

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.05.06

· 临床研究 ·

非小细胞肺癌组织芯片中 RRM1 表达和预后因子分析

廖日强 林嘉颖 乔贵宾 骆新兰 杨衿记 黄玉娟 吴一龙

【摘要】 背景与目的 RRM1 与非小细胞肺癌的预后可能有关。本研究的目的是采用组织芯片技术检测非小细胞肺癌中 RRM1 的表达并分析预后因素。方法 取广东省肺癌研究所标本库的 417 例非小细胞肺癌术后标本制作成组织芯片。通过 SP 法检测 RRM1 的表达情况并分析其与预后的关系。结果 RRM1 在不同的性别、年龄、肿瘤部位、病理类型、分化程度、T 状态、N 状态、M 状态和病理分期等组间的差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。单因素分析显示 RRM1 表达不是有统计学意义的预后因素 ($P > 0.05$)。COX 模型多因素分析显示,分化程度、N 状态是独立的预后因素。结论 通过免疫组化检测的 RRM1 表达不能作为非小细胞肺癌独立的预后因素。TNM 分期仍然是目前最好的预后因素。

【关键词】 非小细胞肺癌 组织芯片 RRM1 预后

【中图分类号】 R734.2

RRM1 expression in tissue microarray and prognosis analysis in non-small cell lung cancer LIAO Riqiang, LIN Jiayin, QIAO Guibin, LUO Xinlan, YANG Jingji, HUANG Yujuan, WU Yilong. Cancer Center, Lung Neoplasm Department, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, P. R. China

Corresponding author: WU Yilong, E-mail: gzyilong@public.guangzhou.gd.cn

【Abstract】 **Background and objective** RRM1 may be a prognostic factor in non-small cell lung cancer (NSCLC). The aim of this study is to evaluate RRM1 expression and prognosis in NSCLC by the means of tissue microarray. **Methods** A total of 417 paraffin-embedded specimens of NSCLC from Lung Cancer Study Center in Guangdong Provincial People's Hospital were collected and tissue microarray was constructed. RRM1 expression was detected by SP method and its correlation with prognosis was evaluated. **Results** No statistic difference was found in RRM1 expression in different gender, age, tumor site, histology, differentiation, T stage, N stage, M stage and pTNM stage groups ($P > 0.05$). Univariate analysis showed that RRM1 was not an independent prognostic factor ($P > 0.05$). At the multivariate analysis, differentiation and N stage were considered independent prognostic factors. **Conclusion** RRM1 expression detected by immunohistology is not an independent prognostic factor in NSCLC. TNM stage is still the best prognostic factor up to now.

【Key words】 Non-small cell lung cancer Tissue microarray RRM1 Prognosis

This work was supported by grants from 'Tenth Five' National Graveness Study Project in Scientific and Technical Task (to WU Yilong) (2002BA711A082), Famous Doctor Study Fund of Guangdong Province (to WU Yilong) (2004-199-25), Graveness Study Project in Scientific and Technical Foundation of Guangdong Province (to WU Yilong) (WSTJJ20030726), and Scientific and Technical Foundation of Guangzhou City (to WU Yilong) (2001-Z-044-01).

本研究受国家“十五”重大科技专项子课题(2002BA711A082)、广东省名医工程研究项目(粤卫 2004-199-25)、广东省重点医学科技攻关专项课题(WSTJJ20030726)、广州市科技计划重点项目(2001-Z-044-01)资助

作者单位:510080 广州,广东省人民医院肿瘤中心肺科(廖日强、乔贵宾、杨衿记、黄玉娟、吴一龙),广东省肺癌研究所、医学研究中心(林嘉颖),病理科(骆新兰)(通讯作者:吴一龙, E-mail: gzyilong@public.guangzhou.gd.cn)

基于国际抗癌联盟标准的 TNM 分期是目前确定非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)治疗原则和预测预后的主要指标^[1],然而这种以解剖范围为基础的预测和预后指标,在临床工作中仍存在不足。不少专家认为应在 TNM 解剖分期的基础上,根据分子标志物进一步对患者分层,以确定更加个体化的治疗方案,如哪些患者仅需手术,哪些患者需要更为

积极的多学科治疗,同时探讨哪些分子标志物可以作为潜在的治疗靶点^[2]。核糖核苷酸还原酶 M1 亚基(ribonucleotide reductase subunit M1,RRM1)基因属于抑癌基因,与肿瘤的发生、发展和预后有着密切的联系。本研究应用组织芯片技术分析 NSCLC 标本中 RRM1 的表达及其预后的价值。

1 资料与方法

1.1 病例和标本的收集 本研究为回顾性研究,收集了 1994 年 1 月至 1997 年 12 月所有接受外科手术治疗的初治 NSCLC 患者的术后石蜡标本。末次随访时间为 2005 年 3 月。根据 1999 年 WHO 公布的肺癌组织分类标准判定病理类型和分化程度,根据国际抗癌联盟 1997 年修订的肺癌国际分期标准进行分期。生存时间按月记录,以手术日至患者死亡或最后一次随访时间为生存时间。最终死于肺癌者为完全数据,如死于其它原因或失访或随访期间仍存活着记为删失数据。

本研究共纳入 417 例 NSCLC 病例,并收集到与

其对应的所有组织标本以及所有病例的年龄、性别等一般人口学资料和肿瘤部位、病理类型、分化程度、T 状态、N 状态、M 状态、病理分期、手术方式、有无辅助治疗以及生存期等资料。

1.2 NSCLC 组织芯片的构建 组织芯片的构建方法如文献^[3]所述: 对供体蜡块穿刺取样; 将圆柱状标本运送到接受蜡块处; 将圆柱状标本挤压到接受蜡块上已打好的阵列孔中; 将布阵好的接受蜡块切片; 将切片装裱到玻片上。

1.3 免疫组化染色 采用链霉卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物法(SP)法检测 RRM1 的表达水平。SP 试剂盒购自 Duke 公司。RRM1 抗体为山羊抗人多抗,购自 Santa Cruz 公司。PBS 代替一抗作为阴性对照,乳腺癌组织标本为阳性对照。

1.4 免疫组化结果的判断 胞质中 RRM1 染色为棕黄色者评定为阳性细胞,阳性细胞百分比 < 25 % 为 (-), 25 % ~ 49 % 为 (+), 50 % ~ 74 % 为 (#+), 75 % 为 (##)。另外,定义表达 (#+) 以上为高表达(图 1)。

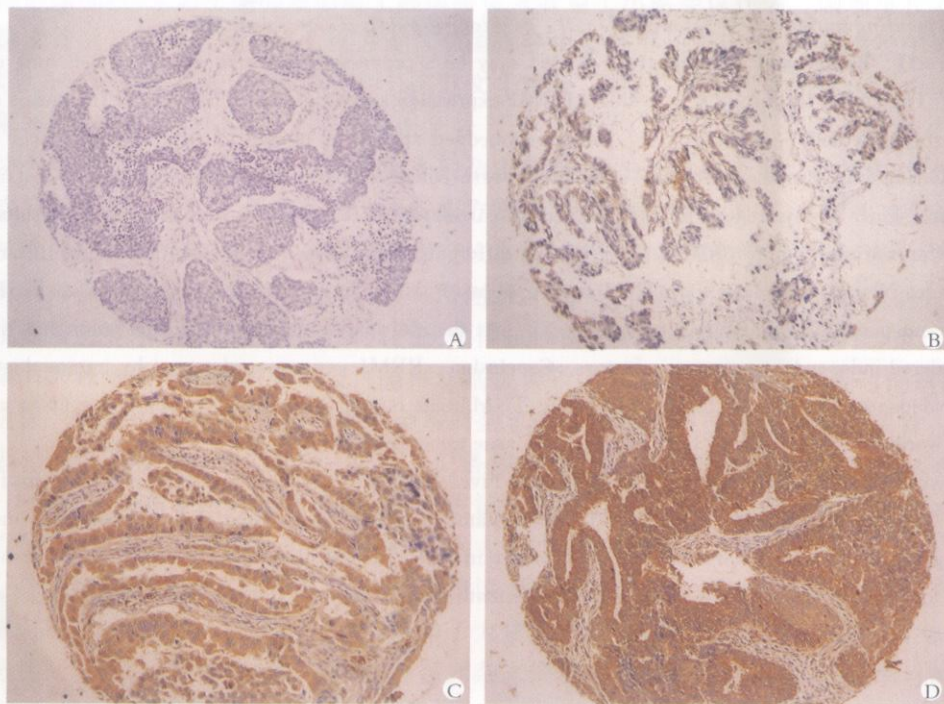


图 1 NSCLC 中 RRM1 检测情况(SP 法,原始放大倍数 ×20)

A: (-), 肿瘤细胞未显色; B: (+), 肿瘤细胞显色,胞质呈淡棕黄色,阳性细胞 25 % ~ 49 %; C: (#+), 肿瘤细胞显色,胞质呈棕黄色,阳性细胞 50 % ~ 74 %; D: (##), 肿瘤细胞显色,胞质呈深棕黄色,阳性细胞 75 % 以上

Fig 1 Detection of RRM1 in NSCLC (SP method, original magnification ×20)

A: (-), negative expression in cytoplasm; B: (+), light brown in cytoplasm, with positive cells of 25 %-49 %; C: (#+), brown in cytoplasm, with positive cells of 50 %-74 %; D: (##), deep brown in cytoplasm, with positive cells more than 75 %

1.5 统计分析方法 所有资料均由 SPSS10.0 软件包处理。RRM1 表达与临床病理资料的关系采用非参数 Mann-Whitney U 检验(两组资料)或 Kruskal-Wallis 检验(多组资料)。采用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析,log rank 检验计算不同组间的生存差异。用 COX 模型进行多因素生存分析。在多因素生存分析时,将所有在单因素分析中发现有预后作用的变量($P < 0.10$)选入方程,以向前逐步的方式进行选择。将 P 值为 0.05 作为协变量进入多元方程的界限, P 值为 0.1 作为协变量剔除出多元方程的界限。在所有的统计分析中, $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基线资料 排除组织芯片中脱落、破坏的病例后,最终共 344 例病例可供分析。其中男性 243 例,女性 101 例;术后病理分期: 期 95 例, 期 82 例, 期 148 例, 期 19 例;RRM1:(-)69 例,(+)168 例,(#)89 例,(##)18 例。

2.2 患者的临床和病理参数中 RRM1 表达的分布 RRM1 在不同的性别、年龄、肿瘤部位、病理类型、分

化程度、T 状态、N 状态、M 状态和病理分期中的表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 NSCLC 术后预后因素的单因素分析结果(表 1)

Kaplan-Meier 法的单因素分析显示,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,与预后有关的变量有:分化程度($P = 0.0000$)、T 状态($P = 0.0001$)、N 状态($P = 0.0000$)、M 状态($P = 0.0308$)、病理分期($P = 0.0000$)、辅助治疗($P = 0.0114$)、手术方式($P = 0.0072$)。RRM1 表达不属于有统计学意义的预后因素($P = 0.1871$),其生存曲线见图 2;将其分为高表达(阳性细胞 50%以上)和低表达(阳性细胞 50%以下)两组,两组之间的差异也没有统计学意义($P = 0.1353$)。

2.4 NSCLC 术后预后因素的多因素分析结果(表 2)

COX 模型的多因素分析结果表明,将单因素分析中有统计学意义的变量一齐纳入多因素分析时,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,只有分化程度($P = 0.000$)、N 状态($P = 0.011$)有统计学意义。由于病理分期由 T、N、M 确定,两者之间存在相关性,将 T、N、M 排除出多因素分析后,则分化程度($P = 0.000$)和病理分期($P = 0.000$)为有统计学意义的预后因素。

表 1 NSCLC 预后因子的 Kaplan-Meier 单因素分析

Tab 1 Univariate analysis of prognosis in NSCLC by Kaplan-Meier method

Variable	Stratification	P value
Gender	Man, woman	0.4954
Age (year)	70, >70	0.7173
Tumor site	Upper lobe, middle lobe, low lobe, others	0.8798
Histology	Squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, adenosquamous carcinoma, others	0.5041
Differentiation	Poor, moderate, well	0.0000
T status	T1, T2, T3, T4	0.0001
N status	N0, N1, N2, N3	0.0000
M status	M0, M1	0.0308
pTNM stage	, , ,	0.0000
Operation type	Lobectomy, pneumonectomy, limited resection	0.0072
Adjuvant therapy	Yes, no	0.0114
RRM1 expression	-, +, #, ##	0.1871
RRM1 expression	High, low	0.1353

表 2 NSCLC 预后因子的 COX 模型多因素分析

Tab 2 Multivariate analysis of prognosis in NSCLC by COX model

Variable	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)
Differentiation	- 0.538	0.099	29.524	1	0.000	0.584	0.481--0.709
T status	0.142	0.111	1.649	1	0.199	1.153	0.928--1.432
N status	0.317	0.124	6.538	1	0.011	1.372	1.077--1.750
M status	0.238	0.344	0.477	1	0.490	1.268	0.646--2.489
pTNM stage	0.241	0.163	2.183	1	0.140	1.273	0.924--1.754
Operation type	0.113	0.112	1.020	1	0.312	1.119	0.899--1.393
Adjuvant therapy	0.080	0.210	0.144	1	0.704	1.083	0.717--1.636

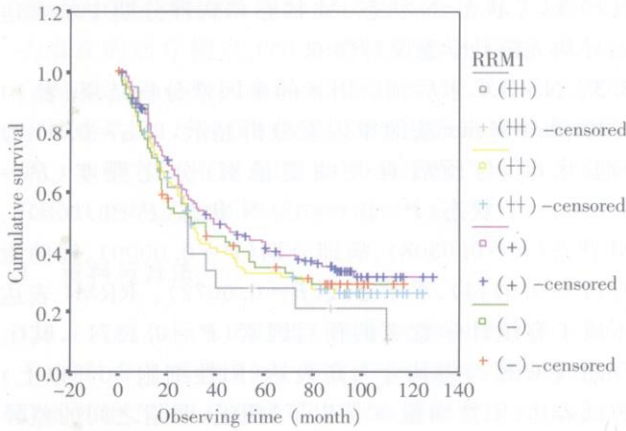


图 2 不同 RRM1 表达水平的 NSCLC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线
 Fig 2 Kaplan-Meier curves of NSCLC patients with different RRM1 expression

3 讨论

基于国际抗癌联盟标准的 TNM 分期是目前确定 NSCLC 治疗原则和预测预后的主要指标。由于 TNM 分期是以解剖结构作为分期标准,因此在临床应用仍存在不足。不少研究者试图从分子水平探寻有效的预测预后的分子指标。临床上对 P53、P21、VEGF、EGFR、ki-67 等分子生物学指标进行了研究,然而多数研究由于样本量小,结论往往相悖^[4]。目前尚没有能被多次重复验证的公认分子预后指标。

组织芯片(tissue chip ,tissue microarray)是 20 世纪 90 年代后期发展起来的技术,它是将数十个甚至数千个不同个体的组织标本按预先设计的顺序排列在一张玻片上所形成的组织微阵列。美国国家人类基因组研究实验室的 Kononen 等^[5]于 1998 年首先提出此概念并在乳腺癌中证实了其巨大的实用价值。与传统的组织切片相比,组织芯片的优势是:高通量 (high-throughput):一次实验可得到大量结果;平行性:组织芯片中的众多组织都处在相同条件下进行实验,较传统方法中一个病例一张切片的实验误差小,结果更可靠、更科学;耗材少、省时、省力、节约开支:成百上千个标本可以一次性进行检测;对原始组织蜡块损坏小:由于制作组织芯片钻取的组织很小(直径 0.6 mm),对原组织蜡块损坏不大。因此,在短短的几年时间里,组织芯片技术在肿瘤研究领域显示出巨大的发展潜力并得到迅速发展。

RRM1 基因位于 11p15.5,属于抑癌基因,通过诱导第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶—张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)表达,以及减少聚集粘连激酶

(focal adhesion kinase,FAK)的磷酸化来发挥其抑癌基因的作用。在哺乳动物 RRM1 基因编码合成核糖核苷酸还原酶的 M1 亚基(RRM1),它与 RRM2 构成核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase,RR),后者是 DNA 合成的限速酶,也是体内唯一能催化二磷酸核糖核苷(NDP)生成相应的脱氧核糖核苷酸(包括嘌呤和嘧啶脱氧核苷酸)的蛋白酶。RR 与 DNA 的合成、修复和细胞的增殖、转移有关,其中 RRM1 是 RR 功能不可或缺的部分,主要起调控酶的活性和确定底物特异性的作用。很早以前人们就发现,在许多肿瘤,如胃癌^[6]、食管癌^[7]和乳腺癌^[8,9]等存在 11p15.5 杂合性丢失。有研究报道,在肺癌中高达 88% 的小细胞肺癌、57% 的鳞癌和 40% 的腺癌存在 11p15.5 的杂合性丢失^[10](又称为 11LOHA^[11]),并且与病理分期相关,在有淋巴结和全身转移的患者出现的频率更高^[12,13]。LOH11A 还与预后有关。Beppler 等^[13]在研究 119 例行手术治疗的 I、II 期 NSCLC 患者的预后因素时发现,存在此区域等位基因缺失的患者,其死亡的相对风险率比没有丢失者高 2.01 倍($P = 0.021$)。Beppler 等^[14]回顾性分析 49 例、前瞻性分析了 77 例 NSCLC 切除后的标本,通过 RT-PCR 法检测 RRM1、RRM2、PTEN 基因的表达,发现 RRM1 表达与 PTEN 表达相关,两者与分期、功能状态和体重减轻一样,都是独立的预后因素,而且 RRM1 高表达的患者生存期更长。另外,RRM1 表达还与 37A/C 的单核苷酸多态性有关,在 51 例接受手术切除的 NSCLC 患者,以 18S rRNA 表达为参照物,在 37C/C 基因型中 RRM1 的表达值为 12.9,37A/A 基因型为 72.8,而 37C/A 基因型为 22.8,高表达的患者生存期有延长的趋势,但未见统计学意义^[15]。

基于以上研究,推测 RRM1 表达可能与预后有关。为了大规模地检测和将来更简便地应用于临床,我们在组织芯片的基础上,通过免疫组化的方法探讨 RRM1 与预后的关系。在制作组织芯片过程中,考虑到标本的代表性问题,每个标本均取三个肿瘤组织点在芯片上,这样有利于读片和尽量避免组织块的移位、脱失造成的影响^[3]。在排除组织芯片中脱失、破坏的病例后,共 344 例病例可供分析。研究发现,通过免疫组化检测的 RRM1 表达与性别、年龄、肿瘤部位、病理类型、分化程度、T 状态、N 状态、M 状态、病理分期等均无关,而且 RRM1 表达不能作为有统计学意义的预后因素。分析其原因可能是:第一,RRM1 基因主要通过诱导 PTEN 表达,减少 FAK 的磷酸化来发挥其抑癌基因的作用,而不是通过 RRM1 起作用,也就

是说 RRM1 的表达与 RRM1 基因的抑癌功能关系不大,因此不能作为预后的指标。第二,存在翻译后调控或转录后调控问题,mRNA 的高表达并不意味着蛋白的高表达。

本研究结果显示,采用免疫组化方法检测的 RRM1 表达不能作为 NSCLC 的预后因子。由于 RRM1 与 RR 的功能密切相关,已经有研究报道 RRM1 表达水平与吉西他滨的疗效有关,而高表达者生存期反而更短^[16,17]。因此,未来对 RRM1 的研究应定位在对化疗疗效的预测上。

参 考 文 献

- Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*,1997,111(6) 1710-1717.
- Wu YL ed. Lung cancer—principles, practice of multidisciplinary synthetic therapy. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000. 26-27. [吴一龙主编.肺癌多学科综合治疗的理论与实践.北京:人民卫生出版社,2000. 26-27.]
- Qiao GB, Wu YL, Ou W, et al. Reliability of tissue microarrays for immunohistochemical detecting of tumor markers in non-small cell lung cancer. *Cancer Res Prev Treat*,2004,31(8) 467-470. [乔贵宾,吴一龙,区伟,等.免疫组化方法检测肿瘤标志在肺癌组织芯片中表达的可靠性研究.肿瘤防治研究,2004,31(8) 467-470.]
- Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*,2002,122(3) 1037-1057.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*,1998,4(7) 844-847.
- Ranzani GN, Renault B, Pellegata NS, et al. Loss of heterozygosity and K-ras gene mutations in gastric cancer. *Hum Genet*,1993,92(3) 244-249.
- Shibagaki I, Shimada Y, Wagata T, et al. Allelotype analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*,1994,54(11) 2996-3000.
- Ali IU, Lidereau R, Theillet C, et al. Reduction to homozygosity of genes on chromosome 11 in human breast neoplasia. *Science*, 1987,238(4824) 185-188.
- Tran YK, Newsham IF. High-density marker analysis of 11p15.5 in non-small cell lung carcinomas reveals allelic deletion of one shared and one distinct region when compared to breast carcinomas. *Cancer Res*,1996,56(13) 2916-2921.
- Bepler G, Fong KM, Johnson BE, et al. Association of chromosome 11 locus D11S12 with histology, stage, and metastases in lung cancer. *Cancer Detect Prev*,1998,22(1) 14-19.
- O'Briant KC, Bepler G. Delineation of the centromeric and telomeric chromosome segment 11p15.5 lung cancer suppressor regions LOH11A and LOH11B. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, 18(2) 111-114.
- Satoh H, Lamb PW, Dong JT, et al. Suppression of tumorigenicity of A549 lung adenocarcinoma cells by human chromosomes 3 and 11 introduced via microcell-mediated chromosome transfer. *Mol Carcinog*,1993,7(3) 157-164.
- Bepler G, Gautam A, Simon G, et al. PTEN, RRM1, and ERCC1 are coexpressed in non-small-cell lung cancer (NSCLC) and are predictive of survival. *Lung Cancer*,2003,41(S2) 76.
- Bepler G, Sharma S, Cantor A, et al. RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*,2004,22(10) 1878-1885.
- Bepler G, Sharma S, Gautam A, et al. Tumor genotype, RRM1 expression, and outcome of patients with lung cancer. *Eur J Cancer*,2003,38(S7) S82-S83.
- Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, et al. Transcripts in pre-treatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene*,2003,22(23) 3548-3553.
- Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, et al; Spanish Lung Cancer Group. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*,2004,10(4) 1318-1325.

(收稿:2005-12-31 修回:2006-02-27)

(本文编辑 李蓓兰)

· 启 事 ·

致作者

为了确保图片制版的效果,请作者向本刊投稿时,尤其是经网上投稿时,务必通过邮局寄来相关的插图,特别是电泳图、X光片或CT片、组织学照片、荧光照片等。电泳图需由原始凝胶电泳图拍摄而成,并标注各条带的名称或编码,以及Marker上各迁移带的片段大小,请勿剪切图片。X光片及CT片应要求部位明确。组织学照片及荧光照片应注明内部标尺比例或放大倍数及染色法等。大体标本照片在图中应有尺度标记。所有图片必须平整光滑,具有良好的清晰度和对比度,不能有折痕或缺损,背面均应贴上标签,注明图序、作者姓名、图的上下方向及其他相关信息。