

· 论 著 ·

3 项指标在非小细胞肺癌组织中的表达及其与患者预后的相关性研究*

魏朋华¹, 沈志鹏², 王 华¹, 钱素泉¹, 高 智^{3△}

(1. 山东省聊城市第三人民医院呼吸内科, 山东聊城 252000; 2. 山东省聊城市第三人民医院影像科, 山东聊城 252000; 3. 湖北省武汉市中医院检验科, 武汉 430014)

摘要:目的 观察非小细胞肺癌(NSCLC)患者组织中活化白细胞黏附分子(ALCAM)、白细胞介素 17 受体 A(IL-17RA)和磷脂酰肌醇 3-激酶(PIK3CA)的表达情况,并探讨上述指标与患者预后的相关性。方法 选取 2011 年 1 月至 2014 年 1 月聊城市第三人民医院收治的 65 例 NSCLC 患者为研究对象。采用免疫组化(S-P)法检测组织中 ALCAM、IL-17RA 和 PIK3CA 的表达情况,分析不同病理参数患者间的表达差异,且对 65 例患者进行术后随访,比较阴性表达组与阳性表达组患者的生存时间,分析 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 与疾病预后的相关性。结果 65 例患者中 ALCAM 表达阳性者 47 例,阳性率为 72.3%;IL-17RA 阳性 34 例,阳性率为 52.3%;PIK3CA 表达阳性 31 例,阳性率为 47.7%。不同的病理分型、TNM 分期及淋巴结转移情况患者 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),而不同性别、年龄的患者表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 阳性组患者的中位生存时间低于阴性组患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 在 NSCLC 组织中表达增加,提示肿瘤恶性程度高、预后不良。

关键词:非小细胞肺癌; 活化白细胞黏附分子; 白细胞介素 17 受体 A; PIK3CA; 表达**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.025**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2017)16-2243-04**Expression of 3 markers and its correlation with prognosis of patients with non-small cell lung cancer***WEI Penghua¹, SHEN Zhipeng², WANG Hua¹, QIAN Suquan¹, GAO Zhi^{3△},

(1. Department of Respiratory Medicine, the Third People's Hospital of Liaocheng, Liaocheng, Shandong 252000, China;

3. Department of Imaging, the Third People's Hospital of Liaocheng, Liaocheng, Shandong 252000, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430014, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of ALCAM, IL-17RA and PIK3CA in patients with non-small cell lung cancer, and to investigate the correlation between the above-mentioned indexes and patients' prognosis. **Methods** A total of 65 patients with non-small cell lung cancer admitted to the third People's Hospital in Liaocheng City were selected and were served as study objects. Immunohistochemical staining(S-P) method was used to detect the expression of ALCAM, IL-17RA and PIK3CA in tissues to analyze the difference of expression between different pathological parameters. And 65 patients were followed up after the operation to compare the survival time of patients in the negative expression group and the positive expression group, and to analyze the correlation between ALCAM, IL-17RA and PIK3CA and the prognosis of the disease. **Results** Among the 65 cases of patients, 47 cases were positive for ALCAM with the positive rate of 72.3%, 34 cases were positive for IL-17RA with the positive rate of 52.3%; 31 cases were positive for PIK3CA with the positive rate of 47.7%. There was significant difference in the expression of ALCAM, IL-17RA and PIK3CA in patients with different pathological types, TNM staging and lymph node metastasis($P < 0.05$). There was no significant statistical difference in the expression of patients with different genders and ages($P > 0.05$). The median survival time of patients with positive results of ALCAM, IL-17RA and PIK3CA were lower than those of negative group, and the differences were statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of ALCAM, IL-17RA and PIK3CA increased in non-small cell lung cancer tissues to remind the higher degree of malignancy and poor prognosis.

Key words:non-small cell lung cancer; ALCAM; IL-17RA; PIK3CA; expression

原发性肺癌是指起源于支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤,现已成为世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤^[1]。肺癌的主要病理类型包括非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC),其中 NSCLC 约占到所有肺癌的 85%^[2]。活化白细胞黏附分子(ALCAM)是一类广泛存在于人体组织器官的糖蛋白,通过细胞间的黏附作用参与机体多种病理、生理过程。白细胞介素(IL)-17 是机体重要的炎性因子,而白细胞介素 17 受体 A(IL-17RA)被认为是 IL-17 实现多种生物学效应的总开关,与多种炎症和自身免疫性疾病相关。PIK3CA 与细胞表面活性酪氨酸激酶受体的激活有关。研究发现,人类实体肿瘤中约 30%发生 PIK3CA 突变,而 NSCLC 中有 70.9%患者表现

为 PIK3CA 高表达^[3]。本研究对 NSCLC 患者的 ALCAM、IL-17RA 和 PIK3CA 表达情况进行分析,并对上述指标与 NSCLC 的发生、发展及预后的相关性进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2011 年 1 月至 2014 年 1 月山东省聊城市第三人民医院收治的 65 例 NSCLC 患者作为研究对象,所有患者均经病理诊断证实。根据 WHO 标准进行病理学检查,并根据 TNM 国际分期法(UICC, 2009)进行分期。其中男 38 例,女 27 例,年龄 38~73 岁,平均(53.1±6.3)岁;鳞癌 37 例(58.5%),腺癌 28 例(41.5%);TNM 分期结果 I 期 17 例

* 基金项目:湖北省武汉市卫生和计划生育委员会临床医学科研项目(WZ11D13)。

作者简介:魏朋华,女,主治医师,主要从事呼吸系统相关疾病的研究。 △ 通信作者,E-mail:510531680@qq.com。

(26.2%), II期19例(29.2%), III期21例(32.3%), IV期8例(12.3%)。手术切除组织标本用甲醛固定、石蜡包埋用于免疫组化(S-P)分析。对65例患者进行随访,分析ALCAM、IL-17RA、PIK3CA的表达与患者预后间的相关性。

1.2 方法 S-P分析严格按照试剂盒说明书操作。一抗试剂为鼠抗人ALCAM单克隆抗体、鼠抗人IL-17RA单克隆抗体、兔抗人PIK3CA单克隆抗体,二抗为酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物,均为美国SIGMA公司生产;DAB显色,苏木素复染,脱水,封片。光镜下观察,细胞核内出现黄色、棕黄色或褐色颗粒为阳性反应。每张切片上选3个高倍视野,分别计数100个细胞。结果判定采用两级标准计分法。(1)PIK3CA结果判定标准:无阳性染色记0分,淡黄色记1分,棕黄色记2分,棕褐色记3分;阳性细胞数小于或等于5%记0分,6%至<26%记1分,26%至<51%记2分,51%至75%记3分,>75%记4分;两级乘分大于或等于1分为阴性,>1分为阳性。(2)IL-17RA、ALCAM结果判定标准:无阳性染色记0分,淡黄色记1分,棕黄色记2分,棕褐色记3分;无阳性细胞记0分,阳性细胞数小于或等于10%记1分,11%~<51%记2分,51%~75%记3分,>75%记4分;两级乘分小于3分为阴性,≥3分为阳性。对65例患者进行术后随访,随访时间从手术结束后开始,直至2016年1月,观察患者是否出现复发或转移,比较阴性表达组与阳性表达组患者的生存时间,分析ALCAM、IL-17RA、PIK3CA与疾病预后的相关性。

1.3 质量控制 (1)根据纳入排除标准严格筛选入组病例;

(2)所有病例术前均未接受过放化疗,未使用糖皮质激素及非甾体类药物;术中癌组织和癌旁组织病理标本齐全;半年内体重减轻小于10%,术后无严重并发症;I期患者至复发后才接受全身化疗,II、III期患者术后接受过至少2周期含铂方案的联合化疗或放疗;(3)查阅试剂说明书和预实验确定最佳的试剂稀释浓度及抗原修复方法;(4)S-P染色过程中设立阴性对照;(5)使用前实验相关仪器进行调校,准确控制实验温度及时间;(6)实验结果采用盲法试验观察判定。

1.4 统计学处理 采用SPSS20.0统计软件进行分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用t检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用Kaplan-Meier生存分析法比较阳性组与阴性组患者的生存情况。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA在NSCLC患者中的表达情况 65例患者中ALCAM表达阳性者47例,阳性率为72.3%;IL-17RA阳性34例,阳性率为52.3%;PIK3CA表达阳性31例,阳性率为47.7%。

2.2 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA表达与患者临床病理参数的关系 不同的病理分型、TNM分期及淋巴结转移情况患者ALCAM、IL-17RA、PIK3CA的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),而不同性别、年龄的患者表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA表达与患者临床病理参数的关系(n)

参数	n	ALCAM(n=47)					IL-17RA(n=34)					PIK3CA(n=31)					
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
性别																	
男	38	28	10	0.087	0.769	20	18	0.004	0.951	18	20	0.004	0.951				
女	27	19	8			14	13			13	14						
年龄																	
<60岁	21	16	5	0.234	0.629	10	11	0.273	0.601	9	12	0.291	0.590				
≥60岁	44	31	13			24	20			22	22						
病理分型																	
鳞癌	37	22	15	7.081	0.008	13	24	10.153	0.001	11	26	11.109	0.001				
腺癌	28	25	3			21	7			20	8						
TNM分期																	
I~II期	36	22	14	11.199	0.001	15	21	7.773	0.005	13	23	8.384	0.004				
III~IV期	29	25	4			19	10			18	11						
淋巴结转移																	
有	34	29	5	6.004	0.014	11	23	11.379	0.001	9	25	12.870	0.001				
无	31	18	13			23	8			22	9						

表2 ALCAM阳性组和阴性组在随访期内的累积生存率比较

组别	n	中位生存时间(月)	3年生存人数及累 积生存率[n(%)]	5年生存人数及累 积生存率[n(%)]
ALCAM(+) 47	33		23(48.3)	8(16.7)
ALCAM(-) 18	51		14(72.6)	8(41.6)
χ^2			4.415	5.274
P			0.036	0.022

2.3 ALCAM阳性组和阴性组在随访期内的累积生存时间比

较随访患者时间最短5个月,最长48个月,在此期间,ALCAM阳性组失访5例,阴性组失访1例,对于失访患者,已做意向性分析。ALCAM阳性组中位生存时间33个月,其3年、5年累积生存率分别为48.30%和16.7%,ALCAM阴性组中位生存时间51个月,3年、5年累积生存率分别为72.6%与41.6%,ALCAM阴性组的各期生存率均高于ALCAM阳性组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2、图1。

2.4 IL-17RA阳性组和阴性组在随访期内的累积生存时间比较 IL-17RA阳性组失访3例,阴性组失访1例,对于失访患者,已做意向性分析。IL-17RA阳性组中位生存时间为38个月,3年、5年累积生存率分别为55.6%与9.82%;IL-17RA阴性组中位生存时间56个月,3年、5年累积生存率分别为

71.1% 与 40.2%, IL-17RA 阴性组的各期生存率均高于 IL-17RA 阳性组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3、图 2。

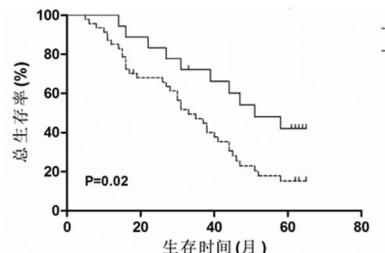


图 1 ALCAM 阳性组和阴性组在随访期内的生存曲线图

表 3 IL-17RA 阳性组和阴性组在随访期内的
累计生存率比较

组别	n	中位生存	3 年生存人数及累积	5 年生存人数及累积
		时间(月)	生存率[n(%)]	生存率[n(%)]
IL-17RA(+)	34	38	16(55.6)	3(9.82)
IL-17RA(-)	31	56	23(71.1)	12(40.2)
χ^2			4.974	8.159
P			0.026	0.004

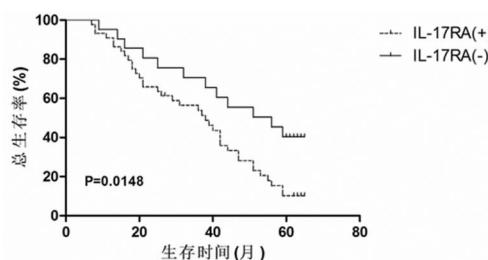


图 2 IL-17RA 阳性组和阴性组在随访期内的生存曲线图

2.5 PIK3CA 阳性组和阴性组在随访期内的累积生存时间比较 PIK3CA 阳性组失访 2 例, 阴性组失访 2 例, 对于失访患者, 已做意向性分析。IL-17RA 阳性组中位生存时间 31 个月, 其 3 年、5 年累积生存率分别为 41.4% 和 12.4%, PIK3CA 阴性组中位生存时间 53 个月, 3 年、5 年累积生存率分别为 67.6% 与 39.1%, PIK3CA 阴性组的各期生存率均高于 PIK3CA 阳性组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4、图 3。

表 4 PIK3CA 阳性组和阴性组在随访期内的
累计生存率比较

组别	n	中位生存时	3 年生存人数及累	5 年生存人数及累
		间(月)	积生存率[n(%)]	积生存率[n(%)]
PIK3CA(+)	31	31	13(41.5)	4(12.4)
PIK3CA(-)	34	53	23(67.6)	14(39.1)
χ^2			4.338	6.473
P			0.037	0.011

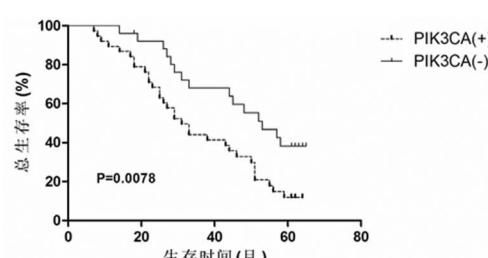


图 3 PIK3CA 阳性组和阴性组在随访期内的生存曲线图

2.6 生存时间影响因素分析 以患者随访期内的生存结局为因变量, ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 的表达为自变量进行 Cox 回归模型分析, 结果显示 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 表达阳性均为影响生存结局的独立危险因素 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 5 Cox 单因素回归分析相关参数

因素	回归系数 (β)	标准误 (SE)	RR	95% CI	P
ALCAM 阳性	0.587	0.473	4.984	3.744~9.976	0.003
PIK3CA 阳性	0.396	0.254	2.454	2.011~3.253	0.005
IL-17RA 阳性	0.403	0.293	2.827	1.474~5.659	0.005

3 讨论

虽然诊断和治疗手段不断改进, 但由于肺癌在早期多症状不明显, 大部分患者在发现时已属晚期, 错过最佳治疗时机, 造成患者预后较差, 生存率低^[4]。因此寻找特异度与敏感度更高的诊断或监测指标一直为人们所关注。

本研究结果显示, 65 例 NSCLC 患者中 ALCAM 表达阳性的 47 例, 阳性率为 72.3%; IL-17RA 阳性 34 例, 阳性率为 52.3%; PIK3CA 表达阳性 31 例, 阳性率为 47.7%, 明显高于文献报道中健康或癌旁组织中的表达水平, 且 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 的表达与患者的病理分型、TNM 分期及淋巴结转移情况密切相关。ALCAM 属免疫球蛋白超家族, 有文献报道, ALCAM 在乳腺癌、肝癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤组织中均高表达, 并与肿瘤的侵袭转移密切相关^[5]。IL-17A 是一种重要的炎性因子, 可促进多种炎性细胞因子释放, 促进局部组织血管生成, 而血管生成被公认为是肿瘤进行血行播散的基本条件和因素^[6]。另有研究显示 IL-17A 可通过上调 CXCL 类基因的表达, 增加微血管的数目和密度, 加快肿瘤的病理进展^[7]。IL-17 的体外试验研究发现, 使用不同浓度的 IL-17A 对肺腺癌细胞系进行培养孵育, 培养上清液中血管内皮生长因子(VEGF)的水平呈现出明显差异, VEGF 的表达与 IL-17A 的剂量呈正相关^[8]。由此可知 IL-17A 可通过刺激肺腺癌细胞对 VEGF 的表达, 加快肿瘤病理进展。提示 IL-17A 可能是肿瘤转移潜能的重要标志。而 IL-17RA 作为 IL-17 实现生物学效应的主要膜受体之一, 也与 IL-17 的表达具有同步性。PI3K/Akt/mTOR 通路在调控细胞的生长、增殖与凋亡中具有重要意义, 当其被异常激活时会导致恶性肿瘤发生^[9-10]。突变的 PIK3CA 基因能促进小细胞肺癌转移瘤的生长, 研究发现 PIK3CA 在多种恶性肿瘤中表达上调^[11]。且 NSCLC 中 PIK3CA 表达上调与淋巴结转移及术后复发密切相关^[12]。本研究中 ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 阳性组患者的中位生存时间低于阴性组患者 ($P < 0.05$), 提示其癌组织中的表达情况是影响预后的主要因素, 可有效地评估预测手术患者术后生存。

综上所述, ALCAM、IL-17RA、PIK3CA 在 NSCLC 组织中表达增加, 提示肿瘤恶性程度高、预后不良。虽然其中的机制尚需进一步研究, 但此发现可为 NSCLC 的早期诊断和术后预测提供参考, 并帮助探索 NSCLC 的治疗新靶点。

参考文献

- 何改平, 张彬, 张宝文, 等. 肺癌脑转移患者 Th17 细胞和 IL-17 水平变化的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2013, 16(4): 476-481.
- Zhang GQ, Han F, Fang XZ, et al. CD4⁺, IL-17 and Foxp3 expression in different pTNM stages(下转第 2248 页)

到 IgG 抗体, 第 6 个月达到峰值,IgG 抗体持续超过 3 年。本课题采用的双抗原夹心法, 检测的 SFTSV 总抗体为 IgM 和 IgG 两种抗体。SFTSV 总抗体阳性的判定标准参考试剂盒检测标准, 所有阳性标本均经过重复检测确认得到。检测结果显示 63 份为阳性, 抗体滴度为 1:2~1:64, 提示贵阳市无偿献血人群甚至健康人群中存在 SFTSV 隐性感染或既往感染, SFTSV 对输血安全仍存在着潜在威胁, 需引起公共卫生、医疗及采供血机构的重视。SFTSV 核酸在发病第 3 天阳性检出率达到最高水平, 第 6 天拷贝数达到峰值^[10], 而此时并未出生临床症状, 即隐性感染, 因此可能存在输血传播的可能性。贵阳目前无 SFTSV 病例出现, 其分布在性别、年龄、职业、民族、采集时间等方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。采集时间差异有统计学意义($\chi^2=4.623, P=0.032$)。

本研究数据分析过程中发现献血者资料登记不全、数据的采集不够充分的现象。尤其是职业分析, 登记除了“农民”、“学生”外, 其他职业登记模糊, 这不利于数据分析, 也不利于疾病干预及卫生行政决策。因此建议采供血系统进一步完善献血者基础数据的采集工作。

由于市区人口流动性大, 因此不排除从其他省市输入新布尼亚病毒的可能性。随着流动人口的增加, 类似新布尼亚病毒的地区性疾病不再受地域限制, 需要加强对输入性病例的预防。

贵阳市无偿献血人群存在 SFTSV 总抗体阳性情况。SFTSV 总抗体阳性率具体危险因素的分析需做进一步调查。

参考文献

- [1] Yu XJ, Liang MF. Severe fever with thrombocytopenia Associated with a novel Bunyavirus in China[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16):1523-1532.
- [2] Yu L, Zhang L, Sun L, et al. Critical epitope in the nucleo-capsid protein of SFTS virus recognized by a panel of

(上接第 2245 页)

- of operable non-small cell lung cancer and effects on disease prognosis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(38):3955-3960.
- [3] 张国庆, 韩峰, 房新志, 等. CD4 IL-17 和 Foxp3 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(5):596-599.
- [4] Wu S, Singh S, Varney ML, et al. Modulation of CXCL-8 expression in human melanoma cells regulates tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis[J]. Cancer Med, 2012, 1(3):306-317.
- [5] Carus A, Ladekarl M, Hager H, et al. Tumor-associated neutrophils and macrophages in non-small cell lung cancer: no immediate impact on patient outcome[J]. Lung Cancer, 2013, 81(1):130-137.
- [6] 魏星, 冀静, 宁芬茹, 等. Sox-2 及 Wnt 信号通路蛋白在宫颈癌中的表达及相互作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2013, 34(6):813-817.
- [7] Liu P, Cheng H, Santiago S, et al. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms[J]. Nat Med, 2011, 17(9):1116-1120.

SFTS patients derived human monoclonal antibodies[J]. PLoS One, 2012, 7(1):1-10.

- [3] 魏艳艳, 邹桂舟, 叶珺, 等. 新兴布尼亚病毒感染病原学检测与预后研究[J]. 中国医院感染学杂志, 2016, 26(23): 5339-5341.
- [4] Liu K, Zhou H, Sun RX, et al. Anasational assessment of the epidemiology of Severe fever with thrombocytopenia syndrome, China[J]. Science Reports, 9679(1):1-8.
- [5] Chen H, Hu K, Zou J, et al. A Cluster of cases of human-to-human transmission caused by severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. Int J Infect Dis, 2013, 3(2):206-208.
- [6] 占建波, 霍细香, 官旭华. 湖北省发热板血小板减少综合征布尼亚病毒健康人群抗体水平分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4):992-993.
- [7] Cui F, Cao HX, Wang L, et al. Clinical and epidemiological study on severe fever with thrombocytopenia syndrome in Yiyuan County, Shandong Province, China[J]. Ame J Trop Med Hyg, 2013, 20(5):510-512.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB18467-2011 献血者健康检查要求[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012.
- [9] 迟媛媛, 翟慎勇, 温红玲. 发热伴血小板减少综合征患者血清中新型布尼亚病毒 RNA 的检测[J]. 山东大学学报, 2012, 50(1):119-121.
- [10] Lu QB, Cui N, Hu JG, et al. Characterization of immunological responses in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome:a cohort study in China[J]. Vaccine, 2015, 33(10):1250-1255.

(收稿日期:2017-02-17 修回日期:2017-04-17)

-
- [8] 贾惠民, 房新志, 张国庆, 等. 白介素 17 与 Foxp3 在ⅢA 期肺鳞癌和腺癌中的表达及与预后的关系研究[J]. 中国全科医学, 2012, 15(12):1345-1349.
 - [9] Boyauh S, Drouet Y, Navarro C, et al. Mutational characterization of individual breast tumors: Tp53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(1):29-39.
 - [10] Fang Y, Gao YA, Geng JS, et al. Elevated expression of SOX2 and FGFR1 in correlation with poor prognosis in patients with small celllung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12):2846-2854.
 - [11] 韩峰, 马晓梅, 张国庆, 等. 非小细胞肺癌组织中白细胞介素 17、基质金属蛋白酶 9 表达与 pTNM 分期的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2012, 24(5):580-583.
 - [12] Maucksch C, Jones KS, Connor B. Concise review: the involvement of SOX2 in direct reprogramming of induced neural stem/precursor cells[J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(5):579-583.

(收稿日期:2017-02-24 修回日期:2017-04-24)