

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.11.003

肺腺癌人转录辅助因子 4 过表达与淋巴转移的相关性*

孙天宇¹, 谭群友^{1△}, 史春梦², 王如文¹, 邓波¹, 周景海¹, 陶绍霖¹, 康珀铭¹

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科, 重庆 400042;

2. 第三军医大学军事预防医学院复合伤研究所, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨肺腺癌组织中的人转录辅助因子 4(PC4)过表达对淋巴转移的促进作用。**方法** 选取 96 份肺腺癌组织标本,采用免疫组织化学法和荧光定量 PCR 法检测 PC4 蛋白和 mRNA 的表达水平,并分析其与淋巴转移和肿瘤分期的相关性。**结果** 肺腺癌组织 PC4 蛋白和 mRNA 表达明显正相关($r=0.63, P<0.01$);PC4 蛋白表达与淋巴转移正相关($\chi^2=8.29, P<0.01$),与 TNM 分期正相关($\chi^2=4.71, P<0.05$);PC4 mRNA 与淋巴转移正相关($\chi^2=8.40, P<0.01$),与 TNM 分期正相关($\chi^2=5.10, P<0.05$)。**结论** PC4 过表达与肺腺癌患者的淋巴转移、TNM 分期密切相关,PC4 可能促进肺腺癌的淋巴转移。

[关键词] 肺;腺癌;转录辅助因子 4;聚合酶链反应;免疫组织化学;淋巴转移**[中图分类号]** R655.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)11-1449-03

Correlation between overexpression of PC4 in lung adenocarcinoma with lymph node metastasis*

Sun Tianyu¹, Tan Qunyou^{1△}, Shi Chunmeng², Wang Ruwen¹, Deng Bo¹, Zhou Jinghai¹, Tao Shaolin¹, Kang Poming¹

(1. Department of Thoracic Surgery, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military

Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Research Institute of Combined Injury, College of

Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the promotion effect of human transcriptional positive cofactor 4 (PC4) overexpression on lymphatic metastasis in lung adenocarcinoma. **Methods** 96 samples of lung adenocarcinoma tissue were collected. The immunohistochemistry(IHC) and real-time quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) were adopted for detecting the expression levels of PC4 protein and mRNA. The correlation of PC4 expression with lymphatic metastasis and TNM stage was analyzed. **Results** The expression of PC4 protein was positively correlated mRNA in lung adenocarcinoma ($r=0.63, P<0.01$); the expression of PC4 protein was positively correlated with lymph node metastasis ($\chi^2=8.29, P<0.01$) and TNM stage ($\chi^2=4.71, P<0.05$); the expression of PC4 mRNA was also positively correlated with lymph node metastasis ($\chi^2=8.40, P<0.01$) and TNM stage ($\chi^2=5.10, P<0.05$). **Conclusion** PC4 overexpression is found to be closely associated with the lymph node metastasis and TNM stage. PC4 may facilitate the lymph node metastasis of lung adenocarcinoma.

[Key words] lung; adenocarcinoma; human transcriptional positive cofactor 4; polymerase chain reaction; immunohistochemistry; lymphatic metastasis

淋巴转移已成为了肺腺癌患者的主要死因^[1],目前对其具体机制知之甚少,亦缺乏早期有效的诊断和治疗方法。人转录辅助因子 4(human transcriptional positive cofactor 4, PC4)是一类在人体广泛分布的核蛋白,其参与了转录、复制、染色质形成和细胞周期进展的多个正常细胞生理进程,并可通过氧化 DNA 损伤作用防止突变从而参与调控正常的细胞生长^[2]。课题前期的体外研究发现,PC4 的表达水平与人类肺癌的进展及预后相关^[3],PC4 在非小细胞肺癌标本中的表达水平显著高于其邻近的非肿瘤组织^[4]。本研究采用免疫组化及实时定量 PCR 技术检测临床患者肺腺癌组织的 PC4 蛋白及 mRNA 表达水平,分析其与淋巴转移及其他临床特征的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 组织标本取自 2013~2014 年于第三军医大学大坪医院胸外科行根治性手术治疗的 96 例肺腺癌患者。新

切除的癌组织被收集并立即冻存于 -80°C 液氮中直至行 PCR 检测。拟行免疫组化检测的组织均送至病理科经固定、包埋后制成石蜡切片。患者术前均未接受过放疗或化疗,肿瘤不是原发性肺腺癌或患肺腺癌之前曾患过其他恶性肿瘤的患者被排除。本研究通过了第三军医大学大坪医院伦理委员会的审批,患者入组前取得了其知情同意。96 例患者均按照世界卫生组织肺癌分类的标准^[5],经病理学确诊,并根据 2009 年国际抗癌联盟(UICC)分期标准进行 TNM 分期^[6]。

1.2 方法

1.2.1 试剂 RNeasy FFPE Kit 购自德国 Qiagen 公司, SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX 购自美国 Invitrogen 公司。兔抗 PC4 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,免疫组化试剂盒购自中国中杉金桥公司。

1.2.2 免疫组化检测 PC4 蛋白表达水平 石蜡切片经常规

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172239)。 作者简介:孙天宇(1989-),硕士研究生,主要从事肺癌的基础与临床研究。

△ 通讯作者, Tel: (023)68757986; E-mail: tanqy001@163.com。

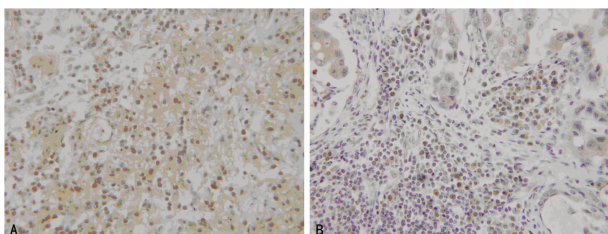
脱蜡复水及抗原修复后,行 SP 法免疫组化染色。一抗为兔抗人 PC4 抗体(稀释度 1:100),二抗为羊抗兔 IgG 抗体(稀释度 1:500)。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染。封片后于显微镜下计数。滴加磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。阳性细胞均为细胞核染成棕黄色或棕褐色,阴性细胞不染色。两位实验人员盲法阅片,在 200 倍镜下随机选取至少 5 个视野,计算 PC4 阳性细胞数比例及染色强度,并参考文献[7]进行评分。染色强度评分为 0~3 分,同时计算不同染色强度细胞分别所占的比例,最后计算 Q 值。 $Q = \sum \text{染色强度} \times \text{比例}$, 0~3 分。PC4 蛋白表达水平被分为 2 组, $Q < 1.5$ 为低表达组, $Q \geq 1.5$ 为高表达组^[8]。

1.2.3 qRT-PCR 检测 PC4 mRNA 表达 采用 TRIzol 法提取肺腺癌总 RNA,测定其水平。采用 TATA 盒结合蛋白(TBP)基因为内参,按照 cDNA 反转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录反应合成 cDNA,其引物顺序 PC4:上游为 5'-AGC GAA GCG ATG CCT AAA-3',下游为 5'-ACT TTT TGT CAA CCT CAC TGT CA-3'。TBP:上游为 5'-GGA TCC CAG CAG TGC AAA C-3',下游为 5'-AAG CCG AAC TTG TAC TCA TAT TTG T-3'。反应条件:50 °C 15 min,95 °C 15 min,然后 94 °C 15 s,55 °C 45 s,共 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PC4 mRNA 的相对表达量。计算所有样本的 PC4 mRNA 表达的平均值,并将各样本的 PC4 的表达水平与平均值进行比较,分为高表达组和低表达组^[9]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行统计学分析。计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,采用 Spearman 回归曲线线性相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PC4 蛋白和 mRNA 的相关性 PC4 蛋白在肺腺癌中的表达,见图 1;PC4 蛋白和 mRNA 在肺腺癌组织中表达水平分布,见图 2A。PC4 mRNA 可能在转录水平上调了 PC4 蛋白的表达,在肺腺癌患者,PC4 蛋白和 mRNA 表达之间存在明显的正相关($r = 0.63, P < 0.01$),见图 2B。

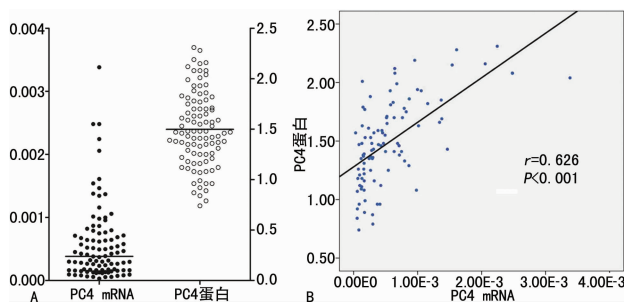


A:PC4 高表达;B PC4 低表达。

图 1 PC4 蛋白在肺腺癌组织中的表达(SP×200)

2.2 PC4 蛋白表达水平与肺腺癌患者临床病理特征的关系 PC4 蛋白与淋巴转移($\chi^2 = 8.29, P < 0.01$)和 TNM 分期($\chi^2 = 4.71, P = 0.03$)显著相关,而与患者的年龄、性别、症状、吸烟史、肺部疾病史、T 分期无关,见表 1。

2.3 PC4 mRNA 表达水平与肺腺癌患者临床病理特征的关系 PC4 mRNA 分别与淋巴转移($\chi^2 = 8.40, P < 0.01$)和 TNM 分期($\chi^2 = 5.10, P = 0.02$)相关,而与患者的年龄、性别、症状、吸烟史、肺部疾病史、T 分期无关,见表 2。



A:表达水平分布图;B:表达水平的相关性曲线。

图 2 PC4 蛋白与 mRNA 在肺腺癌患者中的表达(n=96)

表 1 PC4 蛋白表达水平与肺腺癌临床病理特征的关系[n(%),n=96]

病理特征	n	高表达	低表达	χ^2	P
年龄				0.59	0.44
≥60	33	13(39.39)	20(60.61)		
<60	63	30(47.62)	33(52.38)		
性别				0.15	0.70
男	49	21(42.86)	28(57.14)		
女	47	22(46.81)	25(53.19)		
症状				0.02	0.89
有	64	29(45.31)	35(54.69)		
无	32	14(43.75)	18(56.25)		
吸烟史				0.06	0.81
有	37	16(43.24)	21(56.76)		
无	59	27(45.76)	32(54.24)		
肺部疾病史				0	1.00
有	11	5(45.45)	6(54.55)		
无	85	38(44.71)	47(55.29)		
T 分期				2.44	0.12
T ₁₋₂	80	33(41.25)	47(58.75)		
T ₃₋₄	16	10(62.50)	6(37.50)		
淋巴转移				8.29	0.00
有	56	32(57.14)	24(42.86)		
无	40	11(27.50)	29(72.50)		
TNM 分期				4.71	0.03
I~II	43	14(32.56)	29(67.44)		
III~IV	53	29(54.72)	24(45.28)		

表 2 PC4 mRNA 表达水平与肺腺癌临床病理特征的关系[n(%),n=96]

病理特征	n	高表达	低表达	χ^2	P
年龄				0.42	0.52
≥60	33	15(45.45)	18(54.55)		
<60	63	33(52.38)	30(47.62)		
性别				0.38	0.54
男	49	26(53.06)	23(46.94)		

续表 2 PC4 mRNA 表达水平与肺腺癌临床病理特征的关系[n(%),n=96]

病理特征	n	高表达	低表达	χ^2	P
女	47	22(46.81)	25(53.19)		
症状				3.00	0.08
有	64	28(43.75)	36(56.25)		
无	32	20(62.50)	12(37.50)		
吸烟史				0.04	0.83
有	37	19(51.35)	18(48.65)		
无	59	29(49.15)	30(50.85)		
肺部疾病史				0.10	0.75
有	11	5(45.45)	6(54.55)		
无	85	43(50.59)	42(49.41)		
T 分期				0.30	0.58
T _{1~2}	80	39(48.75)	41(51.25)		
T _{3~4}	16	9(56.25)	7(43.75)		
淋巴转移				8.40	0.00
有	56	35(62.50)	21(37.50)		
无	40	13(32.50)	27(67.50)		
TNM 分期				5.10	0.02
I~II	43	16(37.21)	27(62.79)		
III~IV	53	32(60.38)	21(39.62)		

3 讨 论

肺腺癌正在逐渐成为肺癌的主要病理类型,淋巴转移是导致预后不良的主要原因之一^[10]。大量临床研究表明,肿瘤的某些生物学行为,如侵袭、转移、耐药性等,多存在分子水平的异常表达^[11-13];某些分子的异常表达甚至能够影响肿瘤患者的预后^[14]。据此,作者推测部分肺腺癌患者也存在分子水平上的改变,导致其生物水发生改变,更易出现淋巴结转移。

PC4 是一种相对分子质量为 15×10^3 的核蛋白。它广泛存在于体内并参与多种重要的生理进程,如转录、复制、DNA 修复、细胞周期进展、细胞性状转化和染色质形成等。最近发现 PC4 的表达与人类前列腺癌、乳腺癌及肺癌的发生和发展有关,因此 PC4 被认为是一个能用于人类晚期癌症诊断、评估治疗效果和预测转移的新的靶分子^[3]。此外,体外实验证实下调 PC4 表达能显著抑制非小细胞肺癌细胞的增生,并且能抑制 A549 细胞在裸鼠中的致瘤性^[4]。本课题组前期对 PC4 进行了相关的研究,证实在肺癌肿瘤干细胞转化和肿瘤进展中,PC4 能作为一种新的标记物^[3],PC4 参与了骨髓来源的多能间充质基质细胞的增生和衰老^[15]。以上的研究结果均表明 PC4 或许能作为一类有价值的生物标记物预测肿瘤患者的淋巴结转移和肿瘤的进展。

本研究采用免疫组化和实时定量 PCR 检测了肺腺癌标本中 PC4 蛋白和 mRNA 的表达,并通过分析 PC4 表达与临床病理特征的相关性发现,PC4 表达水平与淋巴转移和 TNM 分期相关,高表达 PC4 的肺腺癌患者更易出现淋巴转移。提示 PC4 在肺腺癌患者中的表达水平可能与肿瘤细胞的生物学行

为相关,高表达患者肿瘤细胞更加倾向于迁移至淋巴结,从而引起淋巴转移。高表达的 PC4 蛋白可能通过一系列信号转导激活肺腺癌淋巴转移相关基因的转录或上调其表达水平,从而促进淋巴转移。而且 PC4 蛋白与 PC4 mRNA 的表达呈明显的正相关,提示此进程或许首先由 PC4 基因的激活启动。在外界环境中的某些因素或患者自身的遗传特征的影响下,肺腺癌患者 PC4 基因的表达水平被上调,PC4 mRNA 转录水平升高,进而导致 PC4 蛋白的表达增加,促进肺腺癌的淋巴转移。

本研究证实 PC4 在肺腺癌组织中高表达,PC4 过表达与淋巴转移和 TNM 分期密切相关。因此,PC4 可能对判断肺腺癌的淋巴转移和病理分期有一定参考价值。有关 PC4 表达与肺腺癌患者的生存和预后的关系还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Ceylan KC, Kaya SO, Samancilar O, et al. The effects of neoadjuvant chemotherapy on pulmonary structures: a quantitative analysis[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 60 (2):111-115.
- [2] Conesa C, Acker J. Sub1/PC4 a chromatin associated protein with multiple functions in transcription [J]. RNA biology, 2010, 7(3):287-290.
- [3] Shi C, Zhu Y, Zhau HE, et al. PC4, a novel marker for stem cell transformation and cancer progression[J]. J Biotechnol, 2008, 136 Suppl: S189-193.
- [4] Peng Y, Yang J, Zhang E, et al. Human positive coactivator 4 is a potential novel therapeutic target in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Gene Ther, 2012, 19(10): 690-696.
- [5] Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelin HK, et al. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart [M]. Lyon: IARC Press, 2004; 35-44.
- [6] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours[M]. 7th ed. New York: Wiley-Liss Inc, 2009; 138-146.
- [7] Deng B, Sun Z, Jason W, et al. Increased BCAR1 predicts poor outcomes of non-small cell lung cancer in multiple-center patients[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20 Suppl 3: S701-708.
- [8] Vilmar A, Garcia-Foncillas J, Huarraz M, et al. RT-PCR versus immunohistochemistry for correlation and quantification of ERCC1, BRCA1, TUBB3 and RRM1 in NSCLC [J]. Lung Cancer, 2012, 75(3):306-312.
- [9] Booton R, Ward T, Ashcroft L, et al. ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2007, 2(10):902-906.
- [10] Kozłowski M, Naumnik W, Niklinski J, et al. Lymphatic vessel invasion detected by the endothelial lymphatic marker D2-40 (podoplanin) is predictive of regional lymph node status and an independent prognostic factor in patients(下转第 1456 页)

- PI3K/Akt signaling pathway in platelet-derived growth factor-induced migration of human lens epithelial cells [J]. *Curr Eye Res*, 2010, 35(5):389-401.
- [4] Dasari VR, Kaur K, Velpula KK, et al. Upregulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/Akt pathway [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4):e10350.
- [5] Lelievre E, Bourbon PM, Duan LJ, et al. Deficiency in the p110alpha subunit of PI3K results in diminished Tie2 expression and Tie2(-/-)-like vascular defects in mice [J]. *Blood*, 2005, 105(10):3935-3938.
- [6] Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, et al. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(6):2836-2846.
- [7] Bullard LE, Qi X, Penn JS. Role for extracellular signal-responsive kinase-1 and-2 in retinal angiogenesis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(4):1722-1731.
- [8] 任萱, 林莉萍, 丁健. 微管抑制剂 C9 抑制新生血管生成的作用机制 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(17):1703-1710.
- [9] 向邦德, 吕明德, 黄洁夫, 等. 诱导正常血管内皮细胞具备肿瘤血管特性的研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(3):354-357.
- [10] 唐小飞. PI3K 抑制剂对三阴性乳腺癌细胞增殖及迁移的影响 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
- [11] Paku S, Kopper L, Nagy P. Development of the vasculature in "pushing-type" liver metastases of an experimental colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(6):893-902.
- [12] 王莉, 刘向东, 赵星成, 等. Notch 信号途径在血管形成和内皮细胞中的作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(8):39-41.
- [13] 胡明明, 胡瑛, 李宝兰. 肿瘤中血管生成信号通路相关药物临床转化研究现状 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(1):86-94.
- [14] Luangdilok S, Box C, Harrington K, et al. MAPK and PI3K signalling differentially regulate angiogenic and lymphangiogenic cytokine secretion in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(4):520-529.
- [15] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4(51):1-8.
- [16] Chung BH, Lee JJ, Kim JD, et al. Angiogenic activity of sesamin through the activation of multiple signal pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1):254-260.
- [17] Yoshizuka N, Chen RM, Xu Z, et al. A novel function of p38-regulated/activated kinase in endothelial cell migration and tumor angiogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(3):606-618.
- [18] 毛斌, 刘肖珩, 赖怡, 等. PI3K 对 IL-8/Rac1 信号通路介导的内皮细胞迁移的影响 [J]. *国际生物医学工程杂志*, 2010, 33(3):134-137, 151.
- [19] 王彦敏. 血管生成因子 VEGF 研究进展 [J]. *河北医药*, 2010, 32(11):1456-1458.

(收稿日期: 2014-10-15 修回日期: 2015-01-28)

(上接第 1451 页)

- with resected esophageal cancer [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2011, 49(1):90-97.
- [11] Giroux Leprieur E, Antoine M, Vieira T, et al. Clinical and molecular features in patients with advanced non-small-cell lung carcinoma refractory to first-line platinum-based chemotherapy [J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(2):167-172.
- [12] 魏东, 匡怡, 刘孟刚, 等. Tim-3 在人肝癌细胞中的表达及其对细胞增殖与迁移能力的影响 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(16):1975-1978, 1982.
- [13] Saigusa S, Tanaka K, Mohri Y, et al. Clinical significance of RacGAP1 expression at the invasive front of gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2015, 18(1):84-92.
- [14] Kato T, Daigo Y, Aragaki M, et al. Overexpression of KIAA0101 predicts poor prognosis in primary lung cancer patients [J]. *Lung Cancer*, 2012, 75(1):110-118.
- [15] Peng Y, Su Y, Wang T, et al. Human transcriptional positive coactivator 4 participates in the proliferation and senescence of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38 Suppl 1: S55-58.

(收稿日期: 2014-10-28 修回日期: 2015-01-10)

2015 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者, 本刊一律接受网上投稿, 不再接受纸质和电子邮箱投稿! 请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话: 023-63604477。

来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部, 编辑部若未收到审稿费, 稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!