛血清白蛋白) 4 ℃ 封闭 2 h。再次 TBST 洗涤 3 次 (5 min/次)。待检测样本用 2 × TBST 稀释。每孔加入稀释好的样本 100 μL 室温孵育 90 min, TBST 洗涤 3 次 (5 min/次)。每孔加入 500 ng/mL 生物素-亲和纯化抗人 PTN 山羊免疫球蛋白 G (IgG) (R&D Systems, Inc.), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次 (5 min/次)。每孔加入链霉亲和素碱性磷酸酶 (50 ng/mL), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次 (5 min/次)。4 ℃ 孵育对硝基苯磷酸盐 (Pierce Chemical Co.) 18 h。酶标仪 450 nm 测定样本吸光度。梯度稀释的人重组 PTN 细胞因子设立标准曲线。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料比较采 *t* 检验; 计数资料比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PTN mRNA 在结直肠癌组织、癌旁组织中的表达

采用 real-time PCR 方法对所收集的结直肠癌组织与癌旁组织中的 PTN mRNA 表达水平进行检测。对照管家基因 GAPDH, 经过标化计算出结直肠癌组织和远端正常组织 ΔCt 值, 进行结直肠癌组织和远端正常组织 PTN 基因表达水平的比较 (表 1)。结果表明, PTN mRNA 的癌组织中表达水平明显高于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

表 1 PTN mRNA 在结直肠癌组织与癌旁正常组织中的表达 ($n=46$)

组织	PTN mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
癌组织	5.7270 ± 4.7635	5.376	<0.01
癌旁正常组织	1.8239 ± 1.2624		

2.2 PTN mRNA 的表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系

46 例结直肠癌患者中 PTN mRNA 在结直肠癌组织中的表达水平在患者年龄、组织类型分组间差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。PTN mRNA 表达水平在 III~IV 期患者中明显高于 I~II 期患者 ($P<0.05$), 且在高分化亚组表达水平明显低于低分化亚组 (均 $P<0.05$) (表 2)。

表 2 PTN mRNA 的表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系

Table 2 Relations of PTN mRNA expression with the clinicopathological factors of colorectal cancer patients

临床病理特征	<i>n</i>	PTN mRNA 表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄 (岁)			1.822	>0.05
< 50	12	6.4165 ± 2.723 1		
≥ 50	34	4.2632 ± 5.135 2		
组织类型			0.4633	>0.05
腺癌	36	4.8710 ± 4.604 3		
黏液癌	10	5.2300 ± 0.370 7		
分化程度			4.099	<0.05
高中分化组	26	3.538 1 ± 3.406 7		
低分化组	20	9.657 4 ± 5.968 6		
TNM 分期			4.467	<0.05
I~II 期	18	3.247 4 ± 2.925 1		
III~IV 期	28	8.947 8 ± 5.678 2		

2.3 PTN 蛋白在结直肠癌组织、癌旁远端正常组织中的表达水平

SDS-PAGE 电泳结果表明, PTN 在 PVDF 膜上 18 kD 显示, 内参 β -actin 条带在 43 kD 处均见, 各泳道 β -actin 表达基本抑制 (图 1)。阳性判读标准: 灰度值 $\geq \beta$ -actin; 阴性判读标准: $< \beta$ -actin 灰度。PTN 蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率为 63.1%, 在癌旁远端正常组织中的表达率为 23.9%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 3)。

2.4 PTN 蛋白的表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系

46 例结直肠癌患者中 PTN 蛋白在结直肠癌组织中的表达水平在患者年龄、细胞组织类型分组间差异无统计学意义 (均 $P>0.05$); PTN 蛋白表达水平在 III~IV 期明显高于 I~II 期 ($P<0.05$), 且高分化水平明显低于低分化水平 ($P<0.05$), 癌组织分化愈差, PTN 蛋白表达愈强 (表 4)。

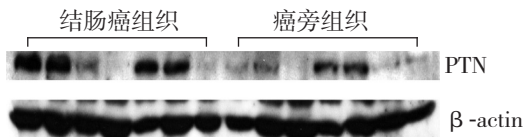


图 1 部分组织蛋白电泳结果

Figure 1 Result of protein electrophoresis from part of the samples

表 3 PTN 蛋白在结直肠癌组织与癌旁正常组织中的表达 [n (%)]

Table 3 PTN protein expression in colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue [(n)%]

类别	阳性	阴性	χ^2	P
癌组织	29 (63.1)	17 (36.9)	14.331	0.000
癌旁正常组织	11 (23.9)	35 (76.1)		

表 4 PTN 蛋白的表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系 [n (%)]

Table 4 Relations of PTN protein expression with the clinicopathological factors of colorectal cancer patients [n(%)]

项目	阳性	阴性	χ^2	P
年龄 (岁)			0.680	0.410
< 50	8 (66.6)	4 (33.3)		
≥ 50	18 (52.9)	16 (47.1)		
组织类型			0.024	1.000
腺癌	17 (47.2)	19(52.8)		
黏液癌	5 (50.0)	5 (50.0)		
分化程度			10.980	0.001
高中分化组	8 (30.9)	18 (69.1)		
低分化组	16 (80.0)	4 (20.0)		
TNM 分期			4.785	0.037
I~II 期	7 (38.9)	11 (61.1)		
III~IV 期	20 (71.4)	8 (28.6)		

2.5 PTN 在结直肠癌患者和健康志愿者血清中的表达

ELISA 检测 58 例健康志愿者和 76 例结直肠癌患者血清中的 PTN 表达水平, 结果显示: 健康志愿者的血清 PTN 水平为 (73.42 ± 46.31) pg/mL; 结直肠癌患者的平均血清 PTN 水平 (187.32 ± 56.78) pg/mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 95.5% 的健康志愿者的 PTN 血清水平低于 200 pg/mL。选取 > 200 pg/mL 作为血清 PTN 升高的标准, PTN 的血清水平结直肠癌患者高于正常对照组 ($P < 0.05$) (表 5)。

表 5 结直肠癌组与正常对照组血清 PTN 浓度

Table 5 Serum PTN level in colorectal cancer patients and normal controls

组别	n	平均年龄 (岁)	PTN (pg/mL)	t	P
正常对照组	58	43.4	73.42 ± 46.31	9.416	<0.01
结直肠癌组	76	52.6	187.32 ± 56.78		

3 讨论

近年来, 随着肿瘤分子标志物的研究, 越来越多的癌基因、抑癌基因、以及一些对肿瘤有预测价值的小分子 miRNA, 逐渐成为研究热点^[8-9]。而 PTN 基因作为一种原癌基因, 属 MDK 家族, 其作用类似于生长因子样作用。在细胞的生长、分化及骨骼发育过程中起重要作用^[10]。在肿瘤相关研究中, PTN 基因不但参与肿瘤细胞的黏附、增殖、抑制肿瘤细胞凋亡等^[11], 还参与肿瘤细胞的远处转移。最近的研究表明: 多种实体肿瘤组织中 (胰腺癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌等) PTN 表达增高^[12-15]。在前列腺癌、胰腺癌的研究^[16-17]表明, PTN 血清中的含量反映患者预后。所以本实验研究结直肠癌组织及血清中 PTN 的表达情况, 对于结直肠癌的发生及患者的预后具有重要意义。

本研究 real-timePCR、Western blot 实验结果显示: 46 例结直肠癌组织标本及对应的远端正常组织中, PTN mRNA 及蛋白表达水平在结直肠癌组织中高于对应远端正常组织, 结直肠癌 TNM 分期中 III~IV 期的表达高于 I~II 期 ($P < 0.05$)。这一结果与 Jäger 等^[18]在肺癌中的研究结果一致; 说明 PTN 作为癌基因, 核酸表达水平、蛋白表达水平异常升高的现象具有很好的一致性, 证实 PTN 基因从转录、翻译水平共同参与结直肠癌细胞的异常增殖, 且随着肿瘤 TNM 分期的升高, PTN 蛋白含量也随之升高。而 PTN 蛋白表达在高分化组明显低于低分化组 ($P < 0.05$), 提示癌组织分化愈差, PTN 蛋白表达愈强, 患者预后愈差。

本实验 ELISA 方法检测 58 例健康志愿者和 76 例结直肠癌患者的血清中 PTN 的含量: 多数健康志愿者的血清 PTN 水平在 50 pg/mL 左右, 均值为 (73.42 ± 46.31) pg/mL, 而结直肠癌患者的平均血清 PTN 水平为 (187.32 ± 56.78) pg/mL。通过统计检验, PTN 的血清水平结直肠癌患者高于正常对照组 ($P < 0.05$)。多数学者检测 PTN 的血

清浓度变化很大,这可能是由于检测方法不同,采血时间及试剂灵敏度等原因引起。而且化疗或手术后患者血清 PTN 含量迅速降低至正常水平^[19]。由此,血清 PTN 含量检测可作为结直肠癌早期筛查和判断预后的参考指标之一。

目前对于结直肠癌的治疗,很大程度上取决于早期诊断发现和有效控制肿瘤浸润、转移^[20]。目前亟需对与肿瘤发生相关的基因、分子标志物进行大量的基础研究。虽然 PTN 基因与肿瘤发生的具体机制,尚未完全阐明,但随着基因研究的逐渐深入,PTN 基因将有望为肿瘤基因治疗和预测临床预后提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Jeml A, Center MM, DeSantis C, et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(8):1893-1907.
- [2] 代珍,郑荣寿,邹小农,等. 中国结直肠癌发病趋势分析和预测[J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(7):598-603.
- [3] Chun P, Wainberg ZA. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer: the role of molecular markers in choosing therapy[J]. *Gastrointest Cancer Res*, 2010, 3(5):191-196.
- [4] 张言,李启驹,王伟,等. 结直肠癌肝转移患者的预后因素分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(4):438-441.
- [5] Papadimitriou E, Mikelis C, Lampropoulou E, et al. Roles of pleiotrophin in tumor growth and angiogenesis[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2009, 20(4):180-190.
- [6] Giddings BH, Kwong SL, Parikh-Patel A, et al. Going against the tide: increasing incidence of colorectal cancer among Koreans, Filipinos, and South Asians in California, 1988-2007[J]. *Cancer Causes Control*, 2012, 23(5):691-702.
- [7] Mikelis C, Koutsournpa M, Papadimitriou E. Pleiotrophin as a possible new target for angiogenesis-related diseases and cancer[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2007, 2(2):175-186.
- [8] 李宏伟,胡海霞,李艳红,等. 结直肠癌组织中 CD44v6 和 survivin 的蛋白表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(4):384-386.
- [9] 郑见宝,孙学军,王炜,等. 缺氧下调结肠癌细胞株 CDX2 表达

的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(4):364-368.

- [10] Yao J, Ma Q, Wang L, et al. Pleiotrophin expression in human pancreatic cancer and its correlation with clinicopathological features, perineural invasion, and prognosis[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(4):895-901.
- [11] Rosenfield SM, Bowden ET, Cohen-Missner S, et al. Pleiotrophin(PTN) expression and function and in the mouse mammary gland and mammary epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47876.
- [12] Wu H, Barusevicius A, Babb J, et al. Pleiotrophin expression correlates with melanocytic tumor progression and metastatic potential[J]. *J Cutan Pathol*, 2005, 32(2):125-130.
- [13] 段明松,苏加庆,周增祥. 结直肠癌转移相关基因的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(9):890-891.
- [14] Yeh HS, Chen H, Manyak SJ, et al. Serum pleiotrophin levels are elevated in multiple myeloma patients and correlate with disease status[J]. *Br J Haematol*, 2006, 133(5):526-529.
- [15] Tsirmoula S, Dimas K, Hatzia Apostolou M, et al. Implications of pleiotrophin in human PC3 prostate cancer cell growth in vivo[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(10):1826-1832.
- [16] Yao J, Zhang M, Ma QY, et al. PAd-shRNA-PTN reduces pleiotrophin of pancreatic cancer cells and inhibits neurite outgrowth of DRG[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(21):2667-2673.
- [17] Orr B, Vanpoucke G, Grace OC, et al. Expression of pleiotrophin in the prostate is androgen regulated and it functions as an autocrine regulator of mesenchyme and cancer associated fibroblasts and as a paracrine regulator of epithelia[J]. *Prostate*, 2011, 71(3):305-317.
- [18] Jäger R, List B, Knabbe C, et al. Serum levels of the angiogenic factor pleiotrophin in relation to disease stage in lung cancer patients[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(6):858-863.
- [19] Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, et al. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas[J]. *Br J Cancer*, 2009, 88(10):1522-1526.
- [20] 凌伟,颜亚平,李良月. 结直肠癌预后影响因素分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(9):925-926.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 陈南征,孙学军,贺赛,等.Pleiotrophin 的表达及其在血清水平与结肠癌的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(4):473-477. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.014
Cite this article as: CHEN NZ, SUN XJ, HE S, et al. Relation of pleiotrophin expression and its serum level with colorectal cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(4):473-477. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.014