

· 论 著 ·

# 非小细胞肺癌 hnRNP A2/B1 免疫组化及定量测定的临床意义

卢兆桐<sup>1\*</sup>, 付强<sup>2</sup>, 耿明<sup>1</sup>, 尹格平<sup>1</sup>, 丁吉元<sup>1</sup>, 寇仁业<sup>1</sup>, 邹志强<sup>1</sup>

(1. 济南军区总医院胸外科, 济南 250031; 2. 山东大学医学院, 济南 250031)

**[摘要]** 目的: 探讨 hnRNP A2/B1 对非小细胞肺癌(N SCLC)的诊断价值及与N SCLC 临床病期、淋巴结转移的关系。方法: 标本系胸外科手术切除的石蜡包埋组织或新近手术切除标本, 其中原发性N SCLC 39 例、肺良性肿瘤 22 例、正常肺 50 例, 各组年龄、性别均具可比性。采用免疫组化 S-P 法和流式细胞术(FCM) 分别检测肺组织 hnRNP A2/B1 的表达及细胞内 hnRNP A2/B1 的含量。结果: (1)N SCLC 组 hnRNP A2/B1 免疫组化表达阳性率(74.4%) 显著高于肺良性肿瘤组(40.1%,  $P < 0.01$ ) 及正常肺组(38.0%,  $P < 0.01$ ), N SCLC 组中有淋巴结转移者阳性率(94.7%) 明显高于无淋巴结转移者(55.0%,  $P < 0.05$ ); (2)N SCLC 细胞内 hnRNP A2/B1 定量测定含量( $67.25 \pm 14.02$ , 阳性率 82.1%) 显著高于肺良性肿瘤细胞( $31.79 \pm 6.79$ , 阳性率 4.5%,  $P < 0.01$ ) 及正常肺细胞( $30.15 \pm 5.85$ , 阳性率 0,  $P < 0.01$ ), N SCLC 组中有淋巴结转移者阳性率(100%) 明显高于无淋巴结转移者(65.0%,  $P < 0.05$ )。结论: hnRNP A2/B1 对 N SCLC 的诊断、病情预测、判断淋巴结转移的程度均具有重要的临床价值。FCM 与免疫组化方法相比, 具有阳性率高、简便、快速等优点。

**[关键词]** 肺癌; 癌, 非小细胞肺; hnRNP A2/B1; 免疫组织化学; 流式细胞术

**[中图分类号]** R 734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)11-1202-03

## Immunohistochemical examination and quantitative determination of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in patients with non-small cell lung cancer

LU Zhao-Tong<sup>1\*</sup>, FU Qiang<sup>2</sup>, GENGMing<sup>1</sup>, YN Ge-Ping<sup>1</sup>, DNG Ji-Yuan<sup>1</sup>, KOU Ren-Ye<sup>1</sup>, ZOU Zhi-Qiang<sup>1</sup> (1. Department of Cardiothoracic Surgery, General Hospital, PLA Jinnan Military Area Command, Jinan 250031, China; 2. Medical College, Shandong University, Jinan 250031)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the relationship between heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A2/B1 and non-small cell lung cancer (N SCLC). **Methods:** Specimens were obtained during cardiothoracic surgery, including 39 N SCLC, 22 benign pulmonary lesions, and 50 normal lungs. All the specimens were matchable in terms of age and sex. hnRNP A2/B1 in patients with N SCLC were detected by immunohistochemical technique and flow cytometry (FCM). **Results:** Positive rate of hnRNP A2/B1 in patients with N SCLC was markedly higher than that in the other groups ( $P < 0.01$ ). The positive rate in stage I-II was markedly lower than that in stage III-IV ( $P < 0.05$ ). The positive rate in patients with lymph nodes metastasis was markedly higher than that in patients without lymph nodes metastasis ( $P < 0.05$ ). FCM showed that the positive rate of hnRNP A2/B1 in patients with N SCLC was significantly higher than those in the other groups ( $P < 0.01$ ). The positive rate in stage I-II was markedly lower than that in stage III-IV ( $P < 0.01$ ). The positive rate in patients with lymph nodes metastasis was markedly higher than that in patients without lymph nodes metastasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Detection of hnRNP A2/B1 has a significant value in early diagnosis and prediction of N SCLC.

**[KEY WORDS]** lung tumor; cancer, non-small cell lung; hnRNP A2/B1; immunohistochemical technique; flow cytometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(11): 1202-1204]

\* 肺癌在我国的发病率和病死率居各种恶性肿瘤的首位。近年来关于异质性细胞核糖蛋白 A2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, hnRNP A2/B1) 与非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, N SCLC) 关系的研究引起人们重视。我们采用免疫组化和流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 分别检测了 39 例原发 N SCLC 组织中 hnRNP A2/B1 的表达及细胞内含量, 并与肺良性肿瘤及正常肺进行比较, 以探讨 hnRNP A2/B1 与 N SCLC 的关系及临床意义。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 全部标本均系济南军区总医院胸外科手术切除的石蜡包埋组织或新近手术切除标本。肺癌组 39 例, 其中男性 25 例, 女性 14 例; 年龄 30~78 岁, 平均年龄 53.0 岁。病变 I~II 期 22 例, III~IV 期 17 例; 无淋巴结转移 20 例, 有淋巴结转移 19 例。肺良性肿瘤组 22 例, 男性 14 例, 女性 8 例;

\* [作者简介] 卢兆桐(1956-), 男(汉族), 硕士, 主任医师, 硕士生导师

\* Corresponding author. Email: luzhaotong1956@yahoo.com.cn



年龄 28~71 岁, 平均年龄 52.4 岁。正常肺组 50 例, 男性 34 例, 女性 16 例; 年龄 27~79 岁, 平均年龄 53.5 岁。3 组年龄、性别均无差异。

1.2 试剂 一抗抗 hnRNP A2/B1 单抗(鼠抗人 703D4)由国际癌症协会(美国)M ulshine 博士馈赠; S-P 染色试剂盒购自北京中山生物技术公司; FCM 阴性对照一抗羊抗鼠 IgG, 二抗异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG, 为美国 Pham ingen 产品, 由北京岳泰生物公司提供。

1.3 免疫组化染色 采用 S-P 法进行免疫组化染色, 抗 hnRNP A2/B1 单抗(1:100)4 过夜孵育, DAB 显色。同时以生理盐水取代一抗作阴性对照, 其余条件相同。结果判断根据相关文献<sup>[1]</sup>制定, 采用双盲法对每张切片在高倍镜( $\times 400$ )下计数 15 个视野, 用阳性细胞染色强度和阳性细胞在癌细胞中的比例来判定染色结果。(A)以染色强度分别计: 0 分为无阳性反应细胞, 1 分为浅黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色; (B)以染色阳性细胞比例计: 1 分为阳性细胞数占 1%~10%, 2 分为阳性细胞数占 11%~50%, 3 分为阳性细胞数占 51%~100%。A、B 两项相乘得分 > 2 分被视为免疫染色阳性。

1.4 FCM 测定 取切除的受检组织 0.5~1.0 g, 置于重叠的 100 目铜网及 300 目尼龙网上, 切成 1 mm<sup>3</sup> 碎块, 以眼科镊持碎块在网上轻搓, 边搓边以磷酸盐缓冲液(PBS)将搓下的细胞冲洗入置于网下方的平面皿中, 直至将组织搓完。收集细胞悬液于 10 ml 离心管中, 以 800 r/min 离心 5 min, 以 2 ml

PBS 液漂洗, 再以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 调整细胞数为 10<sup>6</sup>/ml 左右, 4℃ 保存。每支试管各加 500  $\mu$ l 细胞悬液, 再加相应的一抗工作液或阴性对照一抗 20  $\mu$ l 20 min, 再加二抗工作液 20  $\mu$ l, 均避光反应 30 min。上机前以荧光微球调整仪器的变异系数并稳定在 2% 以内, 上机后收集 1 万个细胞, 荧光强度以对数放大, 光散射数据存软盘, 测试完后在 Macintosh 650 计算机上用 CellQuest Plot 软件(BD 公司提供)分析数据, 由 HP 1200 c/PS 打印结果。hnRNP A2/B1 表达量以 hnRNP A2/B1 荧光强度系数大小表示<sup>[2]</sup>。

1.5 hnRNP A2/B1 定量测定阳性界值的确定 本研究测定了 50 例正常肺细胞内 hnRNP A2/B1 含量, ( $\bar{x} \pm 2s$ ) 为 30.15  $\pm$  2  $\times$  5.85, 得 41.85, 选用 45.00 为阳性界值认为是合理的。

1.6 统计学处理 采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 hnRNP A2/B1 免疫组织化学表达 光镜下 hnRNP A2/B1 阳性反应产物呈棕黄色, 颗粒状, 主要分布于肿瘤细胞胞质中, 少数肿瘤细胞核内也见阳性产物, 间质无表达(图 1A); 阴性对照未见 hnRNP A2/B1 反应产物(图 1B)。NSCLC、肺良性肿瘤、正常肺 3 组 hnRNP A2/B1 免疫组化表达阳性率分别为 74.4% (29/39)、40.1% (9/22)、38.0% (19/50), NSCLC 组显著高于其他 2 组 ( $P < 0.01$ )。

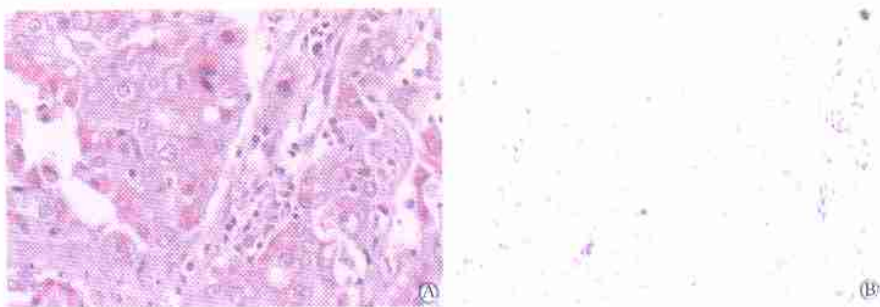


图 1 肺组织 hnRNP A2/B1 免疫组化 S-P 染色结果

Fig 1 Immunohistochemical staining for hnRNP A2/B1 in lung tissue

A: Positive (10  $\times$  40); B: Negative (10  $\times$  10)

2.2 FCM 测细胞内 hnRNP A2/B1 含量 NSCLC 组细胞内 hnRNP A2/B1 的含量为 67.25  $\pm$  14.02, 阳性率 82.1% (32/39) (图 2A); 肺良性肿瘤组细胞内含量为 31.79  $\pm$  6.79, 阳性率 4.5% (1/22) (图

2B); 正常肺组细胞内含量为 30.15  $\pm$  5.85, 均为阴性(图 2C)。NSCLC 细胞内 hnRNP A2/B1 的含量显著高于肺良性肿瘤细胞及正常肺细胞内 hnRNP A2/B1 的含量 ( $P < 0.01$ )。

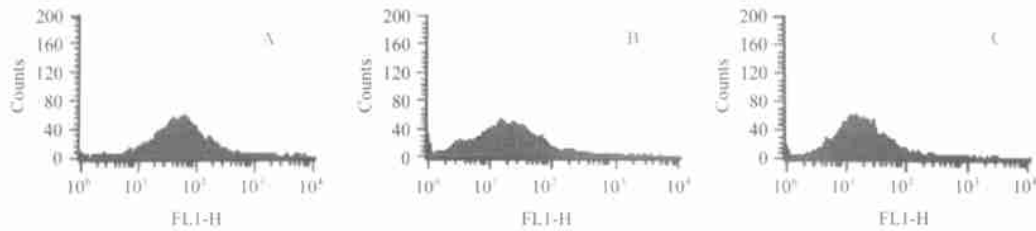


图2 流式细胞术测肺组织细胞内hnRNP A2/B1的含量

Fig 2 Content of intracellular hnRNP A2/B1 in lung tissue by EM C

A: NSCLC cell; B: Lung benign tumor cell; C: Normal lung cell

2.3 NSCLC临床病期与hnRNP A2/B1的关系 I~II期NSCLC患者hnRNP A2/B1免疫组化表达阳性率(13/22, 59.1%)及定量测定阳性率(15/22, 68.2%)均明显低于III~IV期(16/17, 94.1%; 17/17, 100.0%,  $P < 0.05$ )。

2.4 NSCLC淋巴结转移与hnRNP A2/B1的关系 有淋巴结转移患者hnRNP A2/B1免疫组化表达阳性率(18/19, 94.7%)及定量测定阳性率(19/19, 100.0%)均明显高于无淋巴结转移者(11/20, 55.0%; 13/20, 65.0%,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

hnRNP A2/B1是一种重要的RNA连接蛋白,是细胞核中异质性细胞核糖蛋白核心复合体的主要成分,由hnRNP A2和hnRNP B1组成。hnRNP A2和hnRNP B1的相对分子质量分别为34 000和37 000。hnRNP A2/B1基因是7p15的一个单独复制基因,由12个外显子构成。hnRNP A2/B1广泛低量存在于正常肺组织中,参与许多重要的细胞生理作用,包括RNA的拼接,端粒,端粒酶DNA序列的调节,mRNA由胞核到胞质的转运,细胞有丝分裂,成熟,分化及凋亡的调节等<sup>[3-5]</sup>。

近年研究<sup>[1]</sup>发现,肺癌组织中hnRNP A2/B1的异常表达与NSCLC密切相关。本研究采用免疫组化和FCM两种方法分别检测了同一NSCLC患者肿瘤组织中hnRNP A2/B1的表达及癌细胞内hnRNP A2/B1的含量。免疫组化研究结果显示NSCLC组阳性率显著高于肺良性肿瘤组及正常肺组阳性率( $P < 0.01$ ),提示hnRNP A2/B1对非小细胞肺癌具有重要的诊断价值。研究还发现22例I~II期患者中13例阳性,阳性率59.1%;17例III~IV期患者中仅1例阴性,阳性率94.1%;两者相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。20例无淋巴结转移患者中11例hnRNP A2/B1表达阳性,阳性率为55.0%;19例有淋巴结转移患者中也仅1例阴性,阳性率为94.7%;两者相比

有显著性差异( $P < 0.05$ )。提示hnRNP A2/B1表达强度与NSCLC的病变早晚期密切相关,病变越晚期,hnRNP A2/B1的表达阳性率越高。

目前,关于肺癌细胞内hnRNP A2/B1的定量分析国内外均未见报道。本研究采用FCM对NSCLC细胞内hnRNP A2/B1含量进行了定量测定,发现NSCLC细胞内hnRNP A2/B1的含量显著高于肺良性肿瘤细胞及正常肺细胞( $P < 0.01$ )。22例I~II期患者中15例阳性,阳性率为68.2%;17例III~IV期患者均为阳性,两者相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。20例无淋巴结转移者中13例阳性,阳性率65.0%;19例有淋巴结转移者均为阳性,两者相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。

综上所述,采用免疫组化和FCM两种方法检测结果较一致,说明不管选用哪种检测方法对NSCLC的诊断,病情预测,判断预后均具有重要临床价值。但两种方法相比,FCM的敏感性、特异性和阳性率均高于免疫组化法,且具有简便、快速等优点。

致谢:衷心感谢国际癌症协会(美国)James L. Mulshine博士对本研究的大力支持!

### [参考文献]

- [1] Kozu T, Henrich B, Schaffer KP. Structure and expression of the gene(hnRNP A2/B1) encoding the human hnRNP protein A2/B1[J]. *Genomics*, 1995, 25(2): 365-371.
- [2] 孙晓明, 尹格平. 实体肿瘤组织细胞粘附分子流式细胞研究方法的建立[J]. *中华医学检验杂志*, 1997, 20(1): 9.
- [3] Zhou J, Mulshine JL, Ro JY, et al. Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in bronchial epithelium of chronic smokers[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(7): 1631-1640.
- [4] Man YG, Martinez A, Avis M, et al. Phenotypically different cells with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression show similar genetic alterations [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 23(5): 636-645.
- [5] Fielding P, Turnbull L, Prime W, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(12): 4048-4052.

[收稿日期] 2004-04-19

[修回日期] 2004-08-16

[本文编辑] 孙岩