

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00146

亲环素在非小细胞肺癌中的高表达及其与临床病理特征的关系

冯艳铭, 吴卫东, 燕 贞, 姚 武, 吴逸明*

郑州大学公共卫生学院劳动卫生与职业病教研室, 郑州 450052

[摘要] **目的:**观察亲环素 A(CyPA)在非小细胞肺癌(NSCLC)癌组织中的分布和表达,探讨其在 NSCLC 发生发展中的临床意义。**方法:**应用组织芯片免疫组织化学技术,检测 45 例 NSCLC 手术患者切除的肺癌组织,22 例相应的癌旁组织,33 例相应的正常肺组织中 CyPA 的蛋白表达水平,分析其与 NSCLC 分期、病理等临床特征的关系。**结果:**CyPA 在 NSCLC 癌组织和癌旁组织中表现为高表达水平,与相应的肺正常组织中 CyPA 的表达有显著性差异($P < 0.05$);CyPA 的表达水平与 NSCLC 患者的细胞分化程度、病理分型均无明显关系。**结论:**CyPA 在 NSCLC 中的高表达,提示其可能是 NSCLC 的发生发展中的生物特征之一,其作用及机制有待进一步研究。

[关键词] 肺肿瘤;非小细胞肺癌;亲环素 A;微芯片;免疫组织化学

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0146-04

High CyPA expression in non-small cell lung cancer and its relationship with clinical pathological characteristics

FENG Yan-ming, WU Wei-dong, YAN Zhen, YAO Wu, WU Yi-ming*

Department of Occupational Medicine, Institution of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression and distribution of CyPA in non-small cell lung cancer (NSCLC) and to evaluate its clinical significance in the development and progression of NSCLC. **Methods:** The expression of CyPA was examined in 45 NSCLC tissues, 22 paired tumor-adjacent tissues and 33 normal pulmonary tissues using tissue microarray immunohistochemistry method. The relationship between CyPA expression in NSCLC and clinic pathological characteristics of NSCLC was analyzed. **Results:** Expression of CyPA in NSCLC tissues and paired tumor-adjacent tissues was significantly higher than that in the normal pulmonary tissues ($P < 0.05$). No significant correlation was found between the expression of CyPA and differentiation and histological types of NSCLC. **Conclusion:** CyPA is overexpressed in NSCLC tissues, suggesting that CyPA might serve as a biomarker for the development and progression of NSCLC, whose specific role remains to be further studied.

[KEY WORDS] lung neoplasms; non-small cell lung carcinoma; cyclophilin A; microarray; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 146-149]

亲环素(cyclophilin, CyP)^[1]是一个功能相关的蛋白家族,具有肽基脯氨基顺反异构酶活性,能催化细胞内蛋白质的折叠、装配和运输,起分子伴侣的作用。根据在细胞中的分布和氨基酸序列等特征, Cyp 大体可分 3 种,即 CyPA、CyPB 和 CyPC。CyPA 位于胞质,从原核生物细胞到人类 CyPA 广泛存在并且高度保守。人 CyPA 长 165 个氨基酸,相对分子质量为 18 000,是免疫抑制剂环孢素 A(CsA)在细胞内专一性的受体蛋白。新近研究表明,CyPA 与多种恶性肿瘤的发生发展有关,其在肺癌中的表达也明显升高^[2-4],但 CyPA 在非小细胞肺

癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)的发生发展中的作用尚不清楚。本研究采用 SP 免疫组化方法和组织芯片技术,观察 CyPA 在 NSCLC 癌组织、癌旁组织及正常组织中的表达和分布情况,并分析其与临床病理指标的关系,探讨 CyPA 在 NSCLC 发生发展中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 材料 NSCLC 癌及边缘组织组织芯片购自陕西超英生物公司(编号 CC04-11,批号 CC04-11-001),点阵总数为 100 点,兔抗人 CyPA 单抗 Up-

[收稿日期] 2007-10-31 **[接受日期]** 2008-01-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30571552). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571552).

[作者简介] 冯艳铭,博士. E-mail: xie-chenghao@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0371-66913091, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

state 产品购自上海优宁维公司,SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.2 标本 包括 45 例 NSCLC 患者手术切除的肺癌组织,22 例对应的癌旁组织,33 例对应的正常肺组织。45 例 NSCLC 手术患者中男性 33 例,女性 12 例;年龄 32~74 岁,中位年龄 53 岁;鳞癌 25 例,腺癌 20 例;按 TNM 分期标准 I+II 期 27 例,III 期 18 例。对应的癌旁组织是距病变部位 1.5 cm 的肺组织,对应的正常肺组织是癌旁的远端组织。标本用中性甲醛溶液固定,并详细记录每例标本的临床资料,按病理常规方法制成蜡块后保存备用。

1.3 免疫组化(SP 方法)检测 CyPA 的表达 60℃ 烤片 30 min,将贴附有组织芯片的玻璃片按常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化;0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.0) 高压修复抗原,冷却至室温,PBS 洗 5 min×2 次。每张切片加 3% H₂O₂-甲醇封闭内源性过氧化物酶,室温 10 min,PBS 洗 5 min×2 次,滴加非免疫性动物血清,室温孵育 10 min;甩去血清,勿洗,加 2 滴兔抗人 CyPA 一抗(1:100),4℃ 冰箱过夜;0.1% Tween-PBS 洗 5 min×3 次;加 2 滴生物素标记山羊抗兔 IgG(H+L),室温孵育 12 min;加 2 滴链霉菌抗生物素-过氧化物酶,室温孵育 12 min;0.1% Tween-PBS 洗 5 min×3 次;DAB 显色,显微镜下观察控制显色,阳性显色为棕色,蒸馏水洗终止显色;苏木精复染、水洗、分化后充分水洗返蓝;常规脱水透明,中性树胶封片,显微镜下观察摄像。组织芯片上设一阳性对照标记位点,同时以 PBS 代替一抗作为空白对照,与所有临床样本在相同条件下平行进行检测。

1.4 结果判定 免疫组化阳性反应为细胞质或细

胞核中有棕黄色颗粒沉着。蛋白累积的评分方法参照 Fromwitz 综合计分法并略加修改行半定量分析:在 400 倍高倍镜下,随机选择 5~10 个不同的视野各计数 10~20 个癌细胞,共 100 个癌细胞左右,记录阳性细胞的百分数和染色特征。染色计分:阳性百分率<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;着色强度计分:无着色为 0 分,浅棕色为 1 分,棕色为 2 分,深棕色为 3 分。根据上述两项指标进行综合评分,0 分为阴性(-),1 分为可疑阳性(±),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中度阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。读片在 2 位资深病理科医师指导下进行,有争议的结果由 3 位病理科医师共同讨论决定。

1.5 统计学处理 采用 SAS9.0 软件进行单项有序资料秩和检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CyPA 在 NSCLC 肺癌组织及对应的癌旁组织、正常肺组织中的表达 CyPA 在 NSCLC 肺癌组织及对应的癌旁组织均有阳性表达,其阳性信号见于肺癌细胞质、肺泡上皮细胞质,呈棕色颗粒状(图 1A、1B),其分布以广泛性表达为主,偶见局灶性或散在性分布;正常肺组织未见棕色颗粒沉着(图 1C)。45 例 NSCLC 肺癌组织与其对应的癌旁组织中 CyPA 的表达无显著性差异($H=0.378 0, P>0.05$);和其对应的正常肺组织中 CyPA 蛋白的表达呈现显著性差异($H=4.252 4, P<0.05$);癌旁组织和对应的正常肺组织中 CyPA 表达也有显著性差异($H=5.191 7, P<0.05$),结果见表 1。

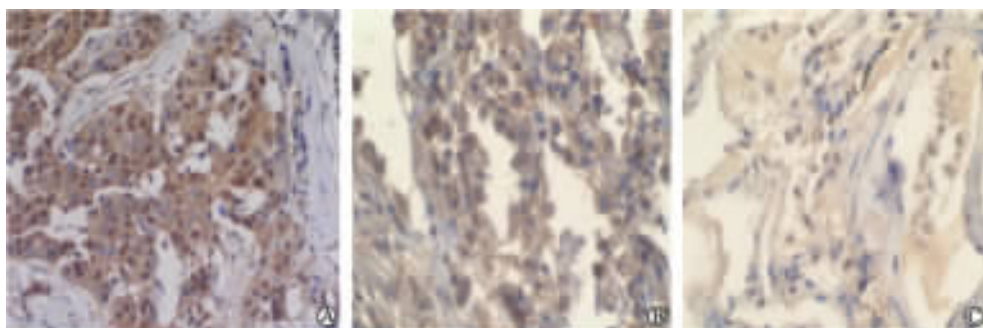


图 1 CyPA 在肺癌组织、癌旁组织及正常组织中的表达

Fig 1 Expression of CyPA in lung cancer tissues, tumor-adjacent tissues and normal tissues

A: Lung cancer tissues (SABC, original magnification: $\times 200$); B: Tumor-adjacent tissues (SABC, original magnification: $\times 400$); C: Normal tissues (SABC, original magnification: $\times 400$)

表 1 CyPA 的表达水平与肺癌、癌旁组织及正常组织中的关系

Tab 1 Expression of CyPA protein and its relationship with clinical characteristics of NSCLC

Tissue	N	CyPA(n)				
		—	±	+	++	+++
Lung cancer tissue	45	2	6	23	9	5
Tumor-adjacent tissue	22	4	6	11	1	0
Normal lung tissue	33	26	4	3	0	0

Lung cancer tissues vs tumor-adjacent tissues, $H=0.3780, P>0.05$; Lung cancer tissues vs normal lung tissues, $H=4.2524, P<0.05$; Tumor-adjacent tissues vs normal lung tissues, $H=5.1917, P<0.05$

2.2 CyPA 的表达水平与 NSCLC 临床特征的关系 按病理分型对 45 例 NSCLC 癌组织样本中 CyPA 的表达水平进行秩和检验分析, $H=0.2654$,

$P=0.6064$;按 TNM 分级进行分析, $H=0.1659$, $P=0.6838$,提示 CyPA 的表达水平与 NSCLC 临床特征无统计学差异(表 2)。

表 2 CyPA 的表达水平与 NSCLC 临床特征的关系

Tab 2 Expression of CyPA protein and its relationship with clinical characteristics of NSCLC

Characteristic	N	CyPA(n)					H	P value
		—	±	+	++	+++		
Histologic type								
Squamous cell carcinoma	25	1	3	13	5	3	0.2654	0.6064
Adenocarcinoma	20	1	4	9	4	2		
TNM stage								
I + II	27	1	5	14	4	3	0.1659	0.6838
III + IV	18	1	2	7	6	2		

3 讨论

新近研究表明, CyPA 参与了许多癌的发生和发展过程, 张慧珍等^[2]应用蛋白质组学方法对高丰度的肺癌特异表达蛋白点进行鉴定发现 CyPA; Howard 等^[3-4]利用 MALDI-TOF 的质谱仪电击肿瘤部位, 鉴别出两种在肺癌细胞中水平升高的 MIF 和 CyPA 蛋白, 并在 NSCLC 细胞株 ADLC-5M2 和 LC-103H 中, 通过 RNAi 技术敲除 CyPA, 发现细胞的增殖能力、侵袭迁移能力降低; Li 等^[5]在人胰腺癌细胞和组织中也发现 CyPA 高表达, 并且外源性 CyPA 能促使胰腺癌细胞生长; Semba 等^[6]通过蛋白表达图谱分析, 认为 CyPA 是抑癌候选基因 Fhit 基因调控细胞 G₁ 向 S 期演进的靶点。Pan 等^[7]通过 RNAi 和 CsA 预处理 HEK 293 细胞发现 CyPA 是 CXCR4 介导的不均一核糖核蛋白 A2 核输出以及 ERK1/2 激活、趋化细胞迁移所必需的, 而 CXCR4 在肿瘤的发生发展侵袭中发挥重大作用。Yang 等^[8]通过分析几种肺癌细胞和正常细胞中 CyPA 与 CD147 的表达水平, 发现小细胞肺癌 (SCLC) H446 细胞呈现高表达, 外源 CyPA 刺激 H446 细胞生长和激活 ERK1/2, 认为 CyPA 可能是 SCLC 新的治疗靶点。Choi 等^[9]也发现缺氧诱导因

子 1 α 转录因子可以上调 CyPA 的表达, 而 CyPA 的表达可阻止缺氧和顺铂诱导的凋亡, 这可能与 ROS 产生、线粒体膜电位去极化受抑制有关, 采用 RNAi 敲除 CyPA 可以扭转该现象, 提示 CyPA 可能在肿瘤发生尤其是凋亡中是很重要的。

组织芯片技术是一种高通量分析平台, 将免疫组化技术与组织芯片技术相结合, 可形成完整的高通量蛋白表达分析系统^[10-11], 本研究采用该技术观察 CyPA 在 NSCLC 中的表达水平, 结果发现 CyPA 在 NSCLC 癌组织中表达水平与正常肺组织相比明显上升, 这与 Howard 等^[4]的研究是一致的; 但肺癌组织与癌旁组织中 CyPA 的表达无明显差异, 进一步研究发现 CyPA 的表达水平与肺癌患者的病理分型、分化程度、临床分期均无明显关系, 这可能是因为肿瘤的发生是多阶段、多因素、多步骤的过程, 涉及到大量相关基因结构和调控异常的改变, 使得 CyPA 未能显示出主导地位。关于 CyPA 表达与肿瘤侵袭、转移的关系可能需在高转移肺癌细胞系中进一步研究。

综上所述, CyPA 作为一个保守蛋白在 NSCLC 癌组织中的高表达, 提示在肺癌的形成过程中, CyPA 可能是 NSCLC 表达的生物学特性之一, 有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Yao Q, Li M, Yang H, Chai H, Fisher W, Chen C. Roles of Cyclophilins in cancers and other organ systems [J]. *World Surg*, 2005, 29: 276-280.
- [2] 张慧珍, 巴月, 杨继要, 范清堂, 吴逸明. 肺癌相关蛋白的筛选与鉴定[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28: 6-8.
- [3] Howard B A, Furumai R, Campa M J, Rabbani Z N, Vujaskovic Z, Wang X F, et al. Stable RNA interference mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small cell lung tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 8853-8860.
- [4] Howard B A, Zheng Z, Campa M J, Wang M Z, Sharma A, Haura E, et al. Translating biomarkers into clinical practice: prognostic implications of cyclophilin A and macrophage migratory inhibitory factor identified from protein expression profiles in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer* 2004, 46: 313-323.
- [5] Li M, Zhai Q, Bharadwaj U, Wang H, Li F, Fisher W E, et al. Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147 [J]. *Cancer*, 2006, 106: 2284-2294.
- [6] Semba S, Huebner K. Protein expression profiling identifies cyclophilin A as a molecular target in Fhit-mediated tumor suppression [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4: 1-10.
- [7] Pan H, Luo C, Li R, Qiao A, Zhang L, Mines M. Cyclophilin A is required for CXCR4-mediated nuclear export of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2, activation and nuclear translocation of ERK1/2, and chemotactic cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 623-637.
- [8] Yang H, Chen J, Yang J, Qiao S, Zhao S, Yu L. Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361: 763-767.
- [9] Choi K J, Piao Y J, Lim M J, Ha J, Choe W, Kim S S. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 3654-3662.
- [10] Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays [J]. *Biotechniques*, 2004, 36: 98-105.
- [11] 李军, 张爱萍, 王军霞, 刘铺. 组织芯片在肿瘤标志物高通量分析中的应用 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2004, 11: 785-789.

[本文编辑] 孙岩

• 消息 •

国内第一个肿瘤介入学专业委员会在上海成立

上海市抗癌协会肿瘤介入专业委员会 2007 年 12 月 26 日在我校东方肝胆外科医院成立, 首届上海肿瘤介入医师论坛同时开讲。据我国肝胆外科奠基人吴孟超院士介绍, 这是国内首个肿瘤介入专业委员会, 该委员会的成立, 将规范介入治疗的技术方法, 积极为不可切除肝癌提供有效治疗。

介入治疗是指在医学影像技术如 X 线透视、超声波等引导下, 用穿刺针、导丝等精密器械进行疾病诊断和治疗的过程, 现已成为继外科、内科之后的第三大临床诊疗体系。介入治疗具有微创、简便、安全、重复性强等鲜明的学科特点, 为肿瘤、心血管系统疾病等疾病提供了一种全新的治疗途径, 现已被学术界和广大患者所认同。根据介入诊疗途径的不同, 介入治疗可分为血管性介入治疗和非血管性介入治疗两类。前者主要包括经导管血管内化疗性栓塞、放疗性栓塞、灌注化疗或生物免疫治疗等; 后者有瘤内无水乙醇注射治疗, 微波、射频、氩氦刀、激光局部消融治疗等。近 30 年的介入医学实践证明, 介入治疗是目前恶性实体瘤非手术治疗中使用最广、疗效最好的方法之一, 有效地提高了患者的生存期和生活质量。如以肝癌血供为理论基础的经导管肝动脉化疗栓塞 (TACE), 无论在肿瘤缩小、甲胎蛋白下降等疗效学考核和生存期、生存质量的评价方面, 都明显超过了其他非手术疗法; TACE 使不能手术的大肝癌变小而得以切除, 成为二期手术前的有效措施; 新近的研究表明, 微小肝癌的综合介入疗效甚至可与手术切除相媲美。因此, 介入治疗已被公认为不可切除肝癌最佳的姑息性治疗手段。应特别指出, 肝癌外科切除疗效最佳, 但 80% 以上的患者发现时已无法手术, 他们和肝癌切除后复发的患者几乎都要接受不同种类的介入治疗。这意味着介入治疗的进步将影响到整个肝癌人群的总体疗效和预后。东方肝胆外科医院已累计完成肝癌 TACE 等介入治疗 4 万余例次, 目前肝癌 TACE 和局部消融治疗的年介入总量已达 8 000 余例次, 均为国内第一。