文章编号:1000-5404(2003)12-1073-03

论著

内皮素1在肺癌组织和转移淋巴结中的表达及其临床意义

陈庆峰[1],矫文捷[2],林乐胜[2],孙显路[2] (青岛大学医学院附属医院:[1]烧伤整形科;[2]胸外科,青岛 266003)

提 要:目的 检测内皮素1(ET-1)在肺癌组织及转移淋巴结中的表达,探讨内皮素在肺癌生长及转移中的作用。方法 应用SABC免疫组化法检测80例肺癌组织及相应周围淋巴结中ET-1表达情况。结果 80例肺癌组织标本中,鳞癌和腺癌中ET-1表达较高,分别为68.7%和62.5%,小细胞肺癌中ET-1表达较低,为15.0%。在转移淋巴结中ET-1阳性表达率为58.0%。TNM临床分期,ET-1阳性率分别为Ⅰ期19.0%,Ⅱ期65.7%,Ⅲ期75.0%。ET-1阳性表达率在肿瘤直径大于3 cm者与小于3 cm者之间有显著性差异($P<0.05$)。肺癌组织中ET-1表达阳性者,其周围淋巴结转移率(79.1%)明显高于阴性表达者(47.8%)($P<0.05$)。结论 ET-1普遍存在于肺癌组织及淋巴结转移灶中,对肺腺癌、鳞癌生长及转移过程起重要作用。

关键词:肺癌;内皮素;免疫组化;预后
中图法分类号:R349.21;R73-37;R734.2 文献标识码:A

Expressions of endothelin-1 in lung cancer and metastatic lymph nodes and clinical significance

CHEN Qing-feng, JIAO Wen-jie, LIN Le-sheng, SUN Xian-lu (Department of Plastic Surgery, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract: **Objective** To detect the expressions of endothelin-1 (ET-1) in lung cancer and metastatic lymph nodes and to explore the role of ET-1 in the generation/development and metastasis of lung cancer. **Methods** ET-1 expressions in 80 lung cancer tissues and the surrounding lymph nodes were detected by avidin-bioctin-peroxidase complex(ABC) immunohistochemical method. **Results** In 80 tumor tissue specimens, high expression of ET was found in squamous carcinoma(68.7%) and lung adenocarcinoma(62.5%). Low expression of ET was found in small cell lung cancer(15.0%). In the surrounding metastatic lymph nodes, ET-positive expression rate was 58.0%. At TNM stage(Ⅰ-Ⅲ tumors), ET positive rate was 19.0%, 65.7% and 75.0% at stages Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ, respectively. ET-positive rate in these tumors >3 cm in diameter was 65.6%, while the rate in those <3 cm in diameter was 36.3%. There was statistical difference between them. The metastatic rate of the surrounding lymph nodes with ET-1 positive expression in tumor was 79.1%, higher than that with ET-1 negative (47.8%) ($P<0.05$). **Conclusion** ET-1 is widely expressed in the cells of lung cancer and in the surrounding metastatic lymph nodes. It plays an important role in the process of growth and metastasis of lung adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma.

Key words: lung cancer; endothelin; immunohistochemistry; prognosis

内皮素(Endothelin, ET)是1988年由日本学者Yanagisawa发现的血管活性肽,对动脉、静脉和微血管均具有强大而持久的缩血管和促血管平滑肌细胞增殖的作用[1]。ET有促血管有丝分裂、促血管生成、参与多种肿瘤的生长过程等多种生物学效应。ET可影响细胞DNA的合成、原癌基因的表达,促进细胞增殖、肥大,并诱导肿瘤生长中的血管生成[2]。近年,内皮素与肿瘤生长和转移的关系受到重视。但ET与肺癌的关系国内报道甚少。本研究应用SABC免疫组化方法检测了80例肺癌组织及相应周围转移淋巴结组织中ET-1的表达情况,以探讨ET-1与肺癌的生长与转移的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

80例肺癌组织标本中男性53例,女性27例,患者年龄30~78岁,平均53.6岁。取手术切除的肺癌组织及相应的肺门淋巴结组织,置10%福尔马林固定。80例肺癌标本及相应肺

基金项目:山东省卫生厅基金资助项目(1999,CA2CKB1)
作者简介:陈庆峰(1972-),男,山东省青岛市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤学的基础与临床方面的研究,发表论文5篇。电话:(0532)2911234
收稿日期:2002-11-05;修回日期:2003-03-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

门淋巴结标本均为 2000—2001 年青岛大学医学院附属医院胸外科手术提供，并经病理确诊。组织学分型根据 WHO 标准（1981 年）进行详细病理学检查，并根据新的 TNM 国际分期法（UICC，1997）进行分期。其中小细胞肺癌 12 例，大细胞肺癌 2 例，鳞癌 32 例，腺癌 34 例。所有病人术前均未进行放、化疗及激素治疗。

1.2 试剂与方法

10%福尔马林固定标本，常规石蜡包埋，厚 3 μm 连续切片，组织蜡片置于涂有多聚赖氨酸的载玻片烤干。应用 SABC 免疫组织化学方法进行检测，采用两步法。兔抗人 ET-1 多克隆抗体（美国 SANTA CRUZ 公司生产）和免疫组化 Picture-PV-6000 试剂盒（美国 ZYMED 公司生产）均购自北京中山生物工程有限公司。切片脱蜡至水，切片放入新配制的 3% H_2O_2 中 10 min，灭活内源性酶，蒸馏水与 0.01 mol/L PBS（pH 7.4）浸洗 3 次，滴加兔抗人 ET-1 多克隆抗体（工作液浓度 1∶100），37 ℃温箱中孵育 60 min，0.01 mol/L PBS 洗 3 次。滴加通用型 IgG 抗体-HRP 多聚体（PV-6000），37 ℃孵育 20 min，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，DAB 显色，苏木精轻度复染。

实验中以动脉血管内皮细胞 ET-1 阳性切片作为阳性对照，以 PBS 缓冲液代替一抗的肿瘤细胞染色切片作为阴性对照。

1.3 结果判断

以细胞膜或细胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性细胞，未见着色细胞者为阴性。切片中随机观察 5 个高倍（HP）视野取其平均值，每一视野阳性细胞数＞5%以上确定为阳性。

1.4 统计学分析

采用 χ^2 检验和四格表精确概率法。

2 结果

2.1 ET-1 在不同组织类型肺癌中的表达结果

免疫组化标记显示，肺癌 ET-1 阳性者多表达在细胞膜或细胞浆内，呈棕黄色颗粒状，见图 1、2。80 例肺癌组织标本中，ET-1 表达阳性者 45 例（56.3%），阴性者 35 例（43.7%）。32 例肺鳞癌 ET-1 阳性表达率 68.7%与 34 例腺癌阳性表达率 61.8%比较，差别无显著意义（$P>0.05$）。66 例 NSCLC（鳞癌＋腺癌）阳性表达率为 65.2%，与 SCLC（小细胞肺癌）阳性表达率 15.0%比较，差别有显著性（$P<0.01$）。

2.2 肺癌组织中 ET-1 表达与 TNM 分期的关系

对肺癌标本进行 TNM 临床分期。Ⅱ期与Ⅲ期肺癌 ET-1 表达阳性率比较，二者无显著性差异（$P>0.05$）。Ⅲ期、Ⅱ期和Ⅰ期肺癌 ET-1 的表达存在显著性差异（$P<0.05$），见表 1。肿瘤直径大于 3 cm 肺癌 ET-1 表达阳性率 68.7%，明显高于直径小于 3 cm 肺癌 ET-1 表达阳性率 37.5%（12/32），二者有显著性差异（$P<0.01$）。表明肿瘤直径越大，临床分期越晚，ET 阳性表达水平越高。

表 1 肺癌组织中 ET-1 表达与 TNM 分期的关系

Tab 1 Relationship between the expression of ET-1 in the tissues of lung cancer and TNM stages

TNM stage	ET-1		n	Positive rate(%)
	+	−		
Ⅰ	4	17	21	19.0
Ⅱ	23	12	35	65.7#
Ⅲ	18	6	24	75.0#

#: $P<0.05$ *vs* stage Ⅰ

2.3 癌组织中 ET-1 阳性表达与肿瘤转移的关系

肺癌组织中 ET-1 表达阳性，其周围淋巴结转移率高于表达阴性者，二者有显著性差异（$P<0.05$），见表 2。

表 2 肺癌组织中 ET-1 阳性表达与肿瘤转移的关系

Tab 2 Relationship between the expression of ET-1 in the tissues of lung cancer and tumor metastasis

Expression of ET-1 in tumor tissues	Circum-lymph nodes		n	Metastasis rate (%)
	Metastasis	Non-metastasis		
Positive	34	9	43	79.1*
Negative	11	12	23	47.8

*: $P<0.05$ *vs* negative group

2.4 周围淋巴结组织中 ET-1 阳性表达

在 50 例发生转移的肺门淋巴结组织中，检测到 ET-1 阳性表达 29 例，其阳性表达率为 58.0%，而在 21 例未发生转移的肺门淋巴结组织中未检测到 ET-1 阳性表达。

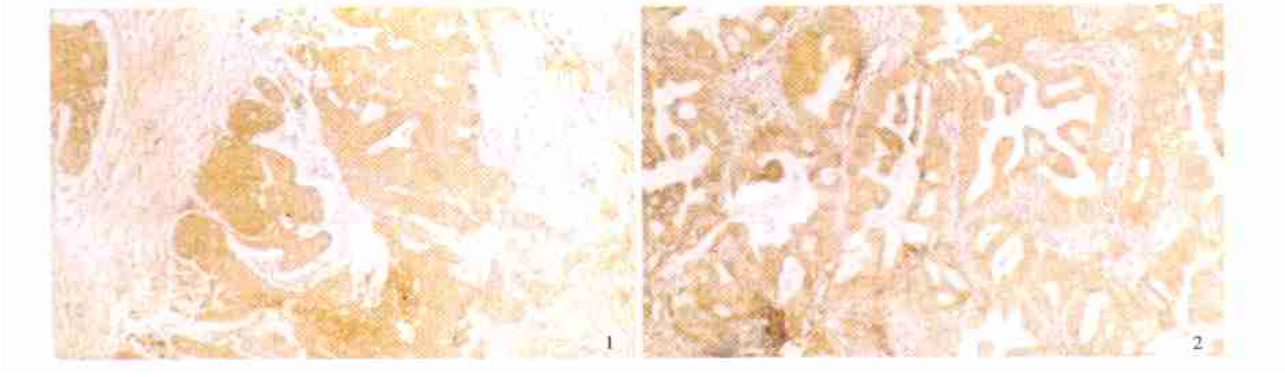


图 1 肺鳞癌 ET-1 阳性表达 （SABC× 100）

Fig 1 Expression of ET-1 in the tissues of lung squamous carcinoma （SABC× 100）

图 2 肺腺癌 ET-1 阳性表达 （SABC× 100）

Fig 2 Expression of ET-1 in the tissues of lung adenocarcinoma （SABC× 100）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

内皮素是由内皮细胞产生的一种很强的缩血管功能多肽。近年来, 发现它具有许多血管外功能, 它是细胞有丝分裂剂, 参与细胞生长代谢, 对细胞 DNA 合成, 原癌基因表达及细胞增殖都有一定的影响。国外已将 ET-1 引入肿瘤学研究领域。有人用"异位" ET-1 产生解释癌细胞产生 ET-1 的现象, 即正常导管细胞或腺泡细胞可能有能力产生 ET-1, 来源于这些细胞的癌细胞保留了这一能力并使之增强, ET-1 可由癌细胞通过自分泌和/或旁分泌的方式释放, 并刺激癌细胞 DNA 合成, 促进癌细胞增殖。ET 能促进原癌基因如 *c-fos* 及 *c-myc* 基因的转录, 促使细胞增殖[3,4]。放射免疫证实: 乳腺癌、肝癌、胃癌、食道癌、胰腺癌、直肠癌、肾癌等肿瘤细胞中均存在 ET-1[5]。

有研究显示, 内皮素与恶性肿瘤的转移也有密切的联系。Kojima 等[6] 用免疫组化技术检测乳腺癌患者的 ET 表达, 发现表达阳性组乳腺癌复发和转移的机会明显大于表达阴性组。Bagnato 等[7] 采用 RT-PCR 和 Northern-bolt 法分析原发卵巢癌和转移卵巢癌, 发现 ET-1、ETAR 在原发灶和转移灶中高度表达。提示内皮素参与肿瘤的转移过程。肿瘤转移灶的生长必须依赖于血管的形成, 新毛细血管网的建立首先要有血管内皮细胞的增殖和移动。内皮素通过增加肿瘤组织的血流量及促进血管的生长与构建而促进肿瘤的生长及转移[8]。

本研究应用免疫组化 SABC 法观察 ET-1 在肺癌组织中阳性表达与分布, 结果表明 ET-1 主要分布于肿瘤细胞胞浆中, 呈棕黄色颗粒。在肺癌组织标本中, ET-1 高度表达。其中鳞癌阳性表达率 68.7%, 腺癌阳性表达率 61.8%, 小细胞未分化癌阳性表达率 15.0%。这与 Giaid 等[9] 报道的结果相一致。表明 ET-1 普遍存在于肺癌细胞中。本实验显示来源于支气管表面上皮的 NSCLC(鳞癌+腺癌)ET 阳性表达率, 明显高于来源于神经内分泌细胞的小细胞未分化癌阳性表达率。目前已知, ET 和血管紧张素 II (Ang II)具有生物学协同作用, Ang II 可以促进内皮细胞 ET 的 mRNA 表达, 其过程与蛋白激酶 C 激活有关。而小细胞未分化肺癌细胞表面 Ang II 受体亚型 AT1 分布少, 不能使细胞内外 Ca^{2+} 活动增加, 从而 ET 的含量较少[10]。以上表明, 来源于上皮组织的肺癌细胞具有合成和分泌 ET 的能力, 作为内生性生长因子, 内皮素可以旁分泌和自分泌的方式释放, 刺激肺癌细胞的异常增生。

对肺鳞癌、腺癌进行临床分期比较发现, TNM II期、TNM III期肺癌组织中 ET-1 阳性表达率明显高于 TNM I 期肺癌组织。肿瘤直径大于 3 cm 中癌组织 ET-1 阳性表达率明显高于直径小于 3 cm 的癌组织。这表明肿瘤增长分化程度高低与 ET-1 含量有一定关系。肿瘤直径越大、病理分期越晚, 癌组织中 ET 阳性表达越高, 而在肺癌早期 ET-1 阳性表达较低。这亦证实 ET-1 通过肺癌细胞的自分泌和/或旁分泌的方式作用于肿瘤自身, 刺激肺癌细胞异常增殖。ET 促进肺癌的发生发展, 可以作为检测肺鳞癌、腺癌生长的分子标志物。

ET-1 除具有促癌细胞 DNA 合成和有丝分裂外, 也可以通过 ETB 受体促进血管内皮细胞的生长和增生, 促进肿瘤血管床的新生血管产生, 增加肿瘤血管血流量[8]。这些新生的大量幼稚血管, 由于缺乏完整性, 癌细胞易于侵蚀这些血管, 增加了肺癌细胞进入血液循环的机会, 有利于肺癌转移的发生。本组肺门转移淋巴结中检测到 ET-1 的表达, 并发现癌组织 ET-1 表达阳性者, 其周围淋巴结转移率明显高于 ET-1 表达阴性者, 提示 ET-1 能够促进肺癌的淋巴结转移。矫文捷等[11] 用放射免疫法测定肺癌患者血浆中内皮素含量, 发现局部淋巴结有转移者其血浆 ET-1 含量明显高于未转移者。本实验结论与之相同。

综上所述, ET-1 普遍存在于肺癌组织及淋巴结转移灶中, 肺癌组织中 ET-1 阳性表达与肿瘤细胞分化类型、肿瘤大小、TNM 分期及淋巴结转移与否有关, ET-1 在肺癌的生长和转移过程中发挥重要作用。发展特异的 ET 转化酶抑制剂和 ET 受体拮抗剂, 制备 ET 的单克隆抗体和应用 ET 拮抗剂, 可能为肺癌治疗开辟新的途径。ET-1 在肺癌发生发展过程中的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, *et al*. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells[J]. Nature, 1988, 332(6163): 411-415.

[2] 汤　健, 唐朝枢. 心脏内分泌学[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1991. 8-14.

[3] Shichiri M, Hirata Y, Marumo F. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine factor for human tumor cell lines[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1991, 17(Suppl 7): S76-78.

[4] Kusuhara M, Yanguchi K, Nagaski K, *et al*. Production of endothelin in human cancer cell lines[J]. Cancer Res, 1990, 50(11): 3257-3261.

[5] Battistini B, Chailler P, D'Orleans-Juste P, *et al*. Growth regulatory properties of endothelins[J]. Peptides, 1993, 14(2): 385-399.

[6] Kojima K, Nihei Z. Expression of endothelin-1 immunoreactivity in breast cancer[J]. Surg Oncol, 1995, 4(6): 309-315.

[7] Bagnato A, Salani D, Di-Castro V, *et al*. Expression of endothelin-1 and endothelin A recepter in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 720-727.

[8] Asham E H, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1 and tumour development[J]. Eur J Surg Oncol, 1998, 24(1): 57-60.

[9] Giaid A, Hamid Q A, Springall D R, *et al*. Detection of endothelin immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumours[J]. J Pathology, 1990, 162(1): 15-22.

[10] Batra V K, Gopalakrishnan V, McNeill J R, *et al*. Angiotension II elevates cytosolic free calcium in human lung adenocarcinoma cells via activation of AT1 receptors[J]. Cancer Lett, 1994, 76(1): 19-24.

[11] 矫文捷, 林乐胜, 罗宜人, 等. 肺癌淋巴结或血行转移时血浆内皮素的变化[J]. 中国肺癌杂志, 2000, 3(1): 66-67.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net