

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00360

原发性肾透明细胞癌中转移相关基因 CD99、FKBP5 和 FLJ13576 的表达

曹廷虎^{1,3}, 侯建国^{1*}, 常文军², 翟羽佳², 林丽萍², 顾春英², 谭晓洁², 曹广文^{2*}

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433
3. 上海市宝山中心医院泌尿外科, 上海 201900

[摘要] **目的:**探讨肿瘤转移相关分子 CD99、FKBP5、FLJ13576 在原发性肾透明细胞癌中的表达。**方法:**应用半定量 RT-PCR 技术研究肿瘤转移相关分子 CD99、FKBP5、FLJ13576 在肾透明细胞癌组织和癌旁组织中的差异性表达。**结果:**CD99、FKBP5、FLJ13576 在原发性肾透明细胞癌组织中的表达率分别为 72%、60% 和 48%, 而对应癌旁组织中的表达率分别为 28%、24% 和 16%, 表达水平也明显不同。肾透明细胞癌组织中 CD99、FKBP5 和 FLJ13576 3 种基因的表达水平均显著高于癌周组织 ($P < 0.05$)。**结论:**肿瘤转移相关分子 CD99、FKBP5、FLJ13576 在肾透明细胞癌原发组织中的表达明显上调, 可能与肾细胞癌发生、发展密切相关, 有望成为检测肾细胞癌的新的生物学标志。

[关键词] 肾肿瘤; CD99; FKBP5; FLJ13576; 基因表达; 透明细胞癌

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0360-04

Expression of metastasis-associated molecules CD99, FKBP5, FLJ13576 in primary clear cell renal cell carcinoma

CAO Ting-hu^{1,3}, HOU Jian-guo^{1*}, CHANG Wen-jun², ZHAI Yu-jia², LIN Li-ping², GU Chun-ying², TAN Xiao-jie², CAO Guang-wen^{2*}

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Urology, Shanghai Baoshan Central Hospital, Shanghai 201900

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the expression of metastasis-associated molecules CD99, FKBP5 and FLJ13576 in primary clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Methods:** Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examine the differential expression of CD99, FKBP5, and FLJ13576 in the primary ccRCC tissues and the corresponding adjacent normal renal tissues. **Results:** The positive rates of CD99, FKBP5, and FLJ13576 in the primary ccRCC tissues were 72%, 60% and 48%, respectively, which were significantly higher than those in the adjacent normal renal tissues (28%, 24%, and 16%, $P < 0.05$). **Conclusion:** Cancer metastasis-associated molecules CD99, FKBP5 and FLJ13576 are highly expressed in the primary ccRCC tissues, which might be associated with the development and progression of renal cancer. CD99, FKBP5 and FLJ13576 may serve as potential markers for detection of ccRCC.

[KEY WORDS] kidney neoplasms; CD99; FKBP5; FLJ13576; gene expression; clear cell carcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 360-363]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是最常见的肾脏实质性恶性肿瘤(约占 96%), 位居泌尿生殖系统肿瘤的第 2 位(仅次于膀胱癌), 占有成人肿瘤的 3%, RCC 的发病率在欧洲和美国每年以 3% 的速度增长^[1]。在我国, 肾细胞癌发病率和死亡率有逐年上升的趋势, 约 30% 的肾细胞癌患者在就诊时

或手术后可能已出现转移, 转移性肾细胞癌患者的中位生存时间为 8~12 个月。肾细胞癌对放疗与化疗均不敏感^[2]。临床上多数患者无任何自觉症状, 因此除定期体检外, 如何早期发现肿瘤、术后如何监测肿瘤是否复发以及如何与良性肾肿块鉴别是目前肾癌诊疗过程的难点之一。肾透明细胞癌(clear cell

[收稿日期] 2008-08-20 **[接受日期]** 2009-01-05

[基金项目] 上海市教委科技创新重点项目(08zz39), Supported by Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission(08zz39).

[作者简介] 曹廷虎, 硕士生. E-mail: cgr70@sina.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-81873409, E-mail: ghou@smmu.edu.cn; Tel: 021-81871061, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

renal cell carcinoma, ccRCC)尚无早期诊断和预后预测指标。本实验室前期应用基因芯片研究非转移 ccRCC 与转移性癌的基因表达差异,确证 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因在转移癌中高表达^[3],本研究在原发性 ccRCC 中进一步验证其表达情况,探讨这些基因在 ccRCC 发生和转移中的作用,为寻找 ccRCC 新的分子标志物提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂 Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR 扩增仪、Eppendorf Centrifuge 5417R 低温离心机、TRIzol 试剂、Promega 试剂盒、Taqplus 酶购于天根生化科技有限公司。CD99、FKBP5、FLJ13576 引物自行设计并由上海生工生物工程技术服务公司合成。实验用器械如研钵、Eppendorf 管等均用 DEPC 处理以去除残存的 RNA 酶。

1.2 标本来源 肾癌组织标本取自第二军医大学长海医院泌尿外科和长征医院泌尿外科 2004 年 7 月至 2007 年 7 月 25 例行肾癌根治术的患者,其中男性 16 例,女性 9 例,年龄 29~75 岁,平均(54.7±3)岁。每例取癌及癌旁组织(距肿瘤切缘 2 cm)标本各 1 份,切取标本后立即放入液氮冻存。所有标本均经过病理检查证实,均为肾透明细胞癌,22 例为 I 期(T₁N₀M₀),1 例肾静脉有癌栓为 III 期(T₃N₀M₀),1 例肾门淋巴结转移为 III 期(T₁N₁M₀),1 例 L₁ 椎体有转移为 IV 期(T₁N₀M₁)。

1.3 半定量 RT-PCR 检测相关基因表达

1.3.1 RNA 的提取 以 TRIzol 试剂提取肾癌和正常肾组织总 RNA。液氮冻存组织放入研钵研磨,加入 TRIzol 试剂进行匀浆,氯仿抽提,异丙醇沉淀,75%(体积分数)乙醇清洗,干燥后,产物溶解于 DEPC 水中,DNase I 消化残量基因组 DNA。经 XIN MAO UV-7504 紫外分光光度仪测得组织 RNA 的光密度(D)值为 0.147~1.416,总 RNA(质量)浓度为 1.059~10.204, D₂₆₀/D₂₈₀ 为 1.8~2.2,确定为没有 mRNA 降解。

1.3.2 PCR 引物设计 根据 GenBank 中公布的 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因序列,采用 Primer premier V5.0 和 Oligo 5.0 软件设计引物,由上海生工生物工程服务有限公司合成。引物序列见表 1。

1.3.3 逆转录和 PCR 扩增 使用 Eppendorf AG 22331 Hamburg 扩增仪。Promega 试剂盒进行逆转录(具体步骤参照试剂盒说明书),扩增 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因,以 β-actin 作为内参照,逆转录体系反应条件:70℃ 10 min、42℃ 60 min、95℃ 5

min、4℃ 5 min。以逆转录产物为模板,利用 40 μl 体系进行 PCR 扩增。CD99 反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 45 s、58℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 1 min,22 次循环,末次循环后 72℃ 再延伸 10 min;FKBP5 反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 45 s、60℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 1 min,25 次循环,末次循环后 72℃ 再延伸 10 min;FLJ13576 反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 45 s、54℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 1 min,25 次循环,末次循环后 72℃ 再延伸 10 min。反应完毕后取反应产物 6 μl 加样,1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min,溴化乙啶染色,观察结果。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Sequences of PCR Primers

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length (bp)
CD99		
S	GCC CAG CAA CAA GCA AAG CAC AT	479
Anti-S	CCC AAC CAC CCT AGT TCC TCC G	
FKBP5		
S	GGG AAT GGT GAG GAA ACG CCG ATG A	243
Anti-S	TTT AGG GAG ACT GCC AGC CGA GCC	
FLJ13576		
S	TTG TTC CCG GCT TAT TAT CGT	236
Anti-S	CTG CTT TCA CTG TGC GTC CCT	
β-actin		
S	CTC GCC TTT GCC GAT CC	625
Anti-S	GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC	

1.4 统计学处理 统计学处理采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾透明细胞癌组织中各基因 RT-PCR 表达结果 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因在 ccRCC 及癌旁组织中的表达情况见图 1。CD99、FKBP5、FLJ13576 在原发性 ccRCC 组织中表达上调分别为 72%、60% 和 48%, 而下调为 28%、24% 和 16%, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.2 ccRCC 及癌旁组织中相关基因表达的具体统计 如表 2 所示, 25 例病例中有 24 例(96%) 可检测到 3 种基因中的 1 种或 1 种以上的基因在癌组织中表达上调, 而在癌旁组织中下调; 13 例(52%) 可检测到 3 种基因中的 2 种或 2 种以上的基因在癌组织中表达上调, 而在癌旁组织中下调; 6 例(24%) 可检测到 3 种基因在癌组织中均表达上调, 而在癌旁组织中下调。

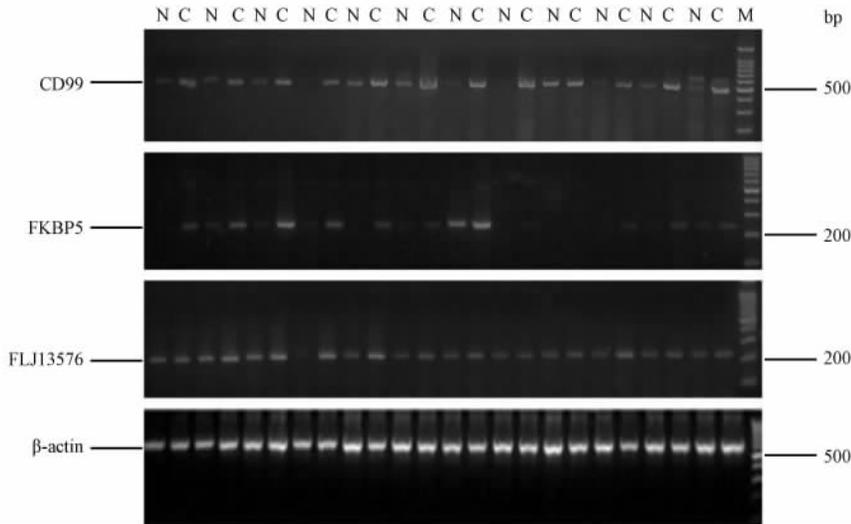


图1 肾细胞癌及癌旁组织中 CD99、FKBP5 和 FLJ13576 的 RT-PCR 结果
 Fig 1 Expression levels of CD99, FKBP5, and FLJ13576 in primary clear cell carcinoma and the corresponding adjacent renal tissues

N: Adjacent tissues; C: ccRCC; M: Marker

表2 3条基因在25例肾细胞癌及癌旁组织中的表达结果

Tab 2 Gene expression of CD99, FKBP5, and FLJ13576 in primary clear cell carcinoma and the corresponding adjacent renal tissues

Gene	P/N=1	P/N=0	P/N=-1	P
CD99	18	7	0	0.002
FKBP5	15	6	4	0.01
FLJ13576	12	4	9	0.005

P/N=1: The level of gene expression in cancer tissues has higher than in the corresponding adjacent renal tissues; P/N=0: The level of gene expression in cancer tissues and the corresponding adjacent renal tissues has no difference; P/N=-1: The level of gene expression in cancer tissues is lower than in the corresponding adjacent renal tissues

3 讨论

我们通过基因芯片技术,利用本实验室前期所作的原位肾透明细胞癌与转移性癌的3组基因芯片,筛选出在转移癌中表达上调3倍以上的人类肿瘤相关基因 CD99、FKBP5、FLJ13576,推断这3条基因可能与肾细胞癌的发生、发展有关。为验证该推断的可靠性,本研究通过半定量 RT-PCR 实验,对 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因在 25 例肾细胞癌组织及癌旁组织中的表达水平进行检测,结果显示,这3条基因在肾细胞癌组织及癌旁组织中的表达水平具有显著差异,再次提示 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因可能与肾细胞癌的发生、发展密切相关。

CD99 蛋白是一个相对分子质量为 32 000 的糖基化跨膜蛋白,在大多数细胞表面表达。编码 CD99

的 mic2 基因位于 X 和 Y 染色体短臂假染色体区 (PAR) 的 Xp22132-pter 和 Yp11-pter 上。CD99 蛋白主要参与细胞间黏附、泡状运输、调节细胞骨架、活化 T 细胞及调节细胞凋亡等^[4-5]。检测基因 CD 99对 Ewing 肉瘤、原发性神经外胚瘤、淋巴母细胞瘤、横纹肌肉瘤和软骨肉瘤等间叶组织肿瘤的诊断有重要意义^[6-8]。CD99 最初应用于 Ewing 肉瘤/PNET 的诊断,被认为是一种相对特异性标志物^[9]。CD99 在肾细胞癌中表达的研究,国内尚未见文献报道。本实验发现在癌组织中 CD99 上调 18 例 (72%),下调 7 例 (28%),且差异显著。由于在多种肿瘤中 CD99 的表达都有较高的阳性率,故其可能无一定的特异性,因此,我们认为将 CD99 联合其他分子标志物应用于肾细胞癌的诊断,可能会明显提高诊断的敏感性和特异性。

FLJ13576 亦称为 TMEM168(跨膜蛋白 168)或 DKFZp564c012,位于 7 号染色体 (7q31,32),其功能等方面的研究未见有关报道。本实验发现在癌组织中 FLJ13576 上调 12 例 (48%),下调 4 例 (16%),且差异显著,说明 FLJ13576 对 ccRCC 有一定的敏感性,有望成为 ccRCC 诊断的敏感分子标志物之一,值得进一步研究。不足的是在本实验中 FLJ13576 上调虽明显高于下调,但对样本总体来说还不够高,可能与样本量偏少、实验中未能进行定量 PCR 测定使结果的判断不够精确等条件有关,尚有待于扩大样本量、改进实验条件以进一步研究。

FKBP 是高度保守的伴侣分子蛋白家族,从原

核生物到真核生物体内都有 FKBP 表达,而且不同物种之间 FKBP 的同源性很高,提示 FKBP 在物种进化过程中起着相当重要的作用。FK506 结合蛋白(FKBP5)属于亲免疫因子家族,因其具有结合免疫抑制药物的能力,故也被称为肽酰-脯氨酰顺反异构酶,在免疫调节、蛋白质折叠和运输中起着十分重要的作用。Jiang 等^[10]在一项对神经胶质瘤的研究中发现,FKBP5 与 NF- κ B 通路激活有关,FKBP5 过度表达时 NF- κ B 亦被加强,FKBP5 的表达被抑制后神经胶质瘤细胞的生长也被抑制,FKBP5 的过度表达阻碍了细胞对雷帕霉素治疗的反应。FKBP5 通过调节 NF- κ B 信号转导系统在神经胶质瘤细胞的发生和抗药性方面起重要作用。Mukaide 等^[11]报道,FKBP5 能抑制结肠腺癌的增殖,可能与糖皮质激素受体功能抑制有关。但有关 FKBP5 在肾细胞癌方面的研究,国内尚未见文献报道。本实验发现在癌组织中 FKBP5 上调 15 例(60%),下调 6 例(24%),且差异显著,我们认为 FKBP5 基因可作为 ccRCC 诊断的敏感分子标志物。近年来随着对 RCC 分子生物学研究的深入,认识到其发生发展与 VHL 基因失活、HIF 异常上调、血管促进因子表达增加(如 GLUT1、VEGF、PDGF、EPO、TGF- α 和碳酸脱水酶 IX 等)、相关信号转导通路激活(如 Ras/Raf/MEK/Erk 及 PI₃K/Akt/mTOR 信号转导通路)等多种因素导致的肿瘤细胞增殖、肿瘤血管生成有关,以上多种关键因子的高表达与肾癌特别是肾透明细胞癌的预后有密切关系,这已成为肾细胞癌分子靶向治疗的基础和作用靶点^[12-14]。既然 FKBP5 的表达和雷帕霉素治疗的反应之间有一定的联系,而雷帕霉素衍生物又是通过阻断 Akt/mTOR 信号转导通路治疗 RCC 的分子靶向药物^[15],我们推测 FKBP5 在 Akt/mTOR 信号转导通路中起着一定的作用,值得进一步研究。

本研究通过原位肾透明细胞癌与转移性癌的 3 组基因芯片筛选出的在转移癌中表达呈显著上调的人类肿瘤相关基因 CD99、FKBP5、FLJ13576,应用 RT-PCR 技术,显示了 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因在肾细胞癌组织中的表达水平比在正常组织的表达水平显著上调,尤其结合 3 种基因的表达 96% 的肾透明细胞癌组织中可见 1 种或 1 种以上表达上调;52% 的肾透明细胞癌组织中可见 2 种或 2 种以上表达上调,从而提示 CD99、FKBP5、FLJ13576 基因可能与肾细胞癌发生、发展有关;3 种基因的联合检测有助于肾透明细胞癌的早期诊断,但是否能成为肾细胞癌诊断的特异性分子标志物,尚有待进一步研究。

步研究。

[参考文献]

- [1] Liou L S, Shi T, Duan Z H, Sadhukhan P, Der S D, Novick A A, et al. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma[J]. BMC Urol, 2004, 4: 9.
- [2] Garcia J A, Rini B I. Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57: 112-125.
- [3] Tan X, Zhai Y, Chang W, Hou J, He S, Lin L, et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2008, 123: 1080-1088.
- [4] Kim S H, Shin Y K, Lee I S, Bae Y M, Sohn H W, Suh Y H, et al. Viral latent membrane protein 1 (LMP-1)-induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype[J]. Blood, 2000, 95: 294-300.
- [5] Kim S H, Choi E Y, Shin Y K, Kim T J, Chung D H, Chang S I, et al. Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (Mic2)[J]. Blood, 1998, 92: 4287-4295.
- [6] Granter S R, Renshaw A A, Fletcher C D, Bhan A K, Rosenberg A E. CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma[J]. Hum Pathol, 1996, 27: 1273-1276.
- [7] Choi Y L, Chi J G, Suh Y L. CD99 immunoreactivity in ependymoma[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001, 9: 125-129.
- [8] Scotlandi K, Perdichizzi S, Bernard G, Nicoletti G, Nanni P, Lollini P L, et al. Targeting CD99 in association with doxorubicin; an effective combined treatment for Ewing's sarcoma[J]. Eur J Cancer, 2006, 42: 91-96.
- [9] 郭东辉,范敬东,师宜荃,王萍. CD99 在卵巢性索-间质肿瘤中的表达[J]. 中华病理学杂志, 2002, 31: 257-258.
- [10] Jiang W, Cazacu S, Xiang C, Zenklusen J C, Fine H A, Berens M, et al. FK506 binding protein mediates glioma cell growth and sensitivity to rapamycin treatment by regulating NF-kappaB signaling pathway[J]. Neoplasia, 2008, 10: 235-243.
- [11] Mukaide H, Adachi Y, Taketani S, Iwasaki M, Koike-Kiriyama N, Shigematsu A, et al. FKBP51 expressed by both normal epithelial cells and adenocarcinoma of colon suppresses proliferation of colorectal adenocarcinoma[J]. Cancer Invest, 2008, 26: 385-390.
- [12] Garcia J A, Rini B I. Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma[J]. CA Cancer J Clin. 2007, 57: 112-125.
- [13] Motzer R J, Bolger G B, Boston B, Carducci M A, Fishman M, Hancock S L, et al. Kidney cancer. Clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2006, 4: 1072-1081.
- [14] Cohen H T, McGovern F J. Renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2005, 353: 2477-2490.
- [15] Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2007, 356: 2271-2281.

[本文编辑] 贾泽军