

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.010

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.010>

CHCHD2 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

杨锋, 夏靖华, 孙盈, 王雪娇, 文苗苗, 李小飞, 张志培

(第四军医大学唐都医院胸腔外科, 西安 710038)

[摘要] 目的: 检测CHCHD2在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织和相应正常组织中的表达, 探讨其在NSCLC发生发展过程中的可能作用及临床意义。方法: 收集209例NSCLC组织, 采用免疫组织化学法检测NSCLC及相应正常组织中CHCHD2的表达, 分析其在临床病理因素中的差异性。结果: CHCHD2主要定位于细胞质中, 癌组织与正常组织中表达阳性率差异有统计学意义($P < 0.001$)。CHCHD2在鳞癌亚型间表达差异无统计学意义($P = 0.957$); 在腺癌亚型间表达差异有统计学意义($P = 0.027$); 在腺癌、鳞癌的病理分级间, 表达差异均有统计学意义($P = 0.009$, $P = 0.006$); 在TNM分期的T分期和N分期中表达差异有统计学意义($P = 0.011$, $P < 0.001$)。结论: CHCHD2在NSCLC中高表达, 是NSCLC组织与相应正常组织表达的差异蛋白, 其高表达可能会促进NSCLC的发展、侵袭和转移, 有望成为NSCLC不良预后的指标。

[关键词] 非小细胞肺癌; CHCHD2; 免疫组织化学

Expression and clinical significance of CHCHD2 in non-small cell lung cancer patients

YANG Feng, XIA Jinghua, SUN Ying, WANG Xuejiao, WEN Miaomiao, LI Xiaofei, ZHANG Zhipei

(Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract **Objective:** To detect the expression of CHCHD2 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and normal tissues, and investigate its role and clinical significance on the process of NSCLC. **Methods:** The expression of CHCHD2 in NSCLC tissues and paired normal tissues of 209 cases was detected by immunohistochemistry method. The difference of CHCHD2 expression in clinicopathological parameters were analyzed by statistics. **Results:** Positive staining of CHCHD2 was mainly in cytoplasm. The positive expression rates of the CHCHD2 protein in NSCLC tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P < 0.001$). In SCCs, no significant difference was found that CHCHD2 expression among different subtypes ($P = 0.957$). However, in ADCs there were significant difference of CHCHD2 expression in different subtypes ($P = 0.027$). The expression of CHCHD2 was significant difference among groups of pathological grading groups of SSCs and ADCs ($P = 0.009$, $P = 0.006$). There were significant difference of the CHCHD2 expression among various groups of T and N clinical stages ($P = 0.011$, $P < 0.001$). **Conclusion:** CHCHD2 is over-expressed in NSCLC and differentially expressed proteins between

收稿日期 (Date of reception): 2017-08-23

通信作者 (Corresponding author): 李小飞, Email: lxfchest@fmmu.edu.cn; 张志培, Email: zzpzzy@fmmu.edu.cn

NSCLC tissues and normal tissues. CHCHD2 over-expressed in NSCLC, might promote the development, invasion and metastasis of NSCLC, which is expected to be a prognostic indicator for NSCLC.

Keywords non-small lung cancer; CHCHD2; immunohistochemistry

肺癌是导致恶性肿瘤患者死亡的首要因素^[1]。非小细胞肺癌约占肺癌总数的85%，其5年总生存率约15%^[2]。因此探寻非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)原癌基因及肿瘤抑制基因的分子表达谱，有望确立治疗NSCLC新的靶标分子^[3]。

CHCHD2(Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2)位于人类7p11.2染色体区，含4个外显子，由456个碱基对编码151个氨基酸，它是含有CHCH结构域蛋白家族的成员之一。CHCHD2含有N端线粒体定位序列和C端CHCH保守结构域，共同存在时具有促进成纤维细胞迁移的功能^[4]。CHCHD2在人类细胞中的功能还不完全清楚，有报道称CHCHD2在人类细胞具有促进翻译的作用^[5]，在成纤维细胞系NIH3T3中过表达CHCHD2具有促进细胞迁移和改变细胞黏附的作用^[4]。也有研究发现肝细胞肝癌中CHCHD2有高表达现象^[6]，而在NSCLC中CHCHD2与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)有共扩增现象^[7]。但是CHCHD2的表达在NSCLC发生发展中的作用尚不明确。因此，本文检测CHCHD2在NSCLC组织及相应正常组织中的表达，探讨CHCHD2与NSCLC临床特征的关系，为明确NSCLC发生发展及其分子机制提供依据，同时为NSCLC的预防、治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集2006年3月至2011年12月第四军医大学唐都医院胸腔外科手术切除的NSCLC组织及正常组织209例，其中正常组织为取自癌旁5 cm以上且病理检查为正常形态的肺组织。所有患者术前均未接受化疗、放疗及其他抗癌治疗。男157例，女52例，年龄30~81(中位62)岁；根据WHO组织学分类、分级，将本研究209例NSCLC分为腺癌83例，其中高分化9例，中分化53例，低分化21例，鳞癌126例其中高分化7例，中分化83例，低分化36例；根据国际抗癌联盟(The Union for International Cancer Control, UICC)肺癌TNM分期标准，分为T1~T4期分别为17, 145, 46, 1例，N0~N3期分

别为99, 57, 52, 1例。本研究已通过第四军医大学唐都医院伦理委员会批准，所有入组患者或其家属均已签署知情同意书。

1.2 试剂

EnVision™两步法免疫组织化学试剂盒购自西安基因公司DAKO产品。CHCHD2蛋白抗体为药明康德ABGENT商品化兔源性抗体。

1.3 免疫组织化学法及结果判断

组织经10%中性甲醛溶液固定，常规脱水、透明、包埋后，4 μm切片。二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化；3 mol/L尿素消化；柠檬酸缓冲液微波修复，冷却至室温；3% H₂O₂溶液阻断内源性过氧化物酶；10%山羊血清封闭；加一抗4 ℃孵育过夜；37 ℃复温；加二抗，37 ℃恒温反应(除血清封闭外，其余各步均需用PBS漂洗3 min ×3次)；DAB显色。苏木精复染，1%盐酸乙醇分化，水洗返蓝，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，光镜下观察。每张切片于高倍镜(EnVision ×400)下随机取5个不同视野，观察计数阳性率和阳性强度。用已知阳性表达的组织作为阳性对照，以PBS代替一抗作为空白对照。

所有切片均经2位有经验的病理医师采用双盲法阅片，用阳性细胞染色强度和阳性细胞在癌细胞中的比例来判定染色结果。1)染色强度评分：无显色为0分，浅黄色或黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐色为3分。2)染色细胞的阳性比例评分：≤5%为0分，6%~25%为1分，26%~50%为2分，51%~75%为3分，>75%为4分。染色强度评分与染色细胞的阳性比例评分相乘，积分0分为阴性(-)，1~4分为弱阳性(+)，5~8分为阳性(++)，9~12分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0对免疫组织化学结果数据进行统计学分析：CHCHD2在NSCLC组织和正常组织中表达的差异性用Wilcoxon(W)检验；在两个独立样本间表达差异性用Mann-Whitney U秩和检验；在多个独立样本间的表达差异性用Kruskal-Wallis H秩和检验。

2 结果

2.1 CHCHD2 在 NSCLC 和相应正常组织中的表达和定位

CHCHD2 在腺癌中表达的阳性率为 97.6%(81/83), 在相应正常组织中表达的阳性率

为 14.5%(12/83), 差异有统计学意义($P < 0.001$); CHCHD2 在鳞癌中表达的阳性率为 92.1%(116/126), 在相应正常组织中表达的阳性率为 8.7%(11/126), 差异有统计学意义($P < 0.001$, 表 1)。CHCHD2 主要表达于细胞质中, 一些也表达于细胞核中(图 1-2)。

表 1 CHCHD2 在癌组织和相应正常组织中表达的差异性

Table 1 Difference of CHCHD2 expression in tumor tissues and corresponding normal tissues

组别	CHCHD2 表达					Z	P
	-	+	++	+++	总计		
腺癌						-8.113	<0.001
-	2	26	36	7	71		
+	0	1	10	1	12		
鳞癌						-9.524	<0.001
-	10	52	47	6	115		
+	0	2	6	3	11		

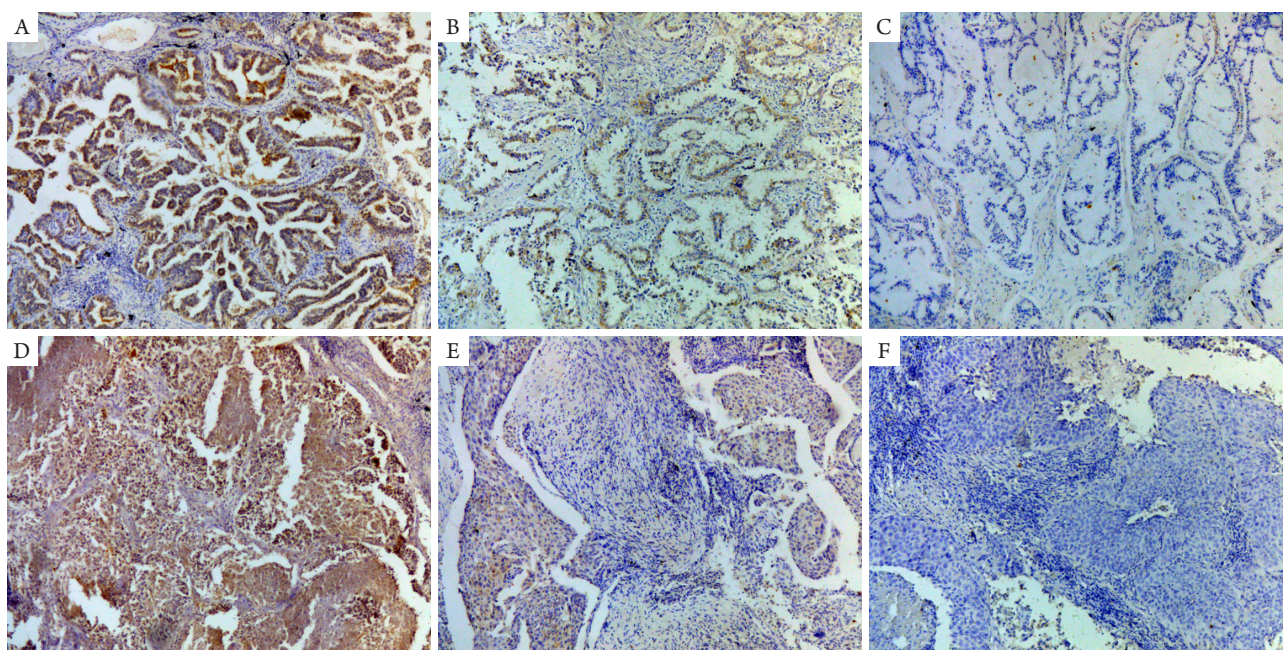


图 1 CHCHD2 在 NSCLC 中的表达 (EnVision, $\times 100$)

Figure 1 Expression of CHCHD2 in NSCLC (EnVision, $\times 100$)

(A) CHCHD2 在腺癌中高表达; (B) CHCHD2 在腺癌中低表达; (C) CHCHD2 在腺癌中不表达; (D) CHCHD2 在鳞癌中高表达; (E) CHCHD2 在鳞癌中低表达; (F) CHCHD2 在鳞癌中不表达。

(A) High expression of CHCHD2 in ADC; (B) Low expression of CHCHD2 in ADC; (C) Negative expression of CHCHD2 in ADC; (D) High expression of CHCHD2 in SCC; (E) Low expression of CHCHD2 in SCC; (F) Negative expression of CHCHD2 in SCC.

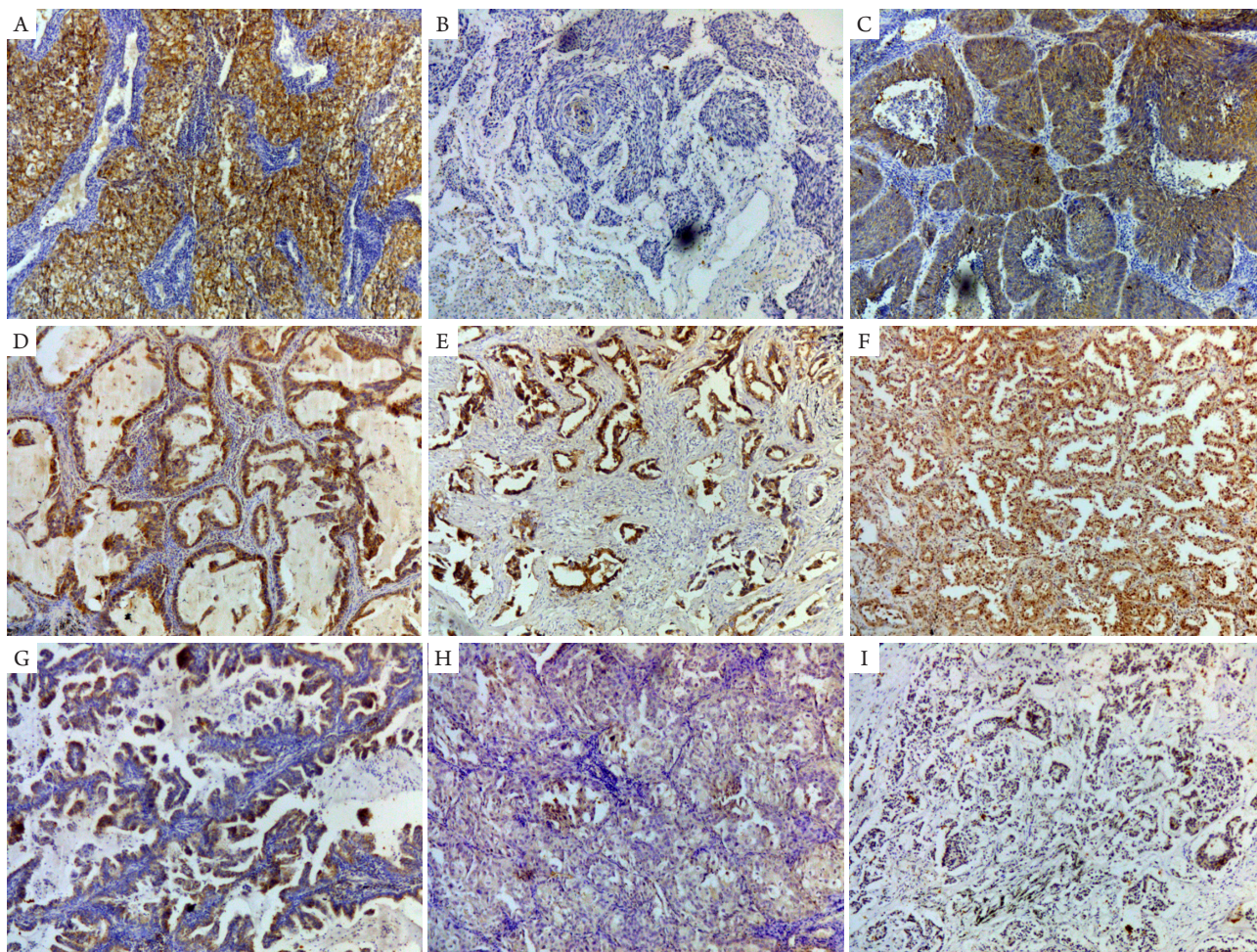


图2 CHCHD2在腺癌和鳞癌亚型中的表达(EnVision, $\times 100$)

Figure 2 CHCHD2 expression in subtypes of ADC and SCC (EnVision, $\times 100$)

(A) CHCHD2在非角化型鳞癌中表达; (B) CHCHD2在角化型鳞癌中表达; (C) CHCHD2在基底样型鳞癌中表达; (D) CHCHD2在伏壁型腺癌中的表达; (E) CHCHD2在腺泡型腺癌中的表达; (F) CHCHD2在乳头型腺癌中的表达; (G) CHCHD2在微乳头型腺癌中的表达; (H) CHCHD2在实体型腺癌中的表达; (I) CHCHD2在气道播散型腺癌中的表达。

(A) CHCHD2 expression in non-keratinizing SCC; (B) CHCHD2 expression in keratinizing SCC; (C) CHCHD2 expression in basaloid SCC; (D) CHCHD2 expression in lepidic predominant ADC; (E) CHCHD2 expression in acinar predominant ADC; (F) CHCHD2 expression in Papillary predominant ADC; (G) CHCHD2 expression in micropapillary predominant ADC; (H) CHCHD2 expression in solid predominant ADC; (I) CHCHD2 expression in spread through air spaces predominant ADC.

2.2 CHCHD2在WHO肺癌组织学分类中表达的差异性

根据2015版WHO肺癌组织学分类将126例鳞癌组织分为角化型26.2%(33/126)、非角化型55.5%(70/126)和基底样型18.3%(23/126)等3个类型;按癌细胞的生长方式将肺腺癌分为伏壁型10.8%(9/83)、腺泡型32.5%(27/83)、乳头型13.2%(11/83)、微乳头型10.8%(9/83)、实体型20.5%(17/83)和气道播散型12.0%(10/83)等6个亚型(图2)。在鳞癌的组织学亚型组间,CHCHD2表达差异无统计学意义($P=0.957$)。在腺癌的组织学

分类亚型组间,CHCHD2表达差异无统计学意义($P=0.025$,表2)。

2.3 CHCHD2在鳞癌和腺癌不同病理分级间表达的差异性

在鳞癌高、中、低分化的不同组中CHCHD2强阳性表达率分别为14.7%(1/7), 43.4%(36/83), 69.4%(25/36), 差异有统计学意义($P=0.009$);在腺癌的高、中、低分化组中CHCHD2强阳性表达率分别为22.2%, 64.2%, 85.7%, 差异有统计学意义($P=0.006$,表3)。

2.4 CHCHD2 在 NSCLC 的 TNM 分期中表达的差异性

根据肿瘤的大小和特征分为T1~T4期, 在T分期中CHCHD2表达的阳性及强阳性率分别为T1期29.4%(5/17), T2期53.1%(77/145), T3~T4期72.3%(34/47, T4分期中的1例强阳性标本归入T3中), CHCHD2表达在T分期中差异有统计学意义

($P=0.011$); 根据区域淋巴结转移情况分为N0~N3期, CHCHD2表达的强阳性率在N分期中分别为N0期41.4%(41/99), N1期56.1%(32/57), N2~N3期81.1%(43/53, N3分期中的1例强阳性标本归入N2中), CHCHD2表达在N分期中差异具有统计学意义($P<0.001$, 表4)。在本组标本中无远处转移组织, 故未对M分期中CHCHD2表达情况进行分析。

表2 CHCHD2在鳞癌和腺癌WHO组织学分类中表达的差异性

Table 2 Difference of CHCHD2 expression in the new WHO classification of squamous cell carcinoma and adenocarcinomas

组织学分类亚型	n	CHCHD2表达				χ^2	P
		-	+	++	+++		
鳞癌	126					0.087	0.957
角化型鳞癌	33	4	12	15	2		
非角化型鳞癌	70	5	32	27	6		
基底样型	23	1	10	11	1		
腺癌	83					12.608	0.027
伏壁型腺癌	9	0	5	4	0		
腺泡型腺癌	27	1	8	17	1		
乳头型腺癌	11	0	2	5	4		
微乳头型腺癌	9	0	2	4	3		
实体性腺癌	17	1	8	8	0		
气道播散型腺癌	10	0	2	8	0		

表3 鳞癌和腺癌不同病理分级间CHCHD2表达的差异性

Table 3 Difference of CHCHD2 expression in different grade of SCC and ADC

病理分级	n	CHCHD2表达				χ^2	P
		-	+	++	+++		
鳞癌	126					9.446	0.009
高分化	7	0	6	1	0		
中分化	83	7	40	33	3		
低分化	36	3	8	19	6		
腺癌	83					10.081	0.006
高分化	9	0	7	2	0		
中分化	53	2	17	29	5		
低分化	21	0	3	15	3		

表4 CHCHD2在NSCLC的TNM分期中表达的差异性

Table 4 Difference of CHCHD2 expression in TNM stage of NSCLC

TNM分期	n	CHCHD2表达				χ^2	P
		-	+	++	+++		
T分期	209					11.188	0.011
T1	17	1	11	4	1		
T2	145	9	59	67	10		
T3	46	2	11	28	5		
T4	1	0	0	0	1		
N分期	209					24.350	<0.001
N0	99	9	49	39	2		
N1	57	1	24	25	7		
N2	52	2	8	34	8		
N3	1	0	0	1	0		

3 讨论

非小细胞肺癌的发生发展与多种因素相关,发病过程极为复杂,目前仍无特异、有效的靶点作为可靠的预后指标^[8-9],因此NSCLC的发生发展原因及其机制或预后因子的研究仍有待加强。CHCHD2是一个从酵母到人类多个物种间都很保守的蛋白,在人类和鼠类中CHCHD2有87%的氨基酸保守序列^[10]。CHCHD2具有C端的CHCH结构域,此结构域的功能尚未明确,具有此结构域的一些其他蛋白行使不同的功能^[11-12]。已有一些关于CHCHD2的研究,但CHCHD2的功能尚未明确。本文旨在检测CHCHD2在NSCLC中的表达,探讨CHCHD2表达与NSCLC临床特征的关系,为寻找CHCHD2在NSCLC发生发展中的作用提供依据。

有研究^[11-12]证实许多含有CHCH结构域的蛋白定位于线粒体内膜或膜间隙。本研究发现CHCHD2在NSCLC组织中主要表达于细胞质中,因此,CHCHD2可能定位于胞质中的线粒体,是线粒体蛋白。CHCHD2在鳞癌和腺癌中表达的阳性率均显著高于相应正常组织表达的阳性率。有关转录组基因分析^[13-14]报道:CHCHD2基因在癌组织中表达高于相应正常组织。综上提示CHCHD2在NSCLC中高表达,是肺癌组织和正常组织的差异蛋白。

进一步的组织学亚型分类是个体化诊断和治疗的需要^[15]。本研究中CHCHD2在鳞癌亚型中表达差异无统计学意义,在腺癌组织学分类亚型中差异统计学意义。有研究显示微乳头型、实体型

生长模式腺癌表现出不良的预后^[16-17],乳头型腺癌也表现出更短的生存期^[17]。本研究发现这些类型的腺癌中CHCHD2强阳性表达率较高,分别为77.8%,47.1%和81.8%。综上结果提示CHCHD2更可能高表达于具有不良预后的腺癌亚型,CHCHD2的表达可能与肿瘤的高恶性状态相关。

随后本研究分析CHCHD2在鳞癌、腺癌病理分级中表达的差异性。在高分化、中分化和低分化的鳞癌组织中,CHCHD2强阳性的表达率分别为14.7%,43.4%和69.4%,即CHCHD2在鳞癌中的表达强度与细胞分化程度呈负相关;在高分化、中分化和低分化的腺癌组织中,CHCHD2阳性和强阳性的表达率分别为22.2%,64.2%和85.7%,即CHCHD2在腺癌中的表达强度与细胞分化程度呈负相关;提示CHCHD2高表达可能促进NSCLC细胞增殖与分化。在临床TNM分期间,CHCHD2表达的强度随临床TNM分期的增高而增强,表明CHCHD2表达高低可能与NSCLC的大小、淋巴结转移程度有关,进一步提示CHCHD2高表达可能会促进NSCLC的发展、侵袭与转移。CHCHD2能增强细胞迁移活性^[18],过表达CHCHD2能促进成纤维细胞NIH3T3的迁移,而敲除内源性CHCHD2会降低其迁移活性^[4],结合我们的临床结果,提示CHCHD2高表达可能会促进NSCLC发展、侵袭和转移,因此,CHCHD2有望成为NSCLC不良预后的靶标。

综上所述,CHCHD2在NSCLC中高表达,是癌组织和正常组织的差异蛋白。CHCHD2可能是

线粒体蛋白, 在NSCLC发生发展中起促进作用, 与NSCLC的不良预后相关, 有望成为NSCLC不良预后的靶标。但CHCHD2在NSCLC中的作用机制尚不清楚, 需进一步研究。

参考文献

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
2. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 359(13): 1367-1380.
3. Kabbout M, Garcia MM, Fujimoto J, et al. ETS2 mediated tumor suppressive function and MET oncogene inhibition in human non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(13): 3383-3395.
4. Seo M, Lee WH, Suk K. Identification of novel cell migration-promoting genes by a functional genetic screen[J]. FASEB J, 2010, 24(2): 464-478.
5. Nayak RR, Kearns M, Spielman RS, et al. Coexpression network based on natural variation in human gene expression reveals gene interactions and functions[J]. Genome Res, 2009, 19(11): 1953-1962.
6. Song R, Yang B, Gao X, et al. Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein transcriptionally regulates CHCHD2 associated with the molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4053-4062.
7. Wei Y, Vellanki RN, Coyaud E, et al. CHCHD2 is coamplified with EGFR in NSCLC and regulates mitochondrial function and cell migration[J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(7): 1119-1129.
8. Yoon SH. Immunotherapy for non-small cell lung cancer[J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2014, 77(3): 111-115.
9. Printz C. Targeted therapy in lung cancer: survival, quality of life improved for some patients[J]. Cancer, 2014, 120(17): 2625-2626.
10. Liu Y, Clegg HV, Leslie PL, et al. CHCHD2 inhibits apoptosis by interacting with Bcl-XL to regulate Bax activation[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(6): 1035-1046.
11. Arnesano F, Balatri E, Banci L, et al. Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding[J]. Structure, 2005, 13(5): 713-722.
12. Nobrega MP, Bandeira SC, Beers J, et al. Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(43): 40206-40211.
13. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43-66.
14. Zhuang X, Herbert JM, Lodhia P, et al. Identification of novel vascular targets in lung cancer[J]. Br J Cancer, 2015, 112(3): 485-494.
15. Wang WP, Yan XL, Li WM, et al. Clinicopathologic features and prognostic implications of Gankyrin protein expression in non-small cell lung cancer[J]. Pathol Res Pract, 2015, 211(12): 939-947.
16. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, et al. Dose lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinico clinicopathologic study based on the new International Association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(9): 1496-1504.
17. Warth A, Muley T, Meister M, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(13): 1438-1446.
18. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals[J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68: 821-861.

本文引用: 杨锋, 夏靖华, 孙盈, 王雪娇, 文苗苗, 李小飞, 张志培. CHCHD2在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(11): 2345-2351. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.010
Cite this article as: YANG Feng, XIA Jinghua, SUN Ying, WANG Xuejiao, WEN Miaomiao, LI Xiaofei, ZHANG Zhipei. Expression and clinical significance of CHCHD2 in non-small cell lung cancer patients[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(11): 2345-2351. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.010