

· 临床研究 ·

肺癌患者外周血中Chemerin的测定及临床意义

曲晓翰 韩立波 王绍成 张其刚 杨春鹿 许顺 张林

【摘要】 背景与目的 Chemerin是近来发现的一种类似于趋化因子的趋化蛋白，能够通过与其受体ChemR23的结合发挥对树突状细胞和巨噬细胞的免疫趋化作用，研究表明Chemerin的活化能够增强APC的吞噬作用及抗原递呈作用。随着研究的深入，Chemerin在肿瘤的发生发展过程中的作用也引起人们的重视。本实验中我们通过研究Chemerin在肺癌患者外周血中的表达来进一步探索Chemerin与肺癌的关系。**方法** 实验选取肺癌患者与健康体检者作为研究对象，应用ELISA法检测两组实验对象外周血中Chemerin的浓度，采用t检验比较两组间统计学差异。应用t检验及单因素方差分析比较肺癌患者外周血中Chemerin的浓度与年龄、性别、病理类型、分化程度、淋巴结转移情况、UICC分期等临床病理指标的关系。**结果** 42例肺癌患者外周血中Chemerin的浓度与31例健康体检者外周血中Chemerin的浓度具有明显统计学差异，肺癌患者外周血中Chemerin的浓度（1 965.81 pg/mL±374.03 pg/mL）显著高于健康体检者（1 111.44 pg/mL±250.72 pg/mL）（P<0.001）。肺癌患者外周血中Chemerin浓度与各临床病理指标间均无统计学差异。**结论** Chemerin可能具有作为肺癌的诊断标记的潜力。

【关键词】 Chemerin；肺肿瘤；酶联免疫吸附试验

【中图分类号】 R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2009.11.09

Detection of Chemerin and It's Clinical Significance in Peripheral Blood of Patients with Lung Cancer

Xiaohan QU¹, Libo HAN¹, Shaocheng WANG², Qigang ZHANG¹, Chunlu YANG¹, Shun XU¹, Lin ZHANG¹

¹Department of Thoracic, China Medical University First Hospital, Shenyang 110001, China;

²Department of Biochip Center, China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Libo HAN, E-mail: han_seal@163.com

【Abstract】 **Background and objective** Chemerin was recently found a chemoattractant just like a chemotatic factor. It can induce immune chemotaxis to dendritic cells and macrophages by binding to its receptor ChemR23. It has been known that the activation of Chemerin could enhance the phagocytosis and antigen presentation of APC. Along with this observation, the contribution of Chemerin in the genesis and development of a tumor attracts more attention. We explored the relation between Chemerin and lung cancer through detecting the expression of Chemerin in peripheral blood of patients. **Methods** The experiment selected samples of lung cancer patients and normal people. The concentration of Chemerin in peripheral blood was detected by ELISA method. T test was used to compare the statistic difference. We compared the concentration of Chemerin in peripheral blood with age, sex, pathological type, degree of differentiation, metastasis of lymphonode, UICC staging and other clinicopathological index, and analyzed by t test and one-way ANOVA. **Results** The concentration of Chemerin in peripheral blood of 42 patients with lung cancer (1 965.81 pg/mL±374.03 pg/mL) were significantly higher than the concentration of 31 healthy examination (1 111.44 pg/mL±250.72 pg/mL)(P<0.001). The concentration of Chemerin in peripheral blood of patients with lung cancer had no relationship with clinicopathological factors. **Conclusion** Chemerin has the potential to lung cancer diagnosis as a marker.

【Key words】 Chemerin; Lung neoplasms; Enzyme linked immunosorbent assay

2003年Wittamer等^[1]在卵巢癌继发的腹水中通过反相高压液相层析发现了Chemerin。血液中Chemerin的活化形式含有134个氨基酸，其前体proChemerin在结构上属于杀菌肽/半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族。Chemerin通

作者单位：110001 沈阳，中国医科大学附属第一医院胸外科（曲晓翰，韩立波，张其刚，杨春鹿，许顺，张林）；110001 沈阳，中国医科大学生物芯片中心（王绍成）（通讯作者：韩立波，E-mail: han_seal@163.com）

过碳末端的处理后，具有趋化白细胞的功能，其受体ChemR23（chemokine like receptor1, CMKLR1）属于G蛋白偶联受体，主要分布在单核细胞衍生的树突状细胞和巨噬细胞膜上^[2]。机体在正常状态下除由外周血白细胞以外的各个组织产生的Chemerin是以前体形式proChemerin分泌到细胞外的，proChemerin活性很低，在蛋白水解酶的作用下去除碳末端的6个氨基酸转化为Chemerin的活性形式，即为ChemR23的强激动剂。

Chemerin-ChemR23通路在炎症反应、脂肪代谢等方面都具有重要功能。近年来研究发现Chemerin可能通过多种机制参与肿瘤的发生发展。本实验通过双抗体夹心ELISA法检测肺癌患者及正常体检者外周血中Chemerin的表达情况,并对实验组中Chemerin浓度与各临床指标进行统计学分析,从而进一步探索Chemerin与肺癌的关系。

1 材料和方法

1.1 实验对象 实验组选取2008年7月-10月于我院胸外科接受手术治疗的肺癌患者42例,男性26例、女性16例,年龄44岁-78岁,中位年龄56岁。所有患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗。对照组为于我院体检中心就诊之健康体检者31例,男性18例、女性13例,年龄32岁-64岁,中位年龄48岁。临床资料包括年龄、性别、病理类型、分化程度、淋巴结转移情况、UICC分期(1997年)。

1.2 试剂与材料 鼠抗人Chemerin单克隆抗体, R&D公司;生物素化的羊抗人Chemerin多克隆抗体, R&D公司;重组人Chemerin标准品, R&D公司;辣根过氧化物酶HRP标记的Streptavidin(抗生物素蛋白链菌素), R&D公司;洗涤液:0.05%Tween 20-PBS, pH7.4;样品稀释液:1%BSA-PBS, pH7.4;显色剂:A液: H_2O_2 , B液:四甲基联苯胺;终止液:2N H_2SO_4 均由中国医科大学生物芯片中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 血浆制备 实验组患者术前无菌条件下采集外周血1.5 mL,肝素抗凝,于4 °C条件下2 000 rpm离心10 min,取上清液1 mL装于EP管中,-20 °C冻存,集中待测。对照组于体检时同法提取血浆,保存待测。

1.3.2 稀释实验试剂 ①标准品:以1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64浓度倍比稀释,浓度(pg/mL)分别为2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25。另取1空作为空白对照;②待测样品:将各实验组与对照组待测样品用反应稀释液按1:50浓度稀释备用;③包被抗体:鼠抗人Chemerin单克隆抗体作为包被抗体,原液浓度720 $\mu\text{g/mL}$,用PBS稀释至工作液浓度4.0 $\mu\text{g/mL}$ 备用;④检测抗体:生物素化的羊抗人Chemerin多克隆抗体作为检测抗体,原液浓度36 $\mu\text{g/mL}$,用反应稀释液稀释至工作液浓度200 ng/mL备用。

1.3.3 酶联免疫吸附试验 96孔酶标反应板每孔加入包被抗体100 μL ,室温下包被。封闭后将比稀释的标准品依次加入7个反应孔中,每孔加入100 μL 。另取1孔作空

白对照,加入反应稀释液100 μL 。将各待测样品1:50浓度加入反应孔中,每孔100 μL ,孵育1.5 h。加入检测抗体孵育1.5 h。洗脱后加入HRP标记的链霉亲和素,20 min后进行底物显色反应及终止反应。用酶标仪检测450 nm波长处的OD值,取570 nm波长的OD值作为校正波长。

1.3.4 绘制标准曲线 以标准品浓度为横坐标,其相应的光密度值为纵坐标绘制标准曲线。由此计算各待测样品的浓度。

1.4 统计学分析 采用SPSS统计软件对两组数据及各临床病理指标进行统计分析,所得数据以Mean \pm SD表示,两组数据间的比较采用t检验,多组数据间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 实验组与对照组外周血中Chemerin浓度的差异 42例肺癌患者外周血中Chemerin的浓度为1 965.81 \pm 374.03 (pg/mL),31例健康体检者中Chemerin的浓度为1 111.44 \pm 250.72 (pg/mL),两组比较有统计学差异($P<0.001$),可见肺癌患者外周血中Chemerin的浓度显著高于正常人(图1)。

2.2 肺癌患者外周血Chemerin浓度与各临床病理指标的统计学分析 将肺癌患者外周血中Chemerin的浓度与年龄、性别、病理类型、分化程度、淋巴结转移情况、UICC分期等临床病理指标进行比较,应用t检验及单因素方差分析,发现肺癌患者外周血中Chemerin的浓度与各临床病理指标间无统计学联系,各P值均大于0.05(见表1)。

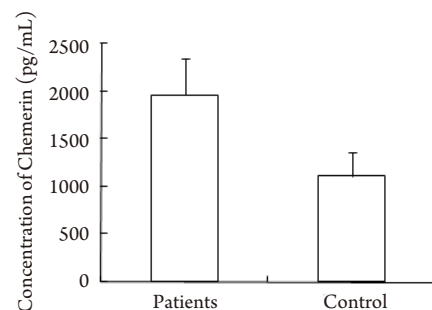


图1 肺癌组与正常组外周血Chemerin的表达

Fig 1 The expression of Chemerin in peripheral blood of patients with lung cancer and health examination

The concentration of Chemerin (pg/mL) in peripheral blood of 42 patients with lung cancer (1 965.81 \pm 374.03) were significantly higher than the concentration of 31 health examination (1 111.44 \pm 250.72), $P<0.001$.

表1 肺癌患者外周血中Chemerin浓度与临床病理特征关系

Tab 1 The relationship between the concentration of Chemerin in peripheral blood of patients with lung cancer and the clinicopathological factors

| Items | <i>n</i> | Chemerin concentration (pg/mL) | <i>t</i> / <i>F</i> | <i>P</i> |
|-------------------------|----------|--------------------------------|---------------------|----------|
| Age | | | <i>t</i> =0.362 | 0.719 |
| <60 | 29 | 1 951.65±380.54 | | |
| ≥60 | 13 | 1 997.38±372.19 | | |
| Sex | | | <i>t</i> =0.697 | 0.490 |
| Male | 26 | 1 997.57±304.47 | | |
| Female | 16 | 1 914.18±472.53 | | |
| Pathological type* | | | <i>t</i> =0.747 | 0.461 |
| SCC | 16 | 2 013.62±370.79 | | |
| Adeno | 15 | 1 904.60±441.16 | | |
| Differentiation degree* | | | <i>F</i> =1.359 | 0.273 |
| Well | 9 | | | |
| Mid | 16 | | | |
| Poor | 6 | | | |
| Lymph node metastasis | | | <i>t</i> =0.545 | 0.589 |
| Yes | 19 | 1 930.87±409.73 | | |
| No | 23 | 1 857.96±384.21 | | |
| UICC Phases | | | <i>F</i> =0.463 | 0.710 |
| I | 19 | | | |
| II | 6 | | | |
| III | 11 | | | |
| IV | 6 | | | |
| Smoking index | | | <i>F</i> =0.652 | 0.527 |
| 0 | 18 | | | |
| <400 | 6 | | | |
| ≥400 | 18 | | | |

SCC: Squamous cell carcinoma; Adeno: Adenocarcinoma.

*not including SCLC and other types since the numbers was too small to be statistical analyzed.

The concentration of Chemerin in peripheral blood of patients with lung cancer had no relationship with clinicopathological factors, *P*>0.05.

3 讨论

2003年Wittamer等^[3]通过反相高压液相层析在卵巢癌继发的腹水中发现了Chemerin。血液中Chemerin的活化形式含有134个氨基酸，与趋化因子的结构成镜面关系。其前体proChemerin在结构上属于杀菌肽/半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族^[1]，Chemerin与半胱氨酸抑制剂、杀菌肽结构相似，且都具有趋化白细胞的功能。ChemR23 (chemokine like receptor1, CMKLR1) 是第一个被发现的Chemerin受体，主要分布在单核细胞衍生的树突状细胞和巨噬细胞中^[2]。在外周组织中，约40%的髓样树突状细胞 (myeloid dendritic cells, mDC) 和全部的浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) 表达ChemR23，在血液里只有pDC表达ChemR23^[4]。

机体在正常状态下就不断地在各种组织中产生

proChemerin。当机体发生损伤、出血和炎症时，止血纤溶过程中的丝氨酸蛋白酶、多形核细胞脱颗粒释放的弹性蛋白酶和组织蛋白酶G或病原体释放的丝氨酸蛋白酶水解去掉proChemerin的碳末端数个氨基酸^[5]，使proChemerin活化。活化的Chemerin对血液中不成熟的pDC和组织中的巨噬细胞具有趋化作用。研究^[6]表明Chemerin在炎症部位的血管内皮细胞高表达，从而通过Chemerin与ChemR23的特异性结合使ChemR23阳性的不成熟的pDC跨过单层的血管内皮到达炎症部位，然后不成熟的pDC和巨噬细胞与微生物产物TOLL样受体或炎症因子相互作用，从而使pDC成熟^[7]。在成熟过程中，pDC失去了吞噬能力，却获得了抗原递呈能力，将抗原递呈给T细胞^[8]。T细胞到达炎症部位杀死病原体。在以上这一过程中Chemerin的活化是限速步骤^[9]。最近有研究^[10,11]表明在炎症中一些天然杀伤细胞也表达ChemR23，且与

树突状细胞同时存在。提示在炎症过程中, Chemerin同时趋化了NK细胞到达炎症部位, NK细胞通过单独分泌细胞因子或与树突状细胞相互作用来参与免疫反应。最近研究^[12]发现除趋化作用外, 脂肪细胞可以通过自分泌作用合成分泌Chemerin到胞外, 作用于脂肪细胞及其周围细胞上的ChemR23受体, 在调节脂肪细胞分化和脂肪代谢中发挥重要作用。

本实验通过酶联免疫吸附试验检测Chemerin在肺癌患者及正常人外周血中的表达情况, 发现肺癌患者外周血中Chemerin的浓度显著高于正常人, 可能与肿瘤组织局部免疫作用增强或自身免疫功能紊乱有关。肿瘤细胞通过直接或间接地产生趋化因子吸引树突状细胞和巨噬细胞^[13,14]。同时, 肿瘤组织局部的慢性炎症反应加速了中性粒细胞产生各种蛋白酶进而活化proChemerin的过程, 从而使局部Chemerin浓度增加, 继而导致入血的Chemerin增加。此外, 实验结果也可能是由于肺癌患者肿瘤细胞及周围正常组织大量坏死, 释放入血的Chemerin增加所造成的。外周血中Chemerin浓度与各临床病理指标之间未发现统计学意义, 可能与实验标本的保存时间以及样本量的限制有关。本实验也显示了Chemerin可能具有作为肺癌的诊断指标的潜力。进一步还需扩大样本量, 并分析与患者预后的关联, 研究其它肿瘤中Chemerin的表达情况以验证其诊断特异度, 并对Chemerin-ChemR23系统的信号通路在肿瘤细胞及肿瘤免疫过程中的作用深入研究。

参 考 文 献

- 1 Yang D, Chertov O, Oppenheim J. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(7): 978-989.
- 2 Zabel BA, Ohshima T, Zuniga L, *et al.* Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages *in vivo*: regulation by TGF-beta and TLR ligands. *Exp Hematol*, 2006, 34(8): 1106-1114.
- 3 Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, *et al.* Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med*, 2003, 198(7): 977-985.
- 4 Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 2001, 167(4): 1862-1866.
- 5 Kulig P, Zabel BA, Dubin G, *et al.* Staphylococcus aureus-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma Chemerin. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3713-3720.
- 6 Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*, 1999, 5(8): 919-923.
- 7 Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, 2004, 5(12): 1219-1226.
- 8 Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, *et al.* Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med*, 2005, 201(4): 509-515.
- 9 Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, 2002, 195(6): 695-704.
- 10 Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, *et al.* NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*, 2008, 15(2): 226-233.
- 11 Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, *et al.* Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem*, 2007, 282(38): 28175-28188.
- 12 Mårtensson UE, Fenyö EM, Olde B, *et al.* Characterization of the human chemerin receptor-ChemR23/CMKLR1-as co-receptor for human and simian immunodeficiency virus infection, and identification of virus-binding receptor domains. *Virology*, 2006, 355(1): 6-17.
- 13 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.
- 14 Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(2): 143-154.

(收稿: 2009-08-24 修回: 2009-09-21)

(本文编辑 南娟)

AACR 101st Annual Meeting

• Information •

Title: AACR 101st Annual Meeting
Date: April 17, 2010 - April 21, 2010
City: Washington
State/Province: DC
Country: United States
Contact: American Association for Cancer Research, 615 Chestnut St., 17th Floor, Philadelphia, PA 19106-4404
Phone: 215-440-9300/1-866-423-3965
Fax: 215-440-7228
E-Mail: aacr@aacr.org

www.lungca.org
中国肺癌杂志