

HIF-2 α 和 OCT-4 在非小细胞肺癌中的表达及与预后的关系

魏林方, 刘先领, 胡春宏

(中南大学湘雅二医院肿瘤科, 长沙 410011)

[摘要] 目的:通过联合检测缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)和转录因子 OCT-4 在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达,分析两者的相关性及其对 NSCLC 预后的影响。方法:应用免疫组织化学 SP 法检测 51 例 NSCLC 术后石蜡切片中 HIF-2 α 和 OCT-4 蛋白的表达,分析两者的相关性及其与 NSCLC 临床预后的关系。结果: NSCLC 组织中 HIF-2 α 表达阳性率为 52.9%,OCT-4 阳性率为 72.5%,两者在 NSCLC 组织中的表达呈正相关($r=0.514, P<0.01$)。HIF-2 α 和 OCT-4 的表达均与病人的生存时间相关,阳性表达的 NSCLC 患者预后差。结论:HIF-2 α 和 OCT-4 在 NSCLC 中的高表达与 NSCLC 预后不良相关,两者可作为 NSCLC 预后判断的指标。

[关键词] 非小细胞肺癌; 缺氧诱导因子-2 α ; OCT-4

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.09.007

Correlation between expression of HIF-2 α and OCT-4 and prognosis of NSCLC

WEI Linfang, LIU Xianling, HU Chunhong

(Department of Oncology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and significance of hypoxia inducible factor-2 α (HIF-2 α) and transcription factor OCT-4 in non-small cell lung cancer (NSCLC), and evaluate their roles in the prognosis of NSCLC. **Methods** Tissues from 51 cases of NSCLC were collected and immunohistochemistry (SP method) was used to detect the expression of HIF-2 α and OCT-4 proteins. The correlation between the protein expression and the prognosis of NSCLC was analyzed. **Results** The positive rates of HIF-2 α and OCT-4 expression in the NSCLC were 52.9% and 72.5%, respectively. There was significant relation between the expression of HIF-2 α and OCT-4 ($r=0.514, P<0.01$). High expression of them revealed poor prognosis for NSCLC patients characterized with a bad overall survival ($P<0.05$). **Conclusion** There is a negative correlation between the expression of HIF-2 α and OCT-4 and the prognosis of NSCLC. Combined examination of HIF-2 α and OCT-4 expression might be an important biomarker for NSCLC prognosis.

Key words: non-small cell lung cancer; hypoxia inducible factor-2 α ; OCT-4

收稿日期 (Date of reception) 2011-07-11

作者简介 (Biography) 魏林方, 硕士, 主要从事临床肿瘤防治研究。现在郑州人民医院工作。

通信作者 (Corresponding author) 刘先领, E-mail: liuxianling3180@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation items) 湖南省科技厅计划资助项目(2009wk3057, 2011FJ6042)。 The work was supported by a grant from the Office of Hunan Science and Technology(2009wk3057, 2011FJ6042).

国内外研究^[1-2]表明:缺氧可以导致肿瘤的恶性转化,其分子机制涉及瘤细胞生存和自我更新的多个环节。缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是一类调节肿瘤细胞对缺氧微环境适应性反应的重要转录因子。HIF的下游靶基因包括以下几类:与肿瘤血管生成相关基因、能量代谢相关基因、细胞增殖和凋亡相关基因、肿瘤细胞的迁移与分化相关基因等。基于在肿瘤发生发展中的重要作用,HIF逐渐成为人们探讨肿瘤治疗的重要生物靶。HIF包括HIF-1,HIF-2,HIF-3 3种亚型。部分研究^[3-4]表明HIF-1和HIF-2调控的靶基因存在很多差异,甚至表现出相反的作用。转录因子OCT-4特异性表达于各种干细胞,研究^[5]证实HIF通过激活Notch信号通路和转录因子OCT-4,在维持肿瘤干细胞的自我更新中发挥重要作用。另有研究表明:HIF-2调节干细胞中OCT-4的表达^[6],且两者在肺癌组织中的表达明显高于癌旁组织及正常组织^[7-8],但是两者在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中表达、两者之间的关系及其对NSCLC预后的指导意义等问题目前仍不清楚。本实验旨在通过检测这两种蛋白在NSCLC组织中的表达,分析两者的相关性,并结合病理资料和随访资料分析其与预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

51例NSCLC组织取自2002年1月至2005年12月在中南大学湘雅二医院行根治性手术获取且经石蜡保存的肺癌手术标本,其中男性39例,女性12例,年龄29~78(中位数55)岁。按国际抗癌联盟(UICC)的TNM分期为:I期4例,II期15例,III期29例,IVa期2例,所有病例均定期随访,末次随访时间为2010年3月,资料完整。所有蜡块在湘雅二医院病理科进行切片(4 μ m连续切片)。

1.2 试剂

兔抗人HIF-2 α 多克隆抗体、兔抗人OCT-4多克隆抗体、SP Kit试剂盒、DAB染色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司。抗体工作浓度均为1:200。

1.3 免疫组织化学SP法

将组织蜡块按4 μ m连续切片,每个蜡块组织取切片2张,分别做HIF-2 α ,OCT-4免疫组织化学染色,先将切片脱蜡至水,高压抗原修复,然后用新鲜配置的3%过氧化氢溶液灭活内源性过氧化物酶活性,其余免疫组织化学步骤参照试剂盒说明进行。

1.4 结果判定

由2位病理科医生用双盲法观察。采用阳性细胞数所占百分比作为判断标准。在显微镜高倍视野下随机观察每张切片5个视野,每个视野计数200个肿瘤细胞,共计1 000个。阳性细胞数0为阴性; $\leq 10\%$ 为(+);10%~50%为(++); $\geq 50\%$ 为(+++)。

1.5 统计学处理

全部数据均应用SPSS16.0统计学软件进行分析。蛋白质表达与总生存时间的关系采用Kaplan-Meier曲线描述,并用Log-rank检验。HIF-2 α 与OCT-4的相关性采用Spearman相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-2 α 与OCT-4在NSCLC组织中的表达

HIF-2 α 与OCT-4在NSCLC组织中呈散在分布,在脱落坏死区表达明显,在血管周围组织中也有表达,51例病人中阳性表达者有27例,阳性率为52.9%,其中强阳性表达的有9例。OCT-4的表达主要位于癌细胞胞核,偶见胞浆表达,表现为棕褐色的颗粒,在组织中呈线状、片状和条索状分布,51例病人中阳性表达者有37例,阳性率为72.5%,其中强阳性表达的有11例(图1)。

2.2 HIF-2 α 与OCT-4在NSCLC组织中表达的相关性

通过Spearman等级相关分析,HIF-2 α 和OCT-4的表达呈正相关($r = 0.514, P < 0.01$;表1)。

2.3 HIF-2 α 与OCT-4表达与预后的关系

2.3.1 HIF-2 α 表达与预后的关系

Kaplan-Meier法单因素生存分析显示HIF-2 α 阴性表达组患者的3年生存率43%,明显高于HIF-2 α 高表达组的18%,两者差异有统计学意义($P = 0.004$;图2);提示HIF-2 α 的表达和病人的生存时间相关,HIF-2 α 阳性表达的病人预后差。

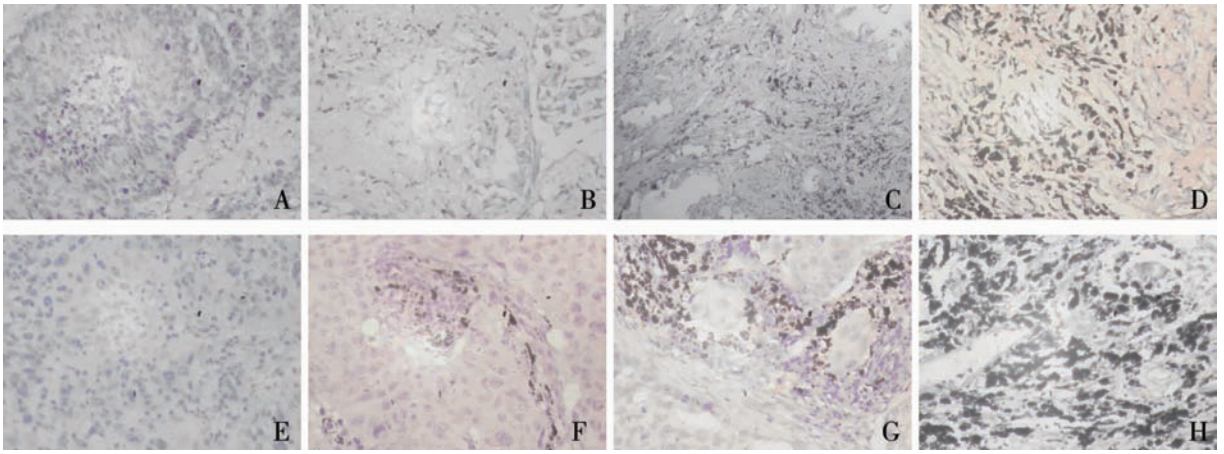


图1 HIF-2α与OCT-4在NSCLC组织中的表达(×200)。A:HIF-2α(-);B:HIF-2α(+);C:HIF-2α(++);D:HIF-2α(+++);E:OCT-4(-);F:OCT-4(+);G:OCT-4(++);H:OCT-4(+++)。

Fig. 1 Expressions of HIF-2α and OCT-4 in NSCLC tissues (×200). A: HIF-2α(-); B: HIF-2α(+); C: HIF-2α(++); D: HIF-2α(+++); E: OCT-4(-); F: OCT-4(+); G: OCT-4(++); H: OCT-4(+++)。

表1 HIF-2α与OCT-4在NSCLC组织中表达的相关性
Tab. 1 Correlation between expressions of HIF-2a and OCT-4 in NSCLC tissues

HIF-2α 表达	OCT-4 表达			
	-	+	++	+++
-	11	3	0	0
+	12	3	0	2
++	1	0	7	1
+++	0	1	4	6

高表达组的19%,两者差异有统计学意义($P = 0.001$;图3);提示OCT-4的表达和病人的生存时间相关,OCT-4阳性表达的病人预后差。

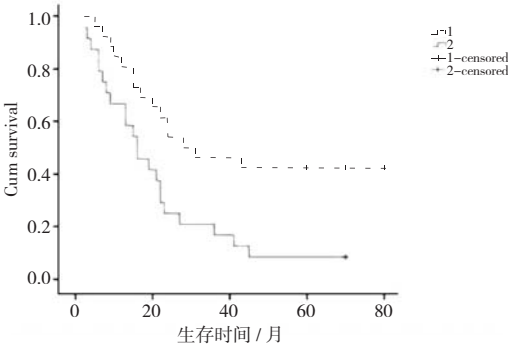


图2 HIF-2α表达与生存时间的关系。1:HIF-2α阴性表达;2:HIF-2α阳性表达。

Fig. 2 Relation between HIF-2α expression and overall survival of NSCLC. 1: HIF-2α negative expression; 2: HIF-2α positive expression.

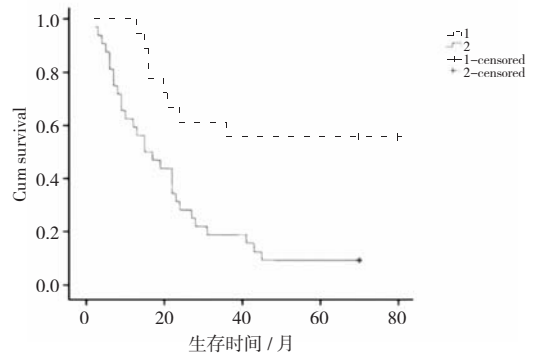


图3 OCT-4表达与生存时间的关系。1:OCT-4阴性表达;2:OCT-4阳性表达。

Fig. 3 Relation between OCT-4 expression and overall survival of NSCLC. 1: OCT-4 negative expression; 2: OCT-4 positive expression.

2.3.2 OCT-4表达与预后的关系

Kaplan-Meier法单因素生存分析显示OCT-4阴性表达组患者的3年生存率60%,明显高于OCT-4

2.3.3 HIF-2α与OCT-4同时表达与预后的关系

HIF-2α与OCT-4同时表达患者的3年生存率为22%,除外两者同时表达的患者3年生存率为39%,两者差异有统计学意义($P = 0.02$;图4);提示两者的表达与生存时间相关,两者同时表达的病人预后差。

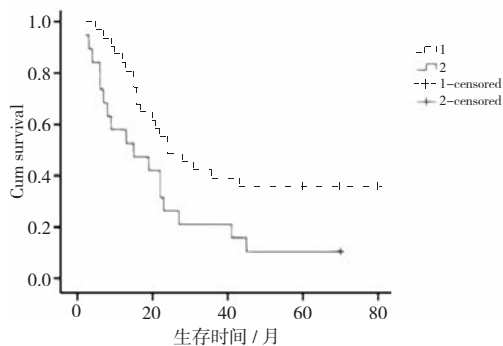


图4 OCT-4 和 HIF-2 α 同时表达与生存时间的关系。1: 除外两者同时表达; 2: HIF-2 α 和 OCT-4 同时阳性表达。

Fig. 4 Relation between HIF-2 α and OCT-4 expressions with overall survival of NSCLC. 1: Except both HIF-2 α and OCT-4 positive expression; 2: Both HIF-2 α and OCT-4 positive expression.

3 讨 论

肿瘤的传统治疗手段大部分是针对肿瘤组织或细胞本身,然而其效果却不尽人意,主要原因是肿瘤细胞对干预手段的耐受,甚至有些治疗方式可以加速肿瘤细胞的转移。随着人类对肿瘤的研究进展,发现缺氧微环境在肿瘤的发生发展中有不可忽视的作用,现已证实缺氧环境可促进肿瘤进一步恶化。因此有必要对肿瘤的发生发展机制进行更加深入的研究,以期在肿瘤的治疗上找到更有效的方式和途径。

大量的研究^[9-11]证明:HIF的表达对肿瘤细胞的增殖、转移有重要的作用,其机制涉及血管生成、细胞代谢、细胞分化、细胞周期等生物过程。研究^[9,11]表明:HIF-2 和 HIF-1 在肿瘤发生发展中的作用虽有许多相似之处,但也有不同,甚至在某些肿瘤的发生发展中 HIF-2 比 HIF-1 发挥更重要的作用。刘亮等^[12]通过细胞培养和动物实验表明 OCT-4、Nanog 和 Sox2 等基因在缺氧处理后表达均增加,缺氧促进肝癌细胞成瘤和转移等恶性表型转化与获得胚胎干细胞样特征有关,其机制之一是 HIF-2 对干细胞相关基因的调控。Covello 等^[13]在胚胎干细胞中,证明 OCT-4 的表达和转录活性的激活受 HIF-2 而不是 HIF-1 调控,从而促进胚胎干细胞存活。另外,Seidel 等^[14]发现 HIF-2 参与对肿瘤干细胞中多种特异基因的调控,这些结果揭示了低氧诱导因子家族在肿瘤发生发展中起重要作用。

本实验通过对 NSCLC 患者肿瘤组织中 HIF-2 和 OCT-4 的表达特征及其表达水平的检测发现在 NSCLC 中 HIF-2 α 与 OCT-4 的表达存在正相关($r = 0.514, P < 0.001$),此结果与 OCT-4 是 HIF-2 下游靶基因的观点相符,其潜在的调节机制可能是:在信号通路中 HIF-2 作为 OCT-4 的上游分子,可以起到一个级联放大的作用;OCT-4 的表达还受到其他因素的影响;HIF-2 和 OCT-4 存在交互作用,有一些共同的通路如 PI3K/Akt, MAPK/Erk 等,存在反馈调节作用;此结果提示在 NSCLC 中, HIF-2 可以通过对 OCT-4 的调控影响肿瘤细胞的干细胞表型,而肿瘤细胞的干细胞表型越明显,肿瘤的恶性程度越高,预后也越差。

本实验同时对 HIF-2 和 OCT-4 的表达与 NSCLC 患者生存期预后的相关性进行分析,发现两者的表达和患者生存时间有关,两者的高表达提示较差的预后。本研究结果与现已明确的 HIF-2 和 OCT-4 在肿瘤发生发展中的作用相符。病理资料分析发现 HIF-2 α 的阳性表达和肿瘤的 T 分期($P = 0.003$)明显相关,与淋巴结转移($P = 0.05$)、临床分期($P = 0.168$)、病理学分级($P = 0.383$)以及病理学类型($P = 0.086$)无明显相关。而 OCT-4 的表达和肿瘤的淋巴结转移($P = 0.044$)和病理学分级($P = 0.002$)明显相关,与 T 分期($P = 0.931$)、临床分期($P = 0.382$)、以及病理学类型($P = 0.104$)无明显相关(结果未展示)。本研究结果与袁凯等^[15]的实验结果一致。OCT-4 作为公认的干细胞标志物在多种类型的肿瘤组织中有高表达。一项针对 OCT-4 在肺腺癌组织中的表达研究^[16]表明:OCT-4 高表达与肺腺癌的分化程度和预后相关。本实验结果验证了 OCT-4 在不同病理类型 NSCLC 中均与 NSCLC 分化程度、淋巴结转移明显相关,说明随着分化程度的降低,肿瘤细胞具有更强的迁移、侵袭和转移能力,甚至更差的预后。但对于表达 OCT-4 的肿瘤细胞是否可被认为是肿瘤干细胞仍有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] Catalano R D, Wilson M R, Boddy S G, et al. Hypoxia and prostaglan E receptor 4 signaling pathways synergise to promote endometrial adenocarcinoma cell proliferation and tumor growth [J]. Plos One, 2011, 6(5): e19209.
- [2] Pires I M, Bencokova Z, Milani M, et al. Effects of acute versus chronic hypoxia on DNA damage response and genomic instability [J]. Cancer Res, 2010, 70(3): 925-935.
- [3] Kapitsinou P P, Haase V H. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice [J]. Cell Death

- Differ, 2008, 15 (4): 650-659.
- [4] Takaaki I, Hirotohi K, Maria-Teresa H, et al. HIF-1 α and HIF-2 α have divergent roles in colon cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(4): 763-771.
- [5] 路秀英,李晓明. 低氧诱导因子对肿瘤干细胞作用的研究进展[J], *医学综述*, 2008, 14(20): 3081-3083.
LU Xiuying, LI Xiaoming. Research development in effects of hypoxia-inducible factors on cancer stem cells [J]. *Medical Recapitulate*, 2008, 14(20): 3081-3083.
- [6] Covello K L, Simon M C, Keith B, et al. Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1 α by a hypoxia-inducible factor-2 α knock-in allele promotes tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 2277-2286.
- [7] 潘铁成,张毅,魏翔,等. 缺氧诱导因子 2 α 在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义 [J]. *医学综述*, 2008, 14(2): 318-319.
PAN Tiecheng, ZHANG Yi, WEI Xiang, et al. Expression of HIF-2 α in non small cell lung cancer tissues and its significance [J]. *Medical Recapitulate*, 2008, 14(2): 318-319.
- [8] 陈丽霞. 转录因子 OCT4 在肺癌中的表达及其临床意义 [D]. 大连: 大连医科大学, 2009.
CHEN Lixia. Expression of transcription factor Oct4 and its clinical significance in lung cancer [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2009.
- [9] Wu X H, Qian C, Yuan K. Correlation of hypoxia-inducible factor-1 α /hypoxia-inducible factor-2 α expression with angiogenesis factors expression and prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *Chin Med (Engl)*, 2011, 124(1): 11-18.
- [10] Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Migneco G, et al. HIF-1 α functions as a tumor promoter in cancer associated fibroblasts, and as a tumor suppressor in breast cancer cells; Autophagy drives compartment-specific oncogenesis [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(17): 3534-3551.
- [11] Petrella B L, Brinckerhoff C E. PTEN suppression of YY1 induces HIF-2 activity in Von-Hippel-Lindau-null renal-cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(14): 1389-1401.
- [12] 刘亮,王文权,朱小东,等. 缺氧增加肝癌细胞胚胎干细胞基因表达促进恶性转化 [J]. *中华普通外科杂志*, 2009, 24(10): 813-816.
LIU Liang, WANG Wenquan, ZHU Xiaodong, et al. Effects of hypoxia on malignant phenotype of HCC cells [J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2009, 24(10): 813-816.
- [13] Covello K L, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2 regulates OCT4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(5): 557-570.
- [14] Seidel S, Garvalov B K, Wirta V, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α [J]. *Brain*, 2010, 133(4): 983-995.
- [15] 袁凯,郑如恒. HIF-2 与人非小细胞肺癌增殖及预后的关系 [J]. *中国临床医学*, 2009, 16(2): 194-197.
YUAN Kai, ZHENG Ruheng. The correlation between the expression of HIF-2 α and the proliferation of tumor and its impact on the prognosis in human non-small cell lung cancer [J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2009, 16(2): 194-197.
- [16] 张雪艳,郑必强,韩宝惠,等. 人肺腺癌干细胞的表型及其与肺腺癌患者预后的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2009, 31(11): 836-840.
ZHANG Xueyan, ZHENG Biqiang, HAN Baohui, et al. Lung adenocarcinoma stem cell phenotypes and their correlation with patient prognosis [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2009, 31(11): 836-840.

(本文编辑 彭敏宁)