

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 06. 010

非小细胞肺癌中 WWOX 蛋白及 ErbB2 蛋白的联合检测

李秋芳¹,杨霄鹏²,杨瑞玲³,王 静⁴,吴逸明⁵

CO-examination of WWOX and ErbB2 Protein in Non-small Cell Lung Cancer

LI Qiu-fang¹, YANG Xiao-peng², YANG Rui-ling³, WANG Jing⁴, WU Yi-ming⁵

1. Clinical Department, Nursing College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University; 4. Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; 5. College of Public Health of Zhengzhou University

Abstract: Objective To study the expression and significance of WWOX gene in non-small cell lung cancer and the relationship with ErbB2 protein. **Methods** WWOX protein expression was evaluated by immunohistochemistry in 50 squamous cell carcinomas, 31 adenocarcinomas and 20 adjacent normal lung tissues, and its correlation with clinical and histopathologic characteristics and the expression of ErbB2 protein were analyzed. **Results** WWOX expression was absent/reduced in 72. 8% of NSCLC, whereas it was normal in 80. 0% of adjacent normal lung tissues. WWOX expression was strongly associated with tumor histology and histologic grade ($P<0. 05$), the percentage of cases with absent/strongly reduced WWOX expression was higher in squamous cell carcinomas and in poorly differentiated tumors. The over-expression of ErbB2 was associated with TNM stage and Lymph node metastasis. Finally, WWOX expression was negatively related to the overexpression of ErbB2 ($r = -0. 239, P<0. 05$). **Conclusion** The low expression of WWOX expression and the overexpression of ErbB2 can estimate the prognosis of NSCLC.

Key words: Non-small cell lung cancer; WWOX protein; ErbB2 protein

摘 要:目的 探讨 WWOX(WW domain-containing oxidoreductase)基因在非小细胞肺癌组织中的表达及与 ErbB2 蛋白之间的关系。**方法** 用免疫组化方法检测 50 例肺鳞癌, 31 例肺腺癌及 20 例癌旁正常组织中 WWOX 基因蛋白的表达, 并分析其与各临床病理指标及 ErbB2 蛋白之间的相关性。**结果** WWOX 基因在 72. 8% 的非小细胞肺癌中失表达或表达减少, 而在癌旁正常组织中有 80. 0% 正常表达。WWOX 基因的表达与组织类型、细胞分化程度密切相关 ($P<0. 05$), 在鳞癌和低分化癌中 WWOX 基因失表达或表达减少的发生率更高。肺癌中 ErbB2 的过度表达与肺癌的临床分期、淋巴结转移相关, WWOX 蛋白阳性表达与 ErbB2 负相关 ($r = -0. 239, P<0. 05$)。**结论** WWOX 蛋白的低表达与 ErbB2 的过表达可以协同判断预后较差的非小细胞肺癌。

关键词: 非小细胞肺癌; WWOX 蛋白; ErbB2 蛋白

中图分类号: R734. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)06-0487-03

0 引言

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的生物学行为差异性很大, 临床因治疗缺乏针对性导致疗效较差。近年来随着肿瘤分子生物学的进展, 人们认为肿瘤发生的内因是体内细胞分

子生物学改变的累加, 因而肿瘤临床生物学特性必定有其分子生物学基础。这使我们能从基因角度来探讨其与 NSCLC 预后关系。WWOX 基因是近年来发现的一个可能的肿瘤抑制基因, 位于染色体 16q 23. 3~24. 1 区域, 跨越了整个常见染色体脆性位点 FRA16D, 该脆性位点易在香烟等物质作用下发生基因变异。近年来的研究证明, 其表达缺失与乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤的发生发展密切相关。人表皮生长因子受体基因 (ErbB2 基因), 又称 neu2 基因, 是编码第二人体表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的癌基因, 定位于 17q12~21. 3, 是 I 型受体酪氨酸激酶家族

收稿日期: 2008-05-21; 修回日期: 2008-06-27
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571552)
作者单位: 1. 450052 郑州大学护理学院临床教研室; 2. 郑州大学第二附属医院神经内科; 3. 河南大学第一附属医院药剂科; 4. 郑州大学第一附属医院呼吸内科; 5. 郑州大学公共卫生学院
作者简介: 李秋芳 (1976-), 女, 硕士, 讲师, 从事肺癌的发病机制的研究

中的一员,与配体结合后,通过自身磷酸化参与细胞的信号传递,信号在细胞内通过激酶级联传递,最终调节细胞的生长及分裂。

有研究表明在前列腺癌组织中 WWOX 抑制 ErbB2 诱导的前列腺癌细胞的生长,WWOX 与 ErbB2 蛋白的表达负相关^[1]。本研究拟采用免疫组化方法检测 WWOX 及 ErbB2 蛋白在 NSCLC 中的表达,以探讨二者在 NSCLC 发生发展中的作用及其相互关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集郑州大学第一、二附属医院 2004~2007 年胸外科手术切除并经病理确诊的原发性 NSCLC 标本 81 例,其中男 53 例,女 28 例;年龄 31~75 岁,平均年龄 58 岁。所有患者术前均未接受化疗、放疗和其他治疗。术后迅速取癌组织及距癌组织边缘 5 cm 以上的正常肺组织,常规石蜡包埋。

1.2 免疫组织化学法检测 WWOX 和 ErbB2 蛋白的表达

兔抗鼠 WWOX(28-42)多克隆抗体,采用 UIP 法染色,石蜡切片常规脱蜡至水,热抗原修复,工作浓度 1:200。阳性着色定位于肿瘤细胞和(或)基质细胞胞质内,呈褐色颗粒。WWOX 的阳性表达按统一判定标准:(1)按阳性细胞面积占切片总面积的百分比进行记分:设<5%为 0 分,5%~24%为 1 分,25%~49%为 2 分,50%~74%为 3 分,≥75%为 4 分;(2)按阳性细胞中染色的强度记分:弱阳性为 1 分,中等阳性为 2 分,强阳性为 3 分。将上述两项之和相加,大于 1 的判定为阳性标本。

兔抗 HER2 多克隆抗体 N1692 为丹麦 DAKO 公司产品,染色采用辣根过氧化酶标记的卵白素-生物素偶联物(ABC)法。ErbB2 结果判断标准如下:(-):所有细胞均未出现棕黄色;(±):≤25%的细胞出现棕黄色;(+):>25%的细胞出现棕黄色;(++):>50%的细胞出现棕黄色;(+++):>75%的细胞出现棕黄色。肺癌 ErbB2 过度表达的判断标准:肺癌组织 ErbB2 染色与癌旁上皮组织 ErbB2 染色相差大于或等于(++),则判为 ErbB2 过度表达^[2]。阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.3 统计学方法

所有数据用 SPSS11.0 软件进行统计处理。采用 χ^2 检验和 Spearman 相关分析,以 $\alpha=0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WWOX 蛋白、ErbB2 蛋白在肺癌组织和相应癌旁正常组织中的表达

WWOX 蛋白主要在细胞胞质中表达,肺癌组织 WWOX 蛋白失表达率 72.8%(59/81),明显高于癌旁正常组织 20%(4/20),($P<0.01$)。正常肺组织没有 ErbB2 的过度表达,肺癌中存在 ErbB2 的过度表达,过度表达率为 64.2%(52/81),两者之间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 WWOX 蛋白、ErbB2 蛋白表达与临床病理指标之间的关系

在 NSCLC 组织中,男性患者 WWOX 蛋白表达明显低于女性患者,吸烟患者明显低于不吸烟患者,鳞癌患者明显低于腺癌患者,低分化癌明显低于高分化癌,有淋巴结转移组明显低于无淋巴结转移组,差异均有统计学意义($P<0.05$),但与年龄、临床分期无关($P>0.05$)。NSCLC 中 ErbB2 的过度表达与年龄、性别、吸烟、病理类型、分化程度不相关,但与肺癌的临床分期、淋巴结转移相关($P<0.05$),见表 1。

表 1 WWOX 蛋白、ErbB2 蛋白表达与临床病理指标的关系
Table 1 Expression levels of WWOX protein and ErbB2 protein in non-small cell lung cancer

Charecteristic	n	WWOX protein			ErbB2 protein		
		+	%	P	+	%	P
Age							
<60	37	9	24.3		23	62.2	
≥60	44	13	29.5	>0.05	29	65.9	>0.05
Gender							
Male	53	10	18.9		36	67.9	
Female	28	12	42.9	<0.05	16	57.1	>0.05
Smoking							
With	48	9	18.8		35	72.9	
Without	33	13	39.4	<0.05	17	51.5	>0.05
Histopathology							
Squamous carcinoma	50	9	18.0		30	60.0	
Adenocarcinoma	31	13	41.9	<0.05	22	71.0	>0.05
Histodifferentiation							
Highly	24	10	41.7		12	50.0	
Middle	25	8	32.0	<0.05	17	68.0	>0.05
Poorly	32	4	12.5		23	71.9	
TNM stage							
I + II	62	19	30.6		35	56.5	
III + IV	19	3	15.8	>0.05	17	89.5	<0.05
Lymph node metastasis							
With	45	8	17.8		34	75.6	
Without	36	14	38.9	<0.05	18	50.0	<0.05

2.3 WWOX 蛋白与 ErbB2 蛋白表达之间的关系

在 NSCLC 中,WWOX 蛋白与 ErbB2 两者共阳性表达 10 例,WWOX 蛋白阳性表达与 ErbB2 负相关($\gamma=-0.239,P<0.05$),见表 2。

3 讨论

WWOX 基因位于人类普通的染色体脆性位点,包含第二常见的脆性位点 FRA16D(16q 23.3~

表 2 NSCLC 中 WWOX 与 ErbB2 蛋白表达的关系
Table 2 Correlation between the expression of WWOX and ErbB2 protein in NSCLC

WWOX protein	ErbB2 protein		n	χ^2	P
	+	-			
+	10	12	22	4. 616	0. 032
-	42	17	59		

q24. 1),由 9 个外显子组成。Bdenarek 等^[3-4]测定 FRA16D 区域的序列,克隆出完整的 cDNA 和候选基因,命名为 WWOX。它是编码含 414 个氨基酸的蛋白,其氨基末端的 88 个氨基酸,与 WW 域蛋白家族的序列同源。多项研究已经发现 WWOX 基因在实体瘤和细胞系中发生经常性缺失。Bednarek^[4]等用 Northern blotting 和 RT-PCR 的方法检测,发现乳腺癌细胞系中有不同水平的 WWOX 表达,与细胞系的恶性程度呈负相关。高侵袭性的细胞系如 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 中 WWOX 低表达或基本检测不到,而低侵袭性的细胞系如 MCF7 和 T47D 则相对高表达。

研究表明,WWOX 基因的失活通常是由于 4~8 号外显子的异常拼接和等位基因的杂合性缺失,纯合性缺失和突变不常见。肿瘤中最常见的表达是全长的 WWOXmRNA 和四个异常的 mRNA 拼接,野生型 WWOX 蛋白常常缺失。缺失并非由于 DNA 甲基化导致的转录沉默,而可能是调节 WWOX 启动子的转录活性发生了改变^[5]。

本研究表明,NSCLC 组织中 WWOX 蛋白失表达率明显高于癌旁正常组织,提示 WWOX 基因表达下调可能在肺癌的发生、发展中具有重要的作用,与 Donati 等人的研究一致^[6]。WWOX 蛋白的失表达与 NSCLC 患者年龄、临床分期无关,但和组织分化程度有关,说明 WWOX 蛋白在一定程度上可以判断预后。重度吸烟患者 WWOX 蛋白表达明显低于不吸烟或少量吸烟患者,提示长期密切接触烟草可能启动 WWOX 基因改变。男性肺癌患者 WWOX 蛋白表达要明显低于女性,鳞癌显著低于腺癌,这可能是由于男性较女性与烟草关系更为密切所致。有研究显示,WWOX 蛋白表达与雌激素受体表达密切相关^[7],这也可能是男性 WWOX 蛋白表达低于女性的原因之一。

本研究显示,ErbB2 蛋白过表达率为 64. 2% (52/81),与阴性表达的正常肺组织相比差异有统计学意义($P<0. 01$),提示 NSCLC 存在 ErbB2 蛋白高表达且与其发生有关。本研究还发现 ErbB2 蛋白表达水平与 NSCLC 患者的 TNM 分期及淋巴结转移呈显著正相关($P<0. 05$),提示 ErbB2 蛋白过

表达能促进 NSCLC 细胞的生长增殖和侵袭转移。本研究表明,ErbB2 的过度表达与肺癌病理类型及分化程度无关,仅与肺癌淋巴结转移及 TNM 分期相关,提示 ErbB2 的过度表达不是肺癌形成过程中的早期事件,而是肺癌发生发展过程中的晚期事件。有关文献^[11]报道 ErbB2 过度表达组肺癌术后生存率较 ErbB2 非过度表达组低,提示 ErbB2 的过度表达与肺癌患者术后生存率有明显的相关性,因此,ErbB2 的过度表达可能是肺癌患者预后不良的一个标记。

ErbB2 蛋白参与细胞增殖、分化,其过表达往往提示肿瘤细胞的增殖能力强,并与易发生转移及化疗耐药有关^[9]。过度表达 ErbB2 的肺癌对放疗不敏感,对化疗也耐药,而用针对 ErbB2 的单克隆抗体处理过度表达 ErbB2 的肺癌细胞株,可显著地抑制癌细胞的生长,且可增加癌细胞对化疗的敏感性。Qin^[1]等的研究表明,WWOX 基因的过表达可以诱导前列腺癌细胞凋亡,在体内和体外均可抑制前列腺癌的生长,WWOX 与 ErbB2 蛋白的表达负相关。本研究结果与之相一致,且二者在一定程度上都能协助判断预后。据此,我们设想,对于 WWOX 基因表达缺失而 ErbB2 蛋白过表达的病例,在不同水平干预 ErbB2 的过度表达,恢复 WWOX 基因的表达可能是治疗晚期肺癌的一个有效方法。

参考文献:

[1] Qin HR, Iliopoulos D, Nakamura T, et al. Wwox suppresses prostate cancer cell growth through modulation of ErbB2-mediated androgen receptor signaling[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(9): 957-65.
[2] 邓在春, 葛棣, 张敦华, 等. 人表皮生长因子受体家族在肺癌中的表达研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(4): 207-209.
[3] Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, et al. WWOX, a novel WW domain-containing Protein mapping to human chromosome16q 23. 3-24. 1, a region frequently affected in breast cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2140-2145.
[4] Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, et al. WWOX, the FRA16D Gene, behaves as a Suppressor of Tumor Growth [J]. Cancer Res, 2001, 61(22): 8068-8073.
[5] Kraemer-Pecore CM, Lecomte JT, Desjarlais JR. A de novo redesign of the WW domain[J]. Protein Sci, 2003, 12(10): 2194-2205.
[6] Donati V, Fontanini G, Dell'Omodarme M, et al. WWOX expression in different histologic types and subtypes of non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 884-891.
[7] Nunez MI, Ludes-Meyers J, Abba MC, et al. Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 89(2): 99-105.
[8] Kostyleva OI, Gerstein ES, Dykhno Alu, et al. EFR-like peptides and their receptors as prognostic factors for the survival of patients with non-small-cell lung cancer[J]. Vopr Onkol, 1999, 45(6): 617-622.
[9] 迟志宏, 张积仁, 李鹏, 等. 常规化疗药物连续刺激对人肺腺癌细胞株表达 erbB-2, p53 和 MDR1 的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(2): 105-109.