

免疫组织化学法检测 PAK4、RNF2、E-cadherin 在肺癌组织中的表达及其意义

龙成凤*, 侯长春, 李华, 申舟如

(广西壮族自治区南溪山医院(广西壮族自治区第二人民医院), 桂林 541002)

摘要: **目的** 利用免疫组织化学法检测 P21 活化激酶 4 (PAK4)、环指蛋白 2 (RNF2)、上皮钙黏附素 (E-cadherin) 在肺癌组织中的表达, 并分析其临床意义。 **方法** 选取 2020 年 6 月—2022 年 1 月于广西壮族自治区南溪山医院确诊肺癌的石蜡切片标本 67 例为研究组, 肿瘤旁正常的肺组织或手术切除肺组织病理为炎症病变的石蜡切片标本 34 例为对照组, 采用免疫组织化学法检测两组肺组织中 PAK4、RNF2、E-cadherin 蛋白表达情况, 并分析各蛋白表达的临床意义。 **结果** 肺癌组织中 PAK4、RNF2 蛋白阳性表达率较高, E-cadherin 蛋白阳性表达率较低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。应用 COX 回归模型进行多因素分析, 结果显示, PAK4 高表达 (风险比 $HR = 2.512$, $P = 0.012$), RNF2 高表达 (风险比 $HR = 3.593$, $P = 0.001$), E-cadherin 低表达 (风险比 $HR = 2.735$, $P = 0.013$) 对于肺癌的生存率有显著影响。 **结论** 免疫组织化学法检测发现肺癌组织中 PAK4、RNF2 阳性表达显著升高, E-cadherin 蛋白阳性表达显著降低, 且检测其表达水平有助于临床预测患者生存率。 **关键词:** 肺癌; 免疫组织化学; P21 活化激酶 4; 环指蛋白 2; 上皮钙黏附素

0 引言

随着现代分子生物学的迅猛进步, 科研人员逐渐认识到肺癌的发生、发展与多种关键蛋白的异常表达相关。活化激酶 (PAK4) 作为 PAK 激酶家族的一员, 通过调控细胞骨架重塑、细胞周期进程及信号转导途径, 对细胞的生长、存活及运动性具有深远影响^[1]。环指蛋白 2 (RNF2) 作为 RING/U-box E3 泛素连接酶家族的重要成员, 通过参与蛋白质的泛素化修饰, 调控细胞周期、DNA 损伤修复及凋亡等生物学过程^[2]。上皮钙黏附素 (E-cadherin) 作为维持上皮细胞极性及组织完整性的关键分子, 其表达异常与肿瘤的侵袭、转移及预后密切相关^[3]。然而, 现有研究多局限于单一分子机制探讨, 缺乏对 PAK4、RNF2 与上皮钙黏附素 (E-cadherin) 联合检测的系统性分析, 尤其针对其免疫组织化学检测技术的标准化优化及临床转化价值仍有待深入探索。免疫组织化学作为实验室检测的核心技术, 在肺癌蛋白标志物研究中具有不可替代的优势^[4]。鉴于此, 本研究旨在利用免疫组织化学法检查 PAK4、RNF2、E-cadherin 在肺癌组中的表达, 深入分析这些蛋白表达的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 6 月—2022 年 1 月于广西壮族自治区南溪山医院确诊的 67 例患者肺癌组织的石蜡切片标本为研究组, 其中包括男 43 例, 女 24 例; 年龄 28~71 岁, 平均 (49.63 ± 10.82) 岁; 鳞状细胞癌 27 例, 腺癌 25 例, 小细胞肺癌 15 例。另选取肿瘤旁正常的肺组织及手术切除肺组织的石蜡切片标本为炎症病变的石蜡标本 34 例为对照组, 其中包括男 20 例, 女 14 例; 年龄 23~74 岁, 平均 (48.91 ± 11.96) 岁。两者性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究通过医院伦理委员会审核 [伦理编号: NXSYY-2025-012(Y)]。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①经病理组织学检查确诊为肺癌, 且具备完整的临床病理资料; ②患者术前均未行放、化疗、靶向治疗等抗肿瘤治疗; ③肺癌组织样本应新鲜采集, 避免长时间保存导致的蛋白降解或变性。

排除标准: ①患者临床病理资料不完整或缺失关键信息; ②合并有其他严重疾病 (如心脑血管疾病、肝肾功能

基金项目: 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费课题研究 (Z20190224)。

* 通信作者: 龙成凤, 硕士, 副主任医师, 研究方向为肺癌。E-mail: 49001729@qq.com

衰竭等); ③接受过非标准或非正规治疗。

1.3 方法

采用免疫组织化学法检测肺组织中 PAK4、RNF2、E-cadherin 蛋白表达情况。具体步骤: 石蜡包埋组织经 Leica RM2255 全自动切片机制备 4 μm 连续切片, 经 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱烘烤 2 h 后, 依次浸入二甲苯 I、II 各 15 min 脱蜡, 梯度乙醇(100%、95%、80%)各 5 min 水化。为消除内源性过氧化物酶干扰, 切片经 3% H_2O_2 室温避光封闭 15 min, PBS 缓冲液充分漂洗(5 min \times 3 次)。将切片置于枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中, 高压锅内煮沸 2 min 修复抗原, 冷却至室温, PBS 冲洗 5 min \times 3 次。一抗孵育阶段, 分别滴加兔抗人 PAK4 单克隆抗体、鼠抗人 RNF2 单克隆抗体及兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体, 湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h。次日切片复温后, PBS 漂洗 3 次, 滴加 HRP 标记的羊抗兔/鼠通用型二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 冲洗后滴加 DAB 显色液, 显微镜下实时监测显色强度, 以阳性对照显色清晰且阴性对照无背景着色为终点。苏木素复染 2 min, 1% 盐酸乙醇分化 3 s, 流水返蓝 10 min, 梯度乙醇脱水后中性树胶封片。

1.4 评定标准

病理判定结果如下。着色细胞染色强弱: 0 分为无色, 1 分为黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色; 阳性细胞所占视野百分比: 0 分为阳性细胞率 \leq 5%, 1 分为阳性细胞率 $>$ 5%~25%, 2 分为阳性细胞率 $>$ 25%~50%, 3 分为阳性细胞率 $>$ 50%。两项评分之积为最终得分: 阴性为 0~1 分, 弱阳性为 2 分, 阳性为 3~4 分, 强阳性为 5~6 分。最终得分 \leq 2 分为阴性表达, $>$ 2 分为阳性表达; 最终得分 \geq 5 分、 $<$ 5 分的分别判定为高表达、低表达。

1.5 临床病理资料收集

由医院专职人员通过医院电子病历系统收集肺癌患者临床病理资料, 包括肿瘤部位、肿瘤最大直径、病理类型、恶性肿瘤分期、分化程度以及淋巴结转移情况。

1.6 预后随访

对纳入研究的 67 例肺癌患者进行随访, 随访时间截至 2025 年 1 月。随访时间自病理活检日期起, 通过家访、电话回访、查询科室随访记录、肿瘤病历档案、复诊资料等方式获取患者的生存状况, 至少每 3 个月进行一次随访。随访终点为患者死亡、失访或随访结束(完成 36 个月的随访时间)。统计患者生存情况, 生存期指从治疗结束至死亡的时间。

1.7 统计学方法

所有数据统计分析均使用统计软件包 SPSS 22.0 处理, 组间阳性率以 [n(%)] 的形式表示, 采用 χ^2 检验或 Fisher

精确概率法检验。通过单因素及多因素 COX 回归模型分析探讨影响肺癌患者预后的因素。检验水准为 $\alpha=0.05$, 以双侧 $P<0.05$ 时, 说明该数据具有显著性统计学差异。

2 结果与分析

2.1 PAK4、RNF2、E-cadherin 蛋白表达

研究组肺癌组织中 PAK4、RNF2 蛋白阳性表达显著高于对照组癌旁组织, E-cadherin 蛋白阳性表达率显著低于对照组癌旁组织($P<0.05$), 见表 1。

表 1 两组 PAK4、RNF2、E-cadherin 蛋白表达情况 [n(%)]

蛋白		研究组 (n=67)	对照组 (n=34)	χ^2 值	P 值
PAK4	阳性	52(77.61)	5(14.71)	36.302	<0.001
	阴性	15(22.39)	29(85.29)		
RNF2	阳性	59(88.06)	7(20.59)	45.342	<0.001
	阴性	8(11.94)	27(79.41)		
E-cadherin	阳性	36(53.73)	29(85.29)	9.795	0.002
	阴性	31(46.27)	5(14.71)		

2.2 影响肺癌患者无病生存率的单因素与多因素分析

单因素分析显示, PAK4、RNF2 高表达, E-cadherin 低表达与患者生存显著相关($P<0.05$)。采用 COX 回归模型进行多因素分析(采用 Wald 检验, 回归系数 β), PAK4 高表达(风险比 $HR=2.512$, $P=0.012$), RNF2 高表达(风险比 $HR=3.593$, $P=0.001$), E-cadherin 低表达(风险比 $HR=2.735$, $P=0.013$)对于肺癌的生存率是独立的影响因素, 见表 2、表 3。SE 为标准误。

表 2 影响肺癌患者无病生存率的单因素分析 [n(%)]

因素	生存(n=46)	死亡(n=21)	χ^2 值	P 值
年龄			0.952	0.329
≤ 60 岁	32(65.31)	17(34.69)		
> 60 岁	14(77.78)	4(22.22)		
性别			0.699	0.403
男	28(65.12)	15(34.88)		
女	18(75.00)	6(25.00)		
肿瘤最大直径			0.046	0.831
≤ 3 cm	21(70.00)	9(30.00)		
> 3 cm	25(67.57)	12(32.43)		
病理类型			0.207	0.902
鳞状细胞癌	18(66.67)	9(33.33)		
腺癌	17(68.00)	8(32.00)		
小细胞肺癌	11(73.33)	4(26.67)		
TNM 分期			0.681	0.409
I 期	17(62.96)	4(37.04)		
II ~ III 期	29(72.50)	2(27.50)		
分化程度			2.385	0.123
高、中分化	26(61.90)	16(38.10)		
低分化	20(80.00)	5(20.00)		

续表				
因素	生存(n=46)	死亡(n=21)	χ^2 值	P 值
淋巴结转移				
是	24(70.59)	10(29.41)	0.120	0.729
否	22(66.67)	11(33.33)		
PAK4 表达				
低表达	16(88.89)	2(11.11)	4.682	0.030
高表达	30(61.22)	19(38.78)		
RNF2 表达				
低表达	20(86.96)	3(13.04)	5.450	0.020
高表达	26(43.48)	18(40.91)		
E-cadherin 表达				
低表达	21(53.85)	18(46.15)	9.513	0.002
高表达	25(89.29)	3(10.71)		

表 3 影响肺癌患者无病生存率的多因素分析

因素	β	SE	Wald	HR	95%CI	P
PAK4 高表达	0.921	0.366	6.332	2.512	1.226~5.147	0.012
RNF2 高表达	1.279	0.372	11.821	3.593	1.733~7.449	0.001
E-cadherin 低表达	1.006	0.403	6.231	2.735	1.241~6.025	0.013

3 讨论与结论

肺癌的发病原因复杂多样, 使得治疗难度也相应增大。随着分子生物学和基因组学的快速发展, 越来越多的研究开始聚焦于肺癌的分子机制和靶向治疗。PAK4 蛋白分子的调节域可以与多种细胞骨架蛋白和信号分子相互作用, 从而参与调控细胞的多种生理功能。RNF2 作为一种 E3 泛素连接酶, 主要通过参与蛋白质的泛素化过程影响细胞内蛋白质降解。E-cadherin 主要通过介导细胞间的同质黏附来维持组织的完整性和稳定性。本研究采用免疫组织化学法对肺癌组织中的 PAK4、RNF2 和 E-cadherin 蛋白表达进行检测。免疫组织化学法作为一种高灵敏度的检测技术, 能够通过特异性抗体标记目标蛋白, 直观地显示其在组织中的定位和表达水平^[5-7]。免疫组织化学结果显示肺癌组织中 PAK4、RNF2 蛋白阳性表达率显著高于正常组织, E-cadherin 蛋白阳性表达率显著低于正常组织。免疫组织化学法的应用为揭示肺癌相关蛋白的表达变化提供了可靠的实验依据。本研究表明, 免疫组织化学法检测到的 PAK4 和 RNF2 蛋白表达上调以及 E-cadherin 表达下调, 与肺癌的发生和发展密切相关。

本研究进一步采用 COX 回归模型进行多因素分析, 结果显示 PAK4、RNF2 高表达及 E-cadherin 低表达对于肺癌的生存率是独立的影响因素。有研究^[8-10]表明,

PAK4 抑制剂可以减弱脑胶质瘤细胞侵袭、迁移与增殖能力; RNF2 可能通过促进上皮-间质转化过程, 增强癌细胞的侵袭和转移能力; 上调 E-cadherin 的表达, 可能会增强细胞间的黏附并抑制肺癌细胞的侵袭和转移能力。本研究结合上述报道, 提示下调 PAK4、RNF2 表达, 上调 E-cadherin 表达可能对延长肺癌患者生存期具有重要的临床意义。

综上所述, 免疫组织化学法检测发现肺癌组织中 PAK4、RNF2 阳性表达显著升高, E-cadherin 蛋白阳性表达显著降低, 且检测其表达水平有助于临床预测患者生存率。但本研究仍存在不足之处, 如样本量单一且数量较少, 可能存在数据偏倚性, 后期考虑扩大样本量进一步验证免疫组织化学法检测的临床应用价值。

参考文献

- [1] 宋可, 陈丹丹, 李静宇, 等. PAK4在细胞骨架和细胞周期调控中的作用研究进展[J]. 生理科学进展, 2024, 55(1): 43-50.
- [2] 贾楠, 宋哲, 陈宝胜, 等. 结直肠癌组织中环指蛋白2的表达及其临床意义[J]. 中华生物医学工程杂志, 2020, 26(1): 26-30.
- [3] 张梦霞. E-cadherin在淋巴组织增殖性疾病中的表达[D]. 广州: 广州医科大学, 2023.
- [4] 杨翠林, 自宝莉, 李萍, 等. 肺腺癌免疫组化标记物的临床应用及其与基因突变关系的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(7): 1100-1104.
- [5] 鲍书友, 李丽, 劳吉锋, 等. 免疫组化法与RNAscope原位杂交法检测宫颈鳞状细胞癌组织中PD-1和PD-L1表达一致性研究[J]. 海军医学杂志, 2023, 44(3): 305-309.
- [6] 冯占军, 祝云霄, 于晓宇. 基于免疫组化SP法检测AEG-1在不同分化程度和分期的卵巢癌患者中的阳性表达及病理特点[J]. 中国性科学, 2024, 33(9): 87-91.
- [7] 张春节, 张志远. 免疫组化法检测非小细胞肺癌组织中CD44v6、Ki-67的表达与患者临床病理特征及转移的关系[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2020, 49(1): 72-77.
- [8] 高永军, 陈天泽, 于如同. PAK4抑制剂对胶质瘤细胞侵袭、迁移与增殖能力的影响[J]. 徐州医科大学学报, 2020, 40(6): 396-401.
- [9] 陈宗浩, 李恒, 杨玉平, 等. 食管癌组织环指蛋白2、环指蛋白6的表达与上皮-间质转化和预后的关系分析[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(1): 189-193, 175.
- [10] 秦婷婷, 马金莲, 袁永, 等. 葛根抑制组蛋白去甲基化酶LSD1抗肺癌的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5574-5583.