

# LCN2 在喉鳞状细胞癌淋巴结转移中的表达及意义

余志娟<sup>1</sup>, 汪雷<sup>2</sup>

(1.湖北科技学院基础医学院,湖北 咸宁,437600;2.咸宁市中心医院,湖北 咸宁 437600)

**摘要:**[目的] 分析 LCN2 在喉鳞状细胞癌淋巴结转移表达及意义。[方法] 收集咸宁市中心医院耳鼻咽喉科 56 例喉鳞状细胞癌患者标本,免疫组化方法分析淋巴结转移组和非转移组原发灶及淋巴结中 LCN2 的表达;组织芯片分析 LCN2 与分化程度的相关性。[结果] LCN2 蛋白在转移组喉鳞状细胞癌原发灶和淋巴结中的表达明显高于非转移组( $P<0.05$ )。LCN2 蛋白在高分化喉癌中呈低表达,在低分化喉癌中呈高表达,分化程度与 LCN2 蛋白表达明显相关( $P<0.05$ )。[结论] LCN2 在伴淋巴结转移的喉鳞状细胞癌中表达明显增高,可能成为预测淋巴结转移的分子标志物。

**关键词:**LCN2;喉鳞状细胞癌;淋巴结转移

**中图分类号:**R737.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2018)08-0783-04

**doi:**10.11735/j.issn.1671-170X.2018.08.B006

## Expression of LCN2 in Lymph Node Metastasis of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Its Significance

YU Zhi-Juan<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>

(1. Basic Medical College of Hubei University of Science and Technology, Xianning 437600, China;

2. Central Hospital of Xianning, Xianning 437600, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the expression of LCN2 in lymph node metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma and its significance. [Methods] Fifty six samples of laryngeal carcinoma were acquired from Otolaryngological Department of Xianning Central Hospital. The LCN2 expression in primary tumor and lymph node was detected by immunohistochemistry. The relationship between LCN2 expression and tumor differentiation was analyzed by tissue microarray. [Results] The expression of LCN2 in patients with lymph node metastasis was higher than that in those without metastasis( $P<0.05$ ). The expression of LCN2 in highly differentiated laryngeal squamous cell carcinoma was low, and in poorly differentiated laryngeal squamous cell carcinoma was high, the LCN2 expression was correlated with tumor differentiation ( $P<0.05$ ). [Conclusion] The expression of LCN2 is higher in laryngeal squamous cell carcinoma with lymph node metastasis, indicating that it may be used as a biomarker of lymph node metastasis.

**Subject words:** LCN2; laryngeal squamous cell carcinoma; lymph node metastasis

喉鳞状细胞癌发病率位于全球第 6 位,严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。颈部淋巴结转移是影响喉鳞状细胞癌患者预后的重要因素,伴淋巴结转移的患者生存率明显下降<sup>[2]</sup>。术前如何预测颈部淋巴结转移对综合治疗具有重要指导作用,目前诊断淋巴结转移主要依靠影像学检查,然而其准确率特别是诊断早期淋巴结转移的准确性尚有较大提高空间。

LCN2(Lipocalin2)是载脂蛋白家族成员之一,最初被发现位于人中性粒细胞特殊颗粒中,可阻止细菌转运铁而具有抗菌作用,因此与固有免疫相关<sup>[3]</sup>。然而,近年研究发现 LCN2 在许多肿瘤中高表达,包括食管癌<sup>[3,4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>及卵巢癌<sup>[6]</sup>等,同时发现 LCN2 可能增强癌细胞生存能力,促进癌细胞增殖并影响转移<sup>[7,8]</sup>。然而,LCN2 在喉鳞状细胞癌特别是淋巴结转移中的作用尚未明确,本研究主要研究 LCN2 在喉鳞状细胞癌组织中的表达,分析其与淋巴结转移的相关性。

**通讯作者:**汪雷,主治医师,博士;湖北省咸宁市中心医院耳鼻咽喉头颈外科,湖北省咸宁市咸安区金桂路 228 号(437600);  
E-mail:wangle\_whu@126.com

**收稿日期:**2017-01-06;**修回日期:**2017-10-08

# 1 材料与方法

## 1.1 一般资料

收集咸宁市中心医院耳鼻咽喉科 2010 年 1 月至 2013 年 12 月间共 56 例喉鳞状细胞癌患者病例资料,所有患者术前均未行放疗化疗,根据术后病理诊断,将患者分为转移组(32 例)和非转移组(24 例)。所有患者均行原发灶切除术及颈部淋巴结清扫术,收集术中标本,包括原发灶和淋巴结。原发部位主要为喉(声门上型 5 例,声门型 48 例,声门下型 3 例),平均年龄 51 岁(31~75 岁)。术后标本用于病理检测,取部分手术标本在 0.5h 内置入多聚甲醛中固定用于常规石蜡包埋。

## 1.2 主要试剂

LCN2 兔抗人多克隆抗体购于 Sigma 公司;SP 免疫组化化学试剂盒及组化相关辅助用品均购于福州迈新生物技术有限公司。组织芯片(产品编号:hn803b)购于西安艾丽娜生物科技有限公司。

## 1.3 免疫组化检测

参照免疫组化试剂盒说明进行操作:组织切片置于 100%二甲苯中脱蜡 2 次,每次 15min,然后梯度酒精(100%,95%,85%,75%各 5min)脱苯,PBS 洗片 3 次,每次 5min,利用柠檬酸缓冲液进行抗原修复,冷却至室温后 PBS 洗片 3 次,每次 5min,阻断内源性过氧化物酶后加入 LCN2 抗体(Sigma-Aldrich;浓度 1:100),4℃冰箱中孵育 12h 后,孵育二抗(羊抗兔,福州迈新)30min,显微镜下进行 DBA 染色,之后苏木素染核,最后脱水透明封片。用已知阳性切片做阳性对照,阴性对照一抗用 PBS 取代。组织芯片的免疫组化方法过程同上。免疫组化结果按以下公式评分:综合评分(IHC Index) = 染色强度 × 阳性

率。其中染色强度分为未染色(0 分),弱阳性(1 分),阳性(2 分),强阳性(3 分);阳性率分为 0~25%(1 分),25%~50%(2 分),50%~75%(3 分),75%~100%(4 分)。

## 1.4 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计学软件分析数据,两组样本间比较应用 *t* 检验,多组间的比较采用方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

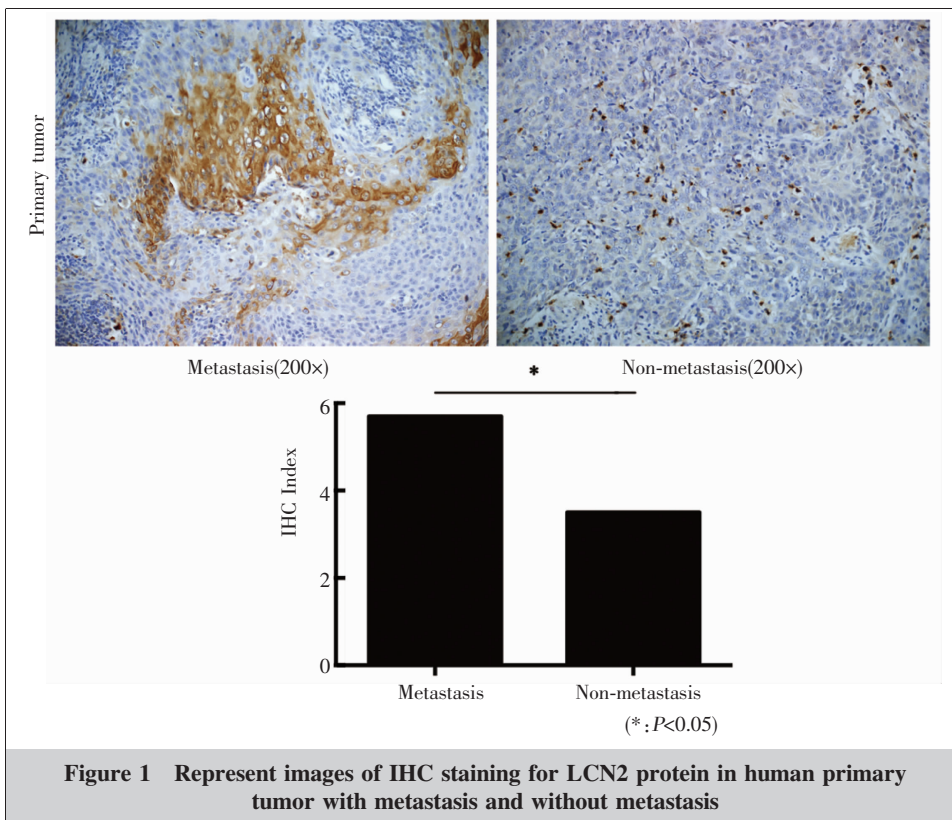
# 2 结果

## 2.1 LCN2 在原发灶中的表达

LCN2 在原发灶中主要表达于肿瘤细胞膜及胞质,其在伴转移的喉鳞状细胞癌组织中的表达呈强阳性,在非转移组织中呈弱阳性,转移组与非转移组免疫组化综合评分值(IHC Index)的平均值分别为 5.8、3.6,两组差异有统计学意义(*P*<0.05)(Figure 1)。

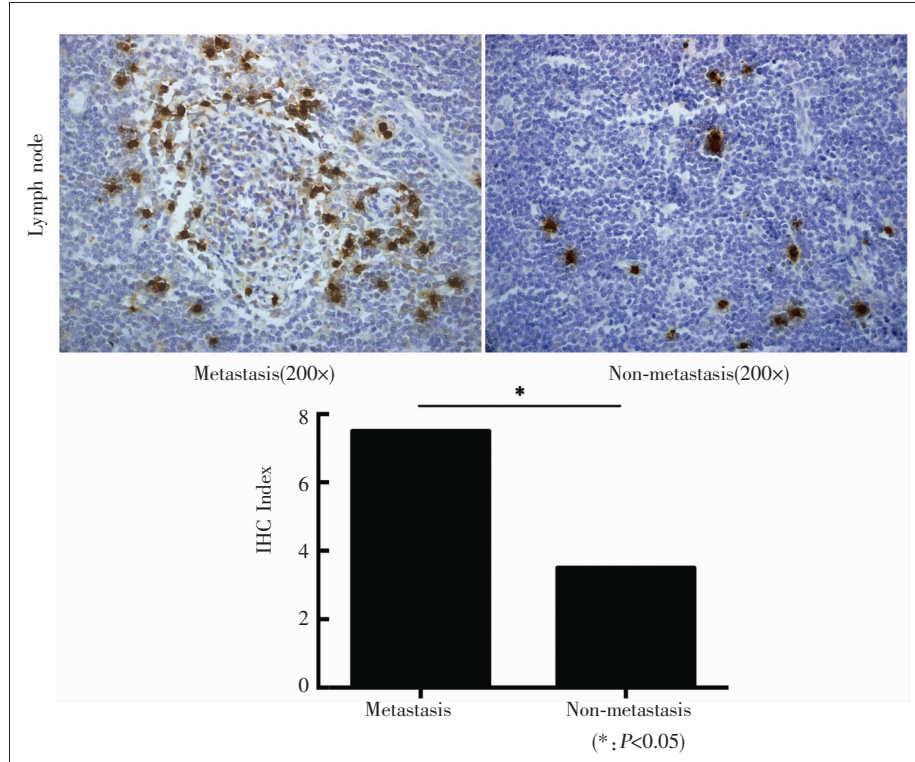
## 2.2 LCN2 在淋巴结中的表达

伴转移的原发灶中 LCN2 表达明显增高,进一步检测淋巴结中 LCN2 的表达情况,发现 LCN2 在转移组的淋巴结中表达强阳性,而无转移的淋巴结

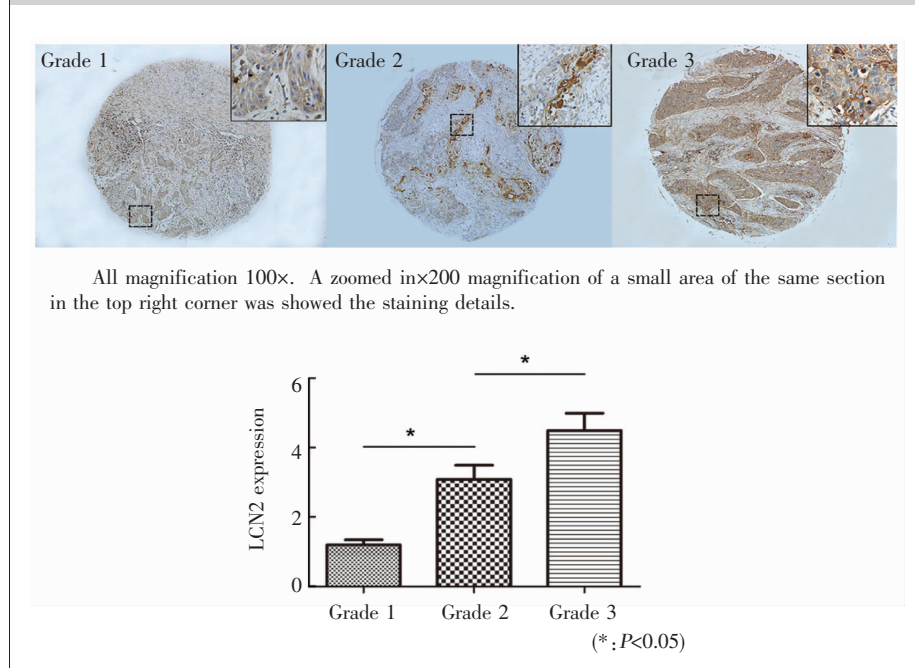


中 LCN2 表达呈弱阳性, 转移组与非转移组淋巴组织 LCN2 免疫组化综合评分值(IHC Index)的平均值分别为 6.7、3.6, 两组差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (Figure 2), 与原发性灶中 LCN2 的表达一致。

**2.3 LCN2 表达与喉鳞状细胞癌病理分化的相关性**  
为进一步验证 LCN2 在喉鳞状细胞癌的作用, 利用组织芯片分析 LCN2 与喉鳞状细胞癌病理分化的相关性。结果发现随着癌组织分化程度增高, LCN2 表达明显升高, 即高分化癌组织 LCN2 表达明显高于中分化癌组织, 同时, 中分化癌组织 LCN2 表达明显高于低分化癌组织, 高、中、低分化肿瘤中 LCN2 免疫组化综合评分值 (IHC Index) 的平均值分别为 1.7、3.2、4.6, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (Figure 3)。



**Figure 2** Represent images of IHC staining for LCN2 protein in lymph node with metastasis and without metastasis



**Figure 3** Represent images of IHC staining for LCN2 protein in differentiation of TMA

LCN2 表达明显升高, 即高分化癌组织 LCN2 表达明显高于中分化癌组织, 同时, 中分化癌组织 LCN2 表达明显高于低分化癌组织, 高、中、低分化肿瘤中 LCN2 免疫组化综合评分值 (IHC Index) 的平均值分别为 1.7、3.2、4.6, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (Figure 3)。

### 3 讨论

随着治疗理念的进步, 喉鳞状细胞癌的治疗不仅要求有效改善生存率, 同时需最大可能保留功能。尽管目前有先进的影像学检查手段, 喉鳞状细胞癌局部淋巴结转移的诊断有效率仍有待进一步提高。目前诊断喉鳞状细胞癌颈部淋巴结转移的主要手段包括 B 超、CT、MRI, 其中 CT、MRI 对临床可以触诊的淋巴结有较高的敏感性<sup>[9]</sup>。Lu 等<sup>[10]</sup>总结 CT 对颈部淋巴结局部转移的检测敏感性和特异性均为 84%。Sun 等<sup>[11]</sup>总结近年文献, 比较 MRI 和 CT 在诊断淋巴结转移中的作用后发现, MRI 有着更高的特异性, 而 CT 有着更高的敏感度, MRI 和 CT 能分辨出转移淋巴结的最小直径分别为 10mm、12mm。然而临床中有部分 N<sub>0</sub> 期喉鳞状细胞

癌患者淋巴结虽小,却存在微小转移,CT、MRI对这些患者淋巴结的检测敏感性将会明显下降。目前临床中利用分子标志物早期诊断部分癌症的方法已得到广泛应用,而尚未见头颈部鳞癌淋巴结转移的分子标志物。本次研究发现 LCN2 在有转移的头颈部鳞癌原发灶和淋巴结中的表达明显增高,提示临床中可以将 LCN2 作为喉鳞状细胞癌淋巴结转移的分子标志物,通过术前对原发灶的病理活检检测 LCN2 表达情况,根据 LCN2 表达情况可判断颈部淋巴结转移情况。

需要注意的是,LCN2 的表达情况应结合影像学检查综合判断淋巴结转移与否,其可作为影像学检查的有利辅助手段,并不能取代影像学检查。然而,由于影像学检查对于早期淋巴结转移诊断敏感度和特异性较差,我们推测 LCN2 在原发灶和淋巴结中的表达可作为淋巴结早期转移的有利参考指标。另外,通过组织芯片的分析,本研究发现 LCN2 的表达量与喉鳞状细胞癌的分化程度相关,高分化的头颈部鳞癌组织中 LCN2 表达更高,而低分化的鳞癌 LCN2 表达明显降低,提示术前病理检测 LCN2 表达偏高时,肿瘤预后可能较差,反之预后较好,这对于临床医生判断喉鳞癌患者的预后具有重要意义。

另一方面,本研究尚处于初步研究阶段,仅在表观上验证 LCN2 与喉鳞状细胞癌淋巴结转移相关,LCN2 促进淋巴结转移的分子机制需要进一步研究,我们下一步将在分子层面上研究两者的相关性,为寻找头颈部鳞癌淋巴结转移的分子机制提供新的思路,同时可能为颈部淋巴结转移的治疗提供新的靶点。

### 参考文献:

[1] Argiris A,Eng C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer [J]. *Cancer Treat Res*,2003,114: 15-60.

[2] Parkin DM,Bray F,Ferlay J,et al. Global cancer statistics,2002[J]. *CA Cancer J Clin*,2005,55(2): 74-108.

[3] Goetz DH,Holmes MA,Borregaard N,et al. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition[J]. *Mol Cell*,2002,10(5): 1033-1043.

[4] Zhang H,Xu L,Xiao D,et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion[J]. *J Clin Pathol*,2007,60: 555-561.

[5] Du ZP,Wu BL,Wang SH,et al. Shortest path analyses in the protein-protein interaction network of neutrophil gelatinase-associated lipocalin overexpression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2014,15(16):6899-6904.

[6] Yang J,McNeish B,Butterfield C,et al.Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer[J]. *FASEB J*,2013,27(1):45-50.

[7] Lim R,Ahmed N,Borregaard N,et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin an early-screening biomarker for ovarian cancer: LCN2 is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition [J]. *Int J Cancer*,2007,120(11):2426-2434.

[8] Tong Z,Wu X,Ovcharenko D,et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor [J]. *Biochem J*,2005,391 (Pt 2):441-448.

[9] Schöder H1,Carlson DL,Kraus DH,et al.18F-FDG PET/CT for detecting nodal metastases in patients with oral cancer staged N0 by clinical examination and CT/MRI[J]. *J Nucl Med*,2006,47(5):755-762.

[10] Lu Y,Li J,Wang H,et al. 18FDG-PET/CT for the detection of regional nodal metastasis in patients with primary head and neck cancer before treatment; a meta-analysis [J]. *Surg Oncol*,2013,22(2):e11-e16.

[11] Sun J,Li B,Li CJ,et al. Computed tomography versus magnetic resonance imaging for diagnosing cervical lymph node metastasis of head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Onco Targets Ther*,2015,8: 1291-1313.