

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.01.004

❖ 基础研究 ❖

LRRK2、PPBP 基因在非小细胞肺癌组织中的表达及其与预后的相关性分析

杨凯¹, 杨明¹, 苏学会¹, 温辉¹, 单娜¹, 牛春密²

(1. 秦皇岛市第二医院呼吸科; 2. 秦皇岛市第一医院呼吸科, 河北 秦皇岛 066000)

【摘要】目的: 探讨 LRRK2、PPBP 基因在非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织中的表达及其与预后的关系。**方法:** 收集 100 例 NSCLC 临床样本, 分析 LRRK2、PPBP 基因在癌旁组织与癌组织中的表达情况, 分析 LRRK2、PPBP 基因在 NSCLC 组织中的表达与临床病理特征的关系及与 NSCLC 患者预后的相关性。**结果:** NSCLC 组织中 LRRK2 蛋白低于癌旁组织 ($P < 0.05$), PPBP 蛋白的相对表达量均高于癌旁组织 ($P < 0.05$); LRRK2 蛋白在不同分化程度及不同 TNM 分期 NSCLC 组织中的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$), LRRK2 蛋白在癌组织中的表达量与 NSCLC 患者肿瘤直径、病理类型、淋巴结转移无关 ($P > 0.05$); PPBP 蛋白在是否淋巴结转移及不同 TNM 分期 NSCLC 组织中的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$), LRRK2 蛋白在癌组织中的表达量与 NSCLC 患者肿瘤直径、病理类型、分化程度无关 ($P > 0.05$)。多因素 Cox 回归分析显示 TNM 分期 ($OR = 2.855$)、LRRK2 ($OR = 0.217$)、PPBP 蛋白 ($OR = 2.812$) 是影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。生存分析显示 LRRK2 低表达组 1 年的生存率高于 LRRK2 高表达组 ($P < 0.05$), PPBP 高表达组 1 年的生存率高于 PPBP 低表达组 ($P < 0.05$)。**结论:** LRRK2、PPBP 基因在非小细胞肺癌组织中明显高表达, 其表达量与患者 TNM 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移及患者预后相关, 有望成为 NSCLC 诊治的新靶点。

【关键词】 非小细胞肺癌; LRRK2; PPBP; 临床特征; 预后

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A

Expression of LRRK2, PPBP genes in non-small cell lung cancer and their correlation with prognosis

YANG Kai¹, YANG Ming¹, SU Xue-hui¹, WEN Hui¹, SHAN Na¹, NIU Chun-mi²

(Department of Respiratory, 1. The Second Hospital of Qinhuangdao; 2. First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of LRRK2, PPBP genes in non-small cell lung cancer (NSCLC) and their relationship with prognosis. **Methods:** The clinical data of 100 cases of NSCLC were collected to analyze the expression of LRRK2 and PPBP genes in paracancerous tissues and cancerous tissues. The relationship between the expression of LRRK2 and PPBP genes in NSCLC tissues and clinicopathological characteristics was analyzed, and the relationship between them was respectively evaluated. **Results:** The relative expression of LRRK2 protein in NSCLC tissues was significantly lower than that in adjacent tissues ($P < 0.05$), while the relative expression of PPBP protein was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The relative expression of LRRK2 protein in NSCLC tissues with different degree of differentiation and TNM stage was significantly different ($P < 0.05$), but the expression of LRRK2 protein in cancer tissues was not related to tumor diameter, pathological type and lymph node metastasis ($P > 0.05$). The expression of PPBP protein in NSCLC tissues with lymph node metastasis and different TNM stages was significantly different ($P < 0.05$), while the expression of LRRK2 protein was not related to tumor diameter, pathological type and differentiation degree of NSCLC patients ($P > 0.05$). Multivariate Cox regression analysis showed that TNM stage ($OR = 2.855$), LRRK2 ($OR = 0.217$), PPBP protein ($OR = 2.812$) were independent risk factors affecting the prognosis of NSCLC patients ($P < 0.05$). Survival analysis displayed that the one-year survival rate in LRRK2 low expression group was higher than that in LRRK2 high expression group ($P < 0.05$), while the one-year survival rate in PPBP high expression group was higher than that of low expression group ($P < 0.05$). **Conclusion:** LRRK2 and PPBP genes are highly expressed in NSCLC and the expression levels are related to TNM stage, tumor differentiation, lymph node metastasis and prognosis of patients, indicating that they may become the new targets for the diagnosis and treatment of

NSCLC.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; LRRK2; PPBP; Clinical features; Prognosis

原发性肺癌是全世界发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,占癌症相关死亡人数的 18%,经相关文献^[1]预测,至 2025 年,我国每年肺癌发病率将超过 100 万,成为世界第一肺癌大国。随着各种综合治疗手段的持续更新,肺癌的临床治疗效果较以往有所提升,但总体预后仍欠佳,5 年生存率仅 10% 左右^[2]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌最常见的病理形态,约占 80%,其肿瘤标志物有糖类抗原 125、鳞状上皮细胞癌抗原、癌胚抗原等,但仍有 99% 的肿瘤标志物未得到完整的临床验证,并且目前还未有研究报道过任何一种敏感性和特异性均很高的肺癌肿瘤标志物^[3]。进一步筛选出灵敏度和特异性高的新型标志物,可快速检测出患者的病理状态,为及早治疗、治愈奠定基础,提高患者的生存率和生存质量,以达到降低肺癌病死率的最终目标。本研究通过本院临床病理资料的回顾性分析,以期找到 1~2 个 NSCLC 的新型预后标志物,为临床上肺癌的诊断和治疗提供较精准的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集秦皇岛市第二医院 100 例 NSCLC 临床样本数据。纳入标准:(1)参照 NSCLC 的相关诊断标准^[4];(2)首次确诊;(3)经 X 线、细胞学或组织病理学证实为 NSCLC;(4)预计生存时间 > 3 个月;(5)入院前未接受过相关治疗;(6)无其他重要脏器功能障碍。排除标准:(1)合并脑转移;(2)病灶无法测量者;(3)妊娠期或哺乳期女性;(4)先前有或继发性恶性肿瘤;(5)曾接受过免疫治疗或放疗;(6)有精神病史;(7)合并血液系统疾病。所有患者中,男性 53 例,女性 47 例;年龄 31~75 岁,平均 (58.94 ± 12.06) 岁;病理类型:肺腺癌 64 例,肺鳞癌 36 例;肿瘤结转移分类 (tumor node metastasis classification, TNM 分期): I 期 12 例, II 期 15 例, III 期 42 例, IV 期 31 例;淋巴结转移:无 28 例,有 72 例。本研究获得病人及家属知情同意,且符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 获取每例病人的正常癌旁组织及癌组织标本,经石蜡包埋、切片(厚度 < 5 mm,长度 < 10 mm)、固定、漂洗、脱水、透明、透蜡、包埋、整修、切片(厚度 4 mm)。

1.2.2 固定化蛋白质印迹法 分别用 RIPA 组织

裂解液裂解癌旁组织和癌组织,提取组织总蛋白,使用蛋白定量试剂盒检测组织提取液的蛋白浓度,每例标本取 50 μg 蛋白进行电泳,经 10% 聚丙烯酰胺电泳分离后,电转移至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上,封闭后,加一抗 (兔抗人 LRRK2 多克隆抗体,英国 Abcam 公司;兔抗人 PPBP 多克隆抗体,台湾 abnova 公司)二抗 (辣根过氧化物酶结合羊抗兔多克隆抗体)进行杂交,ECL 化学发光试剂盒 (由上海贝博生物科技公司提供)检测杂交信号,发光显影于感光胶片上。

1.2.3 免疫组织化学法 待检组织切片置于 30 °C 恒温箱中烤 20 min 或在室温下放置 1 h,二甲苯中浸泡 10 min,更换 1 次二甲苯再浸泡 10 min,磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗 3 次,5 min/次,3% H₂O₂ (80% 甲醇)滴在组织芯片 (tissue microarray, TMA) 上,室温下静置 10 min, PBS 冲洗 3 次,5 min/次,在水浴锅中加入枸橼酸钠缓冲液 (pH = 6.0),加热到 95 °C 时放入切片,再加热 12 min 左右, PBS 冲洗 3 次,5 min/次,滴加山羊血清封闭液进行封闭,室温静置 20 min 后甩去多余液体;按检测目的蛋白的不同,在不同切片分别滴加各类山羊抗兔一抗 50 μL,室温静置 1 h,或 4 °C 过夜;加入 PBS 替代一抗作为阴性对照,阳性对照选取预实验中的阳性切片;检测时需在 37 °C 复温 45 min; PBS 冲洗 3 次,2 min/次;滴加抗山羊生物素标记二抗 45~50 μL,室温静置 1 h;二抗中加入 0.05% tween-20 以增加细胞通透性; PBS 冲洗 3 次,5 min/次;在显微镜下操作,二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色 5~10 min; PBS 或自来水流动冲洗 10 min;苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE 染色) 复染 2 min;盐酸酒精分化、氨水反蓝 15 s;流动自来水冲洗 10~15 min;脱水、透明后,中性树胶封片待检、保存;显微镜下观察,拍照。

1.3 收集临床资料及条带测定

收集患者的年龄、性别、肿瘤直径、TNM 分期、病理类型、淋巴结转移、分化程度、术后生存状态等。条带测定:应用 SLICPS2000 型裂隙灯图像分析测定条带吸光度 (optical density, OD),以 OD 值表示 LRRK2、PPBP 蛋白的相对表达量,以此来反映两个蛋白的表达差异。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0、MedCalc 软件进行统计学分析。服从正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较行 *t* 检验;非正态分布的计量资料以中位数 (范

围)表示,组间比较采用非参数检验;计数资料以 $[n(%)]$ 表示,组间比较行 χ^2 检验;采用逐步回归筛选变量进行多因素 COX 回归分析,以优势比(odds ratio, OR)和 95% 置信区间(confidence interval, CI)表示各因素对 NSCLC 患者预后的影响,应用 Kaplan-Meier 生存分析比较 LRRK2、PPBP 蛋白的高表达与低表达对患者预后的影响。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织与癌旁组织中 LRRK2、PPBP 蛋白的表达

NSCLC 组织中 LRRK2 蛋白低于癌旁组织($P < 0.05$),PPBP 蛋白的相对表达量均高于癌旁组织($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 NSCLC 组织与癌旁组织中 LRRK2、PPBP 蛋白的表达差异($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LRRK2 蛋白	PPBP 蛋白
NSCLC 组织	100	71.66 ± 21.57	140.36 ± 45.32
癌旁组织	100	171.29 ± 53.08	71.85 ± 20.79
<i>t</i> 值	-	17.389	13.740
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001

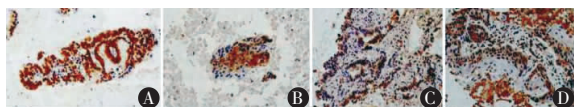


图 1 NSCLC 组织中 LRRK2、PPBP 蛋白表达(10×40)

A.肺腺癌患者免疫组化 LRRK2 蛋白表达情况;B.肺鳞癌患者免疫组化 LRRK2 蛋白表达情况;C.肺腺癌患者免疫组化 PPBP 蛋白表达情况;D.肺鳞癌患者免疫组化 PPBP 蛋白表达情况。

2.2 LRRK2 蛋白表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系

LRRK2 蛋白在不同分化程度及不同 TNM 分期 NSCLC 癌组织中的相对表达量差异有统计学意义($P < 0.05$),而 LRRK2 蛋白在癌组织中的表达量与 NSCLC 患者肿瘤直径、病理类型、淋巴结转移无关($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 PPBP 蛋白表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系

PPBP 蛋白在是否淋巴结转移及不同 TNM 分期 NSCLC 患者癌组织中的相对表达量差异有统计学意义($P < 0.05$),而 LRRK2 蛋白在癌组织中的表达量与 NSCLC 患者肿瘤直径、病理类型、分化程度无关($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 LRRK2 蛋白表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

临床特征	例数	LRRK2 蛋白	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
肿瘤直径(cm)			0.253	0.801
≥3	65	169.88 ± 43.15		
<3	35	172.05 ± 39.64		
病理类型			0.078	0.938
肺腺癌	64	170.83 ± 42.30		
肺鳞癌	36	171.55 ± 44.98		
淋巴结转移			0.433	0.666
有	72	168.28 ± 42.73		
无	28	172.46 ± 43.55		
分化程度			2.332	0.022
高、中分化	32	164.55 ± 36.42		
低分化	68	185.61 ± 52.38		
TNM 分期			2.119	0.037
Ⅲ、Ⅳ期	73	155.34 ± 41.06		
I、Ⅱ期	37	177.19 ± 47.38		

表 3 PPBP 蛋白表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

临床特征	例数	LRRK2 蛋白	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
肿瘤直径(cm)			1.036	0.303
≥3	65	142.37 ± 29.15		
<3	35	136.33 ± 20.37		
病理类型			0.787	0.433
肺腺癌	64	141.92 ± 28.03		
肺鳞癌	36	137.59 ± 22.45		
淋巴结转移			2.671	0.009
有	72	144.52 ± 26.58		
无	28	129.66 ± 20.17		
分化程度			0.726	0.469
高、中分化	32	143.15 ± 25.44		
低分化	68	139.05 ± 26.73		
TNM 分期			3.436	0.001
Ⅲ、Ⅳ期	73	146.02 ± 29.15		
I、Ⅱ期	37	125.06 ± 20.30		

2.4 影响 NSCLC 患者预后的多因素 Cox 回归分析

随访 1 年,1 年生存率为 84.00% (84/100),以患者预后为因变量,年龄、性别、肿瘤直径、病理类型、淋巴结转移、分化程度、TNM 分期、LRRK2、PPBP 蛋白为自变量,进行多因素 Cox 回归分析。结果显示,TNM 分期($OR = 2.855$)、LRRK2($OR = 0.217$)、PPBP 蛋白($OR = 2.812$)是影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 影响 NSCLC 患者预后的多因素 Cox 回归分析

因素	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	95% CI 值
年龄	0.249	0.171	2.120	0.146	1.283	0.917 ~ 1.793
性别	-0.175	0.160	1.196	0.275	0.839	0.613 ~ 1.149
肿瘤直径	0.237	0.133	3.175	0.075	1.267	0.977 ~ 1.645
病理类型	0.125	0.091	1.887	0.170	1.133	0.948 ~ 1.354
TNM 分期	1.049	0.356	8.683	0.003	2.855	1.421 ~ 5.736
淋巴结转移	0.338	0.291	1.349	0.246	1.402	0.793 ~ 2.480
LRRK2	-1.529	0.451	11.494	0.001	0.217	0.090 ~ 0.525
PPBP	1.034	0.309	11.198	0.001	2.812	1.535 ~ 5.153
常项	11.985	29.263	0.168	0.682	-	-

2.5 LRRK2、PPBP 蛋白表达量与 NSCLC 患者 1 年生存率的关系

生存分析显示, LRRK2 低表达组 1 年的生存率高于 LRRK2 高表达组 ($\chi^2 = 4.848, P = 0.028$), PPBP 高表达组 1 年的生存率高于 PPBP 低表达组 ($\chi^2 = 9.641, P = 0.002$)。见图 2。

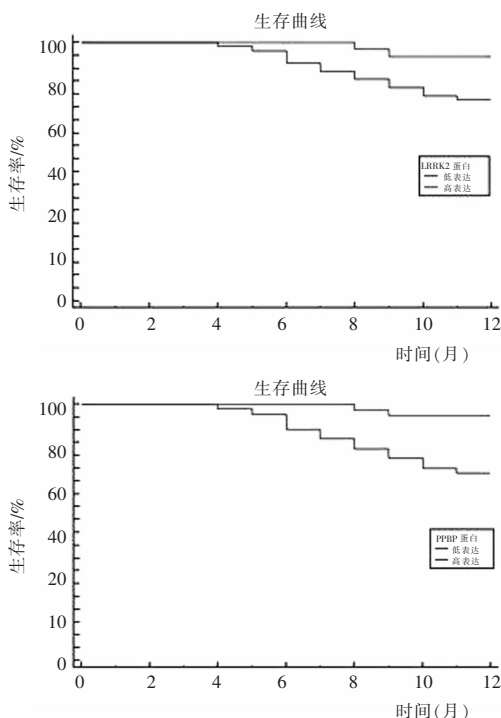


图 2 生存曲线分析

3 讨论

自人类全基因组计划开始以来,利用基因技术寻找疾病发展中的生物标记物得到了快速发展和普及^[5]。研究的生物数据主要包括基因组学数据、转录组学数据、蛋白组学数据、表观基因组学数据、代谢组学数据^[6]。这些数据为研究工作带来了极大的便利,它们主要储存于数据库:癌症基因组图谱

(the cancer genome atlas, TCGA) 和人类肿瘤相关的基因表达汇编 (gene expression omnibus, GEO)^[7]。通过 TCGA 计划,已经成功绘制了卵巢癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤等癌症的特定基因组变化图谱^[8-9]。本研究通过分析 120 例临床样本数据,发现肺癌病人癌旁组织与肿瘤组织中表达具有显著差异的 14 个基因,分别为 IL6、COL1A1、GNG11、LRRK2、TOP2A、CDH5、CXCR2、CAV1、PPBP、TIMP1、CD36、THBS2、CXCL2 和 MMP1。其中, NSCLC 组织中 LRRK2 蛋白低于癌旁组织,而 PPBP 蛋白的相对表达量均高于癌旁组织, LRRK2 蛋白在不同分化程度、PPBP 蛋白在是否淋巴结转移、及两者在不同 TNM 分期 NSCLC 患者癌组织中的相对表达量、均具有统计学差异。故本研究着重探讨 LRRK2、PPBP 两个基因的差异表达对 NSCLC 患者预后的影响。

Lebovitz 等^[10]证实 NSCLC 肺癌中调节自噬的基因组和转录组改变的基因表达显著减少,且一组肺癌细胞系中 LRRK2 蛋白的表达也减少或缺失,但 LRRK2 在癌症中的病理作用及其对自噬状态和致癌性的影响尚未深入研究^[11]。LRRK2 激酶结构域可以刺激帕金森病细胞系的自噬,并且众多肿瘤是利用提高的自噬能力来维持代谢压力和化疗^[12]。因此,探讨肺癌中致病性 LRRK2 介导的自噬作用,可为使用自噬抑制剂治疗肺癌的临床策略提供一定的参考^[13]。本研究显示 LRRK2 蛋白低表达或缺失可能影响 NSCLC 患者预后。

PPBP 属于 CXC 趋化因子亚家族,能有效促进血管生成、肿瘤的发生和转移。PPBP 在多种癌症细胞中表达增高,并且在癌组织中的表达较癌旁组织高,然其具体作用机制尚未清楚^[14]。Paola 等^[15]指出,PPBP 能提高对 NSCLC 患者 DNA 诊断的准确性,尤其对早期肿瘤的诊断。多数肿瘤可自分泌 CXC 趋化因子, CACL2、CACL3、CXCL9、CXCL10、CXCL11 也已被证实可影响各种肿瘤的发生及发展, NSCLC 患者体内多种 CXC 趋化因子高表达^[16-17]。PPBP 蛋白同属于 CXC 趋化因子亚家族,其高表达可能也会导致 NSCLC 患者预后不良。

综上, LRRK2、PPBP 基因在非小细胞肺癌组织中明显高表达,表达量与患者 TNM 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移及患者预后有关,但其具体作用机制仍需作进一步的基础研究。

参考文献

[1] 安云霞,刘畅,程相松,等.含铂同步化疗与靶向治疗对非小细胞肺癌脑转移患者疗效的比较[J].实用癌症杂志,2018,33(7):1158-1160,1164.

- [2] 王超,刘侠,董迪,等.基于影像组学的非小细胞肺癌淋巴结转移预测[J].自动化学报,2019,45(6):1087-1093.
- [3] Agustoni F, Suda K, Yu H, *et al.* EGFR-directed monoclonal antibodies in combination with chemotherapy for treatment of non-small-cell lung cancer; an updated review of clinical trials and new perspectives in biomarkers analysis [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2019, 72(12): 15-27.
- [4] 何建行,钟南山,杨海虹.美国国家综合癌症网络 2008 V2 非小细胞肺癌临床实践指南精确解读[J].中华医学杂志,2008, 88(40):2814-2816.
- [5] 周伟,聂军,张大发.肺腺癌患者 miR-126-5p 的差异性表达及其作用机制预测[J].南方医科大学学报,2019,39(10):1186-1190.
- [6] 张建波,刘华敏,王桂娥,等.大数据挖掘影响肺腺癌总生存的分子机制[J].青岛大学医学院学报,2018,54(6):639-642.
- [7] 唐金陵.再论观察与实验:大数据现实世界研究不能取代随机对照试验[J].中华流行病学杂志,2018,39(8):1121-1124.
- [8] 吕耀怀,曹志.大数据时代的基因信息隐私问题及其伦理方面[J].伦理学研究,2018,000(2):86-91.
- [9] 彭淑贤,李浔,刘琴,等.转录组数据分析肺腺癌和肺鳞状细胞癌中基因的差异表达[J].南方医科大学学报,2019,39(06): 641-649.
- [10] Lehovitz C, Chow N, Lam W, *et al.* Abstract 3668: Investigating a tumor suppressor role for Parkinson's susceptibility gene LRRK2 in lung cancer [J]. *Cancer Research*, 2016, 76(14 Supplement): 3668-3668.
- [11] 郭丽丽,王咏,王莹,等. SNCA 和 GBA 在帕金森病中相互作用研究进展[J].基础医学与临床,2019,39(1):97-101.
- [12] 杨璇,胡月青,刘新秀,等.帕金森病相关蛋白 LRRK2 对细胞自噬的调节和机制[J].医学综述,2018,24(11):13-18,24.
- [13] 段晨阳,向鑫明,匡磊,等.缺氧后活化 Drp1 通过偶联 LRRK2 影响多组织细胞线粒体功能的机制研究[J].第三军医大学学报,2020,42(04):326-333.
- [14] 王启源,徐红艳,姬文兰. LRRK2/NF- κ B 信号对 BCG 诱导巨噬细胞 RAW264.7 炎症应答的调控[J].中国病理生理杂志, 2018, 34(3): 528-532.
- [15] Paola U, Laura M, Gian-Luca C, *et al.* Multiple Marker Detection in Peripheral Blood for NSCLC Diagnosis [J]. *Plos One*, 2013, 8(2): e57401.
- [16] 张森,马素娜,刘飒,等. HIV/AIDS 气阴两虚证患者趋化因子信号通路差异基因分析[J].中华中医药杂志,2019,34(9): 4017-4019.
- [17] 王飞飞,刘珂,郇贝丽,等.猪源干扰素刺激基因 PPBP 荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J].中国动物传染病学报,2018,26(3):28-33.

(收稿日期:2020-08-13)

修回日期:2020-10-12)