

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.027

TNC 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义*

葛忠虎 程庆书 李维妙 冯 征 文苗苗 王文辰 张志培[△]

(第四军医大学唐都医院胸腔外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:肺癌是威胁人类健康最常见的恶性肿瘤之一,并且已有超过 1/3 的 NSCLC 患者诊断时发生了转移。早期判断肺癌的转移对于肺癌患者的治疗和预后有着非常重要的意义。Tenascin-C(TNC)具有调节细胞发生、增殖、迁移、分化的作用。本文主要研究 Tenascin-C(TNC)蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达,探讨 Tenascin-C 与 NSCLC 临床病理特征之间的关系。**方法:**采用免疫组织化学 EnVision 法检测 70 例 NSCLC 及其正常组织内 TNC 蛋白的表达情况,并分析肺癌组织中 TNC 的表达和临床病理特征之间的关系。**结果:**TNC 在 NSCLC 组织内高表达而在正常组织中不表达。TNC 在腺癌和鳞癌中表达差异无统计学意义($P>0.05$)。TNC 表达与 NSCLC 的 TNM 分期、有无侵犯胸膜及淋巴结转移有关($P<0.05$),但其表达与肿瘤直径、病理分级无关($P>0.05$)。**结论:**结果显示 TNC 的表达与肺癌的分类无关。进一步的分析表明,TNC 表达与 NSCLC 的肿瘤的 TNM 分期、有无胸膜浸润及淋巴结转移有关,但其表达与肿瘤直径、病理分级无关。故 TNC 在 NSCLC 组织中的表达与 NSCLC 的侵袭和转移有关,其表达可能有助于肿瘤细胞的转移和癌细胞浸润,检测其表达有助于判断肺癌患者的预后。

关键词:非小细胞肺癌;TNC;免疫组化

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)31-6103-04

Expression of TNC in NSCLC and its Clinical Significance*

GE Zhong-hu, CHENG Qing-shu, LI Wei-miao, FENG Zheng, WEN Miao-miao, WANG Wen-chen, ZHANG Zhi-pe[△]

(Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: Lung cancer is one of the most common malignant tumors threatening human health in the world, one third of the NSCLC patients have shifted at diagnosis. Early judgment of lung cancer metastasis has a very important significance on treating and predicting the prognosis of NSCLC patients. Tenascin-C (TNC) has to regulate the action of cells, proliferation, migration and differentiation. To investigate the expressions of TNC proteins in non small cell lung cancer (NSCLC) and explore the relationship between TNC and clinical pathological features in NSCLC. **Methods:** The expressions of TNC protein were detected with EnVision immunohistochemistry method in the tumor tissues and normal tissue from 72 cases of NSCLC patients. The relationship between the TNC expression and NSCLC clinical pathological features was evaluated. **Results:** TNC was expressed highly in NSCLC tissues, but not in normal tissues expression. TNC expression had no significant difference between in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma ($P>0.05$). The expression of TNC protein was associated with the TNM stage, lymph node metastasis, tumor invasion pleura ($P<0.05$), but not with the patients tumor diameter and pathological grades ($P>0.05$). **Conclusion:** Further analysis showed that TNC expression had associated with the tumor TNM staging of NSCLC, presence of pleural invasion and lymph node metastasis, but its expression had nothing to do with the tumor diameter, pathologic stage. The TNC was high expression in the NSCLC, which may play an important role in invasion and metastasis. In the NSCLC, its expression may contribute to the transfer of tumor cells and cancer cells infiltration, detecting its expression helps us to judge the survival time of lung cancer patients.

Key words: Non-small cell lung cancer; TNC; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)31-6103-04

前言

肺癌是目前最常见威胁人类生命健康的恶性肿瘤之一,占肿瘤总死亡率的 1/6,居各类肿瘤之首^[1]。尽管随着手术、放疗、分子靶向及生物免疫治疗等多种方法的不断推进,但非小细胞肺癌(NSCLC)患者总的 5 年生存率仍仅为 27.2%—

40.6%,其主要原因是 NSCLC 患者诊断时已有超过 1/3 发生了转移,因此转移成为 NSCLC 患者预后不良的重要因素^[2]。如何早期判断肺癌的转移对于肺癌患者的治疗和预后有着非常重要的意义。Tenascin-C(TNC)是一种大分子量细胞外基质糖蛋白,在胚胎发育、炎症反应以及伤口愈合的过程中一过性表达,具有调节细胞发生、增殖、迁移、分化的作用^[3]。TNC 蛋白在肿瘤

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30973379)

作者简介:葛忠虎(1986-),男,硕士,住院医师,主要研究方向:肿瘤病理分子学

[△]通讯作者:张志培,电话:029-84777934, E-mail: zzpzyy@fimmu.edu.cn

(收稿日期:2014-02-26 接受日期:2014-03-21)

组织中高表达时往往与肿瘤的病理分级、分期、浸润和淋巴结转移相关^[4]。但是 TNC 蛋白在 NSCLC 组织分类、分级分期中的表达及与转移相关性未见报道。本文采用免疫组化法探讨 TNC 在 NSCLC 组织中的表达,为近一步研究 TNC 是否在 NSCLC 转移中起到重要作用提供基础理论依据。

1 资料与方法

1.1 标本的采集与储存

收集 2012 年 10 月至 2013 年 5 月我院胸外科手术切除的 NSCLC 新鲜标本 70 例,每份标本至少取两块,分别是肿瘤组织和肿瘤旁正常组织。离体后快速采集标本,放入 -80℃ 冰箱保存。其中腺癌 30 例,鳞癌 40 例。男 46 例,女 24 例,年龄 28~77 岁。将标本用 10% 中性福尔马林固定,经脱水、透明、浸蜡,进行常规石蜡包埋。

1.2 免疫组织化学染色

兔抗人 Tenascin-c 多克隆抗体购自美国 Epitomics 公司,免疫组化试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。切片脱蜡至水,尿素消化,过氧化氢封闭,用柠檬酸缓冲液进行微波修复,血清封闭,加一抗 4℃ 过夜;37℃ 复温,加入二抗 37℃ 恒温反应(中间各步用 PBS 漂洗),加 DAB 显色,显微镜观察终止显色。苏木精复染,脱水透明封片,在光学显微镜下观察。用已知阳性表达和不表达组织作为阳性和阴性对照;以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.3 免疫组织化学结果判断

免疫组织化学评判标准:在 400 倍光学显微镜下观察到细

胞外基质有特异性棕色或黄色颗粒判定为 TNC 蛋白阳性表达,TNC 染色分布于细胞外基质局部,未形成明显的条索状特异性染色判定为(+);TNC 在基质中明显表达,形成明显的条索状及网格状特异性染色判定为(++);TNC 在基质中大量表达,形成明显的条索状及网格状特异性染色判定为(+++)。

1.4 统计学处理统计分析

采用 SPSS18.0 进行统计学分析。肺癌分类、分级、淋巴结转移 2 组间表达差异采用 Mann-Whitney U 检验;病理分期、肿瘤大小多组间差异采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 NSCLC 组织中 TNC 的表达

免疫组织化学结果显示:TNC 在 NSCLC 组织内主要分布在肺癌细胞周围的细胞基质内,形成条索状连接成网(图 1),在正常肺组织内未见 TNC 阳性表达。TNC 在腺癌和鳞癌中的阳性表达率分别为 90.0% 和 82.5%,其表达差异无统计学意义($P=0.132$) (表 1)。TNC 在不同肿瘤直径分组中的阳性表达差异无统计学意义($P=0.079$) (表 1)。进一步的分析显示:TNC 的表达与肿瘤胸膜侵袭和淋巴结的转移有关,其两者的差异有统计学意义($P=0.000$) ($P=0.024$) (表 1)。TNC 在肺腺癌、鳞癌 TNM 分期之间的表达差异性有统计学意义($P=0.044$) (表 1),但 TNC 在中、低分化腺癌的表达差异性无统计学意义($P=0.739$),在鳞癌 II、III 级中的表达差异性无统计学意义($P=0.148$) (表 1)。

2.2 NSCLC 组织中 TNC 的表达与临床病理特征的关系

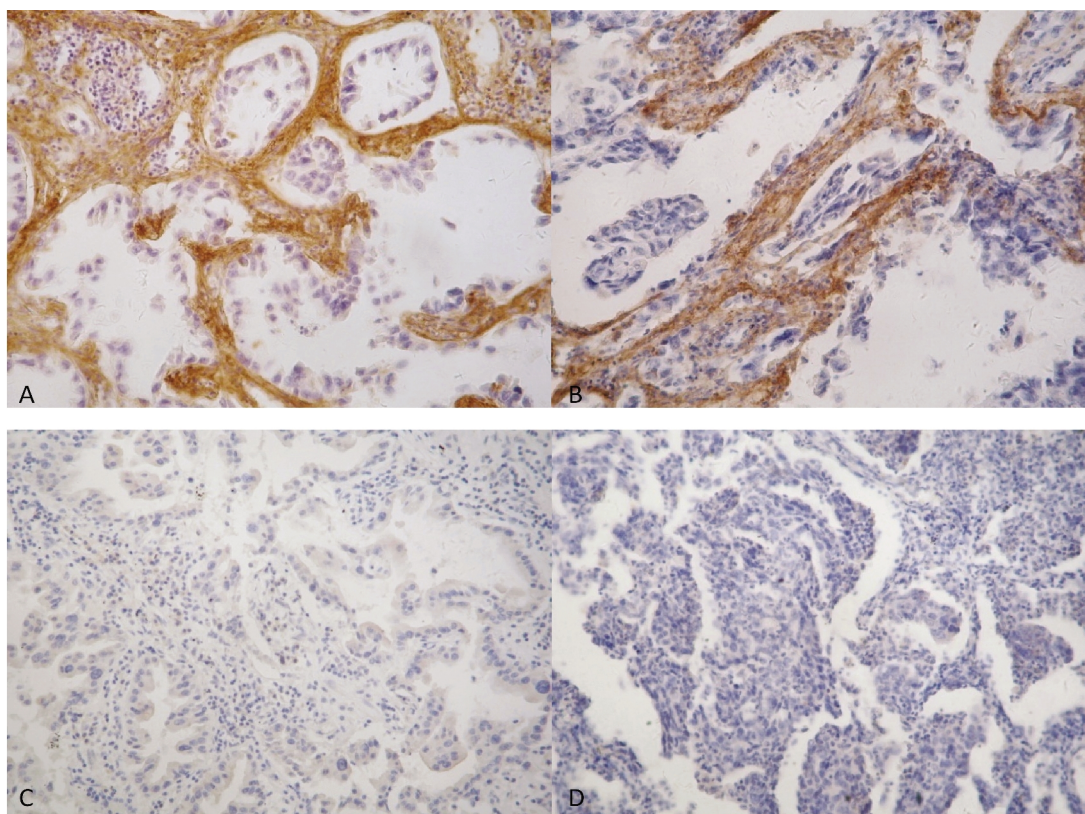


图 1 TNC 在肺腺癌和鳞癌中的表达。A、C:肺腺癌;B、D:肺鳞癌;A、B: TNC 阳性着色;C:肺腺癌空白对照;D:肺鳞癌空白对照;A、B、C、D: EnVision× 200

Fig. 1 F.TNC expression in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinomas. A, C: lung adenocarcinoma; B, D: squamous cell carcinomas; A, B: TNC positive staining; C: Lung adenocarcinoma blank control; D: Lung squamous carcinoma blank control; A, B, C, D: EnVision× 200

研究表明 TNC 蛋白在 NSCLC 组织中的阳性表达差异性与病理分类、病理分级、肿瘤大小无关($P>0.05$),而与 TNM 分期和是否有胸膜侵袭及淋巴结转移有关($P<0.05$)。实验结果显

示 TNC 多表达于 NSCLC 癌巢周围细胞外基质、基底膜。TNM 分期差、有肺内外转移及胸膜侵袭的阳性表达率均高,随着 NSCLC 恶性程度增高,TNC 表达也越强。

表 1 TNC 表达与非小细胞肺癌组织临床病理参数间的关系

Table 1 Relationship between TNC expression and the clinical pathological parameters of non-small cell lung cancer tissue

Grouping	Case number	TNC				Positive rate	Statistic
		-	+	++	+++		
Pathological type							
adenocarcinoma	30	3	8	12	7	90.0%	P=0.132
squamous carcinoma	40	7	13	16	4	82.5%	U=479.5
Diameter of tumor							
≤ 3	19	5	7	6	1	73.7%	P=0.079 $\chi^2=5.088$
> 3-≤ 5	23	4	5	8	6	82.6%	
> 5	28	1	9	14	4	96.4%	
Invade the pleura							
Yes	39	3	4	21	11	92.3%	P=0.000
No	31	7	17	7	0	77.4%	U=218.0
Lymphatic metastasis							
Yes	59	7	16	25	11	88.1%	P=0.024
No	11	3	5	3	0	72.7%	U=192.0
TNM stage							
I	1	1	0	0	0	0.0%	P=0.044 $\chi^2=8.088$
II A	19	5	7	6	1	73.7%	
II B	23	2	7	8	6	91.3%	
III A	27	2	7	14	4	92.6%	
Pathological grading							
adenocarcinoma							
Moderately differentiated	21	3	5	8	5	85.7%	P=0.739 U=87.5
Poorly differentiated	9	0	3	4	2	100.0%	
Squamous carcinoma							
II stage	21	5	8	6	2	76.2%	P=0.148
III stage	19	2	5	10	2	89.5%	U=149.0

3 讨论

肺癌的治疗方法包括手术、化疗、放疗、靶向治疗、生物治疗等多种方法,但是肺癌的预后较差,其中早期转移是导致临床肿瘤治疗失败的主要原因之一。恶性肿瘤的浸润转移过程主要分为:启动、进展、定植、产生毒性效应的阶段,细胞外基质与细胞粘附分子结合所致的肿瘤细胞游离出或通过基底膜的过程,是恶性肿瘤浸润性生长和远处转移的始动步骤^[5,6]。TNC 是细胞外基质中一种具有独特六臂体结构的寡聚糖蛋白,它具有细胞信号传递、抑制细胞黏附、促进细胞增殖等多种功能,进而参与胚胎形成、肿瘤发生与增殖、组织创伤修复等过程^[7]。研究表明 TNC 含有 3 个结构域,分别为富含半胱氨酸的类似表皮生长因子的重复片段、类似Ⅲ型纤连蛋白的重复片段和一个类似纤维蛋白原的片段^[8]。由于 TNC 的独特结构,使它同时具有生长因子和黏附调节因子的作用。

研究显示 TNC 短暂表达于胚胎发育期,成年组织无表达或特定组织弱表达,而 TNC 在许多恶性肿瘤中都有过度表达(乳腺癌、人脑胶质细胞瘤、大肠癌等),且其表达与肿瘤的恶性生物学行为显著相关^[9,10]。目前研究表明 TNC 氨基酸序列中的生长因子样重复序列,能与肿瘤细胞表面的生长因子受体连

接,使肿瘤细胞与细胞外间质发生相互作用从而促进癌细胞的浸润和转移^[11]。在另一项间质损伤修复的研究中,发现 TNC 以其抗黏附作用参与肿瘤的转移或促进癌细胞浸润,在肿瘤细胞外基质中检测到的 TNC 可以促进癌细胞生长并且在肿瘤边缘发挥抗黏附作用^[12]。国内的研究表明 TNC 与血管标记物 CD34 在乳腺癌、肝癌、胆管癌中的表达具有相关性,且有助于肿瘤侵袭和转移^[13,14]。以上研究均提示 TNC 在肿瘤细胞中存在过表达现象,且与肿瘤细胞增殖、黏附、迁移及肿瘤血管形成有关。而 TNC 在 NSCLC 中的表达与肺癌的相关性尚未见报道。

本研究检测了 TNC 在 NSCLC 中的表达,并分析其表达与肺癌肿瘤直径、病理类型、分级、TNM 分期、淋巴结转移以及有无胸膜浸润的相关性。结果显示 TNC 在腺癌和鳞癌中表达差异无统计学意义,提示 TNC 的表达与肺癌的分类无关。进一步的分析表明,TNC 表达与 NSCLC 的肿瘤的 TNM 分期、有无胸膜浸润及淋巴结转移有关,但其表达与肿瘤直径、病理分级无关,提示其表达可能有助于肿瘤细胞的转移和癌细胞浸润。在实验中我们发现 TNC 多表达于 NSCLC 癌巢周围细胞外基质、基底膜。随着 NSCLC 恶性程度增高,TNC 表达也越强。研究提示,TNC 蛋白属于细胞外基质糖蛋白,其独特的结构域可能与肿瘤细胞表面的生长因子受体连接,使 NSCLC 及其癌旁组织

细胞外基质发生了改变,在肿瘤边缘激活其抗黏附作用促进肿瘤的浸润和转移。在乳腺癌的研究中发现癌巢边缘的 TNC 高表达预示高转移性,TNC 对有无转移和生存率的评估作用更优于肿瘤大小和分级^[15]。肿瘤细胞质 TNC 阳性表达提示患者预后不良,在有浸润的肿瘤中 TNC 阳性表达是肿瘤局部复发的重要标志^[16]。在我们的研究中同样发现癌巢边缘 TNC 的表达强度高于癌巢中心,提示在 NSCLC 组织内 TNC 的高表达可能参与肺癌细胞的转移。根据本文和以上研究资料,我们推测 TNC 的表达与 NSCLC 的发生和恶性转化演进有关,其高表达提示 NSCLC 的高转移性影响患者预后。

综上所述,NSCLC 组织 TNC 的高表达可能导致术后肿瘤的早期复发和转移,降低了患者远期生存时间。目前的基础研究提示,通过调节细胞因子、ECM、血管活性肽等多种因子下调 TNC 的表达,阻断肿瘤细胞的浸润和转移以达到肿瘤姑息或根治的目的,延长病人生存期。检测 TNC 在细胞、组织、体液中的蛋白含量变化,可望成为早期诊断肺癌预后的新指标。为初发和复发患者合理选择治疗方案帮助临床医生判断预后提供客观的依据。明确 TNC 蛋白在 NSCLC 中的表达是我们研究的第一步,对它的作用机制以及和其他蛋白的相互作用的研究还需要进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Maione P, Rossi A, Sacco PC, et al. Advances in chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer [J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(18): 2997-3007
- [2] 支修益, 李辉, 陈东红. 早期非小细胞肺癌外科治疗进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2010, 1(22): 2-6
Zhi Xiu-yi, Li Hui, Chen Dong-hong. Surgical progress on early stage non-small cell lung cancer [J]. Cancer Research and Clinic, 2010, 1(22): 2-6
- [3] Kuriyama N, Duarte S, Hamada T, et al. Tenascin-C: a novel mediator of hepatic ischemia and reperfusion injury [J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2125-2136
- [4] Brunner A, Mayer IC, Tzankov A, et al. Prognostic significance of tenascin-C expression in superficial and invasive bladder cancer [J]. J Clin Pathol, 2004, 57(9): 927-931
- [5] 王昌惠. 肺癌转移机制的研究进展[J]. 同济大学学报, 2011, 32(2): 1-4
Wang Chang-hui. Recent advances in the mechanism of the metastasis of lung cancer [J]. Journal of Tongji University, 2011, 32(2): 1-4
- [6] Bennett JS, Berger BW, Billings PC, et al. The structure and function of platelet integrins. J Thromb Haemost, 2009, 7(1): 200-205
- [7] Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, et al. Advances in tenascin-C biology [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(19): 3175-3199
- [8] Peng Q, Zhuang S, Wang M, et al. Mechanical design of the third FnIII domain of tenascin-C [J]. J Mol Biol, 2009, 386(5): 1327-1342
- [9] Guttery DS, Shaw JA, Lloyd K, et al. Expression of tenascin-C and its isoforms in the breast [J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(4): 595-606
- [10] Sivasankaran B, Degen M, Ghaffari A, et al. Tenascin-C is a novel RBPJkappa-induced target gene for Notch signaling in gliomas [J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 458-465
- [11] Van Obberghen-Schilling E, Tucker RP, Saupe F, et al. Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth [J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(4-5): 511-525
- [12] Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, et al. Expression of phosphorylated Akt(pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy [J]. Gastric Cancer, 2007, 10(1): 45-51
- [13] 张奇兵, 管旌旌, 杨明, 等. Tenascin-C 在乳腺导管原位癌的表达及其意义 [J]. 吉林医学, 2009, 30(5): 396-397
Zhang Qi-bing, Guan Jing-jing, Yang Ming, et al. Expression of Tenascin-C in ductal carcinoma in situ of the breast and its clinical significance [J]. Jilin Medical Journal, 2009, 30(5): 396-397
- [14] 尹传昌, 廖晓峰, 陈雯, 等. Tenascin-C 在人原发性肝细胞癌浸润、转移和血管生成中的作用 [J]. 华中科技大学学报, 2012, 41(3): 278-283
Yin Chuan-chang, Liao Xiao-feng, Chen Wen, et al. Role of Tenascin-C in Invasion, Metastasis and Angiogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 2012, 41(3): 278-283
- [15] Jähkola T, Toivonen T, Von Smitten K, et al. Expression of tenascin in invasion border of early breast cancer correlates with higher risk of distant metastasis [J]. Int J Cancer, 1996, 69(6): 445-447
- [16] Pazzaglia L, Conti A, Chiechi A, et al. Differential gene expression in classic giant cell tumours of bone: Tenascin C as biological risk factor for local relapses and metastases [J]. Histopathology, 2010, 57(1): 59-72

(上接第 6034 页)

- [14] Nguyen J, Szoka F C. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? [J]. Accounts of Chemical Research, 2012, 45(7): 1153-1162
- [15] Ito T, Yoshihara C, Hamada K, et al. DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice [J]. Biomaterials, 2010, 31(10): 2912-2918
- [16] Glover D J, Leyton D L, Moseley G W, et al. The efficiency of nuclear plasmid DNA delivery is a critical determinant of transgene expression at the single cell level [J]. The journal of gene medicine, 2010, 12(1): 77-85
- [17] Son S, Kim W J. Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine for plasmid DNA delivery [J]. Biomaterials, 2010, 31(1): 133-143
- [18] Gao, K. & Huang, L. Nonviral methods for siRNA delivery [J]. Molecular pharmaceuticals, 6, 651-658 (2008)
- [19] Zhang J, Li X, Lou L, et al. Non-viral Gene Therapy [M]. Intracellular Delivery. Springer Netherlands, 2011: 599-699
- [20] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery [J]. Cell. Mol. Life Sci. 2009, 66: 2873-2896