

本文引用: 张雯雯, 孔庆暖, 纪霞, 等. 小细胞肺癌组织中神经细胞黏附分子、嗜铬蛋白 A 及突触素的表达及临床相关分析[J]. 新乡医学院学报 2014, 31(2): 100-103.

【基础研究】

小细胞肺癌组织中神经细胞黏附分子、嗜铬蛋白 A 及突触素的表达及临床相关分析

张雯雯¹, 孔庆暖¹, 纪霞², 王海燕², 陈桦¹, 黄维清¹

(1. 青岛大学医学院附属青岛市市立医院病理科, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学医学院附属青岛市市立医院哮喘实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 目的 检测神经细胞黏附分子(NCAM/CD56)、嗜铬蛋白 A(CgA) 及突触素(Syn) 在小细胞肺癌(SCLC) 组织中的表达, 探索其在 SCLC 组织中的表达的意义与价值。方法 应用组织反转录聚合酶链反应(RT-PCR) 及免疫组织化学方法检测 CD56、CgA 及 Syn 在 15 例 SCLC、15 例非小细胞肺癌(NSCLC) 和 10 例正常组织中的表达, 并应用 Fisher 确切概率法检验分析表达结果。结果 CD56、CgA、Syn 基因在 SCLC 组织中表达的阳性率高于 NSCLC 及正常组织, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 3 项指标联合检测 SCLC 的敏感性为 93.3%, 特异性为 96.0%, 准确性为 90.0%; CgA 基因在 SCLC 广泛期的表达(77.8%) 高于局限期的表达(0.0%), 在有淋巴结转移组织的表达(70.0%) 高于无淋巴结转移组织的表达(0.0%)。CD56 和 Syn 蛋白在 SCLC 组织中的表达高于 NSCLC 组织和正常组织($P < 0.05$); 但是 CgA 蛋白在 SCLC、NSCLC 及正常组织中表达的阳性率比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 CD56、CgA、Syn 的检测对 SCLC 的诊断具有重要意义, CgA 基因的表达水平可以间接反映 SCLC 分期。

关键词: 肺肿瘤; 小细胞; 神经细胞黏附分子; 嗜铬蛋白 A; 突触蛋白类

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)02-0100-04

Expression and clinical analysis of neural cell adhesion molecule, chromogranin A and synaptophysin in small cell lung cancer

ZHANG Wen-wen¹, KONG Qing-nuan¹, JI Xia², WANG Hai-yan², CHEN Hua¹, HUANG Wei-qing¹

(1. Department of Pathology, Qingdao Municipal Hospital Group Affiliated to Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China; 2. Laboratory of Asthma, Qingdao Municipal Hospital Group Affiliated to Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of neural cell adhesion molecule(NCAM/CD56), chromogranin(CgA) and synaptophysin(Syn) in small cell lung carcinoma(SCLC) and investigate the value for diagnosis and clinical stages in SCLC. **Methods** Reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and immunohistochemistry method were performed to detect CD56, CgA, Syn in 15 tumor tissues from SCLC patients, as well as 15 tissues from non-small cell lung carcinoma(NSCLC) and 10 normal tissues. The results were analyzed by Fisher's exact probabilities. **Results** In SCLC, the positive rates of CD56, CgA, Syn mRNA genes were obviously higher than those in NSCLC and normal tissue, there were significant differences($P < 0.05$). With combined detection of CD56, CgA, Syn, the results indicated that sensitivity for diagnosis was 93.3%, specificity was 96.0% and accuracy was 90.0% in SCLC. Expression of CgA gene in extensive period(77.8%) of SCLC was higher than that in limited period(0.0%), and the expression in SCLC with lymphatic metastasis(70%) was higher than that in SCLC with non-lymphatic metastasis(0.0%). The protein expressions of CD56 and Syn were higher than those in NSCLC and normal tissue($P < 0.05$). The protein expression of CgA was higher than that in NSCLC and normal tissue, but there was no significant difference($P > 0.05$). **Conclusion** The detection of CD56, CgA, Syn is much more helpful to diagnose SCLC. Moreover, CgA gene expression can reflect different stages of SCLC indirectly.

Key words: lung neoplasms; small cell; neural cell adhesion molecules; chromogranin A; synapsins

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.02.006

收稿日期: 2013-02-16

基金项目: 青岛市公共领域科技支撑计划项目(编号: 11-2-3-2-(3)-nsh)

作者简介: 张雯雯(1985-), 女, 山东德州人, 硕士研究生在读, 研究方向: 肿瘤病理。

通信作者: 黄维清(1966-), 女, 山东青岛人, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 肿瘤病理。

小细胞肺癌(small cell lung carcinoma, SCLC) 占全部肺癌的 15% ~ 20%, 因其生长迅速、转移早, 越来越受关注。有报道, 即使应用敏感的化学治疗方法, 多数 SCLC 患者的中位生存期也只有 10 ~ 14 个月^[1-2]。因此, SCLC 早期诊断有非常重要的价值。

以往的研究表明,神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM/CD56)、嗜铬蛋白A(chromogranin A, CgA)、突触素(synaptophysin, Syn)在SCLC组织中有不同程度的表达^[3-4]。本研究通过反转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫组织化学法比较SCLC与非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)及正常组织中CD56、CgA、Syn基因及蛋白的表达,探讨其在SCLC中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2011年10月至2012年10月青岛市立医院胸外科及呼吸科的SCLC手术标本15例,其中男14例,女1例;年龄49~78岁,中位年龄65岁;中央型13例,周围型2例;局限期6例,广泛期9例;有淋巴结转移者10例。另选取NSCLC 15例(腺癌7例,鳞癌4例,大细胞癌4例),其中男8例,女7例;年龄47~77岁,中位年龄64岁。正常肺组织10例,男4例,女6例;年龄27~70岁,中位年龄61岁。组织标本手术切除后立即分离出肿瘤组织,迅速液氮冷冻至-80℃冰箱中备用。同时保留有相应的蜡块。

1.2 主要试剂及仪器 RT-PCR所需的cDNA合成试剂盒、PCR扩增试剂盒及上下游引物(CD56:上游5'-GCCCATCTCAAATACAAAGC-3',下游5'-GGTCCTGAACACAAAATGAGC-3'; CgA:上游5'-CTCTCTCAGGGTCTGGTGGA-3',下游5'-GTGG-GGGTTCAGCACTACAG-3'; Syn:上游5'-GAGAAA-ACCAAA-CAGGGTGTG-3',下游5'-CCACTGCTCCTCCAA-CATTT-3'; GAPDH:上游5'-AGAAGGCTGGGGCT-CATTTG-3',下游5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3')均购自上海生工生物工程股份有限公司;提取RNA所需的试剂盒及Marker(D2000)购自天根生化科技(北京)有限公司;提取RNA所用的离心机购自湖南湘仪离心机仪器有限公司,PCR仪购自美国Labnet公司,全自动凝胶成像分析仪购自上海培清科技有限公司。单克隆抗体及试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司;组织包埋机购自德国Miccrom公司,石蜡切片机购自德国Leica公司,显微照相系统购自日本Olympus公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR RNA的提取:取10~20 mg组织加裂解液后充分研磨,随后加入RNase-free ddH₂O和蛋白酶K混匀、离心,取上清。缓慢加入无水乙醇,混匀,得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱,离心后弃废液将吸附柱放回收集管中。依次经过去蛋白、漂洗后加入RNase-free ddH₂O充分溶解RNA。

所得到的RNA溶液经分光光度仪鉴定质量后置于一80℃保存。cDNA的合成:将Oligo 1 μL, dNTP 2 μL, 5×buffer 5 μL, RNase抑制剂1 μL, ddH₂O 10 μL, M-MuLV 1 μL及提取的RNA 5 μL加入EP管中37℃孵育60 min, 95℃灭活酶2 min,所得到的25 μL反转录产物用于PCR扩增。

PCR扩增:将dNTP 4 μL, Mg²⁺ 3.2 μL, TaqDNA聚合酶1 μL, cDNA 2 μL, 上下游引物各0.24 μL, ddH₂O 25.32 μL加入EP管,反应条件为预变性94℃ 30 s, CD56和GAPDH(管家基因)为94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 40个循环; CgA和Syn为94℃ 30 s, 60℃ 40 s, 40个循环, 72℃延伸2 min。反应结束后分别取扩增产物6 μL经体积分数2%的凝胶电泳后照相。目的基因处出现高亮的条带为阳性,不出现条带或虽出现条带但不在目的基因处为阴性。

1.3.2 免疫组织化学 标本均经过固定、包埋及常规连续切片。切片经磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)冲洗,柠檬酸缓冲液中微波处理修复后加入过氧化氢室温孵育10 min,阻断内源性过氧化物酶,并依次加入抗体室温孵育,冲洗、显色、复染,光镜观察。已知的阳性切片做阳性对照, PBS代替一抗做空白对照。CD56、CgA和Syn的阳性标记均为细胞膜和(或)细胞质棕黄色颗粒沉积。着色强度计分:无着色0分,淡黄色1分,黄色2分,棕黄色3分;阳性细胞率计分:阳性细胞≤5%为0分, 6%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~75%为3分, ≥75%为4分。2种计分所得分值乘积1分为阴性(-), 2~3分为弱阳性(+), 4~7分为阳性(++), ≥8分为强阳性(+++)。整个读片过程采用双盲法,由2位病理科医师独立观察后一起做出判断。

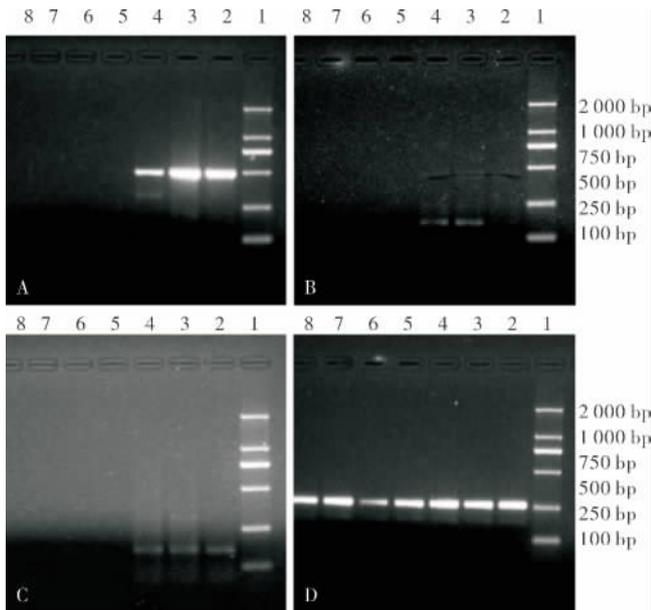
1.4 统计学处理 应用SPSS 17.0统计软件包分析数据,采用Fisher确切概率法进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(所有的 P 值均是双侧检验)。

2 结果

2.1 CD56、CgA和Syn基因在不同组织的表达

CD56的PCR产物为493 bp,凝胶电泳所示SCLC在目的基因处出现条带, NSCLC和正常组织均未出现条带(图1A)。CgA的PCR产物为156 bp,凝胶电泳所示3例SCLC中2例在目的基因处出现条带, 1例阴性; NSCLC和正常组织均未出现条带(图1B); Syn的PCR产物为154 bp,凝胶电泳所示SCLC在目的基因处出现条带; NSCLC和正常组织均未出现条带(图1C)。管家基因GAPDH为内参,图中3例SCLC、2例NSCLC及2例正常组织均在目的基因处出现条带(图1D)。CD56、CgA、Syn基因在SCLC中

的阳性率分别为 86.7%、46.7%、80.0% ,高于其在 NSCLC 及正常组织中的表达 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) ;见表 1。



A: CD56 的 PCR 产物; B: CgA 的 PCR 产物; C: Syn 的 PCR 产物; D: 管家基因 GAPDH。1: Marker; 2~4: SCLC 组织; 5~6: NSCLC 组织; 7~8: 正常组织。

图 1 CD56、CgA 和 Syn 的 RT-PCR 基因条带
Fig.1 Band of CD56、CgA and Syn mRNA detected by RT-PCR

表 1 CD56、CgA、Syn 基因在 SCLC、NSCLC 和正常组织中的阳性表达

| 组织类型 | n | CD56 | CgA | Syn |
|----------|----|----------------------|---------------------|----------------------|
| SCLC 组织 | 15 | 13(86.7) | 7(46.7) | 12(80.0) |
| NSCLC 组织 | 15 | 2(13.3) ^a | 1(6.7) ^a | 2(13.3) ^a |
| 正常对照组织 | 10 | 1(10.0) ^a | 0(0.0) ^a | 0(0.0) ^a |

注: 与 SCLC 组织比较^a $P < 0.05$ 。

2.2 CD56、CgA 和 Syn 基因在 SCLC 组织中的检测分析 CD56、CgA 和 Syn 3 项联合在 SCLC 组织表达阳性率为 93.3% ,可见应用联合表达对 SCLC 的诊断更为敏感; 3 项指标的特异性 [阴性例数 / (真阴性例数 + 假阳性例数)] 分别为 88.0% (22/25)、96.0% (24/25)、92.0% (23/25) 3 项联合表达特异性为 96.0% (24/25); 3 项指标的准确性分别为 87.5% (35/40)、77.5% (31/40)、87.5% (35/40) 3 项指标联合表达准确性为 90.0% (36/40)。

2.3 SCLC 组织中 CD56、CgA 和 Syn 基因的表达与病理学参数的关系 CD56 和 Syn 基因的表达在不同的病理学参数(年龄、性别、肿瘤的分期、分型及有无淋巴结转移)之间比较 ,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) ; CgA 基因在 SCLC 广泛期的表达阳性率显著高于 SCLC 局限期 ($P < 0.01$) ,其在 SCLC 有淋巴结转移组织中的表达阳性率高于无淋巴结转移

组织 ($P < 0.05$) ;见表 2。

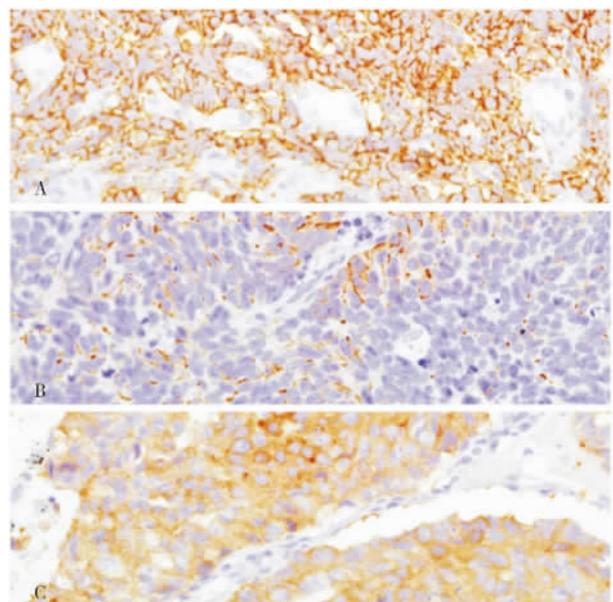
表 2 SCLC 中 CD56、CgA 和 Syn 基因的表达与病理学参数的关系

Tab. 2 Relationship between CD56、CgA、Syn gene and pathological parameters in SCLC 例(%)

| 项目 | CD56(n=13) | | CgA(n=7) | | Syn(n=12) | |
|-------|------------|-------|----------|-------|-----------|-------|
| | 阳性表达 | P | 阳性表达 | P | 阳性表达 | P |
| 年龄 | | | | | | |
| <65 岁 | 6(85.7) | 1.000 | 3(42.9) | 1.000 | 6(85.7) | 1.000 |
| ≥65 岁 | 7(87.5) | | 4(50.0) | | 6(75.0) | |
| 性别 | | | | | | |
| 男 | 12(85.7) | 1.000 | 7(50.0) | 1.000 | 11(78.8) | 1.000 |
| 女 | 1(100.0) | | 0(0.0) | | 1(100.0) | |
| 分型 | | | | | | |
| 中央型 | 11(84.6) | 1.000 | 6(46.2) | 1.000 | 10(76.9) | 1.000 |
| 周围型 | 2(100.0) | | 1(50.0) | | 2(100.0) | |
| 分期 | | | | | | |
| 局限期 | 4(66.7) | 0.143 | 0(0.0) | 0.007 | 4(66.7) | 0.525 |
| 广泛期 | 9(100.0) | | 7(77.8) | | 8(88.9) | |
| 淋巴结转移 | | | | | | |
| 无 | 3(60.0) | 0.095 | 0(0.0) | 0.026 | 3(60.0) | 0.242 |
| 有 | 10(100.0) | | 7(70.0) | | 9(90.0) | |

2.4 SCLC 组织中 CD56、CgA 和 Syn 蛋白的表达

SCLC 组织中 CD56 蛋白呈弥漫强阳性表达(图 2A); CgA 蛋白呈局灶弱阳性表达(图 2B); Syn 蛋白呈强阳性表达(图 2C)。CD56、CgA 和 Syn 蛋白在 SCLC 组织中的阳性率与基因的表达率一致 ,均为 CD56、Syn 蛋白表达率高 ,而 CgA 蛋白表达率较低。CD56 和 Syn 蛋白在 SCLC 组织中的表达高于 NSCLC 和正常组织 ($P < 0.05$) ;但是 CgA 蛋白在 SCLC、NSCLC 及正常组织中表达的阳性率比较 ,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) ;见表 3。



A: CD56; B: CgA; C: Syn。

图 2 SCLC 组织中 CD56、CgA 及 Syn 蛋白的表达(免疫组织化学, ×400)

Fig. 2 Expressions of CD56、CgA and Syn protein in SCLC tissue(immunohistochemistry , ×400)

表 3 CD56、CgA、Syn 蛋白在 SCLC、NSCLC 和正常组织中的阳性表达

Tab.3 Positive expressions of CD56, CgA and Syn protein in SCLC, NSCLC and normal tissue 例(%)

| 组织类型 | n | CD56 | CgA | Syn |
|----------|----|----------------------|---------|----------------------|
| SCLC 组织 | 15 | 13(86.7) | 2(13.3) | 12(80.0) |
| NSCLC 组织 | 15 | 2(13.3) ^a | 1(6.7) | 2(13.3) ^a |
| 正常组织 | 10 | 1(10.0) ^a | 0(0.0) | 0(0.0) ^a |

注: 与 SCLC 比较^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

SCLC 的恶性程度高, 治疗以放射治疗和化学治疗为主^[5], 早期诊断和治疗是提高疗效最有效的手段, 因此选择敏感的肿瘤标志物对其进行诊断尤为重要。

以往对 SCLC 肿瘤标志物的研究大多在蛋白水平, 理论上讲, 肿瘤标志物的生成需要基因的合成, 因此从基因水平对标志物进行检测更为敏感。组织 RT-PCR 技术即提取组织中的总 RNA, 以其中的 mRNA 作为模板, 采用 Oligo(dT) 或随机引物利用反转录酶反转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得目的基因或检测基因表达。RT-PCR 使检测的灵敏性提高了几个数量级, 使分析极为微量的 RNA 样品成为可能。

本研究采用组织 RT-PCR 方法对 CD56、CgA 和 Syn 基因进行检测, 同时应用免疫组织化学方法检测蛋白。结果表明, CD56、CgA、Syn 基因在 SCLC 组织中的表达与 NSCLC、正常组织比较差异均有统计学意义。CgA 蛋白在 SCLC、NSCLC 及正常组织中表达的阳性率比较, 差异均无统计学意义; CgA 基因在 SCLC 中的阳性率与 NSCLC 及正常对照组织比较差异有统计学意义。说明了基因检测的灵敏性, 同时也说明 CD56、CgA、Syn 基因检测对 SCLC 诊断的重要性。CgA 基因在 SCLC 组织表达的阳性率较低, 而联合检测后其敏感性、特异性及准确性均有提高, 说明联合检测对诊断 SCLC 更为敏感。

本研究中, CD56 和 Syn 基因在 SCLC 不同病理学参数之间的表达差异均无统计学意义, 而 CgA 基因在 SCLC 广泛期的表达率显著高于其在 SCLC 局限期的表达, 且 CgA 基因在 SCLC 有淋巴结转移时的阳性率高于无淋巴结转移时的阳性率, 差异有统计学意义, 表明 SCLC 组织中 CgA 基因的检测有助于诊断

SCLC 的分期, 对 SCLC 的临床治疗有一定帮助。

近年来研究发现 CD56 蛋白在 SCLC 组织中有较高的阳性率。云径平^[3]和 Farinola 等^[6]报道 CD56 在 SCLC 及其淋巴结中阳性率为 100%。SCLC 属于神经内分泌肿瘤^[7], 传统的神经内分泌标志物 CgA 和 Syn 蛋白广泛用于 SCLC 的诊断^[8], 有报道表明 CgA 蛋白的检测与 SCLC 预后有关系^[9]。本研究中, CD56、Syn 蛋白在 SCLC 组织中的表达与 NSCLC 和正常组织比较差异有统计学意义, CgA 蛋白在 SCLC、NSCLC 及正常组织中表达的阳性率比较, 差异均无统计学意义, 但由于 3 种蛋白在 SCLC 组织中的表达特异性均较高, 联合检测可以提高 SCLC 诊断的准确性。

综上所述, CD56、CgA、Syn 基因的检测进一步提高了 SCLC 诊断的敏感性, CgA 基因的检测对预测 SCLC 的程度和分期有一定的作用, 至于基因的检测对预后的影响有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 张海平, 董争鸣, 万欣. SCLC 患者循环 DNA 水平的临床应用[J]. 医学检验与临床, 2011, 22(1): 3-7.
- [2] Pires N F, Morais A, Queiroga H. Superior vena cava syndrome as tumour presentation[J]. Rev Port Pneumo, 2010, 16(1): 73-88.
- [3] 云径平, 向锦, 侯景辉. CD56 在小细胞组织中的表达及其对诊断的应用[J]. 癌症, 2005, 24(9): 1140-1143.
- [4] Beasley M B. Immunohistochemistry of pulmonary and pleural neoplasia[J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(7): 1062-1072.
- [5] 马晓, 郭伟华, 王俊杰. 伊立替康联合顺铂治疗复发晚期小细胞肺癌 29 例[J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(5): 352-353, 356.
- [6] Farinola M A, Weir E G, Ali S Z. CD56 expression of neuroendocrine neoplasms on immunophenotyping by flow cytometry: a novel diagnostic approach to fine-needle aspiration biopsy[J]. Cancer, 2003, 99(4): 240-246.
- [7] 赵振, 顾玉海. 神经原特异性烯醇化酶在小细胞肺癌中的价值研究[J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(3): 350-351.
- [8] Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W. Selected markers (chromogranin A, neuron-specific enolase, synaptophysin, protein gene product 9.5) in diagnosis and prognosis of neuroendocrine pulmonary tumours[J]. Pol J Pathol, 2007, 58(1): 23-33.
- [9] 王洁心, 张秀明, 王玲, 等. 过表达 Notch1 对小细胞肺癌细胞的增殖和神经内分泌标志物表达的抑制作用[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(5): 335-339.

(本文编辑: 杨 博 英文编辑: 杨 博)