论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0414-04

层粘蛋白和钙调素蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与转移和预后的关系

刘国祥,黄 英,孙 瑜 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨层粘蛋白(LN)和钙调素(CaM)的表达与非小细胞肺癌(NSCLC)转移与预后的关系。**方法** 采用免疫组织化学技术检测64例NSCLC中LN和CaM的表达。**结果** LN和CaM的表达在NSCLC不同细胞分化程度、不同临床分期及是否有淋巴结转移中均有显著差异($P<0.05$)。LN在腺癌和鳞癌中的阳性表达率分别为45.1%、69.7%($P<0.05$),CaM在腺癌和鳞癌中的阳性表达率分别为74.1%、57.6%($P>0.05$);LN在低分化的肿瘤标本和中高分化的肿瘤标本阳性表达率分别为36.6%、61.7%($P<0.05$),而CaM分别为73.3%、41.1%($P<0.05$);LN在Ⅲ~Ⅳ期和Ⅰ~Ⅱ期的阳性表达率分别为30.7%、56.0%($P<0.05$),而CaM分别为75.7%、48.3%($P<0.05$);LN在无或有淋巴结转移组的阳性表达率分别为58.1%、33.3%($P<0.05$),而CaM分别为32%、69.2%($P<0.05$)。**结论** LN和CaM可能相互作用,共同促进肺癌的浸润转移,其表达的水平对判断NSCLC患者预后有参考价值。

关键词:非小细胞肺癌;层粘蛋白;钙调素;肿瘤转移;预后

中图法分类号:R341;R730.23;R734.2 **文献标识码**:A

Expressions of laminin and calmodulin and its significance in the metastasis and prognosis of non-small cell lung carcinoma

LIU Guo-xiang, HUANG Ying, SUN Yu (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship of the expression levels of laminin (LN) and calmodulin (CaM) in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) with its metastasis and prognosis. **Methods** The expressions of CaM and LN were detected in 64 human NSCLC samples by immunohistochemistry. **Results** The expressions of LN and CaM were closely associated with the differentiation and the grades of NSCLC as well as the lymph node metastasis. The positive rates of LN in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma were 45.1% and 69.7 ($P<0.05$), but those of CaM were 74.1% and 57.6% ($P>0.05$), respectively. The positive rate of LN protein in low-differentiated samples (36.6%) was significantly lower than that in moderate- to well-differentiated samples (61.7%), but the positive rates of CaM were 73.3% in low-differentiated samples and 41.1% in moderate- to well-differentiated samples ($P<0.05$). The expression rate of LN in Ⅲ-Ⅳ stage (30.7%) was significantly lower than that in Ⅰ-Ⅱ stage (56.0%) ($P<0.05$) and the expression rates of CaM were 75.7% and 48.3% ($P<0.05$). The expression rate of LN in lymph node metastasis (33.3%) was significantly lower than that in non-lymph node metastasis (58.1%) ($P<0.05$), but the expression rates of CaM were 69.2% and 32%. **Conclusion** LN and CaM may play an important role in the invasion and metastasis of NSCLC, and may also be used as a useful marker for tumor prognosis.

Key words: non-small cell lung cancer; laminin; calmodulin; tumor metastasis; prognosis

浸润和转移是恶性肿瘤致死的主要原因,因此恶性肿瘤的浸润和转移成为肿瘤学研究的热点和难点之一。钙调素(calmodulin, CaM)是真核细胞中普遍存在的钙离子受体蛋白,是细胞内Ca^{2+}信号转导途径中的主要信号转导分子,介导调控由Ca^{2+}引起的一系列生理生化反应,参与并调节细胞增生、分化、运动等基本代谢过程。研究表明,钙调素在正常细胞的生长发育及肿瘤细胞的增殖中起着重要作用。层粘连蛋白(laminin, LN)是一种基底膜糖蛋白,通过与其受体(laminin receptor, LN-R)结合能调节细胞的粘附、扩散

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3037158)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (3037158)

作者简介:刘国祥(1963-),男,河南省温县人,硕士,主任医师,教授,主要从事肺癌的早期诊断与治疗方面的研究,发表论文40余篇。电话:(023)68752022

收稿日期:2004-12-23;修回日期:2005-02-14

和迁徙。关于 CaM 与 LN 在非小细胞肺癌浸润、转移中的相互作用研究不多。本研究采用 S-P 免疫组化技术检测了 64 例非小细胞肺癌组织中 CaM 与 LN 表达的变化，探讨二者在肺癌生长浸润中的意义。

1　材料与方法

1.1　材料

收集我院 2001 年 1 月至 2004 年 7 月部分 NSCLC 手术切除标本 64 例，标本均为石蜡包埋的肺癌组织块。患者术前均未接受放疗和化疗。64 例患者中，男性 44 例，女性 20 例；年龄 27～75 岁，平均 57.68 岁。按照 WHO 肺癌分型标准分类标准及 UICC1997 年新的国际肺癌分期标准进行分型、分期，其中鳞癌 28 例，腺癌 36 例。Ⅰ期 12 例，Ⅱ期 19 例，Ⅲ期 21 例，Ⅳ期 12 例。64 例中随访 30 例，鳞癌及腺癌 3 年以上生存者分别为 11 例及 6 例，半年内死亡者分别为 4 例及 8 例。

1.2　试剂

抗 laminin 多克隆抗体及抗 calmodulin 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司，S-P 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3　方法

切片脱蜡至水，3% H_2O_2 封闭，复合酶（购自武汉博士德公司）修复 10 min，血清封闭 30 min，免疫组化步骤按 S-P 试剂盒说明进行。CaM 多抗浓度为 1∶100。Laminin 多抗浓度为 1∶100。结果判定：CaM 以肿瘤细胞细胞浆或胞膜出现明显的棕黄色判定为阳性，阳性细胞 < 10% 视为阴性表达，阳性细胞 ≥ 10% 为阳性表达；LN 阳性则出现在癌细胞周围或癌巢周围的基底膜或血管基底膜上，呈连续性分布或呈间断性线状的三维网状结构同其他成分相连接，碎片状着色达到 10%～25% 也视为阳性表达，阴性表达呈碎片状 < 10% 或细胞外无 LN。

1.4　统计学方法

采用 χ^2 检验进行显著性检验。

2　结果

2.1　64 例肺癌 LN 表达与病理组织学分型、肿瘤分期、淋巴结转移

LN 染色出现在癌细胞周围或癌巢周围以及血管基底膜，呈碎片状、断线状和连续线状，部分癌组织基膜层粘蛋白消失，而癌细胞胞浆内可见阳性表达（图 1、2）。我们发现，在鳞癌、分化程度较高、病理分期较早以及无淋巴结转移的癌组织周围基膜 LN 阳性率较高，呈连续或断线状分布，癌细胞内染色阴性；反之，在腺癌、分化程度较低、出现了淋巴结转移的癌组织周围基膜 LN 阳性率较低，呈碎片状，但部分肿瘤细胞内可见阳性表达，见表 1。

2.2　64 例肺癌 CaM 表达与病理组织学分型、肿瘤分期、淋巴结转移

CaM 主要表达在肿瘤细胞胞浆，个别胞核也可见表达[1]。CaM 的表达与肿瘤的分化程度、有无淋巴结转移及临床分期有密切关系，肿瘤分化程度较低、出现了淋巴结转移及临床分期较晚的标本中 CaM 的表达率较高，见表 2。

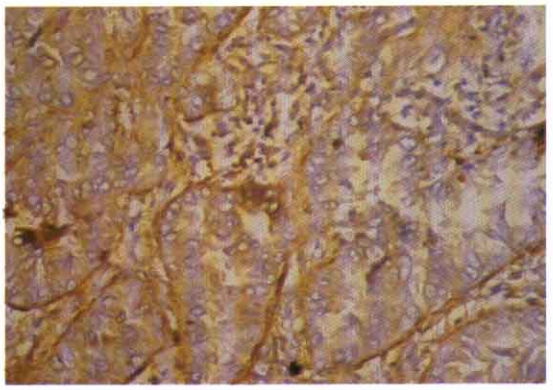


图 1　LN 在鳞癌中的阳性表达　（S-P × 400）

Fig 1　Expression of LN in squamous cell carcinoma　（S-P × 400）



图 2　LN 在腺癌中的阳性表达　（S-P × 400）

Fig 2　Expression of LN in adenocarcinoma　（S-P × 400）

表 1　LN 表达与 NSCLC 的生理病理特征的关系

Tab 1　Relationship between LN expression and pathophysiological characteristics of NSCLC

Characteristics	n	LN			P
		+	−	Positivity (%)	
Sex					
Male	44	28	16	68.1	>0.05
Female	20	12	8	60.0	
Age(year)					
≥50	42	29	13	69.0	>0.05
<50	22	12	10	54.5	
Histology					
Adenocarcinoma	31	14	17	45.1	<0.05
Squamous cell carcinoma	33	23	10	69.7	
Cell differentiation					
Moderate-well	34	21	13	61.7	<0.05
Poor	30	11	19	36.6	
Lymph node metastasis					
Yes	39	12	27	30.7	<0.05
No	25	14	11	56.0	
TNM stage					
Ⅰ～Ⅱ	31	18	13	58.1	<0.05
Ⅲ～Ⅳ	33	11	22	33.3	

表2 CaM表达与NSCLC的生理病理特征的关系

Tab 2 Relationship between CaM expression and pathophysiological characteristics of NSCLC

Characteristics	n	CaM +	CaM −	Positivity (%)	P
Sex					
Male	44	31	13	70.4	>0.05
Female	20	11	9	55.0	
Age(year)					
≥50	42	29	13	69.1	>0.05
<50	22	13	9	59.1	
Histology					
Adenocarcinoma	31	23	8	74.1	>0.05
Squamous cell carcinoma	33	19	14	57.6	
Cell differentiation					
Moderate-well	34	14	20	41.1	<0.05
Poor	30	22	8	73.3	
Lymph node metastasis					
Yes	39	27	12	69.2	<0.05
No	25	8	17	32.0	
TNM stage					
Ⅰ~Ⅱ	31	15	16	48.3	<0.05
Ⅲ~Ⅳ	33	25	8	75.7	

3 讨论

肿瘤浸润、转移是一个十分复杂的生物学现象，涉及肿瘤细胞与宿主细胞间一系列相互作用的连锁反应。研究表明，在NSCLC中，LN与CaM不同程度地参与肿瘤的侵袭转移。

3.1 LN的表达与NSCLC转移及预后的关系

细胞外基质中LN与肿瘤细胞表面的层粘蛋白受体(LN-R)相互识别与结合是介导肿瘤浸润转移的始动环节。肿瘤细胞必须穿过基底膜才能去侵犯周围器官实质，而LN是基底膜屏障功能的主要决定者，它本身具有促进细胞生长、分化、粘附和转移的各种生物学效应，对肿瘤浸润和转移有重要作用[2,3]。本研究结果显示，LN表达在非小细胞肺癌的不同组织学类型中有显著性差异，即鳞癌表达比腺癌表达明显增高($P<0.05$)，同时二者的LN表达类型有所区别，腺癌组织中LN表达以碎片状为主，鳞癌则以断线状和连续线状居多，说明腺癌基底膜断裂缺失比鳞癌明显，其浸润性比鳞癌强，预后比鳞癌差。同时还发现，LN表达与肺癌的分级、不同的临床分期及有无淋巴结转移密切相关，随癌组织分级降低、临床分期越晚以及出现淋巴结转移的患者，LN表达呈减弱趋势($P<0.05$)，这与Hewitt等[4]的研究结论相似，高分级细胞亚群，细胞呈团块状排列，LN表达较强，说明肿瘤侵袭性、转移性均较弱，提示LN的表达增强，具有一定的抗肿瘤作用；低分级的细胞亚群LN表达较弱，其侵袭性强、恶性程度高，更易出现早期转移，说明LN与非小细胞肺癌的转移和预后有关，可作为肺癌细胞分化、淋巴结转移和预后的判定指标之一。

3.2 CaM的表达与NSCLC转移及预后的关系

CaM是细胞内信使钙的受体，它不仅对正常的细胞增殖起重要作用，而且与恶性肿瘤细胞生长有密切关系，在多步骤的致癌过程起着一定的作用[5~7]。我们前面的研究结果[1]显示，在NSCLC中，存在着CaM代谢紊乱，且CaM的表达与NSCLC的分化程度、有无淋巴结转移及临床分期有密切关系，肿瘤分化程度较低、出现淋巴结转移及临床分期较晚的标本中CaM的表达率较高($P<0.05$)，与文献[8]报道基本一致，提示CaM高表达的患者容易出现浸润转移，预后较差，CaM的表达与NSCLC的转移和预后有关。

3.3 LN与CaM在NSCLC转移中的相互作用

本研究显示，LN与CaM的表达与NSCLC的转移密切相关，二者可能相互作用，最终促进肺癌的侵袭转移。目前认为肿瘤细胞具有一定分泌和合成LN的能力，在结肠癌、肝癌、肺癌等肿瘤患者血清中LN浓度增高，但相应肿瘤组织免疫组化染色显示LN表达呈碎片状或染色阴性，提示LN在肿瘤转移过程中具有双重作用，当LN与Ⅳ型胶原构成基膜时，它可作为屏障，阻止肿瘤细胞的转移；而在肿瘤细胞穿越基膜后则可介导其运动，促进转移的形成，LN的高表达与降解同肿瘤转移密切相关，LN可能通过第二信使Ca^{2+}参与或协调CaM对细胞的调节作用，产生一系列生物学效应[9~11]。我们发现，在高分化鳞癌、病理分期较早以及无淋巴结转移的癌组织周围基膜LN阳性率较高，呈连续或断线状分布，癌细胞内染色阴性，而钙调素表达也较低；反之，分化程度较低、出现了淋巴结转移的癌组织周围基膜LN阳性率较低，呈碎片状，但部分肿瘤细胞中可见阳性表达，而钙调素也出现较高的阳性率，提示基膜完整，肿瘤不易出现转移，而基膜破坏，肿瘤细胞浸润力强，容易转移；肺癌细胞可能通过钙/钙调素信息通路分泌和合成LN，促进肿瘤的浸润与转移。反之，Ca^{2+}/CaM稳态失衡，CaM系统代谢紊乱，也可能影响LN的作用，使肿瘤细胞与基膜、细胞外间质的粘附性增加，细胞浸润力增强，容易突破基质向远处转移。二者的相互作用机制有待进一步阐明。

参考文献：

[1] 黄 英，刘国祥，孙 瑜. 钙调素mRNA和蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报，2005，27(3)：238－240.

[2] Kohlberger P，Beneder C H，Horvat R，*et al*. Immunohistochemical expression of laminin-5 in cervical intraepithelial neoplasia[J]. Gynecol Oncol，2003，89(3)：391－394.

[3] Nordstrom B, Einhorn N, Silfversward C, *et al*. Laminin-5 gamma2 chain as an invasivity marker for uni- and multifocal lesions in the lower anogenital tract[J]. Int J Gynecol Cancer, 2002, 12(1): 105 - 109.
[4] Hewitt R E, Powe D G, Morrell K, *et al*. Laminin and collagen IV subunit distribution in normal and neoplastic tissues of colorectum and breast[J]. Br J Cancer, 1997, 75(2): 221 - 229.
[5] Cifuentes E, Mataraza J M, Yoshida B A, *et al*. Physical and functional interaction of androgen receptor with calmodulin in prostate cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(2): 464 - 469.
[6] 李晓军，武建国，郭大文，等. 人钙调素基因Ⅲ表达载体的构建及在大肠杆菌中的高效表达[J]. 金陵医院学报，1998，11(4)：331 - 334.
[7] Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary P M, *et al*. Apoptosis and lung cancer: a review[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(5): 885 - 898.
[8] Liu G X, Sheng H F, Wu S. A study on the levels of calmodulin and DNA in human lung cancer cells[J]. Br J Cancer, 1996, 73(7): 899 - 901.
[9] Kuhn T B, Williams C V, Dou P, *et al*. Laminin directs growth cone navigation via two temporally and functionally distinct calcium signals[J]. J Neurosci, 1998, 18(1): 184 - 194.
[10] 曹 锐，李天星，杨 玲. 肺癌患者血清 VEGF、CoⅣ、LN 检测及其临床意义[J]. 第三军医大学学报，2002，24(2)：212 - 213.
[11] Gonzales M, Haan K, Baker S E, *et al*. A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation[J]. Mol Biol Cell, 1999, 10(2): 259 - 270.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)05-0417-01

个案与短篇

数字减影血管造影下 Willis 动脉环变异与缺血性脑血管病的关系

Relationship between ischemic cerebral vascular disease and the variation of Willis' circle diagnosed by digital subtraction angiography

张艳玲，迟路湘，陈康宁，史树贵，范支辉，陈贞芳 （第三军医大学西南医院神经内科，重庆市介入脑血管病研究所，重庆 400038）

由于 Willis 动脉环[1]的存在，脑血液循环存在广泛侧支，双侧颈内动脉系统之间，双侧颈内动脉和椎-基底动脉系统之间均存在侧支循环通路。正常情况下脑两侧血液压力相近，血液无相互混合，当一侧脑血流量迅速增加或减少时，两侧压力不平衡，一侧或一系统的血液可通过交通动脉流到另一侧或者另一系统。但由于吻合支的正常变异较多，或者吻合支本身存在血管病变，将导致侧支循环不能建立，容易发生缺血性脑血管病。现将本科数字减影血管造影（digital subtraction angiography，DSA）下发现的 Willis 动脉环变异进行总结，分析其与缺血性脑血管病的关系。

1 材料与方法

1.1 病例选择

2003年2至7月在我科住院的行主动脉弓和全脑血管数字减影血管造影及血管内治疗的缺血性脑血管病患者，共73例，年龄15 - 75岁，平均54.3岁，男性45例，女性28例。临床诊断脑梗死33例，椎基底动脉供血不足25例，短暂性脑缺血发作8例，血管性头痛7例。

所有患者采用局麻下股动脉穿刺，成功放入动脉鞘后，在导引导丝的引导下，使用 Pigtail 和 Vertebral 导管，在汤氏位和侧位，行主动脉弓、颈总动脉分叉处、两侧颈内动脉及椎基底动脉的造影。造影剂优维显，主动脉弓造影注射造影剂速度16 ml/s，总量18 ml；两侧颈内动脉造影注射造影剂速度6 ml/s，总量7 ml；椎基底动脉造影注射造影剂速度5 ml/s，总量6 ml。上述造影条件可以保证动脉清晰显影，且双侧动脉显影条件一致。

1.2 Willis 动脉环变异的分析标准

参照李建华等[2]的方法，分析 Willis 动脉环变异。

Willis 前环：应用 A1 优势征判断 Willis 前环的完整性。A1 优势征：一侧颈动脉造影时，该侧大脑前动脉水平段增粗，甚至双侧大脑前动脉纵裂段同时显示，文献[4]称之为"大脑前动脉水平段优势血流征（the sign of dominant blood flow of horizontal segment of anterior cerebral artery），简称 A1 优势征"。该征提示对侧大脑前动脉水平段缺如、发育不良，狭窄等 Willis 前环不完整的血液动力学改变。

Willis 后环：以大脑后动脉供血类型判断 Willis 后环的完整性。大脑后动脉供血类型：①基底动脉供血型：基底动脉造影时大脑后动脉显示，而颈内动脉造影时大脑后动脉未显示者；②颈动脉供血型：基底动脉造影时大脑后动脉未显示，而颈内动脉造影时大脑后动脉显示者；③混合供血型：基底动脉造影时大脑后动脉显示，而颈内动脉造影时大脑后动脉也显示者。颈动脉供血型提示 Willis 后环不完整，混合供血型提示 Willis 后环有血液动力学改变。

2 结果

73例患者中，主动脉弓和全脑血管数字减影血管造影正常

（下转421页）

作者简介：张艳玲（1974 - ），女，河北省石家庄市人，硕士，主治医师，主要从事脑血管病方面的研究，发表论文7篇。电话：(023)68752905

收稿日期：2003-08-22；修回日期：2004-09-28