DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.036


论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1460-03

# 肺癌患者CD、P53、P16、nm23、EGFR和CEA表达及其与预后的关系

王志新,陈正堂 (第三军医大学附属新桥医院全军肿瘤中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨组织蛋白酶D(CD)、表皮生长因子受体(EGFR)、转移抑制基因nm23、抑癌基因P16、P53、癌胚抗原(CEA)在非小细胞肺癌(NSCLC)的表达及临床意义。方法 采用链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)快速免疫组化法检测了64例肺癌标本六种蛋白的表达。结果 肺癌组织P53、CD、EGFR、nm23、CEA和P16表达的阳性率分别为76.6%、65.6%、67.2%、60.9%、76.6%和51.6%,P16蛋白阴性表达率达48.4%,CD、CEA和EGFR表达与肺癌患者临床分期($P<0.05$、$P<0.05$、$P<0.01$)、淋巴结转移($P<0.01$、$P<0.05$、$P<0.05$)密切相关,后者亦与细胞分化程度有关($P<0.01$)。COX比例风险模型分析和Kaplan-Meier存活曲线分析显示CD和EGFR是影响肺癌病人预后的重要因素($P<0.05$)。结论 在NSCLC中nm23、P16、CD、P53、CEA和EGFR异常改变的频率很高,它们在NSCLC的发生、发展中可能起促进作用。CD和EGFR可作为评价NSCLC患者的预后指标之一。

关键词:肺肿瘤;肿瘤标志物;预后
中图法分类号:R734.2 文献标识码:A

# Expressions of cathepsin D, P53, P16, nm23, EGFR and CEA in lung cancer and their prognostic significance

WANG Zhi-xin, CHEN Zheng-tang (Cancer Center of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** Objective To study clinical significance of the expressions of cathepsin D(CD), epidermal growth factor receptor(EGFR), nm23, P16, P53 and carcinoembrynic antigen(CEA) in patients with non-small cell lung cancer.(NSCLC). Methods A rapid immunohistochemical method (streptavidin-peroxidase conjugataed method SP) was used to detect the expressions of the six proteins in the lung cancer samples from 64 cases of NSCLS. Results The positive expression rates of P53, CD, EGFR, nm23, CEA and P16 were 76.6%, 65.6%, 67.2%, 60.9%, 76.6% and 51.6% respectively in the lung cancer tissues. The negative expression rate of P16 protein was 48.4%. The expressions of CD, CEA and EGFR were significantly correlated to the stages of the disease ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$) and lymph node metastasis ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$) in the lung cancer patients, and that of EGFR also had a marked correlation to the cell differentiation ($P<0.01$). The multivariate analysis with COX hazard model and Kaplan-Meier method showed that the expressions of CD and EGFR were the most important indicators in prognosis of the disease. Conclusion The abnormal expressions of all the six factors are very high in the NSCLC patients, and they may play promoting roles in the incidence and development of NSCLC. The expressions of CD and EGFR are the prognostic indicator of NSCLC.

**Key words:** lung neoplasms; tumor marker; prognosis

肺癌的侵袭和转移是造成肺癌病人术后复发和放化疗治疗失败的主要原因;也是肺癌患者存活率、治愈率得不到提高的根本原因。癌转移是一个十分复杂的过程,受多层次基因调控。到目前为止,用于临床提示肺癌转移的标志物很有限,本研究着重探讨溶酶体酸性蛋白酶—组织蛋白酶D,表皮生长因子受体(EGFR),转移抑制基因nm23,抑癌基因P16、P53和癌胚抗原(CEA)在非小细胞肺癌表达及与预后的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

64例肺癌患者均系我院胸外科1991—1995年手术病人,有完整的资料,随访至术后5年,失访3例,5年生存率为32.8%,所有病人术前未行放、化疗。64例患者中男性58例,女性6例,年龄37~68岁,平均56.4岁。鳞癌30例,腺癌34例,其中有淋巴结转移35例。病例按国际TNM分期(UICC, 5th ed, 1997),Ⅰ期23例,Ⅱ期17例,Ⅲ期21例,Ⅳ期3例。

作者简介:王志新(1953—),女,河北省徐水市人,硕士,主任医师,教授,主要从事肿瘤转移方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68755375

收稿日期:2001-03-23;修回日期:2001-05-11

### 1.2 免疫组化染色

全部标本均经10%福尔马林固定,石蜡包埋,常规切片5 μm。采用链酶素抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(Streptavidin peroxides conjugated method, S-P),免疫组化试剂盒及兔抗人组织蛋白酶D、抗NDPN/nm23、抗P16抗体及鼠抗人EGFR、P53、CEA单抗是美国Maxin公司生产,购自福州迈新公司。检测程序按照说明书操作,显色剂DAB。阴性对照用PBS代替一抗,阳性对照由公司提供。

### 1.3 统计学处理

P53、P16、nm23、CD、EGFR和CEA表达与肺癌临床病理关系采用$\chi^2$检验。上述因子表达与病人预后关系应用多因素COX比例风险模型分析,存活曲线用Kaplan-Meier方法分析。采用SPSS软件包完成。

## 2 结果

免疫组化结果判定:细胞染色阳性信号为棕黄色,P53阳性产物定位癌细胞核,胞浆、胞膜无着色。CEA、组织蛋白酶D(CD),nm23蛋白定位癌细胞浆,呈弥漫型胞浆分布,P16蛋白定位胞浆和胞核,少许正常支气管粘膜呈阳性反应,且较癌组织强。EGFR定位癌细胞膜或细胞浆,癌组织阳性细胞以片状,局灶状分布为主,鳞癌以细胞膜型为主,占71.9%,腺癌以胞浆或膜浆表达为主,见图1~2。

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

6 种蛋白在肺癌表达及与临床病理关系见表 1。各临床分期, 不同分化程度以及淋巴结转移组均有六种蛋白的较高表达, CEA、CD 和 EGFR 表达与临床分期, 淋巴结转移密切相关, 后者亦与分化程度有关($P<0.05$、$P<0.01$)。

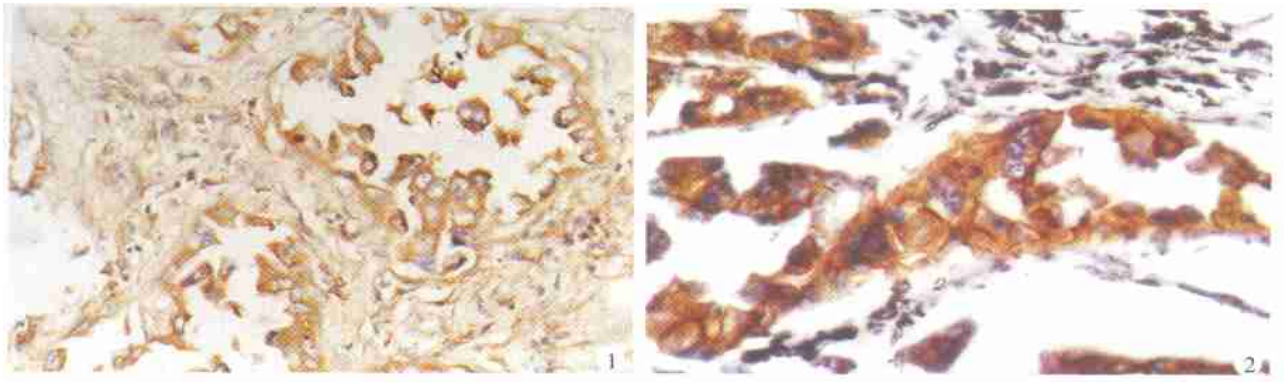


图 1　免疫组化染色显示肺腺癌细胞胞浆 CD 阳性　(S-P× 400)

**Fig 1　Cytoplasmic positivity of CD protein in lung adenocarcinoma with immunohistochemical staining**(S-P× 400)

图 2　免疫组化染色显示肺腺癌胞浆胞膜 EGFR 阳性(S-P× 400)

**Fig 2　Cytoplasmic and membrane positivity of EGFR protein in lung adenocarcinoma with immunohistochemical staining**(S-P× 400)

表 1　肺癌组织 nm23、P16、CD、EGFR、CEA、P53 表达与肺癌患者的临床病理关系

**Tab 1　Relationship of the expressions of nm23, P16, CD, EGFR, CEA and p53 with clinical pathology in NSCLC patients**

| | *n* | nm23 positive(%) | P16 positive(%) | CD positive(%) | EGFR positive(%) | CEA positive(%) | P53 positive(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Type | | | | | | | |
| Squamous | 30 | 20(66.7) | 15(50.0) | 17(56.7) | 24(80.0) | 23(76.8) | 26(86.7) |
| Adenocarcinoma | 34 | 19(55.9) | 18(52.9) | 25(73.5) | 19(55.9) | 26(76.5) | 23(67.7) |
| Stage | | | | | | | |
| Ⅰ－Ⅱ | 40 | 25(62.5) | 23(57.5) | 22(55.0) | 21(52.5) | 26(65.0) | 32(80.0) |
| Ⅲ－Ⅳ | 24 | 14(58.3) | 10(41.7) | 20(83.3) ** | 22(91.7) * | 23(95.8) ** | 17(70.8) |
| Differentiation | | | | | | | |
| Well | 7 | 4(57.1) | 4(57.1) | 4(57.1) | 3(42.9) | 7(100.0) | 4(57.1) |
| Moderate | 16 | 9(56.3) | 11(68.8) | 11(68.8) | 6(37.5) | 15(93.8) | 10(62.5) |
| Poor | 41 | 23(56.1) | 18(43.9) | 27(65.9) | 34(82.9) * | 27(65.8) | 35(85.4) |
| Lymph node metastasis | | | | | | | |
| Positive | 35 | 23(65.7) | 23(65.7) ** | 29(82.9) * | 28(80.0) ** | 30(85.7) ** | 27(77.1) |
| Negative | 29 | 16(55.2) | 10(34.5) | 13(44.8) | 15(51.7) | 19(65.2) | 22(75.9) |

*: $P<0.01$, **: $P<0.05$ *vs* other subgroups of its own group

应用 COX 比例风险模型评估 P53、P16、nm23、CD、EGFR 和 CEA 表达与肺癌患者预后关系, 结果显示只有 CD 和 EGFR 与病人预后有显著相关, P53、P16、nm23、CEA 对病人预后影响不大。存活曲线分析表明 CD 阳性组和 EGFR 阳性组术后生存时间显著短于阴性组($P<0.05$), 见图 3～4。

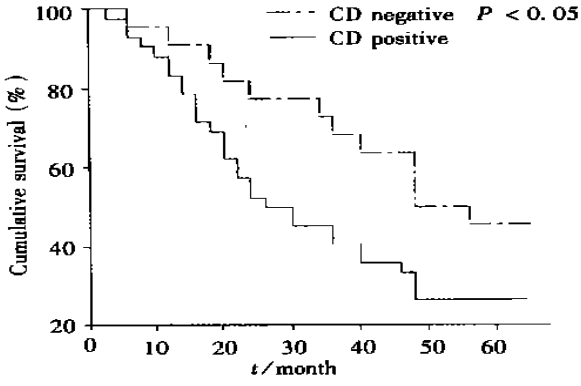



图 3　CD 阳性和阴性组 NSCLC 病人生存曲线

**Fig 3　Survival curves of patients with non-small cell lung cancer CD(－) versus CD(＋)**

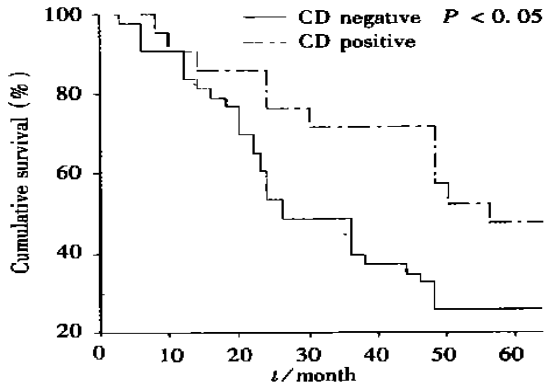



图 4　EGFR 阳性和阴性组 NSCLC 病人生存曲线

**Fig 4　Survival curves of patients with non-small cell lung cancer EGER(－) versus EGFR(＋)**

## 3　讨论

癌转移是一个十分复杂、涉及多环节, 多步骤的连续过程, 受多层次基因调控, 包括肿瘤转移相关基因、

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

蛋白溶解酶、自分泌生长因子、粘附分子等。nm23 基因被认为是肿瘤转移抑制基因的最佳代表，与乳腺癌等多种肿瘤的转移呈负相关，但近几年该论点受到挑战[1]。p53 和 p16 基因是抑癌基因，P16 蛋白为细胞周期依赖激酶(CDK)的抑制剂，其功能是在 G1 卡点与 cyclinD1 竞争结合 CDK4，抑制 CDK4 活性，阻止细胞尤其是带有损伤 DNA 的细胞进入细胞周期，抑制细胞分裂，是细胞周期的负性调控剂，近年研究表明 p53 和 p16 在人类多种肿瘤存在基因的突变和缺失，与肿瘤的发生、发展可能密切相关[2]。组织蛋白酶 D 是一种溶酶体天冬氨酰蛋白酶和自分泌丝裂原，能促进细胞增殖，具有蛋白溶解活性。国外许多研究提示 CD 在肿瘤侵袭、转移中起重要作用[3]。CD 高表达与乳腺癌患者的生存期、淋巴结转移呈显著相关。近年研究发现，CEA 属于免疫球蛋白超家族成员中的细胞粘附分子，具有同嗜和异嗜粘附功能，在肿瘤转移中可能起重要作用。EGFR 是原癌基因 C-erbB-1 的表达产物，具有酪氨酸激酶活性。人类多种肿瘤如结肠癌、胃癌等均有 EGFR 的过度表达，常提示肿瘤细胞分化差，有较强的侵袭转移能力，病人存活期短，预后不良[4]。

为探讨上述转移相关标志物与肺癌发生、发展的关系，我们分析了 nm23、CD、P16、EGFR、P53 和 CEA 蛋白在肺癌表达及与有关病理指标的关系，结果显示 64 例肺癌中，EGFR、CD、P53、nm23、CEA 和 P16 均有很高的异常表达率。其阳性表达与组织学类型没有相关性。Ⅲ~Ⅳ中晚期病人 CEA、EGFR 及 CD 表达阳性率明显高于Ⅰ~Ⅱ期病人。淋巴结转移组 CD、CEA、EGFR 及 P16 表达高于无淋巴结转移组，提示上述因子的异常表达与肺癌的发生、发展关系密切。本研究应用多因素 COX 模型和 Kaplan-Meier 生存曲线分析上述因子与病人预后和生存的关系，结果显示 CD 和 EGFR 是影响病人预后的重要因素。CD 的定位研究发现在基质和肿瘤细胞连接处含有 CD。CD 通过内吞作用可以降解细胞外基质，亦可释放血管生成因子，刺激新生血管生成，此为肿瘤生长和转移所必需[5]。新近研究表明 C-erB 癌基因的激活，可促使肿瘤细胞粘附血管内皮细胞，上调 VEGF，促进血管生成并侵袭血管，EGFR 还可上调基质金属蛋白酶 MMP-9 表达，后者可消化基底膜的Ⅳ胶原[6,7]。体外实验也显示，只有 EGFR 阳性的癌细胞株才具有侵袭能力，可能通过降低粘附分子 E-cadherin 表达，促使瘤细胞侵袭能力增加。上述研究结果提示 CD 和 EGFR 参与了肿瘤侵袭转移过程。本组实验未发现 nm23 表达与肺癌转移有相关性，可能由于 nm23 基因改变，导致异型蛋白产生，形态表型的特殊改变，也可能由于 nm23 基因的两个亚型 nm23-H1 和 nm23-H2 所表达的功能不同[8]。p53 和 p16 基因突变及缺失在 NSCLC 亦属常见，p53 基因异常改变在肺癌的发生、发展中可能是一个早发事件。国外学者研究原发性和转移性 NSCLC，发现只有转移性 NSCLC 存在 p16 基因异常改变，原发灶无 p16 基因突变者，转移灶存在 p16 基因点突变，p16 基因的改变有可能属于迟发事件[9]。CEA 作为细胞粘附分子，其同嗜粘附可促进 CEA 阳性细胞在微循环聚集，形成瘤栓，延长瘤细胞在血管床滞留时间，增加瘤细胞转移机会，CEA 的异质粘附，可造成瘤细胞在继发部位定居[10]。本组研究发现 CEA 的异常高表达与肺癌的临床分期和淋巴结转移密切相关，3 例癌栓 CEA 均表达阳性，尽管多因素 COX 模型分析未发现 CEA 对肺癌病人预后有显著影响，但 CEA 在癌栓形成过程及在肺癌转移过程中可能仍起重要作用[11]。

本研究表明，在肺癌中 nm23、P16、CD、P53、CEA 和 EGFR 蛋白异常改变的频率很高，它们在肺癌的发生、发展中可能起了促进作用。CD 和 EGFR 异常表达提示病人预后不良，可作为 NSCLC 患者的预后因素之一。

参考文献：


[1] Yoo C H, Noh S H, Kim H, *et al*. Prognostic significance of CD44 and nm23 expression in patients with stage Ⅱ and stage ⅢA gastric carcinoma [J]. J Surg Oncol, 1999, 71(1): 22—28.

[2] Roussel M F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer[J]. Oncogene, 1999, 18(38): 5 311—5 317.

[3] Rochefort H, Liaudet C E. Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand[J]. APMIS, 1999, 107(1): 86—95.

[4] Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y, *et al*. Amplification of the c-met, c-erB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features[J]. Oncology, 1998, 55(5): 475—481.

[5] Briozzo P, Badet J, Capony F, *et al*. MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D[J]. Exp Cell Res, 1991, 194(2): 252—259.

[6] Cox G, Jones J L, O'Byrne K J. Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(6): 2 349—2 355.

[7] Eccles S A. Cell biology of lymphatic metastasis: The potential role of c-erbB oncogene signaling[J]. Recent Results Cancer Res, 2000, 15 741—15 754.

[8] Lo Muzio L, Mignogna M D, Pannone G, *et al*. The nm23 gene and its expression in oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 1999, 6(4): 747—751.

[9] Okamoto A, Hussain S P, Hagiwara K, *et al*. Mutations in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15 INK4B/MTS2 and p18 gene in primary and metastatic lung cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(7): 1 448—1 451.

[10] Kitadai Y, Radinsky R, Bucana C D, *et al*. Regulation of carcinoembryonic antigen expression in human colon carcinoma cells by the organ microenviroment[J]. Am J Pathol, 1996, 146(4): 1 157—1 166.

[11] 王志新，高明发. 非小细胞肺癌癌胚抗原表达的临床意义[J]. 第三军医大学学报，2001，23(1)：102—104.


（编辑 陈聪连）

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