

高尔基体糖蛋白 - 73 在非小细胞肺癌中的表达及意义

韩秋月 章霞 陈保富 阮嫣赞 张坚刚 颜卫华 林爱芬

摘要 目的 研究非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)和正常肺组织中高尔基体糖蛋白-73(Golgi protein 73, GP73)的表达差异,探讨 GP73 表达与 NSCLC 发生、发展及其预后的相关性。方法 免疫组织化学法检测 90 例 NSCLC 组织和 19 例肺正常组织 GP73 的表达,结合临床病理因素分析其与 NSCLC 预后的相关性。ROC 曲线分析 GP73 用于肺腺癌和鳞癌鉴别诊断的价值。结果 NSCLC 中 GP73 表达较正常肺组织高,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),GP73 表达与组织学类型及临床病理分期显著相关,而与 NSCLC 肿瘤分化程度、性别、年龄及术后生存期不相关。ROC 曲线下面积为 0.710(95% 可信区间为 0.590~0.831, $P < 0.05$)。结论 GP73 在 NSCLC 组织中高表达,且与病理类型及临床分期显著相关,GP73 对肺腺癌和鳞癌的鉴别诊断具有潜在价值。

关键词 非小细胞肺癌 高尔基体 GP73 免疫组织化学

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.011

Expression and Significance of Golgi Protein 73 in Non-small-cell Lung Cancer. Han Qiuyue, Zhang Xia, Chen Baofu, et al. Affiliated Taizhou Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the expression of Golgi protein-73 (GP73) in non-small-cell lung cancer (NSCLC) and normal lung tissues, and evaluate the significance of GP73 in the diagnosis and prognosis of NSCLC. **Methods** The expression of GP73 was detected by immunohistochemistry in 90 tissues of NSCLC and 19 tissues of normal lung. The correlation of GP73 and NSCLC prognosis was analyzed and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used for the differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell cancer. **Results** GP73 expressed in NSCLC primary lesions was obviously higher than that in normal lung tissues ($P < 0.05$). GP73 expression was significantly associated with histopathology type ($P < 0.01$) and clinical stage ($P < 0.05$), nevertheless, it was not associated with tumor differentiation, age, gender and survival time of NSCLC patients. The area under ROC curve for lesion GP73 was 0.710 (95% CI: 0.590-0.831, $P < 0.05$). **Conclusion** GP73 in NSCLC primary lesions is high expression, mainly in the glandular epithelium cell of lung adenocarcinoma, and correlated with clinical stage. ROC curve analysis revealed that GP73 is a potential biomarker to discriminate adenocarcinoma from squamous cell carcinoma in NSCLC patients.

Key words Non-small-cell lung cancer; Golgi apparatus; GP73; Immunohistochemistry

肺癌是临床上最常见的恶性肿瘤,全球肺癌的发生率和病死率均处于上升趋势,特别在中国等发展中国家^[1,2]。研究表明,高尔基体在细胞增殖、分化及信号转导中发挥重要作用,其功能障碍与肿瘤的发生、发展关系密切^[3]。高尔基体糖蛋白-73(Golgi protein 73, GP73)是近几年发现的定位于高尔基体上的 II 型跨膜蛋白质,又称 Golgi membrane protein 1 (GOLM1)。它在正常人体的多种上皮细胞内表达,尤其高表达于肝脏胆管上皮细胞内,在肺部支气管纤

毛柱状上皮细胞中也有较高的表达水平^[4]。本研究旨在通过研究 GP73 在非小细胞肺癌(NSCLC)及肺正常组织中的表达情况,分析 GP73 表达与临床病理分期、术后生存期等因素的相关性,探讨 GP73 在 NSCLC 的诊断和预后判断中的价值。

材料与方法

1. 标本采集:收集温州医科大学附属浙江省台州医院 2004 年 10 月~2010 年 11 月手术切除的 NSCLC 患者标本 109 例,包括 90 例 NSCLC 原发灶肿瘤组织和 19 例匹配的肺远端正常组织。样本收集及使用均已通过笔者医院伦理委员会审核。所有病例术前均未经过放化疗和其他抗肿瘤治疗。90 例病例中,男性 69 例,女性 21 例,患者年龄为 38~80 岁,平均年龄为 60 岁。19 例肺正常组织中,男性 15 例,女性 4 例,患者年龄为 41~67 岁,平均年龄为 57 岁。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31370920,81372247)

作者单位:317000 温州医科大学附属台州医院组织标本库(韩秋月、章霞、阮嫣赞、张坚刚、林爱芬),心胸外科(陈保富),中心实验室(颜卫华)

通讯作者:林爱芬,研究员,电子信箱:linaf@enzemed.com

NSCLC 标本均经病理医生确诊,其中 30 例为腺癌,44 例为鳞癌,16 例为腺鳞癌。临床病理分期标准参照 UICC 第 7 版肺癌 TNM 分期标准。所有标本均经 10% 中性甲醛溶液固定、常规石蜡包埋,连续 4 μ m 切片备用。

2. 试剂与方法:应用 50 倍丙酮稀释的 APES 处理洁净的载玻片,预防脱片。4 μ m 石蜡切片 60 $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤过夜,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化。蒸馏水浸泡后,0.3% 新鲜配置的 H₂O₂ 孵育 15min,消除内源性过氧化物酶。采用 0.01mol/L 枸橼酸盐溶液 (pH6.0) 进行高温高压热修复。TBS 溶液冲洗后,1% BSA 溶液封闭非特异性抗原,甩净多余的 BSA 溶液后滴加兔抗人 GP73 多克隆抗体 (Abcam 公司),4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。取出湿盒,室温静置 1h。TBS 冲洗后,滴加过氧化物酶标记的抗兔第 2 抗体 (KPL),37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 0.5h。TBS 冲洗后,DAB (DAKO) 显色。苏木精复染,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片、镜检。已知 GP73 阳性的正常胃组织作为每次实验的阳性对照,TBS 溶液作为每次实验的阴性对照。

3. 评分方法:采用 Olympus 显微镜观察组织切片染色情况。GP73 蛋白主要定位于上皮细胞胞质,胞质内出现黄色、棕黄色或褐色颗粒的细胞计为阳性细胞。随机选择 10 个高倍镜视野,计算阳性细胞百分数。评分方法采用阳性细胞百分比计分:0~5% 为 0,6%~25% 为 +,26%~50% 为 ++,>50% 为 +++。GP73 着色的判断与阳性细胞百分比有关,而与着色的深浅程度无关。0 为 GP73 表达阴性,+~+++ 为 GP73 表达阳性。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计分析软件分析处理。计数资料采用卡方检验。生存分析采用 Kaplan - Meier 法,不同组间生存曲线的比较采用 Log - rank 检验。ROC 曲线分析 GP73 在肺腺癌与鳞癌鉴别诊断中的价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. GP73 在 NSCLC 及肺正常组织中的表达情况:GP73 在 NSCLC 组织中呈阳性表达,表达率为 56% (50/90,图 1A)。GP73 在正常组织中阳性表达率相对较低,表达率为 26% (5/19,图 1B)。两组间进行比较,GP73 在 NSCLC 及肺正常组织中表达差异有统计学意义 ($P = 0.021$)。

2. 肺癌组织 GP73 表达与各临床病理参数的相

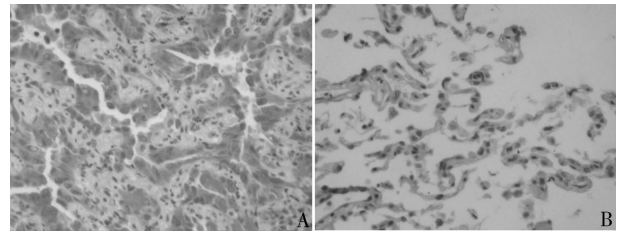


图 1 GP73 在肺癌及肺正常组织中的表达情况 (×100)
A. 肺癌组织 GP73 阳性表达;B. 正常肺组织 GP73 阳性表达

关性分析:90 例 NSCLC 组织 GP73 表达结果与组织学类型及临床分期差异有统计学意义 (表 1)。肺鳞癌 GP73 阳性表达率为 38.6% (17/44),肺腺癌为 73.7% (22/30),肺腺鳞癌为 68.8% (11/16),3 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。TNM 分组中,I、II 期与 III/IV 期 3 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 NSCLC 组织 GP73 表达与肿瘤分化程度、性别、年龄差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 NSCLC 组织 GP73 表达与各临床病理参数的相关性

病理因素	n	GP73 表达		P
		阴性例数	阳性例数	
总例数	90	40	50	
性别				
男性	69	33	36	0.242
女性	21	7	14	
年龄 (岁)				
<60	39	17	22	0.887
≥60	51	23	28	
组织学类型				
鳞癌	44	27	17	0.007
腺癌	30	8	22	
腺鳞癌	16	5	11	
肿瘤分化程度				
低分化	16	9	7	0.295
中高分化	74	31	43	
TNM 分期				
I	17	3	14	0.039
II	55	29	26	
III/IV	18	8	10	

3. GP73 表达与 NSCLC 患者预后关系:GP73 阳性表达的 NSCLC 患者中位生存时间 886 天,95% 可信区间:418.3~1353.7 天;GP73 不表达的患者中位生存时间 875 天,95% 可信区间:683.1~1066.9 天。对两组的生存率进行 Log rank 检验,两组间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.468, P = 0.494$)。生长曲线见图 2。

4. ROC 曲线分析:曲线下面积为 0.710 (95% 可信区间 0.590~0.831, $P < 0.05$)。表明免疫组化法

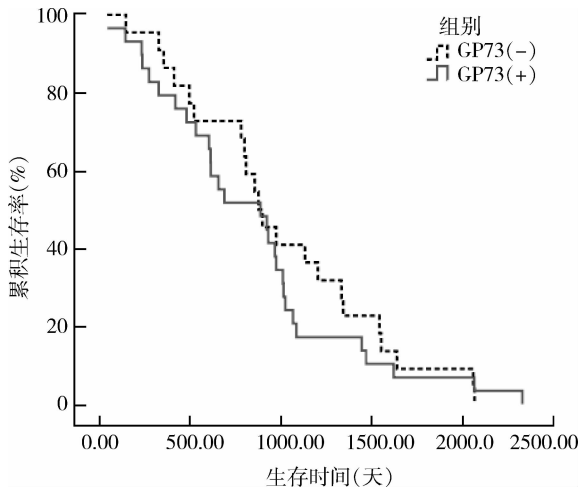


图2 GP73 表达水平与 NSCLC 患者累积生存率的关系

检测 GP73 用于肺腺癌和鳞癌的鉴别诊断具有较高准确性(图3)。

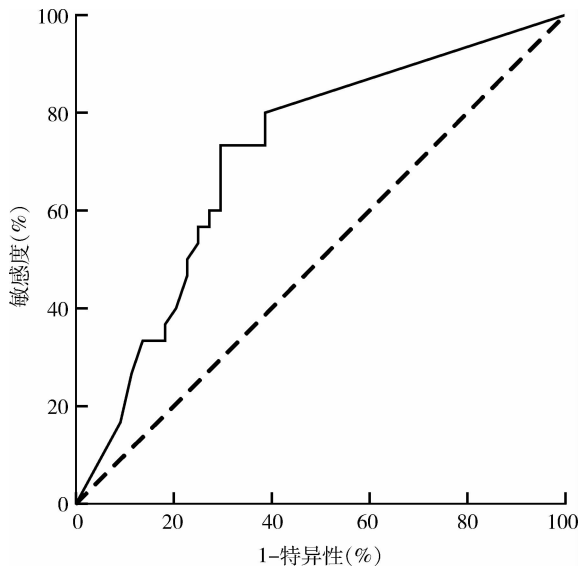


图3 GP73 鉴别诊断肺腺癌和鳞癌 ROC 曲线分析

讨 论

肺癌是当今世界对人类健康危害最大的恶性肿瘤之一,据最新统计,2012 年全球大约新增 180 万肺癌病例,约为新增癌症病例的 13%^[2]。肺癌患者明确诊断时约 70% 已发展成局部晚期或转移性肺癌。因此,寻找肺癌患者肿瘤标志物,提高早期诊断效率,对于提高肺癌患者的疗效具有特殊的重要性。

GP73 是一种 II 型高尔基体跨膜糖蛋白,与肝炎、肝硬化及肝癌等的发生、发展密切相关。2000 年, Kladney 等^[4]在研究成人巨大细胞性肝炎(giant - cell hepatitis, GCH)病原学时首次发现该蛋白。GP73 分子质量为 7.3×10^4 kDa, 位于人类 9q21.33 染色体

上,由 GOLM1 基因编码,共编码 401 个氨基酸。GP73 一级结构可分为 5 个区域,分别是 N 末端胞质区、跨膜区、螺旋结构域区、非保守区及羧基酸性区。其中,螺旋结构域区是 GP73 主要功能区,是蛋白质之间相互作用的区域。

GP73 广泛存在于人体多种上皮细胞,但表达水平的差异很大,主要以肝脏胆管上皮细胞表达最明显。在正常肝脏组织中,GP73 表达主要局限于汇管区的胆管上皮细胞中,在管腔一侧的细胞核和细胞膜之间呈星点状分布,这是典型的极性上皮细胞中的高尔基体分布;而大部分肝细胞不表达,或仅少量汇管区周围的肝细胞呈微量表达^[4,5]。在巨细胞肝炎、HBV 感染、HCV 感染、酒精性肝炎等肝脏疾病中,均能观察到肝细胞和胆管细胞的上皮细胞 GP73 表达上调^[5]。此外,GP73 在肝细胞肝癌中表达上调,且与肿块大小、分化程度和脉管浸润具有显著相关性,而其在肝内胆管细胞癌中的表达与患者生存期显著相关,是一项独立的预后因素^[3,6]。

GP73 在正常的结肠、胃、前列腺和支气管组织中也有较高表达水平^[4]。胃癌中 GP73 mRNA 和蛋白表达水平下调,明显弱于正常胃肌层组织,并且胃癌中 GP73 表达与肿瘤分化程度相关^[7]。然而 Liu 等^[8]研究显示胃癌 GP73 mRNA 和蛋白表达量均明显高于邻近非癌肌层组织,并且其表达与临床分期、T、N、M 和脉管浸润显著相关,提示 GP73 表达高的病人生存期明显缩短。在肾细胞癌中,GP73 表达仅与其病理类型差异有统计学意义($P < 0.05$),肾透明细胞癌下调 GP73 表达,而嫌色、乳头状肾细胞癌上调 GP73 表达^[9]。

近来研究表明,GP73 能在肺癌组织中表达。Lu 等^[10]分析人类恶性肿瘤上调的基因,其中 GP73 在人类一些癌症中表达异常,包括肺癌组织 GP73 表达上调。Kladney 等^[4]分析人类不同器官组织中 GP73 mRNA 和蛋白质表达水平差异性,发现正常肺组织显示中等表达。Zhang 等^[11]研究发现 GP73 在肺腺癌表达率较高,主要表达在肺腺癌腺上皮细胞,尤其聚集在管腔一侧。本研究结果显示,GP73 在 NSCLC 组织中表达明显高于肺正常组织。肺腺癌组织 GP73 表达率明显高于肺鳞癌、肺腺鳞癌组织的表达率,与 Zhang 等^[11]报道的一致。本研究发现,NSCLC 组织中 GP73 表达不仅与肺癌患者病理组织学类型明显相关,也与其临床分期有关,而与 NSCLC 肿瘤分化程度、性别、年龄及生存期差异无统计学意义($P <$

0.05)。GP73 表达的 ROC 曲线下面积为 0.710 (95% 可信区间 0.590 ~ 0.831, $P < 0.05$), 提示 GP73 可作为肺腺癌和鳞癌鉴别诊断的参考指标。

GP73 定位于高尔基体膜顺面, 其 N 末端是单次跨膜结构域, 其 C 末端是高尔基体管腔表面的螺旋结构域, 最初提示 GP73 是不能分泌到细胞外的蛋白^[5]。但血清学检测, 发现肝细胞癌、肝胆管上皮细胞癌中 GP73 表达均上调^[6]。这说明 GP73 可以分泌到血清中, 是一类分泌型蛋白, 但其确切的分泌机制仍未知。AFP 是肝癌早期诊断的金标准, 而有研究显示 AFP 和 GP73 检测肝癌的敏感度分别为 58.2% 和 74.6%, 特异性分别为 85.4% 和 97.4%, 提示 GP73 对肝癌血清学检测的敏感度和特异性均优于 AFP, GP73 有可能成为早期肝癌诊断的筛选指标。Zhang 等^[11]对肺癌血清中 GP73 表达水平进行检测分析, 也发现肺癌患者血清 GP73 表达升高, 且肺腺癌、鳞癌、正常组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此可见, 多中心大样本检测 NSCLC 组织及血清中 GP73 表达水平, 分析 GP73 在 NSCLC 中的生物学功能, 对于了解 GP73 在非小细胞肺癌诊断和预后判断中的价值具有重要意义。

综上所述, GP73 在 NSCLC 组织中表达上调, 且与病理类型及临床分期显著相关。ROC 曲线分析表明 GP73 可作为肺腺癌和鳞癌鉴别诊断的辅助分子标志物。NSCLC 组织 GP73 表达的差异, 提示 GP73 在 NSCLC 发生、发展过程中起着重要作用, 有望成为 NSCLC 潜在的诊断和预后判断指标之一。

参考文献

1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J].

CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90

2 Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108

3 Sun Y, Yang H, Mao Y, et al. Increased Golgi protein 73 expression in hepatocellular carcinoma tissue correlates with tumor aggression but not survival[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(7): 1207-1212

4 Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection[J]. Gene, 2000, 249(1-2): 53-65

5 Kladney RD, Cui X, Bulla GA, et al. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease[J]. Hepatology, 2002, 35(6): 1431-1440

6 Riener MO, Stenner F, Liewen H, et al. Golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2) expression in liver tumors and its value as a serum marker in hepatocellular carcinomas[J]. Hepatology, 2009, 49(5): 1602-1609

7 Chen LG, Wang HJ, Yao HB, et al. GP73 is down-regulated in gastric cancer and associated with tumor differentiation[J]. World J Surg Oncol, 2013, 11(6): 132-138

8 Liu G, Zhang Y, He F, et al. Expression of GOLPH2 is associated with the progression of and poor prognosis in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 32(5): 2077-2085

9 Fritzsche FR, Riener MO, Dietel M, et al. GOLPH2 expression in renal cell cancer[J]. BMC Urol, 2008, 8(11): 15-21

10 Lu Y, Yi Y, Liu P, et al. Common human cancer genes discovered by integrated gene-expression analysis[J]. PLoS One, 2007, 2(11): e1149

11 Zhang F, Gu Y, Li X, et al. Up-regulated Golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2) expression in lung adenocarcinoma tissue[J]. Clin Biochem, 2010, 43(12): 983-991

(收稿日期: 2015-06-08)

(修回日期: 2015-07-03)

老年大脑中动脉闭塞患者远期预后相关危险因素分析

韩春玉 孙玉芳 张拥波 李继梅

摘要 目的 分析影响老年大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)患者远期预后的相关危险因素。
方法 回顾性收集 2006 年 1 月 ~ 2013 年 12 月期间, 在笔者医院神经内科住院, 行头颈部 CT 血管成像(CT angiography, CTA)或磁共振血管成像(magnetic resonance angiography, MRA)证实存在 MCAO 的所有老年(年龄 ≥ 65 岁)患者。收集患者住院期间临床资料及生化指标, 并对其进行远期随访。以死亡或脑卒中再发为临床终点事件, 采用单因素及多因素 Logistic 回归分析影响远

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81371355)

作者单位: 100050 首都医科大学附属北京友谊医院神经内科

通讯作者: 张拥波, 电子邮箱: ybzhang@sina.com