

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.16.006

HBB 在肺癌组织中的表达及临床意义*

徐鑫鑫¹, 蔡 花¹, 彭静静², 刘红利³, 褚福营^{2△}1. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226000; 2. 江苏省南通市第一人民医院检验科, 江苏南通 226000;
3. 江苏省南通市肿瘤医院检验科, 江苏南通 226000

摘 要:目的 探讨人血红蛋白 β (HBB) 在肺癌组织中的表达及临床意义。方法 收集南通市肿瘤医院收治的 56 例肺癌患者的肺癌组织和癌旁组织标本, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测 HBB 的表达水平, 并分析其与肺癌临床病理特征之间的关系; 采用受试者工作特征曲线评价 HBB 对肺癌的诊断价值; 采用 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 HBB 与肺癌预后的关系。结果 肺癌组织中 HBB 表达水平明显低于癌旁组织, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺癌组织中 HBB 高表达 12 例, 低表达 44 例。肺癌组织中 HBB 的表达水平与患者性别、TNM 分期、5 年生存情况有关($P < 0.05$), 而与年龄、吸烟史、病理类型、肿瘤最大径及是否有淋巴结转移无关($P > 0.05$)。HBB 诊断肺癌的曲线下面积为 0.714(95%CI: 0.648~0.834), 当最佳截断值为 11.91 时, 其诊断灵敏度为 71.4%, 特异度为 69.6%。Kaplan-Meier 生存分析发现, HBB 低表达患者生存率明显低于高表达患者($HR = 0.77, 95\%CI: 0.67 \sim 0.89, P < 0.05$)。结论 HBB 在肺癌组织中低表达, 可能参与了肺癌的发生、发展, 且对肺癌具有一定的临床诊断价值。

关键词: 人血红蛋白 β ; 肺癌; 癌旁组织; 生存分析; 病理特征

中图法分类号: R734.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)16-2181-04

Expression and clinical significance of HBB in lung cancer tissue*

XU Xinxin¹, CAI Hua¹, PENG Jingjing², LIU Hongli³, CHU Fuying^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nantong First People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Nantong Tumor Hospital, Nantong, Jiangsu 226000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of human hemoglobin β (HBB) in lung cancer tissue. **Methods** The lung cancer tissue and adjacent tissue samples of 56 lung cancer patients treated in Nantong Tumor Hospital were collected, and the expression level of HBB was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). And analyzed the relationship between the expression level of HBB and the clinicopathological characteristics of lung cancer. The receiver operating characteristic curve was used to evaluate the diagnostic value of HBB in lung cancer. The Kaplan-Meier Plotter database was used to analyze the relationship between HBB and the prognosis of lung cancer. **Results** The expression level of HBB in lung cancer tissue was significantly lower than that in adjacent tissue, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There were 12 cases of high HBB expression and 44 cases of low HBB expression in lung cancer tissues. The expression level of HBB in lung cancer tissue was related to the patient's gender, TNM stage, and 5-year survival ($P < 0.05$), but was not related to age, smoking history, pathological type, maximum tumor diameter and lymph node metastasis or not ($P > 0.05$). The area under the curve of HBB for the diagnosis of lung cancer was 0.714 (95%CI: 0.648—0.834). When the optimal cut-off value was 11.91, the diagnostic sensitivity was 71.4%, and the specificity was 69.6%. Kaplan-Meier survival analysis showed that the survival rate of patients with low HBB expression was significantly lower than that of patients with high HBB expression ($HR = 0.77, 95\%CI: 0.67 \sim 0.89, P < 0.05$). **Conclusion** HBB is lowly expressed in lung cancer tissue, may be involved in the occurrence and development of lung cancer, and has certain clinical diagnostic value for lung cancer.

Key words: human hemoglobin β ; lung cancer; adjacent tissue; survival analysis; pathological characteristics

* 基金项目: 江苏省南通市科技项目(JC2020070)。

作者简介: 徐鑫鑫, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: fychu19870817@163.com。

肺癌在全球范围内的发病率高,由于缺乏早期诊断方法,大部分肺癌患者被发现时已经处于中晚期^[1]。因此寻找肺癌早期诊断的分子标志物成为临床肺癌诊断和治疗研究中迫切需要解决的问题。人血红蛋白 β (HBB)基因是血液中主要的珠蛋白基因,HBB可作为氧气的转运载体。近年来,随着研究的深入,人们发现 HBB 除了参与血液疾病的发生、发展外^[2],其在肿瘤中也发挥着重要的作用。ONDA 等^[3]发现,HBB 能抑制间变性甲状腺癌 KTA2 细胞生长,这表明 HBB 基因可能是一种新型肿瘤抑制基因。目前,HBB 在肺癌中的研究还相对较少,本研究通过收集 56 例肺癌患者癌组织及癌旁组织,检测 HBB 的表达并分析其与肺癌临床病理特征的关系,以期对肺癌发生、发展的机制研究提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 4 月至 2011 年 5 月南通市肿瘤医院收治的 56 例肺癌患者为研究对象,收集其经手术病理检查证实的肺癌组织及相应癌旁组织(距离癌灶边缘 5 cm)标本,取材后立即放入 -80°C 冰箱保存。患者术前均未进行放疗及免疫治疗。患者对本研究知情同意,本研究获得医院医学伦理委员会批准。肺癌患者病理分期参照国际肺癌研究协会(IASLC)第七版 TNM 分期标准。

1.2 仪器与试剂 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒购自德国 Roche 公司,反转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,Trizol 试剂购自美国 Ambion 公司,氯仿、异丙醇、无水乙醇购自上海生工生物工程有限公司,HBB 引物由广州锐博生物科技有限公司合成。7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司, 4°C 离心机购自美国 Sigma 公司, -80°C 冰箱购自海尔公司,微量核酸蛋白分析仪购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 检测 HBB 表达 肺癌组织中加入 Trizol 试剂提取总 RNA,反转录为 cDNA。反应体系: $4\mu\text{L } 5\times\text{buffer}$, $2\mu\text{L dNTP}$, $1\mu\text{L OligodT}$,反转录酶 RT,RI 各 $1\mu\text{L}$, $11\mu\text{L DEPC}$ 水及总 RNA。反应条件: $42^{\circ}\text{C } 60\text{ min}$, $72^{\circ}\text{C } 5\text{ min}$ 。以 cDNA 为模板, $\beta\text{-actin}$ 为内参,引物均由广州锐博生物科技有限公司设计及合成。HBB 上游引物: $5'\text{-TCCTTTGT-TCCCTAAGTCCAACACTAC-3'}$,下游引物: $5'\text{-TTAG-GCAGAATCCAGATGCTCAA-3'}$; $\beta\text{-actin}$ 上游引物: $5'\text{-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG-3'}$,下游引物: $5'\text{-ACATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'}$ 。采用 SYBR Green 法检测 HBB 的表达水平,实验中设置 3 个复孔。PCR 反应体系共 $20\mu\text{L}$: $2\mu\text{L}$ 反转录产物,各 $0.8\mu\text{L}$ 上下游引物, $10\mu\text{L}$ Mix 体系和 $6.4\mu\text{L DEPC}$ 水。PCR 反应条件: 95°C 预变性 10 min , 95°C 变性 15 s , 60°C 退火和 72°C 延伸各 30 s ,共 45 个循

环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 HBB 的表达水平。

1.3.2 临床资料收集 收集 56 例肺癌患者的临床资料,包括性别、年龄、吸烟史、病理类型、肿瘤最大径、TNM 分期、淋巴结转移情况、5 年生存情况。

1.3.3 Kaplan-Meier 生存分析 登录 Kaplan-Meier Plotter 数据库(<http://kmplot.com/analysis/>)分析 HBB 与肺癌患者预后的关系。设置条件为(1)Gene:HBB;(2)Cancer:Lung cancer;(3)Split patients:median;(4)Survival:OS;(5)Follow up threshold:60 months。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 和 Graphpad Prism5.0 软件进行数据分析。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)进行诊断效能评价;采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组织中 HBB 表达水平 肺癌组织中 HBB 表达水平为 $7.035(2.339, 13.580)$,低于癌旁组织的 $20.120(5.284, 72.830)$,差异有统计学意义($U=813.0, P<0.05$)。

2.2 肺癌组织中 HBB 表达水平与肺癌患者临床病理特征的关系 肺癌组织中 HBB 高表达 12 例,低表达 44 例。肺癌组织中 HBB 表达水平与性别和 TNM 分期有关($P<0.05$),而与年龄、吸烟史、病理类型、肿瘤最大径及是否有淋巴结转移无关($P>0.05$)。此外,仅追踪到 46 例患者的 5 年生存情况,其中 35 例患者存活,11 例患者死亡,肺癌组织中 HBB 表达水平与患者 5 年生存情况有关($P<0.05$),见表 1。

表 1 肺癌组织中 HBB 表达水平与肺癌患者临床病理特征的关系(n)

临床病理特征	n	HBB 高表达 (n=12)	HBB 低表达 (n=44)	χ^2	P
性别				8.346	0.004
男	38	4	34		
女	18	8	10		
年龄(岁)				0.113	0.737
<65	35	7	28		
≥ 65	21	5	16		
吸烟史(年)				3.065	0.080
≤ 20	40	11	29		
>20	16	1	15		
病理类型				1.134	0.287
腺癌	33	9	24		
鳞癌	15	2	13		
其他	8	1	7		
肿瘤最大径(cm)				1.053	0.305
<5	30	8	22		
≥ 5	26	4	22		

续表 1 肺癌组织中 HBB 表达水平与肺癌患者临床病理特征的关系(n)

临床病理特征	n	HBB 高表达 (n=12)	HBB 低表达 (n=44)	χ^2	P
TNM 分期(期)				4.837	0.028
I ~ II	31	10	21		
III ~ IV	25	2	23		
淋巴结转移情况				1.158	0.282
无	25	7	18		
有	31	5	26		
5 年生存情况				4.544	0.033
存活	35	11	24		
死亡	11	0	11		
不明确	10	1	9		

2.3 HBB 对肺癌的诊断价值 经 ROC 曲线分析, HBB 诊断肺癌的曲线下面积(AUC)为 0.714(95% CI:0.648~0.834),当最佳截断值为 11.91 时,其诊断灵敏度为 71.4%,特异度为 69.6%。见图 1。

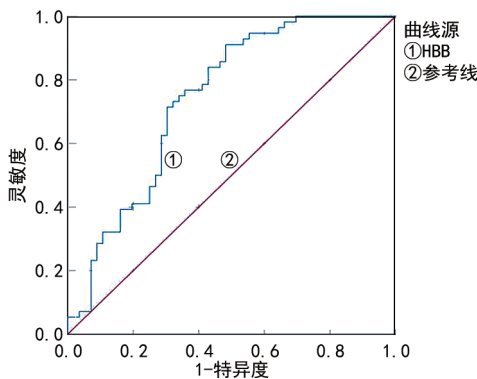


图 1 HBB 诊断肺癌的 ROC 曲线

2.4 HBB 表达水平与肺癌患者预后的关系 Kaplan-Meier 生存分析结果显示, HBB 低表达患者生存率明显低于高表达患者($HR=0.77$, 95% CI:0.67~0.89, $P<0.05$)。见图 2。

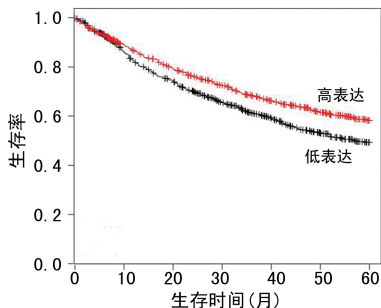


图 2 HBB 表达水平与肺癌患者预后关系的 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨 论

近年来,随着多重靶向药物的研发与应用,肺癌患者总体生存率有所提高,但其发病率和病死率仍居于恶性肿瘤首位。目前,已经明确报道了部分与肺癌相关的癌基因和抑癌基因,包括间变性淋巴瘤激酶

(ALK)^[4]、表皮生长因子受体(EGFR)^[5]、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)^[6]、鼠类肉瘤病毒癌基因同源物 B1 (BRAF)^[7]、p53^[8] 基因等,但还有许多潜在的基因尚未被发现。寻找新的分子标志物和治疗靶点,对探讨肺癌诊断、治疗的新方向具有重要价值。

健康人的血红蛋白是由两个 α 链和两个 β 链组成的四聚体,其主要参与氧气运输。最初的研究认为,血红蛋白专一性表达于红细胞系,但随着研究的不断深入,发现在多种非红细胞系中也存在血红蛋白链的表达,如神经细胞、肾小球系膜细胞、巨噬细胞和肝细胞等^[3,9-10]。HBB 是珠蛋白家族成员之一,可广泛表达于人正常甲状腺组织中^[3],且在鼠肺泡上皮细胞及内皮细胞中也均有表达^[11]。近年来, HBB 与肿瘤的关系引起了研究者的重视。HBB 位于染色体 11p15.5, BEPLER 等^[12] 发现,该位点的缺失与非小细胞肺癌患者预后不良有关。在间变性甲状腺癌中, HBB 表达显著下调,且过表达 HBB 能明显抑制 KTA2 细胞的生长^[3]。另外,外源性加入 HBB 也能够抑制多种肿瘤细胞的增殖^[11]。以上研究表明, HBB 在肿瘤的发生、发展中具有抑制作用。本研究发现,肺癌组织中 HBB 的表达水平明显低于癌旁组织,这与 RHO 等^[13] 的报道一致。临床病理特征分析表明, HBB 的表达水平与肺癌患者的性别和 TNM 分期有关($P<0.05$),而与年龄、吸烟史、病理类型、肿瘤最大径及是否有淋巴结转移无关($P>0.05$)。ROC 曲线分析显示, HBB 诊断肺癌的 AUC 为 0.714,当最佳截断值取 11.91 时,诊断灵敏度为 71.4%,特异度为 69.6%。这表明 HBB 可作为肺癌诊断的潜在分子标志物。

基因的表达变化受多种因素影响,如杂合性缺失、DNA 甲基化、非编码 RNA 调节及外界环境的变化等^[14-15]。ONDA 等^[3] 研究发现,在未分化甲状腺癌中 HBB 的启动子存在半甲基化,其导致 HBB 表达水平降低。氧化应激状态下,活性氧(ROS)能够以依赖 Krüppel 样锌指转录因子 4(KLF4)的方式促进 HBB 的表达^[16]。关于肺癌组织中是否也存在类似机制还需要进一步研究。目前, HBB 在肿瘤发生、发展中的机制还不太明确。有研究发现, HBB 能够抑制神经母细胞瘤在肺组织中的微小转移^[11]。微小转移灶内神经母细胞瘤可能通过分泌可溶性因子刺激肺泡内皮细胞及血管内皮细胞中 HBB 表达上调。这两种细胞可能将 HBB 旁分泌至细胞外并与肿瘤细胞表面的 HBB 受体结合,进而以胞吞、胞饮的方式进入肿瘤细胞,激活转化生长因子激酶 1(TAK1)和 p38 信号通路,并下调细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化水平,最终导致转移灶的肿瘤细胞生长抑制及凋亡^[11]。另外, HBB 在肿瘤的免疫逃逸机制中也可能具有一定的作用。HBB 可作为肿瘤微环境中的相关抗原被 T 细胞识别,并导致 T 细胞向 CD8⁺ 分化。BALB/c 小鼠

在接种 HBB33-42 多肽疫苗后可使其免受肿瘤细胞的攻击,疫苗发挥的保护作用不是直接作用于肿瘤细胞,而是通过与血管周细胞中的 HBB 发生免疫应答反应,限制或破坏肿瘤相关血管的结构来达到抗肿瘤作用^[17]。因此笔者推测,在某些外界因素的作用下,正常肺组织中 HBB 表达会下调,HBB 表达下调一方面可能直接导致正常肺泡上皮细胞的恶性转变,另一方面则可能导致体内免疫靶点的缺失,从而使肿瘤微环境朝着有利于肿瘤生长的方向发展,最终促进肺癌的发生、发展。但也有些研究持相反的观点,有研究发现,在前列腺癌患者的尿液及口腔舌鳞状细胞癌患者的唾液中都可以检测到高水平的 HBB^[18-19]。ZHENG 等^[16]通过分析来源于乳腺癌、前列腺癌及非小细胞肺癌中的循环肿瘤细胞(CTC)发现,与原发部位的癌细胞相比,CTC 中 HBB 的表达显著升高,HBB 能保护 CTC 免受 ROS 诱导的凋亡,并促进 CTC 的远处转移。PONZETTI 等^[20]也发现,高表达 HBB 能促进乳腺癌细胞迁移和侵袭,且高表达 HBB 的人群总体生存率较低。而本研究显示,低表达 HBB 的肺癌患者预后较差,这表明在不同的肿瘤中 HBB 可能发挥不同的生物学作用。本研究尚存在一些不足之处,一方面,本研究只在 mRNA 水平检测了 HBB 的表达而没有进行蛋白水平的检测,因此,下一步将通过蛋白质免疫印迹及免疫荧光检测技术,从蛋白水平进一步分析其表达情况;另一方面,本研究样本量偏少,结果可能存在一定的偏倚,后续将扩大样本量,对所得结果进行进一步验证。

参考文献

- [1] BADE B C, DELA CRUZ C S. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention[J]. Clin Chest Med, 2020, 41(1): 1-24.
- [2] KATO G J, PIEL F B, REID C D, et al. Sickle cell disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18010.
- [3] ONDA M, AKAISHI J, ASAKA S, et al. Decreased expression of haemoglobin beta (HBB) gene in anaplastic thyroid cancer and recovery of its expression inhibits cell growth[J]. Br J Cancer, 2005, 92(12): 2216-2224.
- [4] GOLDING B, LUU A, JONES R, et al. The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 52.
- [5] CHONG C R, JANNE P A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer[J]. Nat Med, 2013, 19(11): 1389-1400.
- [6] SONG M, BODE A M, DONG Z, et al. AKT as a therapeutic target for cancer[J]. Cancer Res, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [7] O'LEARY C G, ANDELKOVIC V, LADWA R, et al. Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer [J]. Transl Lung Cancer Res, 2019, 8(6): 1119-1124.
- [8] SKOULIDIS F, HEYMACH J V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(9): 495-509.
- [9] CAPULLI M, ANGELUCCI A, DRIOUCH K, et al. Increased expression of a set of genes enriched in oxygen binding function discloses a predisposition of breast cancer bone metastases to generate metastasis spread in multiple organs[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(11): 2387-2398.
- [10] SAHA D, PATGAONKAR M, SHROFF A, et al. Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous? [J]. Int J Inflam, 2014, 2014: 803237.
- [11] MAMAN S, SAGI-ASSIF O, YUAN W, et al. The beta subunit of hemoglobin (HBB2/HBB) suppresses neuroblastoma growth and metastasis[J]. Cancer Res, 2017, 77(1): 14-26.
- [12] BEPLER G, GAUTAM A, MCINTYRE L M, et al. Prognostic significance of molecular genetic aberrations on chromosome segment 11p15.5 in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(5): 1353-1360.
- [13] RHO J H, ROEHRL M H, WANG J Y. Glycoproteomic analysis of human lung adenocarcinomas using glycoarrays and tandem mass spectrometry: differential expression and glycosylation patterns of vimentin and fetuin A isoforms[J]. Protein J, 2009, 28(3/4): 148-160.
- [14] ANGELONI A, BOGDANOVIC O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation[J]. Essays Biochem, 2019, 63(6): 707-715.
- [15] TAKEMATA N, OHTA K. Role of non-coding RNA transcription around gene regulatory elements in transcription factor recruitment[J]. RNA Biol, 2017, 14(1): 1-5.
- [16] ZHENG Y, MIYAMOTO D T, WITTNER B S, et al. Expression of beta-globin by cancer cells promotes cell survival during blood-borne dissemination[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14344.
- [17] KOMITA H, ZHAO X, TAYLOR J L, et al. CD8⁺ T-cell responses against hemoglobin-beta prevent solid tumor growth[J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 8076-8084.
- [18] DAVALIEVA K, KIPRIJANOVSKA S, MALEVA K I, et al. Comparative proteomics analysis of urine reveals down-regulation of acute phase response signaling and LXR/RXR activation pathways in prostate cancer [J]. Proteomes, 2017, 6(1): 123-126.
- [19] SURESH A, VANNAN M, KUMARAN D, et al. Resistance/response molecular signature for oral tongue squamous cell carcinoma [J]. Dis Markers, 2012, 32(1): 51-64.
- [20] PONZETTI M, CAPULLI M, ANGELUCCI A, et al. Non-conventional role of haemoglobin beta in breast malignancy [J]. Br J Cancer, 2017, 117(7): 994-1006.

(收稿日期: 2021-12-19 修回日期: 2022-04-12)