

• 论 著 •

Tim-3 及其配体 Gal-9 在宫颈鳞癌患者中的表达及意义^{*}

冯秀兰, 古杰超

(广东省江门市人民医院检验科 529000)

摘要:目的 探讨 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(Tim-3)及其配体半乳凝素 9(Gal-9)在宫颈鳞癌患者中的表达及意义。方法 收集 2012 年 6 月至 2015 年 10 月在江门市人民医院就诊的 25 例上皮癌样病变(CIN)组、56 例宫颈鳞癌(SCC)组的组织和血清样本,其中 SCC 组按癌组织分化程度又分为低分化癌(PSCC)组 17 例,中分化癌(MSCC)组 18 例,高分化癌(WSCC)组 21 例,并收集同期 25 例健康妇女作为对照组。采用蛋白质免疫印迹(Western blot)技术、RT-PCR 方法检测不同组织样本中 Tim-3 及 Gal-9 的表达,采用 ELISA 法检测血清中 Gal-9 的表达。结果 采用 Western blot、RT-PCR 方法检测 Tim-3 和 Gal-9 的表达显示 CIN 组高于对照组,SCC 组高于 CIN 组,差异有统计学意义($P<0.05$),其 mRNA 表达随病理分级的增加而增加,具体表现为 WSCC 组>MSCC 组>PSCC 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。ELISA 结果显示 Gal-9 在 SCC 血清中高于 CIN 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。宫颈鳞癌分化越高, Tim-3 和 Gal-9 的表达越强,与病理分级呈正相关。结论 Tim-3 及其配体 Gal-9 的表达与宫颈鳞癌病理分级呈正相关,可作为宫颈鳞癌临床诊断及预后的有意义指标。

关键词:宫颈鳞癌; 病理分级; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3; 半乳凝素 9

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0297-03

Expression and significance of Tim-3 and its ligand Gal-9 in patients with cervical squamous cell carcinoma^{*}

FENG Xiulan, GU Jiechao

(Department of Clinical Laboratory, Jiangmen Municipal People's Hospital, Jiangmen, Guangdong 529000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of T cell immunoglobulin mucin 3(Tim-3) and its ligand galectin-9(Gal-9) in the patients with cervical squamous cell carcinoma and its significance. **Methods** The samples of tissues and serum in 25 cases of cervical intraepithelial neoplasia(CIN group) and 56 cases of cervical squamous cell carcinoma(SCC group) in our hospital from June 2012 to October 2015 were collected. The SCC group was divided into the poorly differentiated squamous cell carcinoma group (PSCC group, 17 cases), moderately differentiated squamous cell carcinoma group(MSCC group, 18 cases) and well differentiated squamous cell carcinoma group (WSCC group 21, cases) according to the cancer tissue differentiation degree. And 25 healthy women were collected as the control group at the same time. The expressions of Tim-3 and Gal-9 in different tissue samples were detected by Western blot, RT-PCR and the expression of serum Gal-9 was detected by ELISA. **Results** Tim-3 and Gal-9 expressions detected by Western blot and RT-PCR in the CIN group were higher than those in the control group, the SCC group was higher than the CIN group, the differences were statistically significant($P<0.05$), their mRNA expressions were increased with the pathological grade increase, its specific performance was the WSCC group>MSCC group>PSCC group, the differences were statistically significant($P<0.05$). The ELISA results showed that serum Gal-9 level in SCC group was higher than that in the CIN group, the difference was statistically significant($P<0.05$). The higher the differentiation of cervical cancer, the stronger the Tim-3 and Gal-9 expression, which was positively correlated with the pathological grade. **Conclusion** The expression of Tim-3 and its ligand Gal-9 has positive correlation with the pathological grade of cervical squamous cell carcinoma. Tim-3 and Gal-9 can serve as the meaningful indicators of clinical diagnosis and prognosis of cervical squamous cell carcinoma.

Key words: cervical squamous cell carcinoma; pathological grade; T cell immunoglobulin mucin 3; galectin-9

宫颈癌是全球妇女中最常见的恶性肿瘤之一,据世界卫生组织(WHO)报道,世界每年新发宫颈癌患者约为 50 万,其中我国新发病例 15 万,约占全球 1/3。组织学以宫颈鳞癌为主,占 90%~95%,高发年龄为 50~55 岁,发病趋势年轻化,因此发现和研究新的检测指标有助于宫颈鳞癌的诊断和预后^[1]。近年来, T 细胞免疫球蛋白黏蛋白(Tim)家族作为一类参与调节机体免疫的关键分子引起大家的重视,其中 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(Tim-3)是一种 I 型膜表面蛋白分子,在 Th1 型辅助细胞中表达,其分泌到血清中很少,而半乳凝素 9(Gal-9)作为其特异性配体,可以分泌至血清中,两者通过 Tim-3-Gal-9

途径产生抑制信号,诱导 Th1 细胞死亡,负调节 Th1 免疫应答^[2-3]。经研究显示, Tim 家族中的 Tim-3 在胃癌、肝癌、前列腺癌等多种癌组织中呈强表达阳性^[4-6]。本文探讨 Tim-3 及其配体 Gal-9 在宫颈鳞癌患者中的表达及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集江门市人民医院 2012 年 6 月至 2015 年 10 月经临床病理确诊的 56 例原发宫颈鳞癌(SCC)组和 25 例上皮癌样病变(CIN)组的组织和血清样本, CIN 组平均年龄为(41.5±2.3)岁, SCC 组平均年龄为(42.0±2.5)岁。依据 2003 年 WHO 宫颈癌组织学分类, SCC 组又分为低分化癌

^{*} 基金项目:广东省医学科研基金课题(A2013757)。

作者简介:冯秀兰,女,主管技师,主要从事临床免疫检验研究。

(PSCC)组 17 例,平均年龄为(40.0±2.0)岁;中分化癌(MSCC)组 18 例,平均年龄为(41.0±2.5)岁;高分化癌(WSCC)组 21 例,平均年龄为(43.0±3.0)岁,同时收集同期 25 例健康妇女血清样本作为对照组,平均年龄为(41.0±3.2)岁。各组患者排除其他妇科疾病和器官性肿瘤,且术前均未经过放化疗,年龄间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质免疫印迹(Western blot)技术检测 采用 Western blot 技术检测 CIN 组、PSCC 组、MSCC 组、WSCC 组中 Tim-3 及 Gal-9 的表达。分别取各组的组织样本 100 mg,采用膜蛋白抽提试剂(购自 Therrmo 公司)抽提蛋白,通过二喹啉甲酸法蛋白定量试剂盒(购自 Therrmo 公司)进行定量,将定量蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,以 100 mA 恒流 4℃转膜 3 h,将重组蛋白转移至硝酸纤维素膜上。转移后的膜在室温下封闭 1 h,用含有 0.75%吐温-20 的磷酸盐缓冲液洗膜 6 次后,将膜转至含有辣根过氧化物酶(HRP)标记兔 IgG 的稀释液中,37℃孵育 1 h,洗膜后进行显色反应。

1.2.2 RT-PCR 检测 采用 RT-PCR 检测 CIN 组、PSCC 组、MSCC 组、WSCC 组的组织样本中 Tim-3 及 Gal-9 的表达。取各组的组织样本 $10^6\sim10^7$ 的细胞,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗细胞,去 PBS 后加 1 mL 的 RNA 抽提试剂采用酸性酚抽提法(TRIZOL)抽提组织样本总 RNA,经一步法反转录试剂盒(购自 Takara 公司)进行反转录 PCR 后,采用 SYBRw Green PCR 试剂盒,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,以 CIN 组作为参照物,循环参数设定为 95℃ 15 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s,72℃ 35 s,连续 40 个循环。每份标本重复 3 次,所有的 RT-PCR 产物均经熔解曲线分析以分辨目的产物与非特异产物及引物二聚体,再经 1.5%琼脂糖凝胶电泳证实。用 Michael 等^[7]推导的数学公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算目的基因的相对表达量。其中 RT-PCR 引物序列如下。Tim-3 正义链:5'-CAG ATA CTG GCT AAA TGG GGA T-3';反义链:5'-ACC TTG GCT GGT TTG ATG AC-3'。Gal-9 正义链:5'-AAT GGC CTT CAG CGG TTC CCA G-3';反义链:5'-CTA TGT CTG CAC ATG GGT CAG-3'。GAPDH 正义链:5'-TGA CCA CAG TCC ATG CCA TC-3';反义链:5'-GAC GGA CAC ATT GGG GGT AG-3'。

1.2.3 ELISA 技术检测 取对照组、CIN 组、PSCC 组、MSCC 组、WSCC 组外周血进行 30 min 2 000 r/min 离心,取上清采用 ELISA 试剂盒(购自 R&D 公司)按操作说明书进行 Gal-9 的表达检测。

1.3 统计学处理 通过 SPSS17.0 软件,采用 t 检验、秩和检验计算 Tim-3 及其配体 Gal-9 在组间表达差异性分析。采用 Spearman 检验分别计算 Tim-3 以及 Gal-9 与不同病理分级的宫颈鳞癌之间相关性。计量资料表达用 $\bar{x}\pm s$,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Western blot 检测结果 Western blot 的结果显示,在 SCC 组中 Tim-3 和 Gal-9 的表达均高于 CIN 组,并且其表达均随着病理分级的改变而改变,具体表现见图 1~2。

2.2 RT-PCR 检测结果 RT-PCR 结果显示,CIN 组和 SCC 组的组织样本中 Tim-3 和 Gal-9 的表达均比对照组高,差异有

统计学意义($P<0.05$);SCC 组的组织样本中 Tim-3 和 Gal-9 的表达比 CIN 组高,差异有统计学意义($P<0.05$);SCC 组的组织样本中 Tim-3 和 Gal-9 的表达随着病理分级的改变而改变,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3~4。Spearman 秩相关系数(r)分别是 0.738 和 0.671,说明病理分级与 Tim-3 和 Gal-9 基因表达呈正相关。

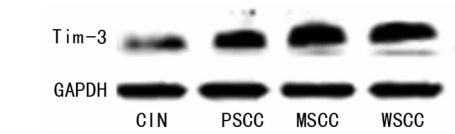


图 1 Tim-3 在各组的组织中的表达



图 2 Gal-9 在各组的组织中的表达

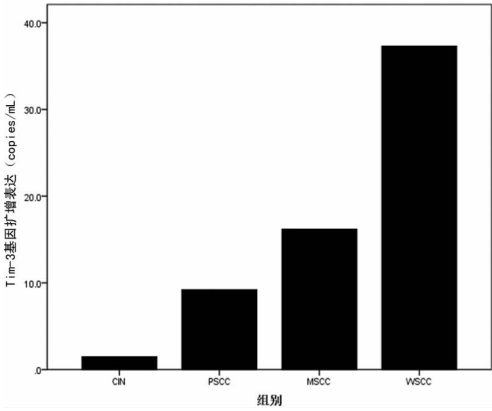


图 3 Tim-3 在各组的组织中的表达

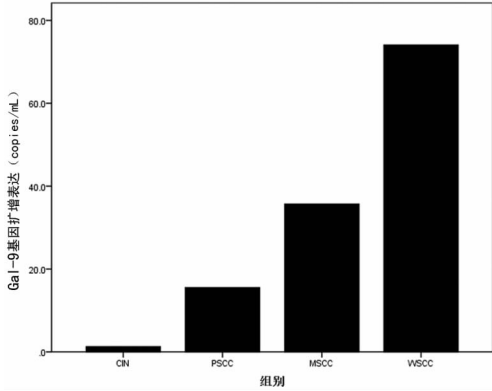


图 4 Gal-9 在各组的组织中的表达

2.3 ELISA 检测结果 ELISA 结果显示,SCC 组的血清样本中 Gal-9 表达与对照组(11.2±4.5)ng/L、CIN 组(18.8±4.0)ng/L 比较,差异有统计学意义($P<0.05$);在不同病理分级中, Gal-9 的表达 WSCC 组(35.3±3.8)ng/L>MSCC 组(28.5±5.0)ng/L>PSCC 组(26.2±4.2)ng/L,显示随癌组织分化程度增加而增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。血清中 Gal-9 表达与癌组织分化程度呈正相关($r=0.687$)。

3 讨 论

Tim 家族是在研究 Th 细胞表面受体时发现的一个新的基因家族,是一类参与调节机体免疫的关键分子,人类 Tim 基

因家族由 Tim-1、Tim-2、Tim-3 组成。Tim-3 及其配体 Gal-9 是近年来研究得较为深入的免疫检测点分子,鉴于其在 Th1 细胞免疫,自身免疫和肿瘤免疫耐受的重要功能使其成为肿瘤免疫研究的焦点^[8]。Tim-3 主要通过参与 T 细胞功能障碍或耗竭及扩增髓系来源移植细胞增殖等在肿瘤免疫中起负调控作用^[9]。而 Gal-9 作为 Tim-3 的特异性配体,与 Tim-3 一起调控机体抗肿瘤的免疫应答^[10]。本研究基于在基因水平上检测 CIN 和不同分化程度的 SCC 患者组织和血清中 Tim-3 及其配体 Gal-9 的表达来探讨其在 SCC 诊断及预后的临床意义。

该研究中,RT-PCR 结果显示 Tim-3 及其配体 Gal-9 在 SCC 各组的组织中表达高于 CIN 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),进一步分析发现 Tim-3 及 PSCC、MSCC、WCC 组中 Gal-9 表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 Tim-3 和 Gal-9 在 SCC 中表达,而在各组表达呈现由低分化癌向高分化癌递增的现象,表明 Tim-3 和 Gal-9 的病理分级呈现明显的正相关(r 分别为 0.738、0.671)。同时在血清中对 Gal-9 的表达与病理分级的正相关性作进一步验证,ELISA 结果显示,SCC 血清中 Gal-9 水平明显高于对照组和 CIN 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),在不同病理分级下,亦由 PSCC 至 WCC 呈现明显递增关系($r = 0.687$)。可见 Gal-9 无论在 mRNA 表达量还是分泌至外周血的表达均比对照组及 CIN 组高且与病理分级呈正相关,可与 Tim-3 一同作为病理分级和预后的指标。

综上所述, Tim-3 和配体 Gal-9 的表达与 SCC 呈正相关,而癌组织的分化程度越高,其恶性程度越低,说明 Tim-3 和 Gal-9 是一种抗肿瘤的负血调控因子,可为临床的诊断和预后提供参考依据。

参考文献

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2000:

(上接第 296 页)

应^[4-5],该项技术具有免疫测定自动化的新方法,其具有灵敏度高、测量范围宽及结果稳定的优点,同时应用的范围广、洗液保存时间也较长。在综合性及基层医院均可满足样本需求,但其洗液价格较为昂贵,三丙胺在发光缓冲液中具有电子供体的作用,但其不易溶于水,需乳化剂进行乳化^[6-7]。

本研究结果显示,性能测试的测试数值均达到罗氏电化学发光免疫分析系统的要求,自配和原装免疫洗液和定标液测定检查结果比较差异无统计学意义($P > 0.05$);细菌培养统计的菌落数无明显变化。因此,自配免疫洗液准确度高、稳定性好。可是,自配免疫洗液中发现最难解决的是防腐问题,没加防腐剂的洗液质控结果可以衰减至靶值的一半^[8],其与细菌嗜好乳化剂有关,若通过减少乳化剂的量,溶解的三丙胺量也相应减少而影响发光效果,在配制洗液时加入防腐剂,可以从源头开始抑菌且不影响主体光电反应。

综上所述,自配免疫洗液完全可以替代罗氏原装免疫洗液,其准确度高、稳定性好,值得临床应用。

参考文献

[1] 万汝根,孙建民,张勇军,等. 自配日立生化分析仪碱性清洗液的应用研究[J]. 浙江检验医学,2011,9(2):33-35.
[2] 黄建平,胡建华,周蔚,等. 日立 7180 型全自动生化分析

314.

- [2] Su EW, Lin JY, Kane LP. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation[J]. Cytokine, 2008, 44(1):9-13.
- [3] Rennert PD. Novel roles for TIM-1 in immunity and infection[J]. Immunol Lett, 2011, 141(1):28-35.
- [4] 程贵,蒋敬庭,吴昌平. Tim-3 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(3):219-222.
- [5] 魏东,匡怡,刘孟刚,等. Tim-3 在肝癌细胞中的表达及其对细胞增殖与迁移能力的影响[J]. 重庆医学, 2014, 43(16):1975-1978.
- [6] 赵国栋,朴勇瑞. Tim-3 在前列腺癌中的表达及其意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(8):1241-1244.
- [7] Michael W, Crahan W, Dempfle HL. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1):1-10.
- [8] Kaori S, Pushpa J, Samuel M, et al. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity[J]. Trends Immunol, 2011, 32(8):345-349.
- [9] Anderson AC. Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(4):213-216.
- [10] Keiko N, Tomohiro A, Souichi O, et al. Galectin-9 increases Tim-3 dendritic cells and CD8T cells and enhances anti-tumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions[J]. J Immunol, 2008, 181(8):7660-7669.

(收稿日期:2016-08-07 修回日期:2016-10-30)

仪碱性清洗液的配制和临床应用[J]. 医学检验与临床, 2014, 25(5):84-85.

- [3] 肖静,杨元好,蒋艺勤,等. Roche 电化学发光免疫分析系统发光缓冲液和清洗液配制及应用[J]. 检验医学与临床, 2006, 3(4):152-153.
- [4] 谭浩. 电化学发光免疫分析系统 E170 的应用评价[J]. 实用预防医学, 2011, 30(5):527-528.
- [5] 乔国昱,何亚萍. 两种免疫分析仪测定孕中期孕妇血清 AFP 和 β -hCG 结果的对比分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 26(7):743-745.
- [6] 尹志军,隋洪,郑文婷,等. 罗氏 Cobas e411 加样/洗液针日常保养的重要性[J]. 中国医疗设备, 2013, 25(2):150-143.
- [7] 李荣海,陈勋,李琦,等. 罗氏电化学发光分析仪自配配套清洗缓冲溶液应用评价[J]. 生物医学工程与临床, 2013, 21(5):82-86.
- [8] 乔国昱,何亚萍. 两种免疫分析仪测定孕中期孕妇血清 AFP 和 β -hCG 结果的对比分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 26(7):743-745.

(收稿日期:2016-08-01 修回日期:2016-10-21)