

文章编号 1006-8147(2015)05-0401-03

论著

核糖体蛋白 L37 在前列腺癌中的表达及临床意义

盛 斌, 张 蒙, 马鹏德, 杨 阔, 徐 勇, 王玉琢

(天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

摘要 目的: 研究核糖体蛋白 L37(RPL37)在前列腺癌中的表达及其临床意义。方法: 应用 real-time qPCR(RT-qPCR)和 Western blot 检测 64 例前列腺癌组织及癌旁组织中 RPL37 mRNA 和蛋白的表达情况, 分析其与前列腺癌患者临床病理特征及生存状况之间的关系。结果: RT-qPCR 和 Western blot 结果表明, 前列腺癌组织中 RPL37 mRNA 和蛋白表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$); RPL37 mRNA 的表达增高与患者血清中的前列腺特异性抗原(PSA)水平增加、高 Gleason 评分及肿瘤的临床分期有关($P<0.05$), 与患者的年龄、淋巴结转移、精囊侵犯及手术切缘无关($P>0.05$)。生存分析表明, 前列腺癌患者中 RPL37 mRNA 高表达组的总生存期显著低于低表达组($P=0.006$)。结论: RPL37 mRNA 的表达增高与前列腺癌的发生、发展相关; RPL37 可以初步判断前列腺癌患者的预后。

关键词 RPL37; 前列腺癌; RT-qPCR; 预后

中图分类号 R737.25

文献标志码 A

Expression of ribosomal protein L37 in prostate cancer and its clinical significance

SHENG Bin, ZHANG Meng, MA Peng-de, YANG Kuo, XU Yong, WANG Yu-zhuo

(Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To explore the expression of ribosomal protein L37 in prostate cancer and its clinical significance. **Methods:** Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to measure and compare the levels of the expression of ribosomal protein L37 mRNA and protein in 64 specimens from prostate cancer tissues and surrounding non-tumor tissues. The relationship between RPL37 mRNA expression and clinicopathological factors were statistically analyzed. **Results:** RPL37 mRNA and protein expression were expressed at higher levels in prostate cancer tissues compared with non-tumor tissues ($P<0.05$). The enhanced expression of RPL37 mRNA was significantly associated with the increased level of PSA, higher Gleason score and clinical stage, but not correlated with age, lymph node metastasis, seminal vesicle invasion and surgical margin status. Survival analysis showed that prostate cancer patients with high expression of RPL37 had shorter survival time than those with low RPL37 expression. **Conclusion:** The elevated expression of RPL37 may be involved in the development of prostate cancer and related to poor survival of prostate cancer patients.

Key words RPL37; prostate cancer; RT-qPCR; prognosis

前列腺癌是欧美国家中老年男性最常见的恶性肿瘤之一^[1]。近年来,我国前列腺癌发病率也在不断增加^[2],严重威胁男性健康。探讨前列腺癌的发病机制,将为前列腺癌的临床治疗提供新的思路。核糖体蛋白 L37(RPL37)是核糖体蛋白大亚基的组成成分之一,位于 5p13,编码 97 个氨基酸,相对分子质量为 11 070,含有多个丝/苏氨酸磷酸化位点和一个锌指结构区域^[3]。消减杂交技术研究发现,RPL37 在结肠癌组织和前列腺癌组织中表达增高,这提示 RPL37 可能参与癌症的发生发展^[4-5]。因此,本研究就 RPL37 在前列腺癌组织中的表达进一步分析,并探讨其与临床特征、预后之间的关系。

1 材料与方法

1.1 病例与标本 收集天津医科大学第二医院泌尿外科 2010 年 6 月-2012 年 8 月手术切除的 64 例前列腺癌组织,以及距离肿瘤边缘 2 cm 以上的癌旁正常前列腺组织,组织标本由我院病理科经 HE 染色明确诊断。患者年龄 43~75 岁,中位年龄 62 岁,其中<62 岁者 26 例,≥62 岁者 38 例;外周血 PSA<10 ng/mL 者 25 例,≥10 ng/mL 者 39 例;Gleason 评分<7 者 25 例,等于 7 者 19 例,>7 者 20 例;临床分期 T1 者 35 例,T2 和 T3 者 29 例;淋巴结转移阴性者 40 例,阳性者 24 例;精囊侵袭阴性者 43 例,阳性者 21 例;手术切缘阴性者 33 例,阳性者 31 例。所有患者术前均未行放、化疗以及内分泌治疗,标本术后立即取材,并放于-80℃保存,供 RT-qPCR 和 Western blot 检测。

1.2 试剂 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,反

基金项目 天津市应用基础及前沿技术研究计划(12JCYBJC31400)
作者简介 盛斌(1989-),男,硕士在读,研究方向:泌尿外科;通信作者:王玉琢,E-mail:ywang1407@126.com。

转录试剂盒 (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自 Thermo 公司, RT-qPCR 试剂盒 (Fast Start SYBR Green Master) 购自 Roche 公司, 引物由苏州金唯智公司合成。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝公司, 所需抗体均购自 Affinity Bioscience 公司, ECL 发光液购自 Advansta 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取及逆转录 将组织标本用 Trizol 法提取总 RNA, 以紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 各组吸光度 A260/A280 均接近 2.0, RNA 经甲醛变形凝胶电泳证实为完整。采用 Thermo 公司 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒, 在 20 μ L 反应体系中将 RNA 逆转录成 cDNA, 产物置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 RT-qPCR 实时定量 PCR 反应在 7900HT Fast Real-Time PCR System 上操作, 采用 Roche 公司 Fast Start SYBR Green Master 试剂, 引物序列见表 1, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。基因的相对表达水平通过相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 进行分析。每次实验重复 3 次。

表 1 引物序列及扩增长度

Tab 1 Primer sequence and amplicon size

引物	引物序列	长度/bp
RPL37	上游引物 5'-TCGCAATAAGACGCACACGTT-3'	294
	下游引物 5'-CTCATTCGACCAGTTCCGGT-3'	
GAPDH	上游引物 5'-GGATTGCTCGTATTGGG-3'	205
	下游引物 5'-GGAAGATGCTGATGGGATT-3'	

1.3.3 Western blot 提取前列腺癌组织和正常癌旁组织总蛋白应用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 按照每孔 50 μ g 上样量进行 SDS-PAGE 电泳, 冰浴电转至硝酸纤维素膜上, 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜 (RPL37 1:1 000, GAPDH 1:3 000), 室温下二抗孵育 1 h (羊抗兔 1:5 000), TBST 洗膜 3 次, ECL 发光系统曝光检测。

1.4 统计学处理 不同组间的 RPL37 mRNA 表达水平采用 t 检验分析, 结果通过 $\bar{x} \pm s$ 显示; RPL37 mRNA 表达和临床指标通过秩和检验分析; 生存分析用 Kaplan-Meier 曲线估计, Log-rank 检验。所有分析均借助 SPSS20.0 统计软件, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 RPL37 mRNA 和蛋白在前列腺癌中的表达

RT-qPCR 和 Western blot 检测表明, 前列腺癌组织中 RPL37 mRNA 和蛋白的表达明显高于癌旁组

织 (图 1, $P = 0.037$)。

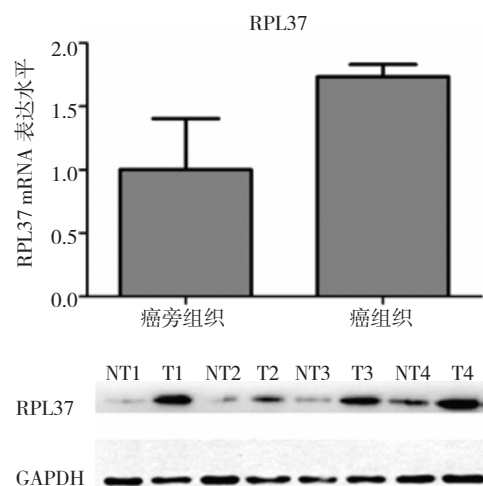


图 1 RPL37 mRNA 和蛋白在前列腺癌组织和正常癌旁组织中的表达

Fig 1 The expression of RPL37 mRNA and protein in prostate cancer tissues and noncancerous tissues

2.2 RPL37 mRNA 表达与前列腺癌患者临床指标的关系 根据 RPL37 mRNA 的中位表达水平, 将前列腺癌患者分为两组, 其表达水平高于中位水平为高表达组 (34 例), 低于中位水平为低表达组 (30 例)。临床指标分析显示, RPL37 mRNA 的高表达与前列腺癌患者术前前列腺特异性抗原 (PSA) 水平升高、Gleason 评分及临床分期增加有关, 与其他临床病理特征如年龄、淋巴结转移、精囊侵袭及手术切缘无相关性 (表 2)。

表 2 前列腺癌组织中 RPL37 mRNA 表达水平与临床指标的关系 (n)

Tab 2 Relation between RPL37 expression and clinical characteristics in prostate cancer tissues (n)

临床指标	Group	RPL37 mRNA 表达			P
		Low	High	Total	
年龄/岁	<62	14	12	26	0.355
	≥ 62	16	22	38	
术前 PSA	<10	16	9	25	0.028
	≥ 10	14	25	39	
Gleason 评分	<7	16	9	25	0.034
	7	9	10	19	
	>7	5	15	20	
临床分期	T1	21	14	35	0.021
	T2-T3	9	20	29	
淋巴结转移	阴性	21	19	40	0.244
	阳性	9	15	24	
精囊侵袭	阴性	22	21	43	0.325
	阳性	8	13	21	
手术切缘	阴性	17	16	33	0.443
	阳性	13	18	31	

2.3 RPL37 mRNA 表达与前列腺癌患者生存时间的关系 RPL37 mRNA 高表达患者中术后 5 年内死亡 47.1%(16 例),生存 5 年以上者 52.9%(18 例);低表达患者中术后 5 年内死亡 20.0%(6 例),生存 5 年以上者 80.0%(24 例),各组间比较具有显著性差异($P=0.006$ Log rank 检验)(图 2)。

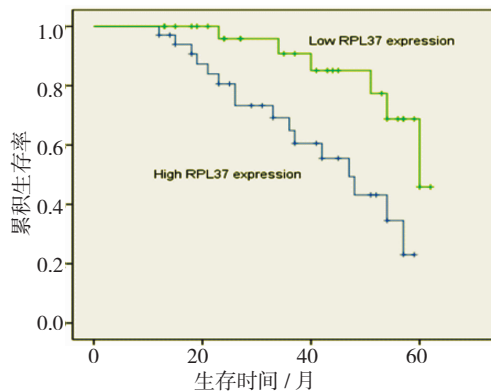


图 2 前列腺癌患者中 RPL37 mRNA 表达与生存时间分析

Fig 2 Association of RPL37 mRNA expression with cum survival of prostate cancer patients

3 讨论

核糖体蛋白是核糖体的重要组成部分,在细胞内蛋白质的合成中发挥重要作用。近年来,越来越多的证据表明,核糖体蛋白还具有核糖体外功能,参与复制、转录、DNA 修复、翻译调控及正常细胞的恶性转化等^[6]。很多研究发现,肿瘤组织中的核糖体蛋白表达出现改变^[7-11]。Vaarala 等^[4]用消减杂交技术发现,RPL37 在前列腺癌细胞 LNCaP 中的表达水平是正常前列腺细胞 PrEC 的 3.4 倍,通过原位杂交技术进一步证实 RPL37 在前列腺癌组织中表达增加。因此 RPL37 在前列腺癌的发生发展中可能发挥重要作用。

很多研究报道了关于核糖体蛋白基因的过表达在肿瘤中的作用机制,但 RPL37 基因高表达在前列腺癌的作用机制目前还不清楚。通过文献复习发现,核糖体蛋白异常表达可能通过以下机制促进肿瘤的发生发展。首先,Sturgill 等证实核糖体 S6 蛋白激酶(RSK)可以激活丝/苏氨酸磷酸化位点使 S6 蛋白发生磷酸化,从而促进 mRNA 的翻译,在调节细胞生长和增殖过程中起重要作用^[12];核糖体蛋白的锌指结构能够与核酸(DNA 和 RNA)结合,这种结合可能使核糖体蛋白干扰细胞内转录和翻译过程,从而导致细胞恶性转变^[13]。而 Barnard 等^[3]研究发现 RPL37 同时含有多个丝/苏氨酸磷酸化位点和一个锌指结构区域。因此,RPL37 也可能通过上述作用机制促进肿瘤的发生。其次,大约 50%的人类肿瘤

中,p53 活性丧失或突变^[14]。Loging 等^[15]研究表明,R248W p53 突变的结肠癌细胞和何杰金氏淋巴瘤的细胞系中 RPL37 mRNA 的表达水平增高,这些结果显示 p53 发生突变时,核糖体蛋白基因表达增高可能是在人类肿瘤中过表达的一种机制。最后,核糖体蛋白基因过表达时具有抗凋亡作用。研究发现,L7、S11 及 L35a 高表达时均导致了肿瘤细胞凋亡抑制的发生^[16-17]。在结肠癌细胞系中发现,核糖体蛋白基因的过表达抑制了肿瘤细胞的凋亡,且 RPL37 的表达在结肠癌组织中明显增高,因此,RPL37 的高表达可能通过抗凋亡作用导致结肠癌的发生。

本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测 RPL37 mRNA 和蛋白在前列腺癌组织以及癌旁组织中的表达,结果表明,RPL37 mRNA 及蛋白在前列腺癌组织中的表达明显增高,且与其癌旁组织相比,差异具有统计学意义,此结果与前人研究相符。本研究同时对 RPL37 mRNA 的表达量与前列腺癌临床病理特征进行相关性分析,结果显示随着 PSA 水平、临床分期和 Gleason 评分的增加,RPL37 mRNA 的表达量随之增加,差异均具有显著性,但是与患者年龄、有无淋巴结转移、精囊侵袭及手术切缘无相关性。随后笔者对 RPL37 mRNA 的表达情况与患者的 5 年生存率进行分析发现,高表达 RPL37 mRNA 的患者的 5 年生存时间明显比低表达组低,说明 RPL37 基因的高表达降低了前列腺癌患者术后的生存时间。

总之,RPL37 在前列腺癌中高表达,与前列腺癌的临床特征具有一定的相关性,且在前列腺癌患者的预后预测中具有潜在的指导价值。由于病例数有限,可能会影响分析的可靠性,有待于积累更多的病例再行进一步的分析。有关 RPL37 在前列腺癌发生发展中的作用机制目前还不明确,需要进一步后续实验进行深入研究。

参考文献:

- [1] Siegel R, Ma J M, Zou Z H, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014,64(1):9
- [2] Ito K. Prostate cancer in Asian men[J]. Nat Rev Urol, 2014,11(4): 197
- [3] Barnard G F, Staniunas R J, Puder M, et al. Human ribosomal protein L37 has motifs predicting serine/threonine phosphorylation and a zinc-finger domain[J]. Biochim Biophys Acta, 1994,1218(3): 425
- [4] Vaarala M H, Porvari K S, Kyllönen A P, et al. Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-

(下转第 417 页)

- [15] 高维杰,王彦,孙玫,等. 持续气道正压通气治疗阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的依从性调查[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011,34(1):68
- [16] Weaver T E. Adherence to positive airway pressure therapy[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2006, 12(6): 409
- [17] Olsen S, Smith S, Oei T P. Adherence to continuous positive airway pressure therapy in obstructive sleep apnoea sufferers: a theoretical approach to treatment adherence and intervention[J]. *Clin Psychol Rev*, 2008, 28(8): 1355
- [18] Holley A B, Lettieri C J, Shah A A. Efficacy of an adjustable oral appliance and comparison with continuous positive airway pressure for the treatment of obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Chest*, 2011, 140(6): 1511
- [19] Randerath W J, Heise M, Hinz R, et al. An individually adjustable oral appliance vs continuous positive airway pressure in mild-to-moderate obstructive sleep apnea syndrome[J]. *Chest*, 2002, 122(2): 569
- [20] Lam B, Sam K, Mok W Y, et al. Randomised study of three non-surgical treatments in mild to moderate obstructive sleep apnoea[J]. *Thorax*, 2007, 62(4): 354
- [21] Pecotic R, Dodig I P, Valic M, et al. The evaluation of the Croatian version of the Epworth sleepiness scale and STOP questionnaire as screening tools for obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Sleep Breath*, 2012, 16(3): 793
- [22] Guimarães C, Martins M V, Vaz Rodrigues L, et al. Epworth sleepiness scale in obstructive sleep apnea syndrome --an underestimated subjective scale[J]. *Rev Port Pneumol*, 2012, 18(6): 267
- [23] Cai S J, Chen R, Zhang Y L, et al. Correlation of epworth sleepiness scale with multiple sleep latency test and its diagnostic accuracy in assessing excessive daytime sleepiness in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(17): 3245

(2015-01-24 收稿)

.....

(上接第 403 页)

- cancer tissue samples[J]. *Int J Cancer*, 1998,78(1):27
- [5] Barnard G F, Staniunas R J, Mori M, et al. Gastric and hepatocellular carcinomas do not overexpress the same ribosomal protein messenger RNAs as colonic carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1993,53(17):4048
- [6] Wool I G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996,21(5):164
- [7] An S J, Chen J K, Liu L L, et al. Over-expressed genes detected by suppression subtractive hybridization in carcinoma derived from transformed 16HBE cells induced by BPDE[J]. *Biomed Environ Sci*, 2005,18(5):302
- [8] Ohl F, Jung M, Xu C, et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2005,83(12):1014
- [9] Wang M, Hu Y, Stearns M E. RPS2: a novel therapeutic target in prostate cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009,28:6
- [10] Huang C J, Chien C C, Yang S H, et al. Faecal ribosomal protein L19 is a genetic prognostic factor for survival in colorectal cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2008,12(5B):1936
- [11] Karan D, Kelly D L, Rizzino A, et al. Expression profile of differentially -regulated genes during progression of androgen -independent growth in human prostate cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2002,23(6):967
- [12] Sturgill T W, Wu J. Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991,1092(3):350
- [13] Dresios J, Chan Y L, Wool I G. The role of the zinc finger motif and of the residues at the amino terminus in the function of yeast ribosomal protein YL37a[J]. *J Mol Biol*, 2002,316(3):475
- [14] Kirsch D G, Kastan M B. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis[J]. *J Clin Oncol*, 1998,16(9):3158
- [15] Loging W T, Reisman D. Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999,8(11):1011
- [16] Kasai H, Nadano D, Hidaka E, et al. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum[J]. *J Histochem Cytochem*, 2003,51(5):567
- [17] Lopez C D, Martinovsky G, Naumovski L. Inhibition of cell death by ribosomal protein L35a[J]. *Cancer Lett*, 2002,180(2):195

(2015-03-30 收稿)