

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.008

## 铁调素在非小细胞肺癌组织和血清中的表达 及其与临床病理特征的相关性

毛旭华<sup>1</sup>, 汤俊明<sup>1</sup>, 乔国洪<sup>1</sup>, 陈姝颖<sup>2</sup>, 井昶雯<sup>3</sup>

(1. 江苏大学附属宜兴市人民医院检验科, 江苏 无锡 214200; 2. 江苏大学附属宜兴市人民医院病理科, 江苏 无锡 214200;  
3. 南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 江苏省肿瘤医院临床肿瘤实验中心, 南京 210009)

**[摘要]** 目的: 检测非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者肿瘤组织及血清标本中铁调素的水平, 并探讨两者与其临床病理特征之间的相关性。方法: 免疫组织化学检测60例NSCLC标本中铁调素的表达, 应用ELISA检测血清中铁调素的含量, 统计两者与临床病理特征的相关性。结果: 组织中铁调素表达及血清铁调素水平与NSCLC的年龄、性别、病理类型、分化程度以及是否有淋巴结转移无显著相关性, 但均与肿瘤分期及是否有远处转移相关。组织中铁调素表达与血清中铁调素水平并无显著相关性。结论: 组织和血清中铁调素水平与NSCLC肿瘤分期及是否有远处转移相关, 具体机制需要进一步研究。

**[关键词]** 非小细胞肺癌; 铁调素; 免疫组织化学; 远处转移

## Expression of hepcidin in tumor tissues and serum and its correlation with clinicopathological features of non-small cell lung cancer

MAO Xuhua<sup>1</sup>, TANG Junming<sup>1</sup>, QIAO Guohong<sup>1</sup>, CHEN Shuying<sup>2</sup>, JING Changwen<sup>3</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Yixing People's Hospital, Jiangsu University, Wuxi Jiangsu 214200; 2. Department of Pathology, Affiliated Yixing's People Hospital, Jiangsu University, Wuxi Jiangsu 214200; 3. Clinical Cancer Research Center, Nanjing Medical University Affiliated Cancer Hospital, Cancer Institute of Jiangsu Province, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression levels of hepcidin in tumor tissues and serum of non-small cell lung cancer, and study its relationship with the clinicopathological features. **Methods:** Immunohistochemistry was applied to detect hepcidin protein in 60 non-small cell lung cancer patients. The levels of hepcidin in serum were detected by ELISA. **Results:** Both of hepcidin positive rates in tissues and hepcidin levels in serum were related to clinical stages and distant metastasis, but not with sex, gender, tumor differentiation degree, pathological pattern

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-14

通信作者 (Corresponding author): 井昶雯, Email: jcw223200@163.com

基金项目 (Foundation item): 江苏省卫生和计划生育委员会科研项目 (Z201602); 无锡市卫生和计划生育委员会面上项目 (MS201536)。This work was supported by the Scientific Research Project of Health and Family Planning Commission of Jiangsu Province (Z201602) and the Project of Health and Family Planning Commission of Wuxi City (MS201536), China.

and lymphatic metastasis. There is no relationship between the levels of hepcidin in tumor tissues and serum.

**Conclusion:** Hepcidin positive rates in tissues and levels in serum were related to clinical stages and distant metastasis in NSCLC patients. Further study is needed to explore the mechanism.

**Keywords** non-small cell lung cancer; hepcidin; immunohistochemistry; metastasis

肺癌发病率居我国各类肿瘤首位, 5年生存率不足20%<sup>[1]</sup>。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最常见的肺癌类型。编码铁调素的Hamp基因位于19号染色体, 其产物是由84个氨基酸组成的早期多肽降解成60个氨基酸组成的前体肽, 最后形成20, 22或25个氨基酸组成的多肽分子, 25个氨基酸组成的多肽分子是铁调素的主要存在方式, 且与铁调节功能相关<sup>[2]</sup>。近年来研究<sup>[3]</sup>表明铁调素与肿瘤的关系密切。本研究旨在通过检测铁调素在NSCLC患者组织和血液标本中的表达水平, 分析其与临床病理学特征的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

收集江苏省肿瘤医院2015年1月至2016年12月期间临床病理资料完整的60例NSCLC患者的手术切除标本, 所有标本均经过临床和病理明确诊断。并同时收集这60例患者的血液标本, 所有血液标本均在患者术前未接受任何治疗时采集。其中, 男34例, 女26例; 年龄43~79(中位60)岁。根据最新第七版的肺癌TNM分期标准进行TNM分期, 其中I~II期22例, III~IV期38例; 高分化者14例, 中低分化者46例; 鳞癌25例、腺癌35例; 无淋巴结转移者31例, 有淋巴结转移者29例; 有远处转移者38例, 无远处转移组22例。本研究已获得江苏省肿瘤医院伦理委员会批准。

### 1.2 试剂及引物

小鼠抗人铁调素单克隆抗体购于美国Santa Cruz公司; 双抗夹心生物素-亲和素-酶联免疫吸附试剂盒(ELISA方法)购于武汉优尔生科技股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 免疫组织化学及结果判断标准

采用EnVision法, 首先用poly-L-lysine处理载玻片, 连续石蜡4  $\mu\text{m}$ 切片, 60  $^{\circ}\text{C}$ 烘干处理1 h, 常规脱蜡、水化组织切片; pH6.0的柠檬酸修复液

修复VEGF抗原, 胰蛋白酶消化、修复处理EGFR抗原; 切片用蒸馏水冲洗1次, PBS冲洗2次; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理切片10 min, 以抑制内源性过氧化物酶, 再用PBS冲洗3次; 滴加一抗, 置于湿盒内, 4  $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜; PBS冲洗3次, 滴加EnVision<sup>TM</sup>反应30 min, PBS冲洗3次; DAB显色3~5 min; 苏木精对比复染, 中性树脂封固。

结果判断标准: 由两位具有经验丰富的病理科医生对所有切片进行双盲式阅片, 在显微镜100 $\times$ 视野下观察, 每张切片随机选择5个区域, 以肿瘤细胞和正常肺组织上皮细胞的胞质或胞核内出现明显的棕黄色或黄褐色颗粒为阳性细胞, 着色定位准确视为阳性结果。根据细胞染色强度和染色细胞所占比例分别计分, 以两积分之和判断最后的结果。按染色强度记为0~3分, 不着色为0分, 轻度着色为1分, 中度着色为2分, 强着色为3分。按阳性细胞数记为0~4分, 无着色为0分, <25%为1分, 25%~49%为2分, 50%~74%为3分,  $\geq 75\%$ 为4分。上述两项之和即为该肿瘤细胞的染色指数评分, 染色指数0~2分定义为阴性表达, 3~7分定义为阳性表达。

#### 1.3.2 ELISA

首先根据试剂盒操作流程建立标准曲线, 然后按照建立标准曲线的方法对人外周血中铁调素水平进行检测。

### 1.4 统计学处理

用SPSS 20.0统计分析软件, 组间比较时若计量资料满足正态分布用样本均数 $t$ 检验。分类变量的关联性分析采用 $\chi^2$ 检验进行统计分析, 以双侧检验水准 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织中铁调素表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

免疫组织化学实验结果显示铁调素主要表达于细胞质中(图1)。铁调素阴性则呈较弱的棕黄色着色(图1A), 而阳性者呈明显的棕黄色着色(图1B)。

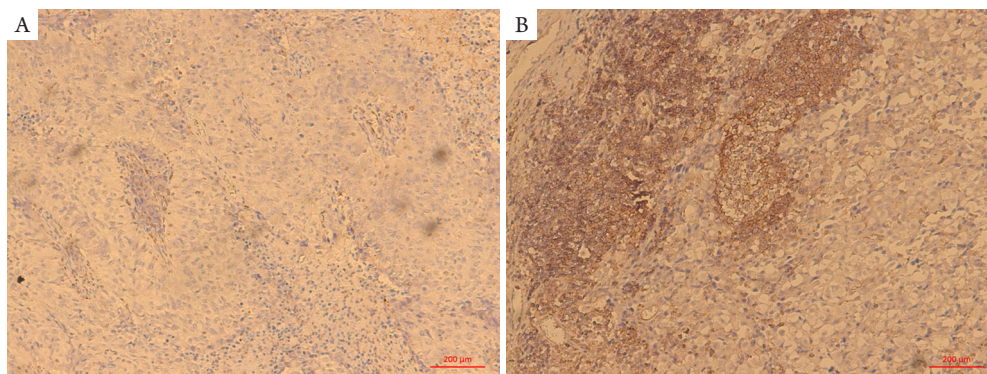


图1 铁调素在非小细胞肺癌组织中的表达( $\times 100$ )

Figure 1 Expression of hepcidin in NSCLC tissues ( $\times 100$ )

(A)阴性表达; (B)阳性表达。

(A) Negative expression; (B) Positive expression.

通过免疫组织化学结果对组织中铁调素的表达进行定性分析。将NSCLC根据年龄、性别、病理类型、分化程度、TNM分期、淋巴结与远处转移与否进行分组, 统计各组间的铁调素阳性和阴性例数。结果显示: 组织中铁调素的表达与NSCLC的年龄、性别、病理类型、分化程度以及是否有淋巴结转移无显著相关性。TNM I~II期患者的组织中铁调素阳性和阴性表达例数分别为8例和14例, 阳性率为36.36%(8/22), 而III~IV期患者铁调素阳性和阴性表达例数分别为26例和12例, 阳性率为68.42%(26/38), 差异具有统计学意义( $\chi^2=5.83$ ,  $P=0.02$ )。伴随远处转移者铁调素阳性表达率为77.27%(17/22), 无远处转移者阳性率为44.74%(17/38), 差异具有统计学意义( $\chi^2=6.00$ ,  $P=0.01$ ; 表1)。

## 2.2 血清中铁调素表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

血清铁调素水平与NSCLC的年龄、性别、病理类型、分化程度以及是否有淋巴结转移无显著相关性(均 $P>0.05$ ), 而与肿瘤分期及是否有远处转移有相关性( $P<0.05$ )。I~II期患者的血清铁调素含量为(25.74 $\pm$ 12.67) ng/mL, 而III~IV期患者铁调素含量为(33.46 $\pm$ 15.16) ng/mL, 高于早期患者, 差异有统计学意义( $t=2.02$ ,  $P=0.0486$ )。无远处转移者血清铁调素含量为(25.22 $\pm$ 11.78) ng/mL, 而伴随远处转移组远高于无远处转移组(39.98 $\pm$ 14.71) ng/mL, 差异具有统计学意义( $P<0.001$ , 表2)。

表1 组织中铁调素表达与非小细胞肺癌临床病理特征的关系

Table 1 Relationship of hepcidin expression in tumors and clinicopathologic features in NSCLC patients

病理特征	铁调素阳性	铁调素阴性	$\chi^2$	P
年龄/岁			<0.01	1.00
$\leq 60$	17	13		
$>60$	17	13		
性别			2.07	0.15
男	22	12		
女	12	14		
病理类型			0.94	0.33
鳞癌	16	9		
腺癌	18	17		
分化程度			1.42	0.23
中低分化	28	18		
高分化	6	8		
肿瘤分期			5.83	0.02
I~II	8	14		
III~IV	26	12		
淋巴结转移			0.05	0.82
无	18	13		
有	16	13		
远处转移			6.00	0.01
无	17	21		
有	17	5		

表2 血清中铁调素表达与非小细胞肺癌临床病理特征的关系

Table 2 Relationship of serum hepcidin levels and clinicopathologic features in NSCLC patients

病理特征	血清铁调素量/(ng·mL <sup>-1</sup> )	t	P
年龄/岁		0.55	0.58
≤60	29.58 ± 14.00		
>60	31.68 ± 15.49		
性别		1.37	0.18
男	32.89 ± 13.51		
女	27.68 ± 15.86		
病理类型		0.83	0.41
鳞癌	32.50 ± 14.33		
腺癌	29.30 ± 14.99		
分化程度		1.28	0.2
中低分化	31.97 ± 15.09		
高分化	26.24 ± 12.77		
肿瘤分期		2.02	0.0486
I~II	25.74 ± 12.67		
III~IV	33.46 ± 15.16		
淋巴结转移		0.24	0.81
无	31.07 ± 16.39		
有	30.17 ± 12.88		
远处转移		4.27	0.001
无	25.22 ± 11.78		
有	39.98 ± 14.71		

### 3 讨论

铁调素于2000年被发现,是肝合成并分泌的多肽类物质,表达于多种脏器,如脑、心脏、肺和胰腺中<sup>[4]</sup>。既往对铁调素的生物学功能研究主要聚焦在与铁代谢相关疾病的发病机制,目前越来越多的研究将焦点放在铁调素与肿瘤的关系上。有研究<sup>[5-7]</sup>表明某些肿瘤组织中铁调素mRNA和血清铁调素水平增高。肾癌肿瘤组织与癌旁组织相比,铁调素mRNA高表达。伴随远处转移的肾癌患者肿瘤组织中铁调素的升高程度远高于未转移组,且铁调素mRNA高表达提示总体生存率低。转移性肾癌患者血清中铁调素-25的水平明显高于未转移组,并与血清

IL-6和CRP的水平呈正相关<sup>[5]</sup>。霍奇金淋巴瘤患者血清中铁调素的水平增高,与IL-6增高水平相一致,且血清高铁调素水平的患者具有更强侵袭性的疾病特征,如IV期疾病、B症状和国际预后评分<sup>[6]</sup>。在非霍奇金淋巴瘤的弥漫大B淋巴瘤中,铁调素血清水平明显增高,且与淋巴瘤恶性特征相关<sup>[7]</sup>。

铁调素与NSCLC临床进展的研究较少。Guo等<sup>[8]</sup>将编码铁调素的hamp1基因敲除,建立hamp1<sup>-/-</sup>小鼠模型,分别向hamp1<sup>-/-</sup>小鼠和野生型小鼠尾静脉注射肺癌细胞系LL/2,野生型小鼠组肺癌发生率为47%,hamp1<sup>-/-</sup>小鼠组肺癌发生率为6%,hamp1<sup>-/-</sup>小鼠生存率明显高于野生组,表明铁调素对肺癌的发生和生存率起关键作用。Chen等<sup>[9]</sup>检测NSCLC组织及癌旁组织中铁调素mRNA的表达情况,发现多数肺癌组织中铁调素的表达明显高于癌旁组织,且铁调素在NSCLC患者血清中的表达增高而且与淋巴结转移和肿瘤分期呈正相关。本研究并未在mRNA水平上检测铁调素,通过免疫组织化学检测铁调素的蛋白水平,结果发现组织中铁调素表达与NSCLC的年龄、性别、病理类型、分化程度以及是否有淋巴结转移无显著相关性,而与肿瘤分期及是否有远处转移相关。这意味着III~IV期和伴随远处转移的NSCLC患者癌组织中铁调素阳性率更高,且血清中铁调素的水平也与临床分期和远处转移相关,与淋巴结转移并无关联,这与Chen等<sup>[9]</sup>的研究并不一致,可能是标本及检测方法不同所致。

血清中铁调素水平增高及参与NSCLC进展的机制尚不明确。本研究通过Spearman相关性分析对组织中铁调素表达与血清中铁调素水平的关系进行统计,结果表明NSCLC患者血清铁调素水平与肿瘤组织中的铁调素表达并无相关性,提示循环铁调素的起源可能不是癌细胞。猜测在NSCLC发生发展中,肿瘤刺激多种炎症介质的释放,IL-6/STAT3和BMP/Smad4信号通路可能被激活,随着病情的进展和转移,IL-6等炎症因子在体内积聚,从而刺激肝分泌大量铁调素。本研究并未涉及NSCLC中铁调素和上游信号通路IL-6/STAT3的关系研究,两者的相关性需要进一步研究。此外,后续研究将增加随访,进一步明确血清铁调素与NSCLC进展及预后的作用。

本研究通过检测组织和血液样本中铁调素表达,发现NSCLC组织和血清中铁调素水平与肿瘤

分期及是否有远处转移相关, 铁调素表达与血清中铁调素水平并无显著相关性, 为NSCLC的治疗开辟了新的理论和实验依据。

## 参考文献

1. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
2. Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. J Biol Chem, 2001, 276(11): 7806-7810.
3. Nicolae CD, Coman OA, Ene C, et al. Hepcidin in neoplastic disease[J]. J Med Life, 2013, 6(3): 355-360.
4. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload[J]. J Biol Chem, 2001, 276(11): 7811-7819.
5. Wang SJ, Gao C, Chen BA. Advancement of the study on iron metabolism and regulation in tumor cells[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(4): 451-455.
6. Hohaus S, Massini G, Giachelia M, et al. Anemia in Hodgkin's lymphoma: the role of interleukin-6 and hepcidin[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(15): 2538-2543.
7. Tisi MC, Bozzoli V, Giachelia M, et al. Anemia in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: the role of interleukin-6, hepcidin and erythropoietin[J]. Leuk Lymphoma, 2014, 55(2): 270-275.
8. Guo W, Zhang S, Chen Y, et al. An important role of the hepcidin-ferroportin signaling in affecting tumor growth and metastasis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47(9): 703-715.
9. Chen Q, Wang L, Ma Y, et al. Increased hepcidin expression in non-small cell lung cancer tissue and serum is associated with clinical stage[J]. Thorac Cancer, 2014, 5(1): 14-24.

**本文引用:** 毛旭华, 汤俊明, 乔国洪, 陈姝颖, 井昶雯. 铁调素在非小细胞肺癌组织和血清中的表达及其与临床病理特征的相关性[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(9): 1816-1820. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.008

**Cite this article as:** MAO Xuhua, TANG Junming, QIAO Guohong, CHEN Shuying, JING Changwen. Expression of hepcidin in tumor tissues and serum and its correlation with clinicopathological features of non-small cell lung cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(9): 1816-1820. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.008