

Versican 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及意义

孙 佳,姜秀峰,惠复新

(南京医科大学附属无锡市人民医院,江苏 无锡 214023)

摘 要: [目的] 研究非小细胞肺癌(NSCLC)组织中 versican 蛋白的表达,探讨其与 NSCLC 临床病理参数及预后之间的关系。[方法] 应用免疫组化方法检测 80 例 NSCLC 组织中 versican 蛋白表达水平,并对其与患者的临床病理特征及总生存时间(OS)关系进行分析。[结果] 80 例 NSCLC 肿瘤组织中,versican 蛋白全部表达,其中强阳性表达率 36.3%(29/80),弱阳性表达率 63.7%(51/80)。Versican 蛋白在晚期 NSCLC 中的强阳性表达率显著高于早期 NSCLC ($P=0.006$)。Versican 蛋白强阳性和弱阳性表达患者的中位生存时间(MST)分别为 12 和 22 个月($P=0.000$)。单因素分析的结果显示,NSCLC 患者的预后与肿瘤分期、淋巴结转移、分化程度、versican 蛋白表达水平密切相关(P 均 <0.05)。Cox 比例风险回归模型进行多因素分析的结果显示,肿瘤分期、淋巴结转移状态和 versican 蛋白的表达水平是影响 NSCLC 患者预后的独立因素(P 均 <0.05)。[结论] Versican 蛋白的表达情况是 NSCLC 的独立预后因素,与患者的预后呈负相关。

主题词: 非小细胞肺癌;versican;预后

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)10-0787-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.10.B002

Expression of Versican Protein in Non-small Cell Lung Cancer and Its Significance

SUN Jia, JIANG Xiu-feng, HUI Fu-xin

(Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of versican in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and its correlation with clinicopathological features and prognosis. [Methods] The expression of versican in 80 cases of tissue samples from NSCLC was detected immunohistochemically. The correlation of the expression of versican with clinicopathological features and overall survival (OS) of the NSCLC patients was analyzed. [Results] Versican protein was all expressed in 80 NSCLC tissue samples, with strong positive expression rate of 36.3% (29/80), and weak positive expression rate of 63.7% (51/80). The strong positive expression rate of versican in advanced NSCLC was significantly higher than that in early stage NSCLC ($P=0.006$). The median survival time (MST) was 12 months and 22 months respectively in patients with high positive expression of versican and in patients with weak positive expression of versican ($P=0.000$). Univariate analysis revealed that TNM stage, lymph nodes status, differentiation grade and versican expression were significantly associated with prognosis of NSCLC patients ($P<0.05$). The Cox multivariate analysis demonstrated that TNM stage, lymph node status and versican expression were independent prognostic factors. [Conclusion] Versican expression is independent prognostic factor for NSCLC, and is negatively correlated with prognosis.

Subject words: non-small lung cancer; versican; prognosis

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占全部肺癌的 80%, 包括腺癌、鳞癌、大细

胞癌、未分化癌。早期患者主要选择手术治疗, 但约 70% 患者确诊时已有远处转移或不能手术, 总体疗效不甚理想。治疗失败和死亡的主要原因是肺癌细胞的转移特性。近年来对于肿瘤转移机制的研究发现, 肿瘤转移是一个多步骤的复杂过程, 在这一过程

基金项目: 南京医科大学科技发展基金面上项目(2012NJMU174)

通讯作者: 姜秀峰, 主任医师, 硕士; 南京医科大学附属无锡市人民医院呼吸内科, 江苏省无锡市清扬路 299 号(214023); E-mail: jiang_xiufeng@sohu.com

收稿日期: 2014-07-08; **修回日期:** 2014-08-03

中有多个因素参与了转移的调控,它涉及到肿瘤细胞间黏附作用的丧失、肿瘤细胞外基质的降解、肿瘤细胞迁移能力的增强、肿瘤新生血管的产生等多种细胞生物学行为,而这些细胞生物学行为都受特定基因的调控。Versican 蛋白为细胞外基质蛋白,属于外源凝集素家族,是与肿瘤转移有关的基因,versican 表达增强已在多种不同的人类肿瘤中检测到,包括乳腺癌、前列腺癌、脑瘤、胃癌、肠癌和皮肤癌^[1],其在乳腺癌、子宫内膜癌中的表达水平还与肿瘤转移情况、临床分期以及患者预后等显著相关。因此,研究 NSCLC 的 versican 蛋白表达并探讨其与 NSCLC 发生、浸润、转移之间是否存在理论上的协同作用,可为提高 NSCLC 的治疗水平,改善患者的预后以及为进一步应用肿瘤浸润抑制因子治疗肿瘤提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集南京医科大学附属无锡市人民医院 2005 年 1 月至 2009 年 6 月经术后病理确诊的未经治疗且病理和临床资料完整的 NSCLC 患者 80 例进入本研究,取同期手术切除的非肿瘤肺组织 8 例,作为对照组。病例组和对照组所有标本均经福尔马林液固定,常规石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片。同时也将术前淋巴结穿刺细胞学和(或)手术切除淋巴结病理证实有淋巴结转移的进行分类。80 例患者中,男性 54 例,女性 26 例;年龄 35~85 岁,中位年龄 64 岁;腺癌 45 例,鳞癌 30 例,其他类型 5 例;病理分期为 I~II 期 35 例,III 期 28 例,IV 期 17 例。患者随访自诊断之日起开始,截止至 2013 年 5 月 31 日。患者术前均未进行化疗及放疗,所有患者手术标本均液氮保存。术后 NSCLC 病理学分级根据世界卫生组织《肺肿瘤组织学分型》(2000)标准分型;分化程度判断依据人民卫生出版社出版《病理学》第 7 版。TNM 分期参照美国癌症联合委员会(AJCC)指南。

1.2 免疫组织化学染色

应用免疫组织化学 SP 法进行组织染色。80 例 NSCLC 患者组织标本均经福尔马林溶液固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,兔抗人 versican 抗体购自晶美生物技术公司,SP 免疫组织化学试剂盒购自北京中

杉金桥生物技术公司,兔抗人 versican 抗体工作液浓度为 10 μ g/ml。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染。染色步骤严格按试剂盒说明进行。用已知的阳性切片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.3 免疫组织化学染色结果判定

经 DAB 染色后,细胞核和(或)细胞质呈棕黄色颗粒沉着。每例标本选 5 个高倍视野,根据细胞质染色程度和阳性染色细胞所占的百分比进行评分。①染色程度:不着色为 0 分,呈淡黄色为 1 分,呈棕黄色为 2 分,呈棕褐色为 3 分;②阳性染色细胞百分比:阳性细胞范围<5%为 0 分,阳性细胞范围 6%~25%为 1 分,阳性细胞范围 26%~50%为 2 分,阳性细胞范围 51%~75%为 3 分,阳性细胞范围>75%为 4 分。将两项评分的结果相乘,8~12 分为强阳性表达,4~7 分为弱阳性表达,0~3 分为阴性表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析。用 χ^2 检验、Fisher's 确切概率法进行统计学处理,生存曲线采用 Kaplan-Meier 方法,并进行 Log-rank 检验。建立 Cox 比例风险回归模型进行多因素分析,确立 NSCLC 的独立预后因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

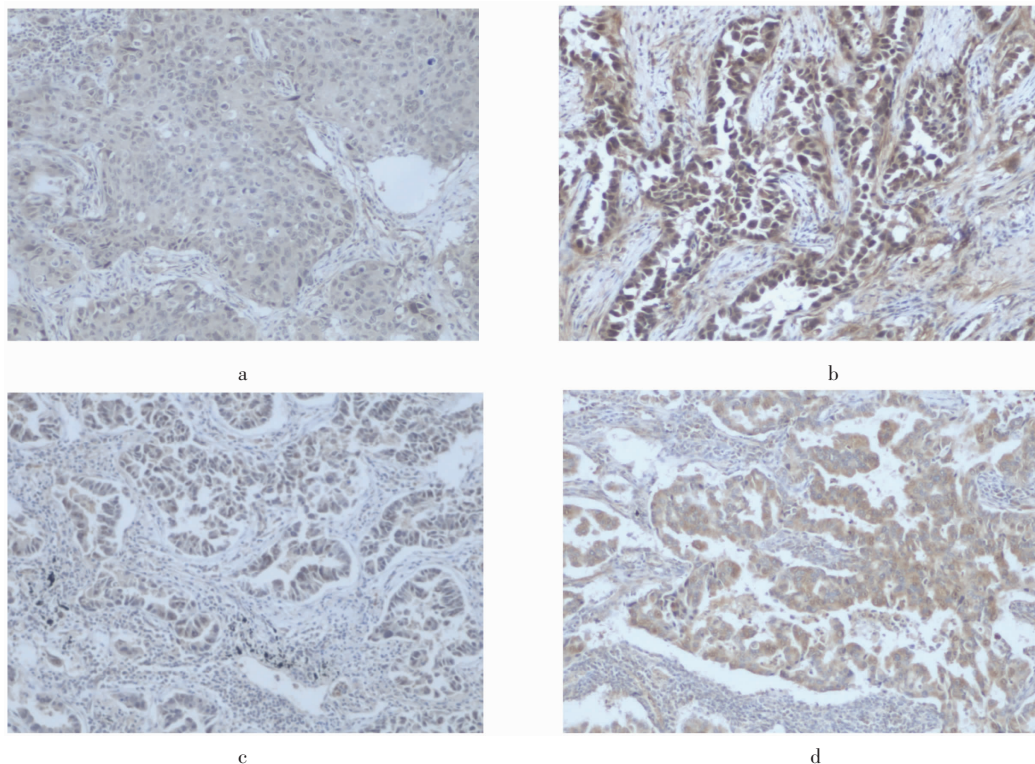
2 结果

2.1 免疫组化染色结果

Versican 蛋白在正常肺组织中细支气管和肺泡壁弱表达,在肺血管壁也见弱表达。在肺癌细胞质和肺癌细胞间质中表达呈棕黄色或棕褐色颗粒。在 80 例 NSCLC 肿瘤组织中,versican 蛋白 100%表达,其中强阳性表达 29 例,弱阳性表达 51 例。在肺腺癌中 versican 蛋白强阳性表达 16 例,弱阳性表达 29 例,在肺鳞癌中 versican 蛋白强阳性表达 11 例,弱阳性表达 19 例(Figure 1)。

2.2 Versican 蛋白表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系

Versican 蛋白在晚期(III、IV 期)NSCLC 中的强阳性表达率显著高于早期(I、II 期)患者($P=0.006$),且与淋巴结转移状态有关($P=0.049$);Versican 蛋白强、弱阳性表达与 NSCLC 患者的性别、年龄、病理类



Note:a:weak positive in adenocarcinoma tissues;b:strong positive in adenocarcinoma tissues;c:weak positive in squamous cell cancer tissues;d:strong positive in squamous cell cancer tissues.

Figure 1 The expression of versican protein in NSCLC tissues by immunohistochemistry(SP ×200)

型、分化程度、复发无关(P 均 >0.05 , Table 1)。

2.3 Versican 蛋白表达以及 NSCLC 临床病理特征与患者预后的关系

随访期内,63 例(79%)患者死亡,其中 60 例死于肺癌,2 例死于心血管疾病,1 例死于猝死。全组患者的中位疾病进展时间(TTP)为 12.5 个月,中位生存时间(MST)为 16.5 个月。Versican 蛋白弱阳性和强阳性表达患者的中位 TTP 分别为 13 个月和 12 个月,MST 分别为 22 个月和 12 个月。生存曲线的分析结果显示 versican 蛋白强阳性表达组患者的生存率明显低于弱阳性表达组 ($P=0.002$, Figure 2)。单因素分析结果显示,NSCLC 患者的预后与肿瘤的分化程度、淋巴结转移状态、分期及 versican 蛋白表达情况相关,分化程度差、有淋巴结转移、分期晚以及 versican 蛋白强阳性表达患者的生存时间短(P 均 <0.05 , Table 2)。Cox 比例风险回归模型分析的结果显示,分期、淋巴结转移状态以及 versican 蛋白的表达

Table 1 The correlation of clinicopathological features and versican protein expression in patients with NSCLC

Factors	N	Expression of versican(%)		P
		Strong positive	Weak positive	
Gender				
Male	54	21(38.9)	33(61.1)	0.479
Female	26	8(30.8)	18(69.2)	
Age(years old)				
≥ 60	48	21(43.8)	27(56.2)	0.087
<60	32	8(25.0)	24(75.0)	
Histological type				
SCC	30	11(36.7)	19(63.3)	0.072
ADC	45	16(35.6)	29(64.4)	
Others	5	2(40.0)	3(60.0)	
Stage				
I ~ II	35	7(20.0)	28(80.0)	0.006
III	28	9(32.1)	19(67.9)	
IV	17	13(76.5)	4(23.5)	
Lymph metastasis				
Yes	45	21(46.7)	24(53.3)	0.049
No	35	8(22.8)	27(77.1)	
Differentiation grade				
Poor	44	16(36.4)	28(63.6)	0.981
Moderate+High	36	13(36.1)	23(63.9)	
Recurrence				
Yes	35	16(45.7)	19(54.3)	0.120
No	45	13(28.9)	32(71.1)	

Note:SCC:squamous cell carcinoma;ADC:adenocarcinoma.

情况是 NSCLC 的独立预后因素(P 均 <0.05 ,Table 3)。

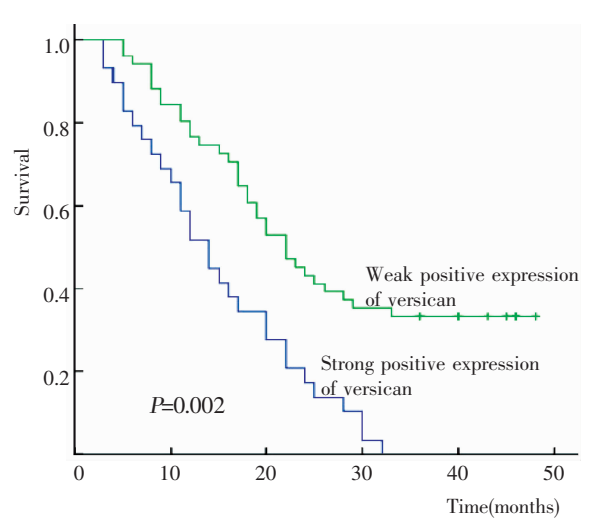


Figure 2 The correlation of versican protein expression and survival of NSCLC patients

Factors	N	MST(months)	P
Gender			
Male	54	16(8.5~25.3)	0.817
Female	26	12(5.7~21.1)	
Age(years old)			
≥60	48	11(8.5~21.0)	0.539
<60	32	13(9.0~22.3)	
Stage			
I ~ II	35	20(13.7~42)	0.001
III	28	13(10.5~19.7)	
IV	17	10(8.5~13.1)	
Lymph metastasis			
Yes	45	11(6.7~15.3)	0.023
No	35	23(20.3~33)	
Differentiation grade			
Poor	44	11(8.9~17.2)	0.007
Moderate+High	36	22(16.7~28.5)	
Expression of versican			
Strong positive	29	12(10.3~18.9)	0.000
Weak positive	51	22(15.7~30.2)	

Factors	RR	95%CI	P
Gender	1.334	0.623~2.412	0.796
Age	1.002	0.568~2.131	0.747
Stage	1.968	1.571~2.553	0.031
Differentiation grade	0.458	0.271~1.004	0.237
Lymph metastasis	2.175	1.337~4.860	0.018
Expression of versican	1.563	1.079~3.005	0.025

3 讨 论

多功能蛋白聚糖(versican),是来自成纤维细胞的一种蛋白聚糖,在体内广泛分布于动脉、脑、软骨、胎盘、皮肤和肌腱等组织中。研究表明,versican 在细胞生长旺盛的区域表达增加,而肿瘤组织具有旺盛的细胞生长状态^[2],versican 由癌细胞自身分泌或者肿瘤旁间质细胞分泌^[3]。已有研究证实 versican 可以增加癌细胞能动性、增殖、转移^[4-6]。

研究发现 versican 在骨肉瘤、口腔癌、胰腺癌、乳腺癌等肿瘤组织中表达均增高,同时 versican 的高表达与多种细胞外基质成分如透明质酸(hyaluronan,HA)、黏附分子 CD44、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)等呈正相关^[7-10]。本研究结果显示 36.3%的 NSCLC 组织呈 versican 强阳性表达。分期晚及淋巴结转移患者 versican 水平表达较高,提示 versican 蛋白表达水平与肿瘤进展相关因子关系密切,但代表肿瘤恶性程度的重要指标肿瘤分化程度与 versican 表达水平无关,究其原因可能与本研究的样本量偏小有关。以上结果提示 versican 可能通过重建细胞外基质得以促进肿瘤进展。

Pirinen 等^[12]发现 NSCLC 的 versican 高表达与肿瘤晚期及复发相关。其他肿瘤研究亦报道 versican 与疾病进展有关^[8,12-14]。Versican 高表达在乳腺癌中降低患者生存时间和生存率^[10]。子宫内膜癌 versican 表达水平是整体生存率的独立预后指标^[12]。本研究结果显示,versican 强阳性表达患者的 OS 显著短于 versican 弱阳性表达的患者($P<0.01$)。多因素分析的结果显示,肿瘤分期、淋巴结转移状态和 versican 蛋白的表达水平是预测 NCSLC 患者预后有意义的指标。

研究显示哮喘药物包括布地奈德和福莫特罗可以减少人类肺成纤维细胞和气道平滑肌细胞 versican 的表达^[15,16]。哮喘药物抑制 versican 表达需在肿瘤细胞模型中进一步探索,下调 versican 的表达的治疗方法如降解其代谢产物成为更有活性片段或抑制其功能可能减缓或阻止肿瘤侵袭。了解 versican 表达调节机制和活性有助于研发 versican 介导的肿瘤细胞转移的抑制剂。如果能阻止 versican 的表达,就能限制肺癌的扩散了,那么 versican 也就可能成为肺癌治疗的新靶标。

参考文献:

- [1] Karlsson NG, McGuckin MA. O-linked glycome and proteome of high-molecular-mass proteins in human ovarian cancer ascites: identification of sulfation, disialic acid and O-linked fucose[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(7): 918–929.
- [2] Du R, Sheng W, Zeng Y. Biological activities of versican and biological molecules that interact with it[J]. *Journal of Medical Forum*, 2008, 29(7): 123–127. [杜蓉, 盛望, 曾毅. Versican 基因的生物活性及其相互作用的生物分子[J]. *医药论坛杂志*, 2008, 29(7): 123–127.]
- [3] Ricciardelli C, Sakko AJ, Ween MP, et al. The biological role and regulation of versican levels in cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(1–2): 233–245.
- [4] Arslan F, Bosserhoff AK, Nickl-Jockschat T, et al. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor-beta2 [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(10): 1560–1568.
- [5] LaPierre DP, Lee DY, Li SZ, et al. The ability of versican to simultaneously cause apoptotic resistance and sensitivity[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4742–4750.
- [6] Paris S, Sesboue R, Chauzy C, et al. Hyaluronectin modulation of lung metastasis in nude mice [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(18): 3253–3259.
- [7] Nikitovic D, Zafiropoulos A, Katonis P, et al. Transforming growth factor-beta as a key molecule triggering the expression of versican isoforms v0 and v1, hyaluronan synthase-2 and synthesis of hyaluronan in malignant osteosarcoma cells[J]. *IUBMB Life*, 2006, 58(1): 47–53.
- [8] Pukkila M, Kosunen A, Ropponen K, et al. High stromal versican expression predicts unfavourable outcome in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Pathol*, 2007, 60(3): 267–272.
- [9] Skandalis SS, Kletsas D, Kyriakopoulou D, et al. The greatly increased amounts of accumulated versican and decorin with specific post-translational modifications may be closely associated with the malignant phenotype of pancreatic cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(8): 1217–1225.
- [10] Castronovo V, Kischel P, Guillonneau F, et al. Identification of specific reachable molecular targets in human breast cancer using a versatile ex vivo proteomic method [J]. *Proteomics*, 2007, 7(8): 1188–1196.
- [11] Pirinen R, Leinonen T, Bohm J, et al. Versican in nonsmall lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis[J]. *Hum Pathol*, 2005, 36(1): 44–50.
- [12] Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, et al. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer[J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(2): 269–274.
- [13] Voutilainen K, Anttila M, Sillanpaa S, et al. Versican in epithelial ovarian cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors and prognosis[J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(3): 359–364.
- [14] Suwihat S, Ricciardelli C, Tammi R, et al. Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(7): 2491–2498.
- [15] Burgess JK, Oliver BG, Poniris MH, et al. A phosphodiesterase 4 inhibitor inhibits matrix protein deposition in airways in vitro[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(3): 649–657.
- [16] Todorova L, Gurcan E, Miller-Larsson A, et al. Lung fibroblast proteoglycan production induced by serum is inhibited by budesonide and formoterol[J]. *Am J Respir Cell Mol Bio*, 2006, 34(1): 92–100.

