

Podoplanin 在非小细胞肺癌中的表达

谢立箴^{1△}, 鲍旭辉², 林 晨³, 王 征⁴, 张 静¹, 樊 皎¹

(1. 复旦大学附属肿瘤医院放疗科, 上海 200032; 2. Department of Pathology, Duke University Medical Center, NC 27710, USA; 3. 复旦大学附属肿瘤医院化疗科, 上海 200032; 4. 上海质子重离子医院肝胆胰肿瘤专科, 上海 201321)

[关键词] 癌, 非小细胞肺; podoplanin; 淋巴结转移; 预后

[中图分类号] R551.2 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2017)02-0357-04

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2017.02.031

肺癌是发病率和死亡率增长最快、对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一, 据不完全统计, 2015 年我国肺癌确诊人数达 73.3 万, 因肺癌导致死亡的患者有 61 万。目前, 用于肺癌诊治的医疗费用成倍增长, 给医疗资源的分配带来了严峻的挑战。WHO 根据生物学行为、治疗以及预后等因素, 将肺癌分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中 NSCLC 占 80% 以上^[1]。在 NSCLC 中, 约 65% 的患者在首诊时已经发生了局部进展或者远处转移, 转移性 NSCLC 患者的平均中位生存期只有 1~2 年^[2], 而相对于 SCLC, NSCLC 对于传统治疗手段化疗和放疗都较不敏感, 即使目前的靶向治疗药物如厄洛替尼或贝伐单抗等已在临床上广泛应用, 但往往也只是初期疗效较为显著而已, 几个月后多由于肿瘤细胞演化出不同的代谢旁路而逐渐耐药进而失去作用^[3-4]。因此, 提高转移性 NSCLC 的疗效已刻不容缓, 亟需新疗法来改善治疗效果、延长患者生存期。随着单克隆抗体尤其是肿瘤抗原特异性的单克隆抗体研究的发展, 进一步推动了多种与肿瘤特异性抗体相结合的靶向疗法的基础与临床研究。

本研究通过大数据分析及临床资料阐明特异性肿瘤抗原 podoplanin (PDPN) 在非小细胞肺癌中的表达情况以及其与患者预后的关联, 证实 PDPN 是一个新的、较为可靠的肺癌治疗靶点, 从而为将来非小细胞肺癌中各类新型生物靶向疗法的开展提供了新的潜在特异性治疗靶位。

1 资料与方法

1.1 数据

利用美国癌症基因图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 大数据平台, 选取 *PDPN* 基因明显高表达和低表达的患者 (选取最高表达及最低表达各 25%), 对于 NSCLC 中的最主要的两大类肺鳞癌和肺腺癌病例按 *PDPN* 基因表达情况分为高表达组和低表达组, 进一步根据美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 的淋巴结分期进行随机配对, 获得肺鳞癌高表达及低表达各 108 例, 腺癌高表达及低表达各 109 例。

1.2 NSCLC 患者石蜡切片获取

本研究组依托复旦大学附属肿瘤医院组织病理库, 选取了 2012 年接受治疗的 NSCLC 患者的 43 例石蜡切片进行 PDPN 免疫组织化学染色分析, 确定 PDPN 蛋白的表达情况, 并分析这些患者临床的病理诊断淋巴结转移情况。

本研究开始前经过复旦大学附属肿瘤医院伦理委员会审查批准, 所取组织库标本已经患者书面知情同意。

1.3 方法

采用免疫组化 SP 法对 NSCLC 患者石蜡切片中的 PDPN 抗原进行检测。将石蜡切片进行脱蜡和水洗后使用 PBS 冲洗, 再用 3% (体积分数) 过氧化氢甲醇溶液封闭, 室温下封闭 10 min, 然后用 PBS 冲洗, 经抗原修复后再用 PBS 冲洗, 加羊血清 20 min, 加抗人 PDPN 一抗 (Sigma), 于 4 °C 冰箱内过夜, 使

基金项目: 上海市浦江人才计划项目 (编号 14PJ1402000) 和国家自然科学基金 (编号 81401896) 资助 Supported by Pujiang Talent Program, Shanghai Municipal Human Resource Bureau and Shanghai Science and Technology Committee (14PJ1402000) and the National Nature Science Foundation of China (81401896)

△ Corresponding author's e-mail, xiely01@126.com

网络出版时间: 2016-12-29 10:10:42 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20161229.1010.036.html>

用 PBS 冲洗后滴加二抗,用 PBS 冲洗后行 DAB 染色,然后水洗,使用苏木精复染后冲洗脱水封片镜检。免疫组化图片采用 OLYMPUS 荧光显微镜 BX51 摄取,并用 Image Pro Express 分析系统进行分析。经病理科医师阅片,诊断为强阳性并排除其他部位的表达如淋巴管等,仅肺癌肿瘤病变区域的表达者确定为阳性。

1.4 统计学分析

使用 PASW 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) 软件进行统计学分析,使用 Kaplan Meier 法绘制生存曲线,并用 log-rank 检验比较分析 PDPN 基因表达与患者总生存情况的关系;计数资料用例数和百分率表示,组间比较采用 Fisher 精确概率法,采用双侧检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

经 TCGA 数据库大于 15 年的随访分析发现,在肺鳞癌患者中 PDPN 基因低表达患者的总生存 (overall survival, OS) 明显优于高表达患者,且中位生存时间分别为 65.2 个月和 36.6 个月,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 1)。这一结果提示在肺鳞癌中,PDPN 基因高表达可能通过下游的各项信号转导通路引起肿瘤的侵袭性以及转移性增加,从而导致患者的预后不佳。在肺腺癌患者中,PDPN 基因高表达和低表达的患者总生存差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 2)。

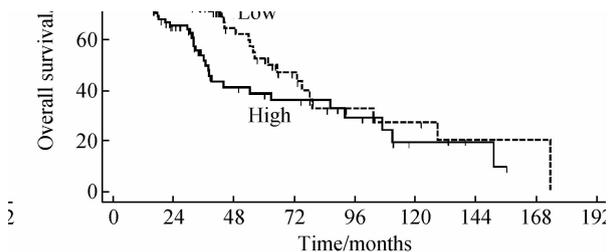


图 1 PDPN 基因表达情况与肺鳞癌患者的生存曲线分析

Figure 1 Association between overall survival curve in lung squamous cell cancer patients and expression of PDPN gene

本 研 究 组 选 取 的 2012 年 接 受 治 疗 的 43 例 NSCLC 患 者 的 石 蜡 切 片 PDPN 免 疫 组 化 染 色 分 析 并 确 定 其 PDPN 蛋 白 的 表 达 情 况,其 中 包 括 肺 鳞 癌 15 例,肺 腺 癌 15 例,其 他 NSCLC 13 例。染 色 结 果 显 示,PDPN 在 8 例 肺 鳞 癌 患 者 病 理 标 本 中 呈 现 阳 性 表 达,阳 性 率 53.3%,肺 腺 癌 中 4 例 阳 性,阳 性 率

26.7%,其 他 NSCLC 4 例 阳 性,阳 性 率 30.8% (表 1,图 3)。进 一 步 分 析 PDPN 表 达 阳 性 与 阴 性 患 者,发 现 肺 鳞 癌 与 其 他 NSCLC 中 PDPN 阳 性 患 者 中 淋 巴 结 N2 以 上 淋 巴 结 转 移 比 例 明 显 高 于 PDPN 阴 性 者,其 中 肺 鳞 癌 患 者 中 两 者 差 异 具 有 统 计 学 意 义 ($P = 0.04$,表 1)。

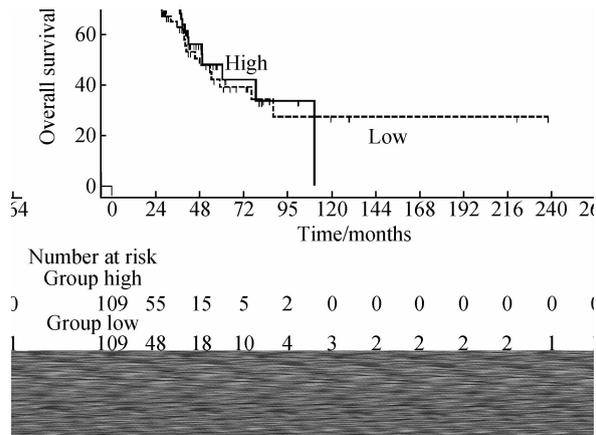
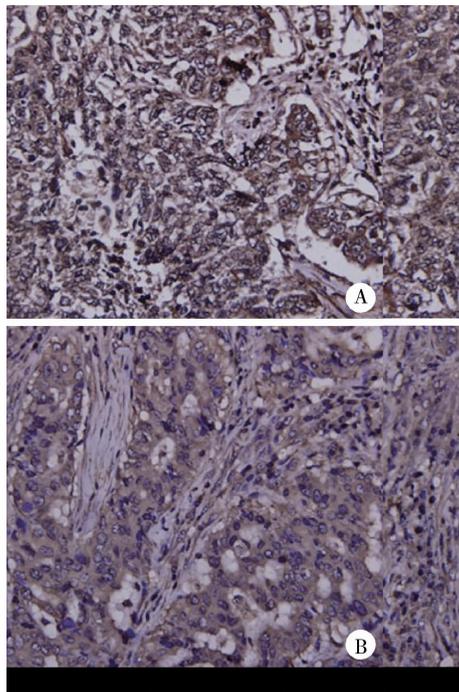


图 2 PDPN 基因表达情况与肺腺癌患者的生存曲线分析

Figure 2 Association between overall survival curve in lung adenocarcinoma patients and expression of PDPN gene



A, PDPN (+) in squamous cell carcinoma; B, PDPN (+) in adenocarcinoma.

图 3 NSCLC 患 者 病 理 切 片 的 PDPN 免 疫 组 化 染 色 结 果 (×40)

Figure 3 Immunohistochemistry expression of PDPN in NSCLC patients (×40)

3 讨论

肺 癌 发 病 率 和 死 亡 率 均 居 我 国 恶 性 肿 瘤 首 位,肺 癌 也 是 我 国 疾 病 负 担 最 重 的 肿 瘤,本 研 究 通 过

TCGA 大数据平台进行候选基因表达与 NSCLC 患者总生存等预后相关首要指标分析,结合小样本的中国肺癌患者人群免疫组化表达及病理诊断的淋巴

结转移能力相关性分析,结果提示可以将 PDPN 这一肿瘤表面抗原作为潜在治疗转移性非小细胞肺癌尤其是肺鳞癌的目标靶点。

表 1 非小细胞肺癌中 PDPN 免疫组化表达与病理淋巴结转移程度的相关性分析

Table 1 Association between immunohistochemistry expression of PDPN and pathological lymph node metastasis in NSCLC

Lung cancer type	Cases	PDPN	Positive rate	$\geq N2 +$	$\geq N2 +$ rate/%	<i>P</i>
Squamous cell carcinoma	15	positive	8	53.3%	6	75.0
		negative	7		1	
Adenocarcinoma	15	positive	4	26.7%	2	50.0
		negative	11		6	
Others	13	positive	4	30.8%	3	75.0
		negative	9		4	

PDPN 最初在足细胞表面被检测到,故也称平足蛋白,是一个由 162 个氨基酸组成的 I 型跨膜唾液黏蛋白样糖蛋白抗原,它由一个富含丝氨酸和苏氨酸的细胞外功能域,一个单次跨膜功能域以及一个含有 cAMP 和蛋白激酶 C 磷酸化位点的细胞内功能域组成^[5]。PDPN 在淋巴内皮细胞中选择性表达,并有一定调节血管淋巴管的发育、细胞运动,促进肿瘤侵袭和转移能力。多种人源性肿瘤细胞已报道有 PDPN 的表达,包括黑色素瘤、脑肿瘤、生殖细胞肿瘤、泌尿系肿瘤、头颈部肿瘤以及非小细胞肺癌等^[6-10],同时,PDPN 与肿瘤的恶性进展,如上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)、远处转移及浸润等紧密相关^[9-11]。Shimada 等^[12]报道在其检测的 66% NSCLC 样本中发现 PDPN 高表达。

美国癌症基因图谱(TCGA, <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)是目前最大的癌症基因信息的数据库,是美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)与国家人类基因组研究所(National Human Genome Research Institute, NHGRI)联合于 2006 年启动的大型研究平台,通过大数据大样本的方式,全面、系统地提供恶性肿瘤生长和转移等过程中的分子生物学信息及临床相关资料。本研究分析了非小细胞肺癌中的特异性肿瘤抗原 PDPN 靶点,通过 TCGA 大数据平台分析,阐明了 PDPN 基因表达情况与 NSCLC 尤其是其中的肺鳞癌患者的总生存有着密切的关系,发现 PDPN 基因高表达的肺鳞癌患者往往预后不佳,预示 PDPN 基因表达水平可能是影响 NSCLC 尤其是肺鳞癌患者预后的一个重要因素。在本研究中,经淋巴结转移程度配对后的 PDPN 基因表达与肺鳞癌患者的总生存仍呈现了明

显的相关性,提示 PDPN 在促进淋巴结转移作用的基础上,仍可能直接影响预后。研究中的复旦大学附属肿瘤医院患者的免疫组化结果与国外研究报道的结果基本吻合^[12],阐明了在中国 NSCLC 患者中,PDPN 蛋白同样有着相当高的阳性率,尤其是在肺鳞癌患者中的比例,经病理组织学审核后排除正常情况下淋巴管的一定表达,PDPN 在肺癌区域的阳性率仍大于 50%,进一步在蛋白质表达的层面上证明 PDPN 可以成为治疗中的一个新的潜在细胞表面治疗靶点。

目前已有多种抗 PDPN 抗体处于成熟的研究阶段,对这些抗体的构造已有了相当的了解,包括 NZ-1, D2-40, AB3 及 18H5^[13-14],同时如 NZ12, chLpMab-7 等诸多新抗体也在积极的研发和检测中^[15-16]。

综上所述,在靶向治疗占重要地位的各项抗肿瘤疗法中,与抗 PDPN 抗体相结合的各类新型靶向治疗可能作为一个潜在的个体化新疗法,给以鳞癌为主的 PDPN 阳性 NSCLC 患者带来新的治疗希望。

参考文献

- [1] Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors[J]. *Semin Roentgenol*, 2005, 40(2): 90-97.
- [2] Reck M, Heigener DF, Mok T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments[J]. *Lancet*, 2013, 382(9893): 709-719.
- [3] Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. National comprehensive cancer network: NCCN clinical practice guidelines in oncology, non-small cell lung cancer version 1.2017[EB/OL]. (2016-10-14) [2016-10-25]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf.
- [4] Binder D, Hegenbarth K. Emerging options for the management of non-small cell lung cancer[J]. *Clin Med Insights Oncol*, 2013, 7(1): 221-234.

- [5] Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28 (5B): 2997 - 3006.
- [6] Chandramohan V, Bao X, Kaneko KM, et al. Recombinant anti-podoplanin (NZ-1) immunotoxin for the treatment of malignant brain tumors[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(10): 2339 - 2348.
- [7] Ochoa-Alvarez JA, Krishnan H, Pastorino JG, et al. Antibody and lectin target podoplanin to inhibit oral squamous carcinoma cell migration and viability by distinct mechanisms[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(11): 9045 - 9060.
- [8] Kenmotsu H, Ishii G, Nagai K, et al. Pleomorphic carcinoma of the lung expressing podoplanin and calretinin [J]. *Pathol Int*, 2008, 58(12): 771 - 774.
- [9] Sun JG, Wang Y, Chen ZT, et al. Detection of lymphangiogenesis in non-small cell lung cancer and its prognostic value[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1): 21.
- [10] Perez-Moreno P, Brambilla E, Thomas R, et al. Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(9): 2443 - 2451.
- [11] Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(1): 1 - 5.
- [12] Shimada Y, Ishii G, Nagai K, et al. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11): 2054 - 2059.
- [13] Ogasawara S, Kaneko MK, Price JE, et al. Characterization of anti-podoplanin monoclonal antibodies: critical epitopes for neutralizing the interaction between podoplanin and CLEC-2[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2008, 27(4): 259 - 267.
- [14] Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(4): 1301 - 1307.
- [15] Abe S, Kaneko MK, Tsuchihashi Y, et al. Antitumor effect of novel anti-podoplanin antibody NZ-12 against malignant pleural mesothelioma in an orthotopic xenograft model [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(9): 1198 - 1205.
- [16] Kato Y, Kunita A, Abe S, et al. The chimeric antibody chLpMab-7 targeting human podoplanin suppresses pulmonary metastasis via ADCC and CDC rather than via its neutralizing activity [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 36003 - 36018.

(2016-10-26 收稿)

(本文编辑:王 蕾)

· 书 讯 ·

北京大学基础医学院杨宝学教授主编的 *Aquaporins* 一书出版

由北京大学基础医学院杨宝学教授主编的 *Aquaporins* 一书已由 Springer 出版社正式出版发行,来自中国、美国、日本等 11 个国家的水通道研究领域的专家学者参与了撰写。该书系统介绍了近三十年来水通道(aquaporins, AQP)领域的研究进展,共分 18 章,其内容包括水通道的分子生物学、水通道的进化过程、水通道转运特性、水通道与腺体分泌、神经系统的水通道、心血管系统的水通道、呼吸系统的水通道、消化系统的水通道、泌尿系统的水通道、生殖系统的水通道、皮肤的水通道、眼的水通道、胚胎发育与水通道、尿崩症、水通道和肥胖、水通道作为治疗靶点、具有水通透性的其他膜通道和水通透性测定方法等。

水通道是一组特异性通透水的膜通道蛋白,该家族共有

13 个成员(AQPO ~ AQP12)。水通道广泛表达于肾、红细胞、脑、眼、心脏、血管、肺、肝、肠道、膀胱、输尿管、睾丸、腺体等多个组织器官。对水通道基因敲除小鼠模型研究和临床流行病学调查发现,水通道功能缺陷可导致尿崩症、干眼症、干皮症等病理改变。研究还发现,水通道的功能性抑制可减缓脑水肿和肿瘤的进展,提示水通道可作为新的药物靶点,其抑制剂有可能研发成为新型治疗脑水肿和肿瘤的药物。以水通道为靶点的药物研发近年来正逐步成为该领域的研究热点,水通道的生理学功能研究、药物靶点确认和相关药物筛选模型也在不断发展之中。

(北京大学基础医学院)