

## 大肠癌组织 CD137L 的表达及意义

杨琳<sup>1,2</sup>, 黄娜<sup>1</sup>, 雷尚通<sup>3</sup>, 李爱民<sup>1</sup>, 吕成伟<sup>1</sup>, 廖旺军<sup>1</sup>, 罗荣城<sup>1\*</sup>

(1. 南方医科大学南方医院肿瘤中心; 2. 解放军广州疗养院一科; 3. 南方医科大学南方医院普外科, 广东 广州 510515)

**摘要:**【目的】检测大肠癌组织及癌旁组织中 CD137L mRNA 及蛋白的表达情况,探讨其在大肠癌发生进展中的意义。【方法】运用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应及冰冻切片免疫组化的方法检测大肠癌组织及癌旁组织中 CD137L 的表达情况,并分析其表达情况与各临床因素的相关性。【结果】54 例大肠癌组织中 CD137L mRNA 的相对表达水平为  $0.035 \pm 0.013$ ,显著高于癌旁组织的  $0.008 \pm 0.005$  ( $P < 0.05$ )。但在不同性别、年龄、肿瘤发生部位、Dukes 分期、病理分化及血清 CEA 水平情况下,CD137L mRNA 的表达水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。随机抽取 8 例大肠癌肿瘤组织及 3 例癌旁组织,进行免疫组化检测,结果显示 6 例 CD137L 蛋白呈阳性表达,CD137L 表达于肿瘤细胞表面;3 例癌旁组织该分子的表达均为阴性。【结论】CD137L mRNA 在大肠癌组织中高表达,CD137L 分子表达于大肠癌肿瘤细胞表面,提示该分子可能在大肠癌的发生进展中发挥作用。

**关键词:** CD137L; CD137; 聚合酶链反应; 免疫组化; 结直肠癌

**中图分类号:** R735.35      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)04-0381-05

### Expression of CD137L in Colorectal Cancer Tissues and Its Significance

YANG Lin<sup>1,2</sup>, HUANG Na<sup>1</sup>, LEI Shang-tong<sup>3</sup>, LI Ai-min<sup>1</sup>, LV Cheng-wei<sup>1</sup>,  
LIAO Wang-jun<sup>1</sup>, LUO Rong-cheng<sup>1\*</sup>

(1. Department of Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University; 2. Guangzhou Sanitarium of People's Liberation Army; 3. Department of General Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** 【Objective】 To detect the expression of CD137L mRNA and protein in colorectal cancer tissues and discuss its possible clinical significance. 【Methods】 To detect the expression of CD137L mRNA in colorectal cancer tissues and adjacent noncancerous tissues by real-time RT-PCR and immunohistochemistry and to analyze the relationship between CD137L expression and clinical features. 【Results】 The mean level of CD137L mRNA in colorectal cancer tissues is significantly higher than that of adjacent noncancerous tissues ( $0.035 \pm 0.013$  vs.  $0.008 \pm 0.005$ ,  $P < 0.05$ ). CD137L mRNA expression in colorectal cancer show no significant differences among different age, sex, tumor location, Dukes classification, histological differentiation, and serum levels of CEA. We selected 8 colorectal cancer tissues and 3 adjacent tissues randomly to analyze the expression of CD137L by immunohistochemistry. CD137L was expressed on tumor cells in colorectal cancer tissues. The expression of CD137L was observed only in colorectal cancer tissues (6/8), but not in adjacent noncancerous tissues (0/3). 【Conclusions】 The expression of CD137L mRNA in colorectal cancer tissues is higher than that of adjacent noncancerous tissues and CD137 is expressed on tumor cell surface, it might be of biological importance for the progression of colorectal cancer.

**Key words:** CD137L; CD137; polymerase chain reaction; immunohistochemistry; colorectal cancer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4): 381-385]

CD137(4-1BB, ILA)属于肿瘤坏死因子受体家族,是表达于活化 T 细胞表面的共刺激分子。其

配体 CD137L 主要表达于抗原呈递细胞表面,也可诱导表达于 T 细胞。CD137/CD137L 是一对重

收稿日期: 2009-04-02

基金项目: 广东省自然科学基金(2007005208)

作者简介: 杨琳, 博士研究生, 主治医师, youngnil@163.com; \* 通讯作者: 罗荣城, 教授、博士生导师, 南方医院肿瘤中心主任, E-mail: luorc01@163.com

要的共刺激分子,在活化T细胞与抗原呈递细胞之间传导双向信号,对维持特异性细胞免疫应答及免疫记忆有重要意义<sup>[1-3]</sup>。在动物实验及体外细胞实验中,应用CD137单抗或表达抗CD137-scFv肿瘤细胞作为肿瘤疫苗,在某些弱免疫原性肿瘤的治疗上取得了一定疗效<sup>[4-5]</sup>。研究发现CD137L不仅高表达于淋巴或骨髓来源的肿瘤细胞表面,还持续表达于多种实体瘤细胞株表面,如Colo 205, HCT 116, HT 29, PC 3, SKBR 3等<sup>[6]</sup>。本研究运用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应及免疫组化检测大肠癌组织及癌旁组织中CD137L的表达情况,为探讨CD137/CD137L在大肠癌发生发展中的作用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病例选择及标本采集

收集我院2007年10月~2008年4月手术切除的大肠癌肿瘤组织标本54例及距离肿瘤边缘10 cm处癌旁组织标本18例,肿瘤组织均经病理检查为腺癌。54例患者中男性29例,女性25例,年龄22~84岁,中位年龄60岁。结肠癌38例,直肠癌12例,直肠乙状结肠交界癌4例。28例有淋巴结转移。组织经手术切除后30 min内采集标本,标本采集后立即置于RNAlater<sup>®</sup>中,-80℃保存。另取黄豆大小肿瘤组织及癌旁组织,加少许冰冻切片包埋剂用铝箔包裹,浸没于液氮中冰冻成块后置-80℃保存,用于冰冻切片。

### 1.2 主要细胞、试剂及仪器

人大肠癌细胞株Colo 205为本中心实验室保存。RNAlater<sup>®</sup>为Ambion公司产品,Trizol为Invitrogen公司产品,DEPC为BIO BASIC公司产品。两步法实时荧光定量反转录试剂盒为TaKaRa公司的SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit。PCR引物由TaKaRa公司设计,英骏生物技术有限公司合成。anti-CD137L C20 Ab为Santa Cruz公司产品。即用型二步法(非生物素)免疫组化检测试剂盒、DAB显色试剂盒为中杉金桥公司产品。Mx3000P Real Time PCR扩增仪为美国Stratagene公司生产。

### 1.3 总RNA制备

取100 mg左右标本加1 mL Trizol,按试剂说明书中操作步骤进行RNA提取。提取产物经凝胶

电泳确定RNA质量,使用紫外分光光度仪检测抽提总RNA的纯度并计算其浓度。

### 1.4 cDNA合成

按逆转录试剂盒使用说明操作。反应体系:5 × PrimeScript<sup>™</sup> Buffer 2 μL, PrimeScript<sup>™</sup> RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL, Total RNA 500 ng, 加入RNase free dH<sub>2</sub>O至总体积10 μL。逆转录条件:37℃ 15 min, 85℃ 5 s。cDNA -20℃保存。

### 1.5 实时荧光定量PCR

β-actin上游引物5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3',下游引物5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTA GAAGCA-3',扩增产物186 bp;CD137L上游引物5'-CATGTTTGGCAGCTGGTG-3',下游引物5'-CGCCGCAGCTCTAGTTGAAAG-3',扩增产物183 bp。PCR反应体系总体积为25 μL;SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2×) 12.5 μL,上游及下游引物(10 μmol/L)各1 μL,ROX Reference Dye II (50×) 0.5 μL,cDNA模板1 μL,加双蒸水至25 μL。PCR反应条件为:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,72℃ 5 s,40个循环;扩增完毕后进行融解曲线分析:95℃ 60 s,55℃ 30 s,95℃ 30 s。反应结束后对扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳分析特异性。每个cDNA标本进行3次PCR反应,取Ct值的均值带入公式进行计算。

### 1.6 标准曲线的绘制

将1 μL Colo 205细胞的cDNA分别稀释10<sup>0</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>倍作为模板,分别扩增CD137L和β-actin。将稀释10<sup>4</sup>倍的cDNA的拷贝数赋值为10,稀释10<sup>0</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>倍的cDNA的拷贝数则分别为10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>。以2为底cDNA拷贝数的对数为横坐标,Ct值为纵坐标绘制标准曲线,计算R<sup>2</sup>。两标准曲线的线性关系取决于R<sup>2</sup>,当R<sup>2</sup>>0.99,可运用公式计算CD137L mRNA的相对表达量:CD137L mRNA = 2<sup>-ΔCt</sup> × 100。ΔCt = Ct<sub>CD137L</sub> - Ct<sub>β-actin</sub>。

### 1.7 冰冻切片及细胞滴片免疫组化

冻存组织从-80℃低温冰箱中取出后置-20℃中至少1 h,使用防脱片处理玻片,切片6~8 μm,室温下自然风干。丙酮4℃固定10 min,风干。取防脱玻片高压蒸汽消毒,烤干备用。消化Colo 205细胞,制备细胞悬液,滴加适当细胞于玻

片上,在铝盒中加少许灭菌 PBS 液以保持盒内湿度,置 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。然后用 PBS 小心冲洗玻片上的培养基,丙酮 4 °C 固定 10 min。固定后的组织切片及细胞滴片滴加 3% 过氧化氢孵育 5 ~ 10 min,消除内源性过氧化物酶的活性。滴加 1:400 稀释的 CD137L C20 Ab,4 °C 过夜。然后按照两步法免疫组化检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒的说明操作。DAB 显色后用苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。

1.8 免疫组化结果判断

用 CD137L 蛋白在 Colo 205 细胞滴片的表达为的阳性对照,用 PBS 液取代一抗稀释液作为阴性对照。按参考文献[7]的方法,200 倍光镜视野下随机选取 5 个视野,以细胞膜着棕黄色为阳性细胞。计数阳性染色细胞数,< 10% 为阴性表达,>10% 为阳性表达。

1.9 统计学处理

实验数据用 SPSS 16.0 软件分析。多组间比较采用 One-way ANOVA,两组间均数比较采用 Independent-Samples T test。*P* < 0.05 时有统计学显著差异。

2 结 果

2.1 β-actin 和 CD137L 标准曲线的绘制

国外研究已证实结肠癌细胞株 Colo 205 细胞持续性表达 CD137L,故我们采用 Colo 205 的 cDNA 作为标准品绘制标准曲线。以 cDNA 浓度梯度的对数值为横坐标,Ct 值为纵坐标绘制标准曲线(图 1-2)。β-actin 和 CD137L 标准曲线的 R<sup>2</sup> 值分别为 0.994 和 0.992,均显示出良好的线性关系,可进行相对定量分析。

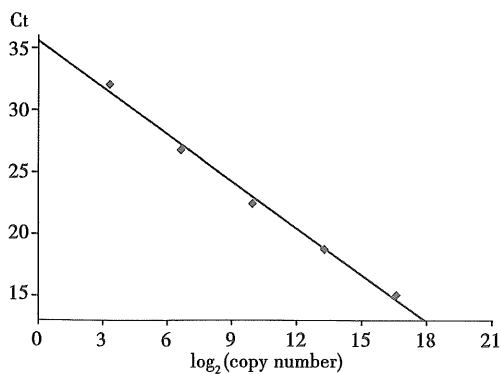


图 1 十倍梯度稀释 cDNA 建立的 β-actin 标准曲线  
Fig.1 Amplification regression curve of β-actin

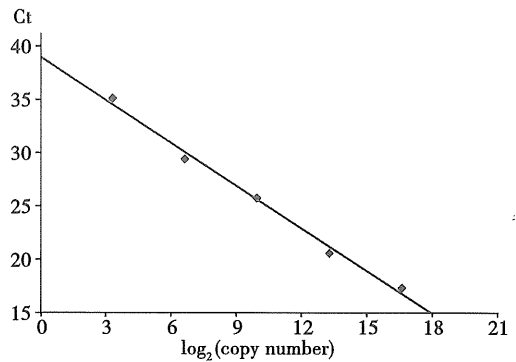


图 2 十倍梯度稀释 cDNA 建立的 CD137L 标准曲线  
Fig.2 Amplification regression curve of CD137L

2.2 大肠癌组织中 CD137L mRNA 的表达

CD137L 和 β-actin 扩增产物的融解曲线见图 3-4。大肠癌组织 CD137L mRNA 的相对表达量为 0.035 ± 0.013,显著高于癌旁组织的相对表达量 0.008 ± 0.005 (*P* < 0.05)。但结肠癌、直肠癌及直乙交界癌的 CD137L mRNA 的表达水平没有统计学差异 (*P* > 0.05),且不同性别、年龄、Dukes 分期、病理分化及血清 CEA 水平的患者,其肿瘤组织

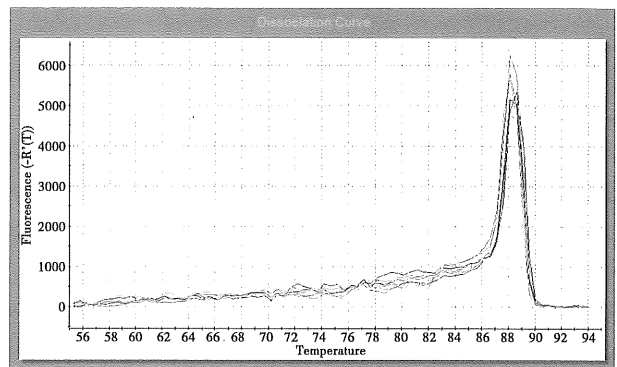


图 3 CD137L 基因扩增产物的融解曲线  
Fig.3 Dissociation curves for CD137L PCR reactions

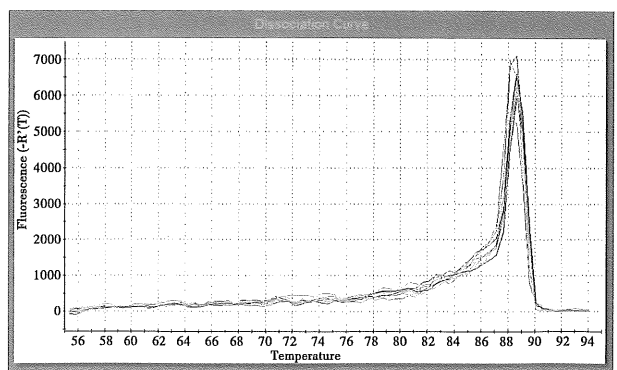


图 4 β-actin 基因扩增产物的融解曲线  
Fig.4 Dissociation curves for β-actin PCR reactions

CD137L mRNA 的表达水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

## 2.3 大肠癌组织中 CD137L 蛋白的表达

由于 CD137L 分子可表达于抗原呈递细胞如

表 1 大肠癌组织 CD137L mRNA 表达与各临床因素的关系

Table 1 Relationship between CD137L mRNA expression and clinical features

Clinical features		<i>n</i>	CD137L mRNA	<i>P</i>
Sex	male	29	0.036 ± 0.015	0.351
	female	25	0.033 ± 0.011	
Age (years)	≥ 60	27	0.034 ± 0.015	0.472
	< 60	27	0.035 ± 0.012	
Location	colon	38	0.035 ± 0.014	0.220
	rectum	12	0.030 ± 0.010	
	between rectum and sigmoid colon	4	0.035 ± 0.013	
Dukes classification	A	6	0.036 ± 0.007	0.569
	B	16	0.034 ± 0.016	
	C	12	0.032 ± 0.012	
	D	20	0.035 ± 0.013	
Histological differentiation	well and moderate	48	0.035 ± 0.013	0.676
	Poor	3	0.038 ± 0.008	
CEA	≥ 5.0 μg/L	19	0.037 ± 0.017	0.339
	< 5.0 μg/L	28	0.033 ± 0.012	

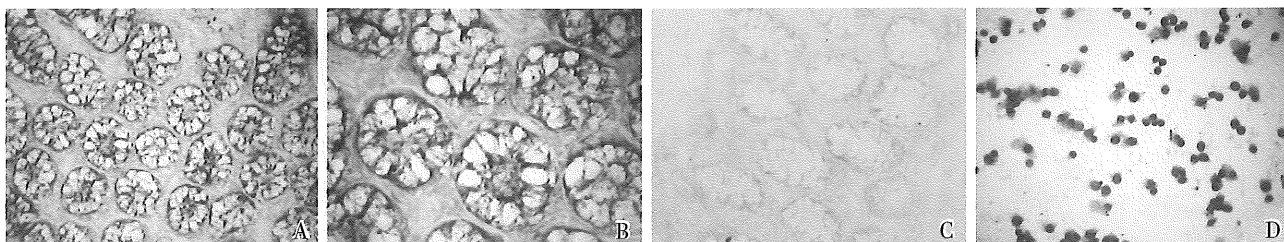


图 5 免疫组化检测 CD137L 在大肠癌组织、癌旁组织及 Colo 205 细胞的表达

Fig.5 Detection of CD137L expression in colorectal cancer tissues, adjacent tissues and Colo 205 by immunohistochemistry

A: CRC tissue, 200 ×; B: CRC tissue, 400 ×; C: adjacent tissue, 200 ×; D: Colo 205, 200 ×

B 细胞、单核细胞及巨噬细胞表面,为进一步明确该分子在结直肠癌肿瘤组织的表达情况,我们在以上 54 例大肠癌肿瘤组织及 18 例癌旁组织中随机抽取 8 例大肠癌肿瘤组织(Dukes A、B、C、D 期各 2 例)及 3 例癌旁组织,运用冰冻切片免疫组化技术检测 CD137L 蛋白的表达。结果显示 CD137L 分子表达于肿瘤细胞表面。在 6 例大肠癌肿瘤组织中呈阳性表达。2 例阴性表达的大肠癌组织分别为 Dukes A 期和 B 期。在 3 例癌旁组织中该分子表达均呈阴性(图 5)。

## 3 讨论

CD137L 属于肿瘤坏死因子家族,主要表达于

抗原呈递细胞表面,如单核细胞、树突状细胞、B 细胞、巨噬细胞;亦表达于多种肿瘤细胞株表面,如 Raji, Colo 205, HT 29。近年来许多研究开始关注 CD137L 的逆向信号转导。CD137L 能促进单核细胞的活化增殖,增加促炎症细胞因子如 TNF、IL-6、IL-8、IL-12 的分泌,并且诱导单核细胞表面 ICAM-1 的表达,显著增强单核细胞的侵袭迁移活性<sup>[8]</sup>。Drenkard 等<sup>[9]</sup>发现促炎因子能诱导 CD137 高表达于炎症部位的血管内皮细胞,CD137 通过激活 CD137L 的逆向信号进而诱导单核细胞的迁移。人 PBMC 经抗 CD3 单抗刺激后能够通过细胞间直接接触产生的 CD137/CD137L 信号交联而增加 B 细胞的凋亡<sup>[10]</sup>。并且肿瘤细胞株表面的 CD137L 也具有逆向信号转导的生物学功能,能诱

导肿瘤细胞分泌 IL-8<sup>[6]</sup>。而 IL-8 能够直接促进肿瘤组织的血管生成。Wang 等<sup>[7]</sup>运用免疫组化的方法检测了 36 例恶性肿瘤组织 CD137 及 CD137L 的表达情况,发现 CD137L 表达于多种恶性肿瘤组织细胞表面,CD137 则表达于恶性肿瘤组织血管内皮细胞表面,并且中低分化的肿瘤组织中 CD137L 的表达较高分化的肿瘤组织高。CD137L 的胞浆段表达一个酪氨酸激酶的识别位点,并且阻断酪氨酸激酶能够抑制 CD137L 介导的生物学效应。Söllner 等<sup>[11]</sup>发现 CD137L 下游信号转导涉及酪氨酸蛋白激酶、p38 MAPK、PI3-K、ERK1/2、MEK 和 PKA,但 PKC 不参与 CD137L 下游信号的转导。

近年来出现的实时荧光定量 PCR 技术以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为了医学研究中的重要方法。本研究中,我们运用实时荧光定量 RT-PCR 法检测 54 例大肠癌组织及 18 例癌旁组织 CD137L mRNA 的表达情况,结果显示大肠癌组织中 CD137L mRNA 的表达水平显著高于癌旁组织,但在不同性别、年龄、Dukes 分期、病理分级、血清 CEA 水平及肿瘤发生部位的情况下,CD137L mRNA 的表达水平未检测出显著性差异。由于 CD137L 分子可表达于抗原呈递细胞如 B 细胞、单核细胞及巨噬细胞表面,为进一步明确该分子在结直肠癌肿瘤组织的表达情况,我们运用冰冻切片免疫组化的方法检测了 CD137L 蛋白在 8 例大肠癌肿瘤组织及 3 例癌旁组织的表达情况,结果显示 CD137L 蛋白在 6 例大肠癌肿瘤组织中呈阳性表达,且该分子表达定位于肿瘤细胞表面,而在 3 例癌旁组织中均呈阴性表达。我们推测大肠癌组织细胞通过表达 CD137L,与免疫细胞表面的 CD137 分子结合,可能向免疫细胞传递凋亡信号,进而诱导免疫细胞发生凋亡从而逃脱免疫系统的监视。CD137L 亦可能通过促进大肠癌组织细胞分泌 IL-8 及增强 ICAM-1 的表达,进而促进肿瘤血管生成、增强肿瘤微环境中血管的通透性以及肿瘤细胞的侵袭迁移活性。CD137/CD137L 在恶性肿瘤组织中的表达模式以及这一对共刺激分子的双向信号转导模式,使它们在肿瘤微环境中可能发挥多种生物学作用,还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Chu NR, DeBenedette MA, Stiernholm BJ, et al. Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and CD28- T cells [J]. *J Immunol*, 1997, 158(7):3081-3089.
- [2] DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, et al. Costimulation of CD28 - T lymphocytes by 4-1BB ligand [J]. *J Immunol*, 1997, 158(2):551-559.
- [3] Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, et al. Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28 [J]. *J Immunol*, 1995, 155(7):3360-3367.
- [4] Ito F, Li Q, Shreiner AB, et al. Anti-CD137 Monoclonal Antibody Administration Augments the Antitumor Efficacy of Dendritic Cell-Based Vaccines [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(22):8411-8849.
- [5] Zhang H, Knutson KL, Hellstrom KE, et al. Antitumor efficacy of CD137 ligation is maximized by the use of a CD137 single-chain Fv-expressing whole-cell tumor vaccine compared with CD137-specific monoclonal antibody infusion [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(1):149-155.
- [6] Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, et al. Constitutive Expression of Functional 4-1BB (CD137) Ligand on Carcinoma Cells [J]. *J Immunol*, 2000, 165(5):2903-2910.
- [7] Wang Q, Zhang P, Zhang Q, et al. Analysis of CD137 and CD137L expression in human primary tumor tissues [J]. *Croat Med J*. 2008, 49(2):192-200.
- [8] Langstein J, Michel J, Schwarz H. CD137 Induces Proliferation and Endomitosis in Monocytes [J]. *Blood*, 1999, 94(9):3161-3168.
- [9] Drenkard D, Becke FM, Langstein J, et al. CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity [J]. *FASEB J*, 2007, 21(2):456-463.
- [10] Kienzle G, von Kempis J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes [J]. *Int Immunol*, 2000, 12(1):73-82.
- [11] Söllner L, Shaqireen D O Kwajah MM, Wu JT, et al. Signal transduction mechanisms of CD137 ligand in human monocytes [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(9):1899-1908.

(编辑 张恩健)