

Derlin-1 的表达与非小细胞肺癌临床特征及预后的相关性

成炜, 葛珊珊, 陆彬, 曹玉华

南通市通州区人民医院呼吸科, 江苏 南通 226300

摘要: **目的** 探讨内质网相关降解蛋白 Derlin-1 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的表达及其与 NSCLC 临床特征和预后的相关性。**方法** 回顾性分析 2010 年 1 月至 2011 年 12 月在南通大学附属医院手术治疗确诊的 40 例 NSCLC 患者的临床资料。按 TNM 分期分为 I ~ II 期 22 例, III ~ IV 期 18 例, 其中 18 例患者癌旁组织作对照组。应用实时 PCR、Western blot、免疫组化技术检测癌组织和癌旁组织中 Derlin-1 的表达, 分析其表达与 NSCLC 临床特征及预后的关联性, 分析 Derlin-1 阳性与 NSCLC 患者 3 年总生存率的关系。**结果** Derlin-1 的 mRNA 和蛋白相对表达量, 呈 III ~ IV 期癌组织 > I ~ II 期癌组织 > 癌旁组织, 总体及两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$)。III ~ IV 期、I ~ II 期和对照组 Derlin-1 阳性率分别为 94.44%、63.64% 和 16.67%, 三组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Derlin-1 阳性率与 NSCLC 的 TNM 分期、病理分级、淋巴结转移有关联性 ($P < 0.05, P < 0.01$); Derlin-1 阴性 NSCLC 患者 3 年生存率明显高于 Derlin-1 阳性患者 (77.78% vs 22.58%, $P < 0.01$)。**结论** Derlin-1 在 NSCLC 中过表达, 表达高者恶性程度高, 阳性表达者预后差, Derlin-1 或可作为 NSCLC 治疗的潜在靶点。

关键词: 非小细胞肺癌; 内质网相关的降解蛋白 Derlin-1; 预后; 临床特征

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)01-0023-04

Associations of Derlin-1 expression with clinical features and prognosis in patients with non-small cell lung cancer

CHENG Wei, GE Shan-shan, LU Bin, CAO Yu-hua

Department of Respiratory, Nantong Tongzhou People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226300, China

Abstract: Objective To investigate the expression of endoplasmic reticulum associated degradation protein Derlin-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and explore its associations with clinical features and prognosis in NSCLC patients. **Methods** A retrospective analysis was performed on 40 patients with histologically confirmed NSCLC from January 2010 to December 2011 in Affiliated Hospital of Nantong University. According to TNM classifications, the patients were divided into I-II stage group ($n=22$) and III-IV stage group ($n=18$). The normal tissues adjacent to cancer of 18 subjects in all patients were used as control group. Real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry were respectively used to detect the expressions of Derlin-1 in cancer tissues and adjacent tissues. The associations of Derlin-1 expression with clinical characteristics and prognosis of NSCLC and the relationship between positive expression of Derlin-1 and overall 3-year survival rate were analyzed. **Results** The relative expressions of Derlin-1 mRNA and protein decreased significantly in the order of III-IV group, I-II group and control group, overall and pairwis comparison were statistic significant ($P < 0.01, P < 0.05$). The positive rates of Derlin-1 in III-IV group, I-II group and control group were 94.44%, 63.64% and 16.67%, respectively, and there were statistical differences in them among three groups ($P < 0.01$). The positive rate of Derlin-1 was statistically correlated with TNM stage, pathological grading and lymph node metastasis ($P < 0.05, P < 0.01$); the 3-year overall survival rate in patients with positive expression of Derlin-1 was significantly lower than that in patients with negative expression of Derlin-1 (77.78% vs 22.58%, $P < 0.01$). **Conclusion**

Derlin-1 is overexpressed in NSCLC and results in high malignancy and poor prognosis. Derlin-1 might be served as a potential target for the treatment of NSCLC.

Keywords: Non-small cell lung cancer; Endoplasmic reticulum associated degradation protein Derlin-1; Prognosis;

Clinical features

Fund program: Nantong Tongzhou District Science and Technology Program of Livelihood and Social Undertakings (Tongke[2016]38-1)

肺癌是全世界肿瘤相关死亡的常见原因之一。其中,非小细胞肺癌(NSCLC)是最常见的类型,占有所有病例的85%左右^[1-3],近年来,NSCLC的治疗虽然取得了一定进展,但患者的生存率仍然较低,所有患者5年总生存率(OS)仅为15%^[4-6]。尽管对NSCLC的研究付出巨大的努力,但是其发病的分子机制仍未能明确。目前研究表明内质网相关降解蛋白Derlin-1在多种肿瘤中表达异常,与肿瘤的发生、发展及预后等密切相关。研究显示,Derlin-1在乳腺癌^[7],肺癌细胞系^[8]和结肠癌^[9]中过表达,并与肿瘤分级和淋巴结转移相关^[7]。Derlin-1作为候选的癌基因,成为重要的肿瘤靶向治疗研究热点^[10-12]。然而,Derlin-1在NSCLC中的表达及其与NSCLC的临床病理特征间的关系,国内外均较少报道。本研究探讨Derlin-1在NSCLC中的表达,并分析其表达与NSCLC临床特征及预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析2010年1月至2011年12月在南通大学附属医院手术治疗确诊的NSCLC患者40例的临床资料。按TNM分期分为I~II期22例,III~IV期18例,其中18例患者癌旁组织作对照组。40例中男23例,女17例;年龄40~85(61.21±13.18)岁。所有患者术前均未接受放化疗及其他抗肿瘤治疗。同时排除非原发肿瘤者及患其他肿瘤者。所有患者术后均接受常规化疗。术后随访以死亡为终点,最长随访时间36个月。本研究经医院伦理委员会批准(审查编号:2016-K006)。

1.2 实时PCR 根据UNIQ-10离心柱RNA纯化试剂盒(碧云天)分离和纯化总RNA。使用RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒(Fermentas)合成第一链cDNA。随后使用FastStart Universal SYBR Green Master Mix(罗氏),对第一链cDNA进行Corbett RG-6000 PCR系统(QIAGEN)处理。通过在50~55℃范围内改变退火温度来优化反应,合成引物如下:GAPDH上游5'-GCAAGTTC AACGGCACAG-3',下游5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'; Derlin-1上游5'-ATGTCGGACATCGGAGACTG-3',下游5'-CTGGTCTC-CAAGTCCGAAAG-3'。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达的倍数变化。

1.3 Western blot 将总蛋白的等分样品(每泳道50 μg)在12% SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶上进行电泳,然后使用湿法转移法转移至硝酸纤维素膜上。将膜在室温下用冲洗缓冲液洗涤,然后用封闭缓冲液(冲洗缓冲液中5%的无脂牛奶)封闭30 min。用Derlin-1(1:500, Sigma)在室温下孵育2 h。然后将膜用冲洗缓冲液洗涤,并在室温下与HRP偶联的二抗(1:1 000, Santa Cruz)孵育2 h,然后用增强的化学发光试剂(Amersham)显影。另外,β-actin用作内参。使用ImageMaster™2D Platinum(5.0版, Amersham Biosciences)分析光密度。目的蛋白条带光密度值与β-actin光密度值的比值为定量结果,然后与癌旁组织目的蛋白条带定量结果做对比分析。

1.4 免疫组化 取各组切片,封闭后用Derlin-1(1:500, Sigma)多克隆抗体在37℃湿盒孵育4 h,用0.01 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗3遍后,每张切片滴加含有1:1 000稀释的结合HRP的羊抗兔二抗,室温孵育2 h,用PBS清洗3遍。然后DAB显色,乙醇脱水干燥,中性树脂封片固定。由两位资深病理科医生对免疫组化结果采用双盲法判读。用半定量积分法对阳性细胞染色强度及阳性细胞率分别进行分级计分。染色强度以阳性细胞呈色反应为准:无特异性着色为0分,浅棕色1分,棕黄色2分,深棕色3分。每张切片随机取400倍视野下染色的阳性细胞占比按下列标准记分:阴性或阳性细胞<5%为0分,5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%~75%为3分,>75%为4分。两种评分相乘,以评分的均值为判定标准,大于均值为阳性,否则为阴性。

1.5 统计学方法 应用SPSS 21.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及两两比较的LSD-*t*检验;计数资料以例(%)表示,关联性采用Fisher确切概率法 χ^2 检验或其校正法分析,三组比较采用R×C表 χ^2 检验及两两比较的分割法;Kaplan-Meier生存分析Derlin-1表达与NSCLC患者3年总生存率的关系。检验水准取 $\alpha = 0.05$,双侧检验;用 χ^2 检验分割法时,校正为 $\alpha' = 0.017$ 。

2 结果

2.1 肺癌组织及癌旁组织Derlin-1 mRNA和蛋白相

对表达量比较 Derlin-1 mRNA 和蛋白相对表达量比较, III ~ IV期 > I ~ II期癌组织 > 癌旁组织, 三组比较及两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表1。图1直条图所示两组癌组织 Derlin-1 蛋白相对表达量是以癌旁组织为参照。

2.2 肺癌组织及癌旁组织 Derlin-1 免疫组化 I ~ II期、III ~ IV期癌组织可见到大量染色较深的 Derlin-1 阳性细胞, 主要位于细胞浆和细胞膜(图2A), I ~ II期、III ~ IV期 Derlin-1 阳性率分别为 63.64% (14/22)、94.44% (17/18); 癌旁组织仅见到少量染色较淡的阳性细胞(图2A), Derlin-1 阳性率为 16.67% (3/18); 三组间 Derlin-1 阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 22.81, P < 0.01$), 两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.017$, 图2B)。

2.3 Derlin-1 阳性率与 NSCLC 临床因素的关联性 表2显示, Derlin-1 阳性率与 TNM 分期、分化程度及淋巴转移有关 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表1 肺癌两组及癌旁组织 Derlin-1 mRNA 和蛋白相对表达量

项目	癌旁组织 (n=18)	I ~ II期 (n=22)	III ~ IV期 (n=18)	F 值	P 值
Derlin-1 mRNA	1.00 ± 0.00	1.28 ± 0.08 ^a	1.60 ± 0.13 ^{ab}	138.531	< 0.01
Derlin-1 蛋白	1.00 ± 0.00	1.28 ± 0.12 ^a	1.51 ± 0.16 ^{ab}	57.334	< 0.01

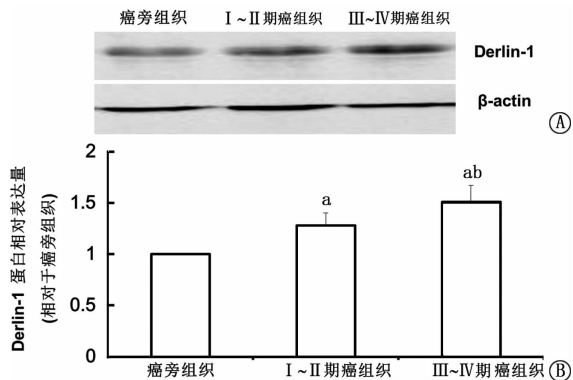
注:与癌旁组织比,^a $P < 0.05$;与 I ~ II期比,^b $P < 0.05$ 。

表2 Derlin-1 阳性率与 NSCLC 临床因素的关联性分析

临床因素	例数	Derlin-1 (例)		χ^2 值	P 值
		阳性(n=31)	阴性(n=9)		
年龄					
≤59	15	12	3	0.010	0.922
>59	25	19	6		
性别					
女	17	13	4	0.062	0.803
男	23	18	5		
吸烟情况					
有	26	20	6	0.077	0.781
无	14	11	3		
组织分型					
腺癌	28	21	7	0.027	0.869
鳞癌	12	10	2		
侵犯脏胸膜					
否	22	17	5	0.117	0.732
是	18	14	4		
TNM 分期					
I ~ II	22	14	8	-	0.027 ^a
III ~ IV	18	17	1		
分化程度					
高分化	10	3	7	17.580	< 0.001
中分化	21	19	2		
低分化	9	9	0		
淋巴结转移					
无	16	9	7	5.024	0.025
有	24	22	2		

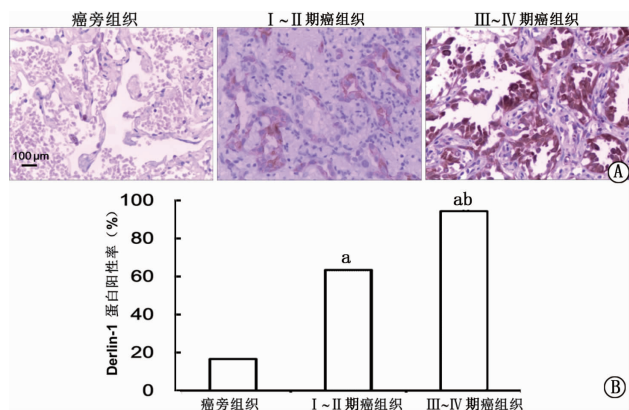
注:^a表示采用 Fisher 确切概率法。

2.4 Derlin-1 阳性率与 3 年总生存率的关系 Kaplan-Meier 法结果显示, 所有患者 3 年生存率为 35%。Derlin-1 阳性 NSCLC 患者平均生存期 27 个月 (95% CI: 24.0 ~ 30.0), Derlin-1 阴性 NSCLC 患者平均生存期 35 个月 (95% CI: 32.8 ~ 36.5)。Derlin-1 阴性 NSCLC 患者 3 年生存率高于 Derlin-1 阳性患者 (77.78% vs 22.58%, $P < 0.01$)。见图3。



注:A为三组 Derlin-1 蛋白凝胶电泳图;B为三组 Derlin-1 蛋白相对表达量直条图;与癌旁组织比较,^a $P < 0.05$;与 I ~ II 期癌组织比较,^b $P < 0.05$ 。

图1 不同 TNM 分期肺癌组织及癌旁组织 Derlin-1 蛋白相对表达量比较



注:A为三组免疫组化结果(×200);B为三组 Derlin-1 蛋白阳性率比较;与癌旁组织比,^a $P < 0.017$;与 I ~ II 期癌组织比,^b $P < 0.017$ 。

图2 不同 TNM 分期肺癌组织及癌旁组织 Derlin-1 蛋白免疫组化图及阳性率比较

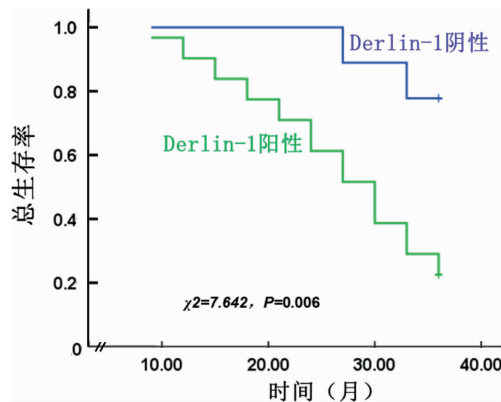


图3 Kaplan-Meier 法绘制 NSCLC 患者 3 年生存曲线

3 讨论

NSCLC 发病机制相当复杂,目前关于 NSCLC 的发病机制仍知之甚少。肿瘤的发生和发展需要若干个抑癌基因与原癌基因作用发生改变,这使得癌细胞的生长逃避控制,同时细胞凋亡信号被抑制,细胞增殖与死亡的平衡状态被打破^[13]。研究发现,如果机体细胞增殖与凋亡失衡,会导致肿瘤的发生,并影响肿瘤的生物行为^[14]。

Derlin-1 除主要定位于内质网膜外,还表达在肿瘤细胞质膜上。在内质网膜上,镶嵌于磷脂双分子层中,其 C 末端和 N 末端均朝向胞质,而在质膜上,其 C 末端则朝向胞外,N 末端朝向胞质^[15]。Derlin-1 是内质网相关性降解途径中内质网膜上的跨膜蛋白,在内质网稳态失衡引起的内质网相关性降解途径中发挥重要作用,参与了错误折叠蛋白质的逆向转运过程。目前研究表明 Derlin-1 在多种肿瘤中表达异常,在肿瘤中发挥关键作用,与肿瘤的发生、发展及预后等密切相关,这可能与参与了错误折叠蛋白质的逆向转运过程、具有抗细胞凋亡作用有关^[7-9]。

有研究显示,Derlin-1 在乳腺癌^[7]、肺癌细胞系^[8]和结肠癌^[9]中过表达。本研究结果也显示,NSCLC 癌组织中 Derlin-1 表达高于癌旁组织,且 TNM 分期高者 Derlin-1 表达量增高。Wang 等^[7]研究发现,乳腺癌组织中 Derlin-1 高表达,正常乳腺组织中几乎不表达,Derlin-1 阳性率与肿瘤的分级及淋巴结转移相关,其可能与乳腺癌的预后有关。Tan 等^[9]研究发现,结肠癌患者癌组织中表达 Derlin-1 基因,其过表达与结肠癌分化程度、浸润、淋巴结转移、Dukes 分期、远处转移及总生存率较差有关。本研究结果显示,Derlin-1 的 mRNA 和蛋白相对表达量及 Derlin-1 蛋白阳性率均呈 III ~ IV 期 > I ~ II 期癌组织 > 癌旁组织;Derlin-1 阳性率与肿瘤分化程度、TNM 分期及淋巴转移有关联性;Derlin-1 阳性表达患者 3 年生存率低于阴性表达患者;此结果与其他学者在其它肿瘤中观察到的结果基本一致。但是本研究样本数量较少,结论仍有待进一步研究验证。Derlin-1 参与 NSCLC 的机制有待进一步阐明。

参考文献

- [1] West H. Management of oligometastatic disease in advanced non-small cell lung cancer[J]. Clin Chest Med,2020,41(2):249.
- [2] Patel SA, Weiss J. Advances in the treatment of non-small cell lung cancer: immunotherapy[J]. Clin Chest Med,2020,41(2):237.
- [3] Giustini NP, Jeong AR, Buturla J, et al. Advances in treatment of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer: targeted therapy[J]. Clin Chest Med,2020,41(2):223-235.
- [4] Myall NJ, Das M. Advances in the treatment of stage III non-small cell lung cancer[J]. Clin Chest Med,2020,41(2):211-222.
- [5] Harada G, Gongora ABL, da Costa CM, et al. TRK inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. Curr Treat Options Oncol,2020,21(5):39.
- [6] Fitzgerald K, Simone CB II. Combining immunotherapy with radiation therapy in non-small cell lung cancer[J]. Thorac Surg Clin,2020,30(2):221-239.
- [7] Wang J, Hua H, Ran YL, et al. Derlin-1 is overexpressed in human breast carcinoma and protects cancer cells from endoplasmic Reticulum stress-induced apoptosis[J]. Breast Cancer Res,2008,10:R7.
- [8] Xu L, Wang ZH, Xu D, et al. Expression of Derlin-1 and its effect on expression of autophagy marker genes under endoplasmic Reticulum stress in lung cancer cells[J]. Cancer Cell Int,2014,14(1):50.
- [9] Tan XM, He XL, Jiang ZH, et al. Derlin-1 is overexpressed in human colon cancer and promotes cancer cell proliferation[J]. Mol Cell Biochem,2015,408(1/2):205-213.
- [10] Liu Y, Wang Z, Liu H, et al. Derlin-1 functions as a growth promoter in breast cancer[J]. Biol Chem,2020,401(3):377-387.
- [11] Yang FM, Wei K, Qin ZQ, et al. MiR-598 suppresses invasion and migration by negative regulation of derlin-1 and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer[J]. Cell Physiol Biochem,2018,47(1):245-256.
- [12] Zeng J, Tian Q, Zeng Z, et al. Derlin-1 exhibits oncogenic activities and indicates an unfavorable prognosis in breast cancer[J]. Cell Biol Int,2020,44(2):593-602.
- [13] Pérez-Benavente B, Nasresfahani AF, Farràs R. Ubiquitin-regulated cell proliferation and cancer[J]. Adv Exp Med Biol,2020,1233:3-28.
- [14] Ryoo HD, Bergmann A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol,2012,4(8):a008797.
- [15] Kadowaki H, Satrimafitrah P, Takami Y, et al. Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1[J]. Sci Rep,2018,8(1):7317.

收稿日期:2020-05-26 修回日期:2020-06-22 编辑:石嘉莹