

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.34.008

文章编号: 1005-8982 (2018) 34-0037-05

## 肝素酶、碱性成纤维细胞生长因子在非小细胞肺癌中的表达及与预后的关系 \*

朱敏, 安云霞

(河南省人民医院 呼吸与危重症学科, 河南 郑州 450003)

**摘要:** **目的** 研究非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织中肝素酶、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的表达情况, 分析其与肺癌转移和预后的关系。 **方法** 选取 2012 年 6 月—2014 年 6 月河南省人民医院收治的 48 例 NSCLC 患者作为研究对象, 所有患者均行手术治疗, 术中取肺癌组织样本作为观察组, 取癌旁组织样本作为对照组。观察肝素酶、bFGF 在两组样本中的表达情况, 分析肝素酶、bFGF 表达与临床病理因素的关系。采用 Logistic 回归方程进行计算, 探究 NSCLC 患者肝素酶、bFGF 表达与转移和生存的关系。 **结果** 观察组中肝素酶阳性例数 38 例 (79.17%), bFGF 阳性例数 37 例 (77.08%)。对照组中肝素酶、bFGF 均为阴性表达, 观察组肝素酶、bFGF 阳性表达率与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。肝素酶表达与 NSCLC 患者病理分期、血管浸润以及淋巴结转移有关; 而 bFGF 表达则与 NSCLC 患者病理分期、分化程度、血管浸润及淋巴结转移有关。随访 NSCLC 患者 3 年, 生存患者 26 例, 生存率 54.17%。死亡患者 22 例, 病死率 45.83%。NSCLC 生存和死亡患者在分化程度、血管浸润、淋巴结转移及 bFGF 表达上差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。将上述有差异因素带入 Logistic 回归方程分析发现, 分化程度、血管浸润、淋巴结转移及 bFGF 表达均是 NSCLC 患者预后的影响因素。 **结论** 肝素酶、bFGF 与 NSCLC 的转移、血管浸润等密切相关, 与 NSCLC 的预后也有明显关系。

**关键词:** 肺肿瘤; 肝素裂合酶; 成纤维细胞生长因子; 肿瘤转移; 预后

**中图分类号:** R734.2

**文献标识码:** A

## Expressions of heparinase and bFGF in NSCLC tissues and their correlations with lung cancer metastasis and prognosis\*

Min Zhu, Yun-xia An

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

**Abstract: Objective** To analyze the clinical expressions of heparinase and basic fibroblast growth factor (bFGF) in the non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and their correlations with the lung cancer metastasis and prognosis. **Methods** Forty-eight NSCLC patients treated in Henan Provincial People's Hospital from June 2012 to June 2014 were selected. During operation, the samples of lung cancer tissues were collected as the observation group, the samples of para-cancerous tissues were collected as the control group. The expressions of heparinase and bFGF were observed, their correlations with the clinical pathological characteristics were analyzed. Using logistic regression equation, the correlations of heparinase and bFGF expressions with the cancer metastasis and survival rate were analyzed. **Results** In the observation group, there were 38 heparinase-positive cases (79.17%) and 37 bFGF-positive cases (77.08%); in the control group, the heparinase and bFGF were negatively expressed, the differences were statistically significant between the two groups ( $P < 0.05$ ). The heparinase expression was correlated with the

收稿日期: 2018-04-01

\* 基金项目: 河南省科技厅基础与前沿技术研究计划资助项目 (No: 142300410383)

NSCLC pathological staging, vascular invasion and lymphatic metastasis; the bFGF expression was correlated with the pathological staging, differentiation degree, vascular invasion and lymphatic metastasis. After 3 y of follow-up, 26 cases survived (54.17%) and 22 cases died (45.83%). The differentiation degree, vascular invasion, lymphatic metastasis and bFGF expression were significantly different between the survived cases and the dead cases ( $P < 0.05$ ). The influencing factors of the prognosis included the differentiation degree, vascular invasion, lymphatic metastasis and bFGF expression. **Conclusions** The expressions of heparinase and bFGF are closely correlated with cancer metastasis and vascular invasion as well as the prognosis of NSCLC patients.

**Keywords:** lung neoplasms; heparinase; fibroblast growth factors; neoplasm metastasis; prognosis

随着对恶性肿瘤的不断研究,人们发现恶性肿瘤转移需要两个关键的步骤,突破基底膜(basement membrane, BM)和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)构成的屏障以及有新的血管生成<sup>[1-2]</sup>。经研究发现<sup>[3]</sup>,肝素酶对BM、ECM中的主要物质硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)具有降解作用,还能协同碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等多种生物因子,促进肿瘤的转移以及新生血管的生成。本文对非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)患者进行研究,分析肝素酶、bFGF在NSCLC患者中癌细胞转移和预后的关系,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取河南省人民医院2012年6月—2014年6月收治的48例NSCLC患者作为研究对象。肺癌诊断标准按中国抗癌协会编著的《新编常见恶性肿瘤诊治规范》进行判断。纳入标准:①经病理学检查和诊断符合NSCLC诊断标准<sup>[4]</sup>的患者;②均行手术治疗的患者;③年龄40~80岁的患者。排除标准:①合并其他肺部疾病的患者;②年龄在40岁以下的患者;③临床资料不全,中途随访丢失的患者。术中取患者肺癌组织样本作为观察组,取癌旁组织样本作为对照组。患者中男性31例,女性17例;年龄42~76岁,平均年龄( $58.2 \pm 4.6$ )岁。TNM分期按国际抗癌联盟(UICC)2009年制定的第七版肺癌P-TNM分期标准进行判断:I期患者13例,II期患者11例,III期患者23例,IV期患者1例。肺癌分型:其中鳞癌35例,腺癌13例。分化程度:低分化患者21例,中分化患者18例,高分化患者9例。

### 1.2 标本的制备

取4%多聚甲醛-0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)固定组织,原位杂交组

织固定时加入1:1 000 DEPC,常规石蜡包埋切片,切片厚度4  $\mu$ m。

### 1.3 试剂与免疫组织化学染色

以色列Insight公司生产的小鼠抗人肝素酶单克隆抗体HP-130,福州迈新生物技术开发公司生产的兔抗人bFGF多克隆抗体、Plus广谱试剂盒以及鼠抗人CD34单克隆抗体。免疫组织化学染色方法和步骤严格按照相关试剂盒说明书进行操作。常规脱蜡至水,采用0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液高温高压2 min抗原修复,4℃过夜,DBA显色,苏木精复染,中性树脂封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。

### 1.4 Western blot

肝素酶浓缩型抗体与免疫组织化学染色所用一致。采用华美生物工程公司生产的羊抗鼠IgG二抗(碱性磷酸酶标记)及NBT/BCIP试剂盒。选用Invitrogen公司生产的梯度蛋白标准。取癌旁组织剪碎,加入裂解缓冲液并搅匀,离心机低温4℃离心,13 000 r/min离心30 min,提取上清液作为细胞总蛋白。10% SDS-PAGE凝胶电泳、转印,5%牛血清封闭,1:500稀释一抗4℃过夜孵育,1:1 000稀释二抗室温孵育1 h, NBT/BCIP显色30 min。

### 1.5 原位杂交

采用武汉博士德生物工程有限公司生产的肝素酶原位杂交试剂盒(MK2156)进行原位杂交。肝素酶靶基因mRNA正向引物:5'-CCAAGCTAAGATCAGCTCAGTTC-3',反向引物:5'-CATCTAAGCGCAACTTTGGAG-3'。石蜡切片的制备和杂交均严格按照试剂盒使用说明书进行操作。从杂交液中去除探针为阴性对照。

### 1.6 观察指标

观察两组标本中肝素酶和bFGF的表达情况,分析肺癌组织中肝素酶和bFGF的表达与肺癌临床病理因素的关系。随访患者3年,分析影响NSCLC患者预

后的危险因素。观察根据阳性判断标准,以细胞膜和细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性,染色强度为阳性细胞比例评定标准。在光镜下随机抽取 10 个高倍视野,按每个视野 100 个细胞进行计数。染色强度分级<sup>[5]</sup>:0 级,胞质或包膜无染色;I 级,胞质或包膜呈淡棕黄色;II 级,胞质和包膜呈棕黄色或更深。阳性细胞数分级<sup>[6]</sup>:0 级,阳性细胞所占比例≤50%;I 级,阳性细胞所占比例为 51%~75%;II 级,阳性细胞所占比例>75%。两项目结果相加大于 II 级为阳性病例。Westem blot 结果判定<sup>[7]</sup>,阳性:转印膜出现蓝紫色条带。原位杂交以细胞群中淡棕黄色和棕黄色染色超过 10% 为阳性表达。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,比较采用 *t* 检验,计数资料以率(%)表示,比较采用  $\chi^2$  检验,采用

Logistic 回归方程进行计算,以患者生存情况作为因变量,以肺癌病理因素作为自变量,逐步筛选  $\alpha_{入}=0.05$ ,  $\alpha_{出}=0.10$ ,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组肝素酶、bFGF 表达情况

观察组肝素酶阳性例数 38 例(79.17%), bFGF 阳性例数 37 例(77.08%)。对照组肝素酶、bFGF 均为阴性表达,观察组肝素酶、bFGF 阳性表达率高于对照组( $\chi^2=11.163$  和  $12.424$ ,  $P=0.001$  和  $0.000$ )。

2.2 肺癌组织中肝素酶、bFGF 表达与病理因素的关系

肝素酶表达与 NSCLC 患者病理分期、血管浸润及淋巴结转移有关;而 bFGF 表达则与 NSCLC 患者病理分期、分化程度、血管浸润及淋巴结转移有关。见表 1。

表 1 肺癌组织中肝素酶、bFGF 表达与病理因素的关系 (n=48, 例)

| 指标               | <60 岁 | ≥ 60 岁 | 男 / 女 |    | I、II 期 | III、IV 期 | 鳞癌    | 腺癌 | 低分化   | 中分化 | 高分化   | 血管浸润 |       | 淋巴结转移 |    |
|------------------|-------|--------|-------|----|--------|----------|-------|----|-------|-----|-------|------|-------|-------|----|
|                  |       |        |       |    |        |          |       |    |       |     |       | 有    | 无     | 有     | 无  |
| 肝素酶表达            |       |        |       |    |        |          |       |    |       |     |       |      |       |       |    |
| 阳性               | 13    | 25     | 26/12 |    | 16     | 22       | 29    | 9  | 17    | 15  | 6     | 26   | 12    | 23    | 15 |
| 阴性               | 5     | 5      | 5/5   |    | 8      | 2        | 6     | 4  | 4     | 3   | 3     | 2    | 8     | 2     | 8  |
| χ <sup>2</sup> 值 | 0.842 |        | 1.175 |    | 4.547  |          | 1.067 |    | 8.267 |     | 7.637 |      | 5.210 |       |    |
| P 值              | 0.359 |        | 0.279 |    | 0.033  |          | 0.302 |    | 0.582 |     | 0.006 |      | 0.023 |       |    |
| bFGF 表达          |       |        |       |    |        |          |       |    |       |     |       |      |       |       |    |
| 阳性               | 13    | 24     | 25    | 12 | 14     | 23       | 28    | 9  | 19    | 14  | 4     | 25   | 12    | 23    | 14 |
| 阴性               | 5     | 6      | 6     | 5  | 10     | 1        | 7     | 4  | 2     | 4   | 5     | 3    | 8     | 2     | 9  |
| χ <sup>2</sup> 值 | 0.385 |        | 0.629 |    | 9.553  |          | 0.622 |    | 5.860 |     | 5.664 |      | 6.572 |       |    |
| P 值              | 0.535 |        | 0.428 |    | 0.002  |          | 0.430 |    | 0.023 |     | 0.017 |      | 0.010 |       |    |

2.3 NSCLC 患者随访情况

随访 NSCLC 患者 3 年,生存患者 26 例,生存率 54.17%(26/48)。死亡患者 22 例,病死率 45.83%(22/48)。

2.4 NSCLC 生存和死亡患者病理资料比较

NSCLC 生存和死亡患者在分化程度、血管浸润、淋巴结转移、肝素酶及 bFGF 表达上差异有统计学意

义( $P<0.05$ )。见表 2。

2.5 NSCLC 患者预后影响因素分析

将上述有差异因素带入 Logistic 回归方程分析发现,分化程度、血管浸润、淋巴结转移、肝素酶及 bFGF 表达均是 NSCLC 患者预后的影响因素。赋值说明见表 3、4。

表 2 NSCLC 生存和死亡患者病理资料比较 (n=48, 例)

| 指标         | <60 岁 | ≥ 60 岁 | 男 / 女 | I、II 期 | III、IV 期 | 鳞癌    | 腺癌 | 低分化   | 中分化 | 高分化 |
|------------|-------|--------|-------|--------|----------|-------|----|-------|-----|-----|
| 生存         | 9     | 17     | 18/8  | 12     | 14       | 20    | 6  | 3     | 14  | 9   |
| 死亡         | 9     | 13     | 13/9  | 12     | 10       | 15    | 7  | 18    | 4   | 0   |
| $\chi^2$ 值 | 0.201 |        | 0.536 | 0.336  |          | 0.461 |    | 8.937 |     |     |
| P 值        | 0.654 |        | 0.464 | 0.562  |          | 0.497 |    | 0.000 |     |     |

| 指标         | 血管浸润  |    | 淋巴结转移  |    | 肝素酶   |    | bFGF  |    |
|------------|-------|----|--------|----|-------|----|-------|----|
|            | 有     | 无  | 有      | 无  | 阳性    | 阴性 | 阳性    | 阴性 |
| 生存         | 10    | 16 | 7      | 19 | 17    | 9  | 17    | 9  |
| 死亡         | 18    | 4  | 18     | 4  | 21    | 1  | 20    | 2  |
| $\chi^2$ 值 | 9.216 |    | 14.389 |    | 6.533 |    | 4.395 |    |
| P 值        | 0.002 |    | 0.000  |    | 0.011 |    | 0.036 |    |

表 3 NSCLC 患者 Logistic 分析赋值说明

| 影响因素  | 变量名 | 赋值说明                   |
|-------|-----|------------------------|
| 分化程度  | X1  | 低分化 =0, 中分化 =1, 高分化 =2 |
| 血管浸润  | X2  | 有 =1, 无 =0             |
| 淋巴结转移 | X3  | 有 =1, 无 =0             |
| 肝素酶   | X4  | 阳性 =1, 阴性 =0           |
| bFGF  | X5  | 阳性 =1, 阴性 =0           |
| 结局    | Y   | 生存 =1, 死亡 =0           |

表 4 NSCLC 患者预后影响因素分析

| 影响因素  | b     | S <sub>b</sub> | P 值   | 95% CI |         |
|-------|-------|----------------|-------|--------|---------|
|       |       |                |       | 下限     | 上限      |
| 分化程度  | 3.257 | 1.112          | 0.003 | 2.938  | 229.391 |
| 血管浸润  | 2.956 | 1.491          | 0.047 | 2.378  | 118.966 |
| 淋巴结转移 | 2.836 | 1.294          | 0.028 | 1.878  | 109.741 |
| 肝素酶   | 2.722 | 1.259          | 0.031 | 2.006  | 101.776 |
| bFGF  | 3.243 | 1.278          | 0.039 | 2.803  | 233.478 |

### 3 讨论

肺癌是恶性肿瘤中发病率最高的疾病之一, 占人类癌症死亡的首位, 严重威胁患者生命健康。据数据显示<sup>[8]</sup>, 80% 以上的肺癌为 NSCLC, 虽然治疗技术和医疗水平不断提升, 但患者预后仍然差, 生存率较低。肺癌的转移和侵袭是影响患者生存的主要原因, 因此研究肺癌转移、侵袭的因素成为人们关注的重点。

肝素酶是一种葡萄糖苷内切酶, 可裂解细胞 BM、

ECM 中的 HSPG, 从而破坏 BM 和 ECM 的完整性, 使肿瘤更容易发生转移和侵袭, 引起人们的注意<sup>[9]</sup>。随后研究显示, 正常情况下肝素酶仅表达于免疫器官、免疫细胞、内皮细胞等<sup>[10]</sup>。但在病理状态下, 肝素酶在多种恶性肿瘤中均有表达, 与肿瘤细胞的转移具有密切关系<sup>[11]</sup>。本文对 NSCLC 患者进行研究, 分析肝素酶与肺癌患者病理因素的关系, 结果显示, 肝素酶的表达水平与肺癌的病理分期、血管浸润及淋巴结转移具有密切关系。在苏树伟等<sup>[12]</sup>研究中发现, 肝素酶表达水平与恶性肿瘤的转移情况呈正相关, 根据肝素酶水平有助于预测恶性肿瘤的转移情况。在随访患者 3 年后分析预后情况发现, 肝素酶是 NSCLC 患者预后的影响因素。这是由于肝素酶表达水平越高, 患者越容易发生恶性肿瘤, 病理分期越高, 越容易发生血管浸润和淋巴结转移, 导致患者生存率较低。

bFGF 是一种强力促血管生成因子, 具有促进新生血管生长的效果<sup>[13]</sup>。在对 bFGF 的研究中发现, bFGF 在肿瘤组织中表达水平明显升高, 且与淋巴结转移、肿瘤患者预后具有密切关系<sup>[14]</sup>。在临床研究发现, bFGF 是多种恶性肿瘤预后不良的独立危险因素<sup>[15]</sup>。本研究中表明, bFGF 与 NSCLC 患者的病理分期、分化程度、血管浸润及淋巴结转移有关。而观察患者生存情况则发现, bFGF 阳性表达率越高, 患者生存率越低。这可能是由于 bFGF 表达水平越高, NSCLC 患者越容易出现淋巴结转移和血管浸润, 病理分期越高, 分化程度低, 促进新生血管的生成, 从而降低患者生存率<sup>[16]</sup>。本研究发现 bFGF 与肝素酶具有较多共性, 可能对 NSCLC 患者的预后造成共同影响, 具体影响



还需要进一步进行深入研究。

综上所述,肝素酶和bFGF在肺癌组织中表达水平较高,对肺癌患者的预后造成较大影响,可能与肝素酶和bFGF能促进肿瘤细胞的侵袭和转移以及促进新生血管生成有关。而随着肝素酶、bFGF水平的升高,NSCLC患者预后不良,生存率较低。

#### 参 考 文 献:

- [1] 邓太兵,黄万秀,唐凤鸣,等. 肝素酶和CD44v6在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 重庆医学, 2014, 43(20): 2606-2608.
- [2] HUANG S X, ISLAM M N, O'NEILL J, et al. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(1): 84-91.
- [3] LI M, SHI H S, ZHANG H L, et al. bFGF peptide combined with the pVAX-8CpG plasmid as adjuvant is a novel anticancer vaccine inducing effective immune responses against Lewis lung carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(3): 625-630.
- [4] 赵真庆,王永勇,戴磊,等. 碱性成纤维细胞生长因子,基质金属蛋白酶-9,基质金属蛋白酶抑制因子-1在肺癌患者血清中的水平差异及其相关性研究[J]. 中国医学前沿杂志:电子版, 2014, 6(12): 76-79.
- [5] LIU J, MOON A F, SHENG J, et al. Understanding the substrate specificity of the heparan sulfate sulfotransferases by an integrated biosynthetic and crystallographic approach[J]. Curr Opin Struct Biol, 2012, 22(5): 550-557.
- [6] 赵凤芝,赵建夫,孙一帆,等. 碱性成纤维细胞生长因子单克隆抗体联合洛铂对肺腺癌A549细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(6): 783-788.
- [7] WANG Y, CHEN X, CAO W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. Nat Immunol, 2014, 15(11): 1009-1016.
- [8] 班媛媛,李道胜. 基质金属蛋白酶-7和碱性成纤维细胞生长因子在非小细胞肺癌中的表达意义及相关性[J]. 实用医技杂志, 2014, 21(9): 930-934.
- [9] WANG X, WU E, WU J, et al. An antimitotic and antivascular agent BPR0L075 overcomes multidrug resistance and induces mitotic catastrophe in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65686.
- [10] FERNANDES T C, GOMES A M, PASCHOAL M E, et al. Heparanase expression and localization in different types of human lung cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(8): 2599-2608.
- [11] 王锦阳,黄文华,李海滨,等. 乙酰肝素酶、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子在非小细胞肺癌组织中的表达及其相关性[J]. 解剖学杂志, 2016, 39(2): 169-172.
- [12] 苏树伟,田辉,李林,等. 乙酰肝素酶和血管内皮生长因子C mRNA的表达与肺癌侵袭和转移的分子生物学[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(6): 1114-1116.
- [13] 张春容,张婷. 碱性成纤维细胞生长因子促进肺癌新生血管形成的机制[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(5): 1177-1178.
- [14] SOTERIOU D, ISKENDER B, BYRON A, et al. Comparative proteomic analysis of supportive and unsupportive extracellular matrix substrates for human embryonic stem cell maintenance[J]. J Biol Chem, 2013, 288(26): 18716-18731.
- [15] 白小燕,孟又胜,王秀问,等. siRNA干扰碱性成纤维细胞生长因子表达对肺腺癌A549增殖和克隆特性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(3): 718-720.
- [16] LAU M T, SO W K, LEUNG P C. Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59083.

(张西倩 编辑)