

论著·临床研究

非小细胞肺癌组织中 Oct4 的表达及其与临床病理参数的关系

田 玲,吴桂新[△],余慧青

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院,重庆 400000)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中八聚体结合转录因子4(Oct4)的表达及其与临床病理参数的关系。**方法**选取2013年9月至2016年12月该院100例NSCLC患者肺癌组织标本(NSCLC组,n=100)及其相应癌旁正常组织(对照组,n=100)为研究样本,采用荧光定量PCR法及免疫组织化学染色法、western blot法分别检测两组组织样本中Oct4 mRNA与蛋白的表达情况,分析Oct4表达水平与患者临床病理参数的关系,并对比NSCLC组中Oct4阳性、阴性患者预后情况。**结果** NSCLC组Oct4 mRNA表达量为(3.21±0.18),蛋白表达量为(0.74±0.11),阳性率为74.00%,均明显高于对照组[(1.47±0.11),(0.10±0.03)、10.00%,P<0.05]。NSCLC患者Oct4表达阳性率与性别、年龄、吸烟指数、肿瘤大小无关(P>0.05),而与病理类型、分化程度、TNM分期有关,其中腺癌、分化程度低、TNM分期Ⅲ期患者Oct4阳性率明显高于非腺癌、分化程度中-高、TNM分期Ⅰ~Ⅱ期患者(P<0.05)。NSCLC患者中,与Oct4阴性患者比较,Oct4阳性患者远处转移率(64.86%)、脉管浸润率(47.30%)明显增高,1年生存率(67.57%)降低(P<0.05)。**结论** NSCLC组织中Oct4的表达与其临床病理参数密切相关,Oct4在腺癌中高表达,且随分化程度的降低及肿瘤分期进展,表达增多并影响预后,Oct4可作为NSCLC的特异性诊断标志物。

关键词:非小细胞肺癌; 八聚体结合转录因子4; 肿瘤分期**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.11.020**中图法分类号:**R734.2**文章编号:**1673-4130(2018)11-1352-04**文献标识码:**A

Expression of Oct4 and its relationship with clinicopathological parameters in non-small cell lung cancer

TIAN Ling,WU Guixin[△],YU Huiqing

(Chongqing University Cancer Hospital/Chongqing Cancer Institute/Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400000, China)

Abstract: Objective To explore the expression of Octamers binding transcription factor 4 (Oct4) and its relationship with clinicopathological parameters in the non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues. **Methods** From September 2013 to December 2016, 100 cases of NSCLC patients with lung cancer (group NSCLC, n=100) and their corresponding normal paracancerous tissues (the control group, n=100) were selected as the samples. The expression of Oct4 mRNA and protein in two groups of tissue samples were detected by fluorescence quantitative PCR, immunohistochemistry and western blot. The relationship between the level of Oct4 expression and the clinicopathological parameters of the patients was analyzed, and the prognosis of the Oct4 positive and negative patients in the NSCLC group was compared. **Results** The expression of Oct4 mRNA in NSCLC group was (3.21±0.18), protein expression was (0.74±0.11) and the positive rate was 74.00%, which were significantly higher than those of control group [(1.47±0.11),(0.10±0.03),10.00%,P<0.05]. The positive rate of Oct4 expression in NSCLC patients was not related to sex, age, smoking index and tumor size (P>0.05), but related to pathological type, degree of differentiation, and TNM staging, in which the positive rates of Oct4 in patients with adenocarcinoma, low differentiation and TNM stage Ⅲ stage were significantly higher than those of non adenocarcinoma, middle-high differentiation degree, Ⅰ~Ⅱ TNM stage patients (P<0.05). In NSCLC patients, compared with Oct4 negative patients, the distant metastasis rate (64.86%), pulse tube infiltration rate (47.30%) in Oct4 positive patients were significantly higher, and the 1 year survival rate (67.57%) decreased (P<0.05). **Conclusion** The expression of Oct4 in NSCLC tissue is closely related to its clinicopathological parameters. Oct4 is highly expressed in adenocarcinoma, and with the

作者简介:田玲,女,主治医师,主要从事肿瘤疾病研究。 **△ 通信作者:**E-mail:wgx800829@163.com。**本文引用格式:**田玲,吴桂新,余慧青.非小细胞肺癌组织中Oct4的表达及其与临床病理参数的关系[J].国际检验医学杂志,2018,39(11):

1352-1355.

decrease of differentiation and progression of tumor stages, the expression increases and affects the prognosis. Oct4 can be used as a specific diagnostic marker of NSCLC.

Key words: non small cell lung cancer; Oct4; tumor stage

肺癌为全球范围内常见恶性肿瘤,该病发病率及病死率较高,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌的80.00%左右,虽然靶向治疗药物表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)等为进展性晚期NSCLC患者带来了希望,但仍处于初步研究阶段,因此,分析NSCLC的发病机制可为临床寻求有效治疗手段提供帮助^[1-2]。近年来,肿瘤干细胞(CSCs)成为肿瘤领域研究热点,CSCs具有逃避免疫监视的能力,同时又具有较强迁移及运动能力,能促进细胞转移,引起肿瘤浸润与转移等^[3]。八聚体结合转录因子(Oct4)为干细胞多能性调节基因,是POU转录因子家族中的一员,可与含八聚体基序(ATG CAA AT)的DNA结合,在未分化胚胎干细胞中参与维持多能性及自我更新性,近年来有学者研究表明,Oct4表达上调可作为肺癌发生的早期预警事件^[4],并与微血管密度呈正相关,两者共同参与肿瘤微血管生成、浸润及血行转移,但关于NSCLC患者癌组织Oct的表达及其与临床病理参数的关系尚不明确。为此,本文以2013年9月至2016年12月本院100例NSCLC患者肺癌组织标本及其相应癌旁正常组织为研究样本,分析NSCLC组织中Oct4的表达及与临床病理参数的关系,并探讨Oct4对患者预后的影响,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2013年9月至2016年12月本院收治的NSCLC患者100例,均符合《NCCN非小细胞肺癌临床实践指南》^[5]中NSCLC诊断标准,以NSCLC患者肺癌组织标本(NSCLC组,n=100)及其相应癌旁正常组织(与肿瘤距离>5.0 cm,对照组,n=100)为研究样本。纳入标准:(1)病理证实为NSCLC,且无其他器官恶性肿瘤病史;(2)在术前或病理检查前未接受过放化疗、靶向药物治疗;(3)血常规、肝肾功能及凝血功能正常;(4)知情同意本研究并签署知情同意书。排除标准:(1)合并心、肝、肾功能不全者;(2)术前或病理检查前已行放化疗或靶向药物治疗。100例NSCLC患者中男55例,女45例;年龄43~64岁,平均(53.15±5.42)岁;分化程度:低分化44例,中-高分化56例;TNM分期:I期25例,II期35例,III期40例。本研究经本院医学伦理委员会批准通过。

1.2 方法

1.2.1 组织样本采集与保存 于手术切除后10 min内完成所有实验样本的采集,样本大小约1.5 cm×

1.0 cm×1.0 cm,NSCLC组标本来自肿瘤非坏死区域,对照组标本来自距肿瘤边缘5.0 cm以外的肺组织,且经病理确认无肿瘤细胞。将样本以焦碳酸二乙酯(DEPC)水清洗,无菌纱布吸干后立即放入液氮中保存,后放置于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 Oct4 mRNA表达量测定 提取组织中总RNA,并检测RNA完整性,去除RNA样品中DNA污染,并进行逆转录PCR,后以GAPDH为内参,采用荧光定量PCR sybr green试剂盒(瑞士Roche公司)检测细胞总RNA中Oct4 mRNA表达量。

1.2.3 Oct4蛋白表达量测定 提取组织总蛋白后采用western blot法(试剂盒由北京博蕾德科技发展有限公司提供)测定Oct4蛋白表达量。

1.2.4 Oct4蛋白的表达与分布 将组织样本修剪成0.5 cm³大小后采用生理盐水将附着于其上的血清洗涤干净,并将组织块上残留的液体擦干后浸泡在95%乙醇中,固定,后采用免疫组织化学法染色测定Oct4蛋白的表达与分布(兔抗人浓缩型Oct4单克隆抗体购自香港Abcam公司)。Oct4阳性判断标准:细胞核表现为黄色或棕褐色颗粒、片状染色,对观察到的染色结果采用染色强度、染色细胞百分率综合积分方式进行评估,染色强度分级:0分(无着色)、1分(浅黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色)。染色细胞百分率分级:0分(阳性细胞百分率<5%)、1分(阳性细胞百分率6%~25%)、2分(阳性细胞百分率26%~50%)、3分(阳性细胞百分率>50%),将染色强度与染色百分数评分相加,最后综合评分≥4分为阳性表达(+),<4分为阴性表达(-)。

1.3 观察指标 (1)比较NSCLC组、对照组组织样本中Oct4 mRNA与蛋白的表达情况;(2)搜集NSCLC患者临床资料,主要包括性别、年龄、吸烟指数、肿瘤大小、病理类型、分化程度、TNM分期,分析NSCLC患者Oct4表达水平与其临床病理参数的关系;(3)随访1年,对比NSCLC组中Oct4阳性、阴性患者预后情况,包括远处转移、脉管浸润率、1年生存率等。

1.4 统计学处理 采用SPSS19.0软件处理数据,计数资料以率(%)表示,采取 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

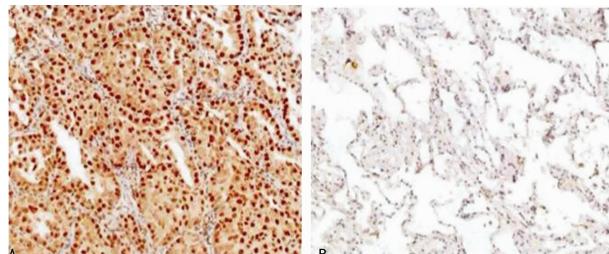
2 结 果

2.1 NSCLC组、对照组组织样本Oct4 mRNA、蛋白表达量比较 NSCLC组组织样本Oct4 mRNA、蛋白表达量明显高于对照组(P<0.05)。见表1。

表1 NSCLC组、对照组组织样本Oct4 mRNA、蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Oct4 mRNA	Oct4蛋白
NSCLC组	100	3.21±0.18	0.74±0.11
对照组	100	1.47±0.11	0.10±0.03
t		82.484	56.132
P		0.000	0.000

2.2 NSCLC组、对照组组织样本中Oct4蛋白表达与分布情况 免疫组织化学法染色结果显示,Oct4在NSCLC组中阳性率为74.00%(74/100),在对照组中为10.00%(10/100),NSCLC组Oct4阳性率明显高于对照组($\chi^2=84.072,P<0.05$)。NSCLC患者免疫组织化学法检测Oct4蛋白染色阳性,呈棕黄色颗粒状;与对照组患者比较,NSCLC患者Oct4蛋白阳性细胞百分比明显升高。见图1。



注:A表示NSCLC组;B表示对照组

图1 免疫组织化学检测Oct4蛋白的表达(×200)

表2 NSCLC患者Oct4与临床病理参数的关系分析[n(%)]

病理参数	组别	n	Oct4阳性	χ^2	P
性别	男	55	39(70.91)	0.607	0.436
	女	45	35(77.78)		
年龄(岁)	<50	59	42(71.19)	0.592	0.442
	≥50	41	32(78.05)		
吸烟指数	<400	43	30(69.77)	0.702	0.402
	≥400	57	44(77.19)		
肿瘤大小(cm)	<3	52	38(73.08)	0.048	0.827
	≥3	48	36(75.00)		
病理类型	腺癌	60	54(90.00)	19.958	0.000
	非腺癌	40	20(50.00)		
分化程度	低分化	44	38(86.36)	6.242	0.012
	中-高分化	56	36(64.29)		
TNM分期	I~II期	60	38(61.67)	8.870	0.003
	III期	40	36(90.00)		

2.3 NSCLC患者Oct4与临床病理参数的关系分析

NSCLC中不同性别、年龄、吸烟指数、肿瘤大小患者Oct4阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$);病

理分型为腺癌、分化程度低、TNM分期Ⅲ期患者Oct4阳性率高于非腺癌、分化程度中-高、TNM分期I~Ⅱ期患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.4 NSCLC患者Oct4表达对其预后的影响分析 随访1年期间,NSCLC患者中Oct4阳性患者远处转移率、脉管浸润率高于Oct4阴性患者,而Oct4阳性患者1年生存率低于Oct4阴性患者($P<0.05$)。见表3。

表3 NSCLC患者Oct4表达对其预后的影响分析[n(%)]

组别	n	远处转移	脉管浸润	1年生存率
Oct4阳性	74	48(64.86)	35(47.30)	50(67.57)
Oct4阴性	26	10(38.46)	6(23.08)	23(88.46)
χ^2		5.506	4.666	4.262
P		0.019	0.031	0.039

3 讨论

NSCLC为临床常见恶性肿瘤,病死率高,虽然近年来其治疗技术有所提高,但目前治疗方案整体疗效不佳,其病死率仍位居全球首位,这与其早期诊断缺乏特异度较高的肿瘤标志物有关^[6]。目前临床常用的肺癌标志物在诊断、药物反应及预后评估中的灵敏度及特异度较差,而CSCs理论认为,不是所有的癌症细胞均是一样的,在部分癌症细胞中存在一种现象:大部分癌细胞缺乏增殖力,在移植后也不能生成肿瘤,相反,少数具有不同表型的癌细胞具有强增殖能力及高致病性,此类少数细胞称为CSCs,CSCs作为一类亚群癌细胞,具有自我更新、无限增殖及致肿瘤形成的特性,对肿瘤的诊断与鉴别有重要意义^[7-8]。Oct4为CSCs中最重要的维持人类胚胎干细胞自我更新的基因之一,对细胞正常分化起决定性作用,可与靶基因启动因子中的核苷酸八聚体相互作用而启动相关基因表达。此外,Oct4仅表达于胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、原发肿瘤及生殖肿瘤细胞中,在正常细胞中表达缺失,因而考虑Oct4在肿瘤发生过程中发挥重要作用。随着细胞不断分化,Oct4在原始生殖细胞及肿瘤细胞中的表达增多,有研究显示在肺癌组织中Oct4蛋白阳性表达率为71.67%,而在正常组织中均呈阴性表达,提示Oct4可能是肺癌新型标志物,其表达上调可作为肺癌发生的早期预警指标,但关于NSCLC患者Oct4表达水平及其与病理参数的关系研究较少^[9-11]。

项保利等^[12]在探讨非小细胞肺癌组织中转录因子Oct4、Sox2的表达变化及意义时发现,NSCLC组织Oct4表达阳性率为73.3%,而在肺部良性病变组织中表达均为阴性。本研究结果显示,NSCLC组织Oct4 mRNA表达量、蛋白表达量、阳性率均明显高于

对照组,这与上述研究结果相近。因而 NSCLC 患者肺癌组织中可能存在具有自我更新及分化潜能的 CSCs 细胞,其中 Oct4 参与 NSCLC 的发生发展、侵袭及转移等,本研究中对照组的 Oct 阳性率为 10.00%,而 NSCLC 组的 Oct4 表达阳性率较上述研究略高,考虑与免疫组织化学参照的评判标准或选取的病例有关。因此,免疫组织化学参照的评判标准为见到有细胞染色即为阳性,这会导致阳性表达率偏高,个别使用的抗体存在假阳性而出现成片染色细胞,此为本研究不足。但 Oct4 蛋白在 NSCLC 中的表达具有相对特异性毋庸置疑,可作为肺癌诊断的一个标志物。在 NSCLC 患者 Oct4 表达水平与其临床病理参数的关系方面,董翠梅等^[13]的研究结果显示 Oct4 蛋白阳性率在高分化、中分化、低分化的 NSCLC 肺癌组织中依次增加,且在有淋巴结转移、临床病理分期高患者中 Oct4 阳性表达增多。李彬^[14]的分析结果显示 NSCLC 患者 Oct4 表达与性别、年龄、吸烟指数等无关,而与其病理分型、分化程度、TNM 分期有关,在腺癌、分化程度低及 TNM 分期Ⅲ期患者中 Oct4 表达明显增多。本次研究结果显示,NSCLC 中不同性别、年龄、吸烟指数、肿瘤大小患者 Oct4 阳性率比较无显著差异,而在病理分型为腺癌、分化程度低、TNM 分期Ⅲ期患者中 Oct4 呈明显高表达状态,这与上述研究结果相似。因此,Oct4 在腺癌、分化程度低、TNM 分期高患者中高表达,随肿瘤分期增加,其分化程度降低,Oct4 自我更新及分化潜能增强以维持 CSCs 细胞的多能性,因而 Oct 表达量增多。此外,本研究也显示 NSCLC 中 Oct4 阳性患者随访 1 年期间远处转移率、脉管浸润率明显高于 Oct4 阴性患者,而 1 年生存率低于 Oct4 阴性患者,证实 Oct4 与 NSCLC 患者预后密切相关,Oct4 的高表达可增加肿瘤细胞的 CSCs 多样性及上皮间质转化(EMT),而 EMT 是肿瘤侵袭与转移的关键过程,可促进肿瘤转移、脉管浸润^[15]。

综上所述,NSCLC 患者 Oct4 呈高表达状态,且与患者病理分型、分化程度、TNM 分期及预后密切相关,可作为 NSCLC 的特异性诊断标志物在临床推广应用。

参考文献

- [1] 殷金兰,李莹,陈金梅,等.4项肿瘤标志物检测在晚期非小细胞肺癌治疗中的意义[J].国际检验医学杂志,2017,38(14):1985-1987.
- [2] 王一北,陈宽冰,张洪岩,等.基于患者筛选采用 EGFR-TKIs 治疗非小细胞肺癌的 Meta 分析[J].国际检验医学杂志,2017,38(11):1535-1537.
- [3] 陈琛,孟凡荣,万海粟,等. MicroRNAs 与 OCT4 基因之间的相互作用[J]. 中国肺癌杂志,2015,18(1):55-58.
- [4] 项保利,钱海红,张志林,等.肺癌组织中干细胞转录因子 Sox2 和 Oct4 表达与微血管密度的相关性[J].中国组织工程研究,2017,21(13):2114-2119.
- [5] 陆舜,纪文翔,虞永峰.2014 版《NCCN 非小细胞肺癌临床实践指南》更新解读[J].中国医师进修杂志,2015,38(5):318-320.
- [6] 曹健斌,何凌云.非小细胞肺癌靶向药物 rociletinib 相关研究进展[J].医学临床研究,2017,34(4):722-725.
- [7] 梁洪享,钟竑,罗勇,等.肿瘤干细胞标志物 CD133、CD44、SOX2、OCT4、ALDH1 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J].肿瘤防治研究,2013,40(12):1138-1142.
- [8] AHMAD A. Sox2 和 Oct4 在人非小细胞肺癌中的表达及与临床病理的相关性研究[D]. 大连:大连医科大学,2013.
- [9] 买尔旦·赛力木,阿里旦·艾尔肯,金钟,等.人肺腺癌干细胞表型与预后的相关性[J].中国组织工程研究,2015,19(10):1523-1527.
- [10] 项保利,李琳琳,曹亮,等.干细胞转录因子 Sox2 和 Oct4 在肺癌患者中的表达及临床意义[J].中国医药导报,2015,12(22):74-77.
- [11] 项保利,钱海红,张志林,等.干细胞转录因子 Sox2、Oct4 在肺癌组织中表达及与肿瘤微淋巴管的关系[J].山东医药,2017,57(21):47-49.
- [12] 项保利,钱海红,李琛,等.非小细胞肺癌组织中转录因子 Oct4、Sox2 的表达变化及意义[J].山东医药,2016,56(13):81-82.
- [13] 董翠梅,涂江江,陶利英,等.非小细胞肺癌组织中 OCT4 和 miRNA-155 的表达及其与临床病理特征的关系[J].肿瘤防治研究,2013,40(8):776-780.
- [14] 李彬.Oct4 在非小细胞肺癌中的表达及对吉非替尼耐药性的影响[D].济南:山东大学,2017.
- [15] 孙向东,宗晓福,汪栋.采用组织芯片研究非小细胞肺癌中 Oct4、Nanog 基因的表达及意义[J].临床和实验医学杂志,2012,11(16):1258-1260.

(收稿日期:2018-01-10 修回日期:2018-03-20)

- [1] 殷金兰,李莹,陈金梅,等.4项肿瘤标志物检测在晚期非