

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.10.018

金属硫蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的关系

侯新芳¹, 宋海岩², 刘文静¹, 李克¹, 王居峰¹

Expression and Prognostic Significance of Metallothionein in Non-small Cell Lung Cancer

Hou Xinfang¹, Song Haiyan², Liu Wenjing¹, Li Ke¹, Wang Jufeng¹

1. Department of Medicine, He'nan Tumor Hospital, Zhengzhou 450003, China; 2. Department of Human Anatomy, Xinxiang Medical University

Corresponding Author: Wang Jufeng, E-mail: hnzzwjf@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of metallothionein (MT) in non-small cell lung cancer. **Methods** Immunohistochemical methods are used to detect the expressions of MT in 68 cases of non-small cell lung cancer and 25 cases of benign lung disease. The relationships between MT expression and clinicopathological factors or patient prognosis and correlations between MT, GST- π , and Topo II were analyzed. **Results** The expression level of MT was significantly higher in NSCLC than in benign lung disease. There was significant correlation between MT expression and age, tumor differentiation. The survival of the patients with high expression of MT as compared to low expression of MT was shorter. No significant correlations were observed between MT and GST- π , MT and Topo II, GST- π and Topo II. **Conclusion** MT was over expressed in various degrees in NSCLC tissues, and related to some biology behaviour and prognosis of NSCLC.

Key words: Non-small cell lung cancer; Metallothionein; Prognosis

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中金属硫蛋白(metallothionein, MT)的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 68 例 NSCLC 和 25 例肺良性疾病中 MT 的表达,分析其与 NSCLC 临床病理特征、预后以及耐药蛋白 GST- π 和 Topo II 表达的关系。**结果** MT 在 NSCLC 组织中表达显著高于肺良性疾病组织($P < 0.05$),与年龄、分化程度有关;MT 表达患者术后生存期明显短于不表达者。MT 表达和 GST- π 、Topo II 表达无相关性($P > 0.05$)。**结论** MT 在 NSCLC 组织中存在不同程度的高表达,且与某些生物学行为有关,可以作为评价预后的指标。

关键词: 非小细胞肺癌;金属硫蛋白;预后

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)10-1236-04

0 引言

肺癌是当今世界上最常见的恶性肿瘤之一,已成为癌症死亡的主要原因。非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的 70%~80%,化学治疗是其主要手段之一。然而,由于耐药的发生,常常导致化疗的失败。自 20 世纪 70 年代发现肿瘤细胞的多药耐药现象以来,其产生机制以及如何解决一直是研究热点。导致肺癌多药耐药性的机制十分复杂,有多种基因和蛋白质与之相关。研究表明,金属硫蛋白(metallothionein, MT)、胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶(GST- π)和 DNA 拓扑异构酶(Topo II)均参与 NSCLC 耐药。本研究主要利

用免疫组织化学的方法,检测 MT 在 NSCLC 患者中的表达情况,并探讨其与 NSCLC 病理特征、预后以及和 GST- π 、Topo II 表达之间的关系,以期为 NSCLC 的治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2006 年 7 月—2008 年 6 月郑州大学第一附属医院、河南省人民医院胸外科手术切除并经病理确诊的原发性非小细胞肺癌标本 68 例。患者年龄 20~72 岁,平均年龄(56.0 ± 12.5)岁;男 48 例,女 20 例;按组织学类型分为:鳞癌 36 例,腺癌 28 例,腺鳞癌 3 例,大细胞癌 1 例;按分化程度分为:高中分化 27 例,低分化 41 例。临床分期依据 2009 年国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期标准,Ⅰ期 20 例,Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 19 例。按淋巴结转移情况分为:有淋巴结转移 47 例,无淋巴结转移 21 例。所有患者

收稿日期:2012-04-27;修回日期:2012-07-12

作者单位:1. 450003 郑州,河南省肿瘤医院内科;2. 新乡医学院解剖学教研室

通信作者:王居峰, E-mail: hnzzwjf@yahoo.com.cn

作者简介:侯新芳(1974-),女,博士,主治医师,主要从事恶性肿瘤的基础与临床研究

术前均未接受化疗、放疗及其他抗癌治疗。取材后用 10% 甲醛固定,石蜡包埋。良性病变肺组织标本 25 例(肺结核 12 例,炎性假瘤 7 例,硬化性血管瘤 1 例,支气管扩张 5 例)作为对照组,男 18 例,女 7 例,年龄 24~69 岁,平均年龄(50 ± 12.5)岁。

1.2 试剂和方法

兔抗人 MT 抗体购自美国 Santa cruz 公司。鼠抗人 GST-π、Topo II 单克隆抗体及 SP 试剂盒均购自福州迈新生物技术公司。采用免疫组织化学 SP 染色方法,步骤参照说明书。采用已知阳性 NSCLC 组织作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

以细胞核或细胞质中存在粗细一致的棕黄色颗粒为阳性染色。核或胞质无着色定为阴性。

1.4 随访情况

纳入本研究的所有病例均有完整随访资料,研究自手术之日起,至本研究结束(2011 年 12 月 31 日)止,随访时间单位为月,研究终点(阳性结局)定义为患者因肺癌或相应并发症死亡,研究结束时仍未出现阳性结局者定为删失。本研究随访时间为 3~60 月,中位随访时间为 22.9 月。

1.5 统计学方法

利用 SPSS10.0 软件处理数据,结果用阳性率表示,采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson's 相关分析;生存分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线,并经

Log rank 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为显著性标准。

2 结果

2.1 MT、GST-π、Topo II 在非小细胞肺癌与肺良性病变组织中的表达

MT 和 GST-π 蛋白阳性染色主要定位于细胞质,Topo II 蛋白阳性染色主要定位于细胞核,见图 1。68 例 NSCLC 组织中,MT、GST-π、Topo II 阳性表达率分别为 69.1%、63.2%、63.2%,明显高于肺良性病变组织的 28.0%、24.0%、16.0% ($P < 0.05$)。

2.2 NSCLC 中 MT、GST-π、Topo II 的表达及其与临床病理特征的关系

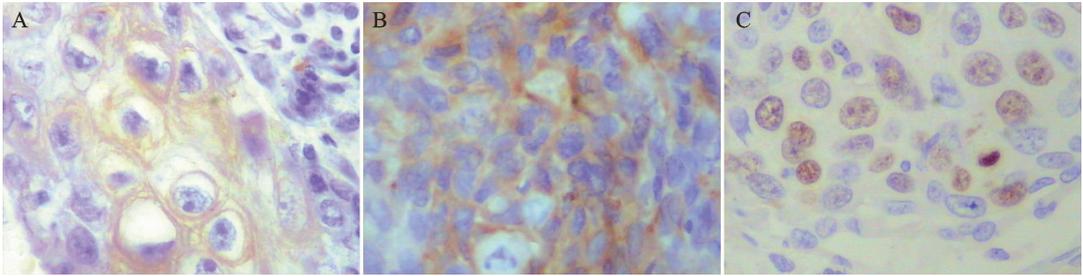
MT 在 NSCLC 中表达与年龄、分化程度有关,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而与性别、组织学类型、临床分期、有无淋巴结转移无关,其差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。GST-π 在 NSCLC 中表达与分化程度有关,其差异有统计学意义 ($P > 0.05$);而与年龄、性别、组织学类型、临床分期、有无淋巴结转移无关,其差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。Topo II 在 NSCLC 中表达与组织学类型有关,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而与年龄、性别、分化程度、临床分期、有无淋巴结转移无关,其差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 非小细胞肺癌中 MT、GST-π、Topo II 的表达与临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between expression of MT, GST-π and Topo II and clinicopathological characteristics

Clinicopathological characteristics	n	Positive expression of MT[n (%)]	P	Positive expression of GST-π[n (%)]	P	Positive expression of Topo II [n(%)]	P
Age(years)							
≤60	38	22(57.9)		23(60.5)		24(63.2)	
>60	30	25(83.3)	0.024	20(66.7)	0.602	19(63.3)	0.988
Gender							
Male	48	35(72.9)		31(64.6)		30(62.5)	
Female	20	12(60.0)	0.294	12(60.0)	0.721	13(65.0)	0.846
Histology*							
Squamous cell carcinoma	36	26(72.2)		22(61.1)		28(77.8)	
Adenocarcinoma	28	19(67.9)	0.705	19(67.9)	0.577	14(50.0)	0.020
Differentiation							
Well-moderate	27	12(44.4)		21(77.8)		16(59.3)	
Poor	41	35(85.4)	0.000	22(53.7)	0.044	27(65.9)	0.581
TNM stage							
I ~ II	49	34(69.4)		30(61.2)		33(67.3)	
III	19	13(68.4)	0.938	13(68.4)	0.581	10(52.6)	0.259
Lymph node metastasis							
Yes	47	31(66.0)		32(68.1)		27(57.4)	
No	21	16(76.2)	0.399	11(52.4)	0.215	16(76.2)	0.139

Note: * : three cases of adenosquamous carcinoma and one case of large cell carcinoma were not included in histology column because of too little case; MT: metallothionein; GST: glutathione-S-transferase; Topo: topoisomerase



A: expression of MT in NSCLC; B: expression of GST- π in NSCLC; C: expression of Topo II in NSCLC

图 1 MT、GST- π 、Topo II 在非小细胞肺癌中的表达 (SP 法 $\times 400$)

Figure 1 Expression of MT, GST- π and Topo II in non-small cell lung cancer (SP $\times 400$)

2.3 MT、GST- π 、Topo II 在 NSCLC 组织中表达的相关性

Pearson 积差相关性分析显示: NSCLC 中 MT 与 GST- π 、MT 与 Topo II、GST- π 与 Topo II 的表达均不相关 ($r = -0.180, P = 0.143; r = 0.216, P = 0.076; r = -0.075, P = 0.541$)。

2.4 MT 在 NSCLC 组织中的表达和预后

截止随访日, 68 例患者中, 有 56 例死亡。MT 表达组和不表达组中位生存期分别为 19 月和 36 月。Kaplan-Meier 生存分析显示: MT 表达组患者术后生存时间较不表达者短, 差异有统计学意义 ($P = 0.002$), 见图 2。

预后的相关信息, 同时还可作为肿瘤化疗耐药的标志物, 诱导 MT 表达可以降低化疗药物的毒副作用^[1]。1993 年 Hart 等^[2] 首先使用亚铁血红素/109Cd 结合实验, 检测 11 例成对的肺癌组织和相应的癌旁组织标本, 发现 MT 在癌组织中含量明显高于癌旁组织, 推测 MT 可能是肺癌早期检测的一个生物指标。2002 年 Theocharis 等^[3] 和 2011 年 Werynska 等^[4] 分别用免疫组织化学方法证实了 MT 在肿瘤组织中高表达, 并且发现腺癌低于鳞癌组织, 和肿瘤分化程度无关。本研究结果表明, MT 蛋白在癌组织中表达高于良性病变, 并且和肿瘤分化、年龄、患者预后有关。在高中分化组织中低于低分化组织, 在 ≤ 60 岁的患者中表达低于 >60 的患者。MT 表达患者术后生存期明显短于不表达者。MT 蛋白表达与性别、组织学类型、TNM 分期、淋巴结转移与否均无关。这些均提示 MT 参与非小细胞肺癌的发生、发展过程。研究发现, 不同肿瘤 MT 表达不同。MT 在乳腺癌、肾癌、鼻咽癌、甲状腺癌、食道鳞癌、睾丸癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、唾液腺癌、宫颈癌中过表达。在这些肿瘤组织中, MT 表达的增加和病理类型或分化程度或分期或化疗抵抗或预后等有关。肿瘤组织中 MT 表达的增加在肿瘤的发生、发展中究竟发挥了什么样的作用目前尚未肯定。大多数学者认为细胞内 MT 具有高度的可诱导性, 细胞在受致癌物刺激后可以产生一系列的保护机制来清除致癌物, MT 水平增高可能是这些保护机制之一。但是, 并非所有肿瘤组织中的 MT 含量均增加, MT 表达减少见于肝癌、胃癌、结直肠癌、中枢神经系统肿瘤以及甲状腺癌等。Arriaga 等^[5] 分析认为, MT 表达下调和 MT1G、MT1E、MT1F、MT1H 和 MT1M 在肠癌中表达缺失, MT1X 和 MT2A 表达下调有关, 这些异构体均参与结直肠癌发生发展, 它们的缺失和下调与不良预后有关。可能由于在不同的肿瘤中存在不同的 MT 异构体, 因此不同肿瘤中 MT 表达水平不同, 并且对肿瘤的生物行为的影响也不同。具体 MT 各个异构体在不同肿瘤中的作用尚待进一步研究。

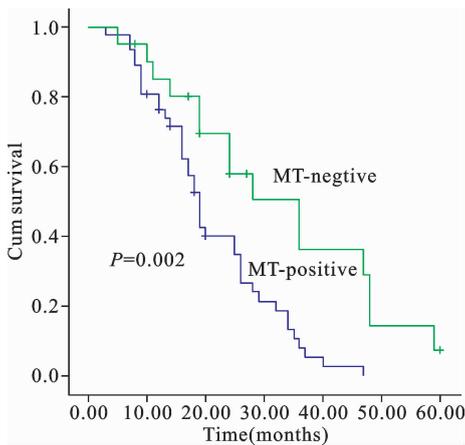


图 2 MT 在 NSCLC 组织中的表达和患者生存期的关系
Figure 2 The survival curves of patients with different MT levels

3 讨论

耐药性是影响肺癌化疗疗效的主要因素。正如肿瘤发生要经历多基因、多阶段、多步骤的作用, 肿瘤耐药亦是多因素参与的过程。研究表明, MT、GST- π 、Topo II 均与肺癌耐药有关。

MT 是一类可诱导的, 富含半胱氨酸的低分子量蛋白质, 由 10 个功能性异构体组成。MT 在肿瘤的发生、发展中具有重要的作用, 检测 MT 表达情况不仅可以提示肿瘤细胞的增殖活性, 还可以提供

近年来,研究发现,细胞内解毒体系,含巯基分子 MT 的过量表达可能是耐药发生机制之一。丰富的半胱氨酸残基使 MT 具有亲核特性,这就使得 MT 在亲电子抗癌药物耐药中受到重视。而且,MT 是高度可诱导的蛋白,它们的诱导经常和金属毒性的耐受,包括致癌金属镉、含金属化疗药顺铂等有关。此外,MT 能通过 caspases-3、caspases-8、caspases-9 以及 JNK 等信号分子抑制细胞凋亡。MT 的这些作用使得其在肿瘤耐药尤其烷化剂耐药中受到重视。研究表明,MT 和顺铂、伊立替康、阿霉素耐药均有关^[6-8]。为了探讨 MT 在 NSCLC 耐药中的作用,我们进一步研究了耐药蛋白 GST- π 、Topo II 在 NSCLC 的表达,以及和 MT 的相关性。GST- π 是谷胱苷肽转移酶 GSTs 基因家族成员之一,占 90% 以上,且与 MDR 关系最为密切。GST- π 不仅通过催化谷胱苷肽与药物结合,而且本身可以和亲脂性细胞毒药物结合,从而降低了药物的细胞毒性作用。肿瘤细胞内 GST- π 的过度表达与顺铂、硼替佐米、吉西他滨、阿糖胞苷和阿霉素耐药有关^[9-10]。Topo II 是许多化疗药物的重要靶点,它能催化 DNA 超螺旋结构的局部构型改变,化疗药物通过该酶连接与 DNA 形成可分割的共价复合物,引起 DNA 断裂,致使肿瘤细胞死亡。如果该酶数量减少、活性减低,则肿瘤细胞易产生耐药。以 Topo II 为靶点的药物主要为蒽环类、鬼臼类^[11]。本结果表明 NSCLC 中 MT、GST- π 、Topo II 阳性表达之间无相关性存在。

本实验结果表明,在 NSCLC 中 MT 表达与年龄、分化程度有关,MT 表达患者术后生存期明显短于不表达者,MT、GST- π 、Topo II 同时参与非小细胞肺癌耐药形成,但其阳性表达之间却无相关性存在。这也证实了肺癌耐药是多基因、多种耐药机制共同作用的结果。临床上同时检测 MT、GST- π 、Topo II 的表达情况,对判断非小细胞肺癌的耐药性以及指导系统、规范的化疗用药有重要意义。我们

的实验研究结果为今后从多基因、多途径逆转肺癌耐药研究提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Pedersen Mø, Larsen A, Stoltenberg M, et al. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis[J]. Prog Histochem Cytochem, 2009, 44(1): 29-64.
- [2] Hart BA, Voss GW, Vacek PM. Metallothionein in human lung carcinoma[J]. Cancer Lett, 1993, 75(2):121-8.
- [3] Theocharis S, Karkantaris C, Philipides T, et al. Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade [J]. Histopathology, 2002, 40(2): 143-51.
- [4] Werynska B, Pula B, Muszczynska-Bernhard B, et al. Correlation between expression of metallothionein and expression of Ki-67 and MCM-2 proliferation markers in non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2011, 31(9):2833-9.
- [5] Arriaga JM, Levy EM, Bravo AI, et al. Metallothionein expression in colorectal cancer: relevance of different isoforms for tumor progression and patient survival[J]. Hum Pathol, 2012, 43(2):197-208.
- [6] Knipp M. Metallothioneins and platinum(II) anti-tumor compounds [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(5):522-37.
- [7] Chun JH, Kim HK, Kim E, et al. Increased expression of metallothionein is associated with irinotecan resistance in gastric cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(14): 4703-6.
- [8] Yap X, Tan HY, Huang J, et al. Over-expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer [J]. J Pathol, 2009, 217(4):563-70.
- [9] Pasello M, Michelacci F, Scionti I, et al. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(16): 6661-8.
- [10] Rolland D, Raharijaona M, Barbarat A, et al. Inhibition of GST-pi nuclear transfer increases mantle cell lymphoma sensitivity to cisplatin, cytarabine, gemcitabine, bortezomib and doxorubicin[J]. Anticancer Res, 2010, 30(10):3951-7.
- [11] Wang J, Zhang J, Zhang L, et al. Expression of P-gp, MRP, LRP, GST- π and TopoII α and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines[J]. Oncol Rep, 2011, 26(5):1081-9.

[编辑:黄园玲;校对:周永红]