

NOK 与 FGFR2 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

710038 西安 第四军医大学唐都医院胸腔外科

刘海涛, 张志培, 葛忠虎, 王雪娇, 文苗苗, 汪健, 李小飞¹

【摘要】目的 检测含激酶结构域新原癌基因(NOK)与成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达,分析其不同病理类型、病理分级及临床 TNM 分期之间的表达差异及相关性。**方法** 应用免疫组化 En Vision 法检测 NOK 与 FGFR2 在 163 例 NSCLC 组织中的表达,分析其表达与病理类型、临床 TNM 分期、病理分级之间的关系,以及 NOK 与 FGFR2 表达的相关性。**结果** NOK、FGFR2 在 163 例 NSCLC 组织中的阳性表达率分别为 66.7% 和 85.2%。NOK 在肺鳞癌和肺腺癌中的阳性表达率分别为 64.5% 和 72.6%,差异无统计学意义($P > 0.05$);NOK 在不同 TNM 分期之间及在不同病理分级之间的表达差异均有统计学意义($P = 0.000$)。FGFR2 在肺鳞癌和肺腺癌中的阳性表达率分别为 88.6% 和 85.7%,差异无统计学意义($P > 0.05$);FGFR2 在不同 TNM 分期之间及在不同病理分级之间的表达差异均有统计学意义($P < 0.05$)。NOK 与 FGFR2 蛋白表达在 NSCLC($r = 0.640, P = 0.000$)、肺鳞癌($r = 0.684, P = 0.000$)、肺腺癌($r = 0.597, P = 0.000$)组织中均呈正相关。**结论** NOK 与 FGFR2 在 NSCLC 中高表达,其表达与病理类型、病理分级及 TNM 分期有关,提示二者可能与 NSCLC 的发生和发展有关。

【关键词】 非小细胞肺癌; 含激酶结构域新原癌基因(NOK); 成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2013)12-1071-05

Expressions of NOK and FGFR2 in non-small cell lung cancer and their clinical significance

LIU Haitao, ZHANG Zhipei, GE Zhonghu, WANG Xuejiao, WEN Miaomiao, WANG Jian, LI Xiaofei. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Corresponding author: LI Xiaofei, E-mail: lxfcchest@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To detect the expressions of novel oncogene with kinase-domain(NOK) and fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2) protein in non-small cell lung cancer(NSCLC), and analyze the expressions among different pathological types, pathological grades, TNM stages and their correlation. **Methods** The expressions of NOK and FGFR2 protein were detected with immunohistochemical En Vision method in 163 NSCLC samples, the expressions among different pathological types, pathological grades, TNM stages and the correlation between expressions of NOK and FGFR2 in tumor samples were analyzed. **Results** The positive rate of NOK and FGFR2 protein in 163 NSCLC tissues were 66.7% and 85.2%, respectively. The positive rate of NOK protein in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma were 64.5% and 72.6% with no statistical difference($P > 0.05$). NOK protein was expressed among different TNM stages with statistical difference($P = 0.000$), and the expressions also different in pathological grades($P = 0.000$). The positive rate of FGFR2 protein in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma were 88.6% and 85.7% with no statistical difference($P > 0.05$). The expression of FGFR2 protein at different TNM stages and different pathological grades were also different statistically($P = 0.000$). The positive correlation between NOK and FGFR2 expression was found in NSCLC samples($r = 0.640, P = 0.000$), squamous cell carcinoma($r = 0.684, P = 0.000$) and adenocarcinoma($r = 0.597, P = 0.000$). **Conclusion** NOK and FGFR2 protein are highly expressed in NSCLC, and their expressions correlates with pathological types, pathological grades and TNM stages, which may be related to the occurrence and development of NSCLC.

【Key Words】 Non-small cell lung cancer(NSCLC); Novel oncogene with kinase-domain(NOK); Fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2)

目前肺癌居全世界癌症死因的首位,其发病率呈逐年上升趋势,其中 80% ~ 90% 的患者为非小细

¹ 通讯作者, E-mail: lxfcchest@fmmu.edu.cn

胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)。含激酶结构域新原癌基因 (novel oncogene with kinase-domain, NOK) 是近年新发现的癌基因,属于受体型酪氨酸蛋白激酶 (RPTK) 家族成员,但致病机制仍不清楚,其表达与肺癌分化程度、病理分型及临床 TNM 分期有关^[1-2]。NOK 与 FGFR/PDGFR 具有 20% ~ 30% 的同源性,但只含有一个单次跨膜结构域和一个胞内酪氨酸蛋白激酶结构域^[3],其缺少胞外配体结合区,胞外信号通过何种受体传导激活 NOK 信号通路仍不清楚。研究表明,NOK 与成纤维细胞生长因子受体 2 (fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2) 均与恶性肿瘤的侵袭和转移相关^[3-4]。本研究探讨了 NOK、FGFR2 在 NSCLC 中的表达,并分析其表达与病理类型、病理分级和 TNM 分期的关系及两者表达的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 3 月至 2013 年 1 月在第四军医大学唐都医院胸腔外科经手术切除的 NSCLC 组织标本 163 例。其中男性 127 例,女性 36 例;年龄 29 ~ 77 岁;鳞癌 79 例,腺癌 84 例;TNM 分期: I 期 11 例, II 期 109 例, III 期 43 例;病理分级: I 级 32 例, II 级 93 例, III 级 38 例。

1.2 主要试剂 鼠抗人 NOK 单克隆抗体 (2H2F10)、鼠抗人 FGFR2 单克隆抗体 (ab58201) 均购自美国 Abcam 公司,免疫组化试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。

1.3 免疫组织化学染色 标本经 5 μ m 连续切片,采用两步法免疫组化染色 (En Vision)。具体步骤

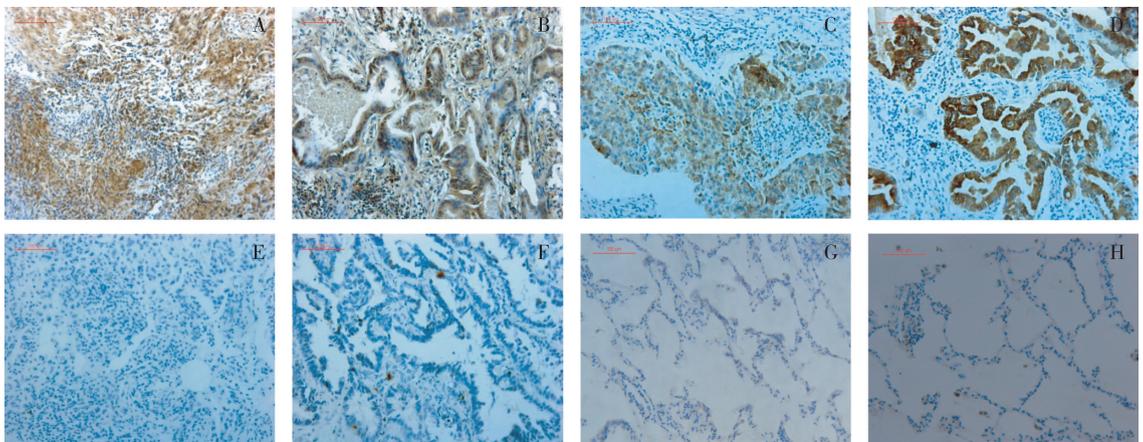
如下:切片脱蜡至水,尿素消化,用柠檬酸缓冲液进行微波加热修复,冷却,3% 过氧化氢封闭,血清封闭,加一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜;37 $^{\circ}$ C 复温,加入二抗 37 $^{\circ}$ C 恒温反应 (中间各步骤用 PBS 漂洗),加 DAB 显色,显微镜观察终止显色。苏木精复染,脱水透明封片,在光学显微镜下观察。用已知肺鳞癌、肺腺癌的阳性表达和不表达组织作为阳性和阴性对照,以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.4 结果判定 NOK 和 FGFR2 免疫组织化学评判标准:以光学显微镜下观察到棕色或黄色颗粒判定为阳性表达,在 400 倍光镜下随机观察 4 个视野并进行半定量判断结果。阳性细胞 \leq 5% 为 0 分,6% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分;阳性强度:黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将两者积分相乘;0 分为阴性 (-),1 ~ 4 分为弱阳性 (+),5 ~ 8 分为中度阳性 (++) ,9 ~ 12 分为强阳性 (+++)。以 (+)、(++)、(+++) 设为阳性,计算阳性率。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计处理。组间比较用 Mann-Whitney U 检验,多组间比较用 Kruskal-Wallis 非参数检验,相关性分析用 Spearman 秩相关检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化表达定位 NOK 阳性着色主要位于癌细胞的胞质中,而在正常肺组织中主要呈阴性染色。FGFR2 阳性着色主要定位于癌细胞胞膜和胞质,在正常肺组织中主要呈阴性染色。见图 1。



A: 肺鳞癌 NOK 阳性表达; B: 肺腺癌 NOK 阳性表达; C: 肺鳞癌 FGFR2 阳性表达; D: 肺腺癌 FGFR2 阳性表达; E: 肺鳞癌空白对照; F: 肺腺癌空白对照; G: 正常肺组织 NOK 阴性表达; H: 正常肺组织 FGFR2 阴性表达

图 1 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 及正常肺组织中的表达情况 (En Vision $\times 200$)

2.2 NOK 和 FGFR2 蛋白在 NSCLC 不同病理类型中的表达 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 组织中的阳性表达率分别为 66.7% 和 85.2%。NOK 在肺鳞癌、肺腺癌中的阳性表达率分别为 64.5% 和 72.6%，两组

比较差异无统计学意义($P=0.215$)；FGFR2 在肺鳞癌、肺腺癌中的阳性表达率分别为 88.6% 和 85.7%，两组比较差异无统计学意义($P=0.316$)。见表 1。

表 1 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 组织中的表达情况

病理类型	n	NOK				P	FGFR2				P	
		-	+	++	阳性率(%)		-	+	++	+++		阳性率(%)
鳞癌	79	28	36	15	64.5	0.215	9	49	18	3	88.6	0.316
腺癌	84	23	40	21	72.6		12	40	27	5	85.7	

2.3 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 不同 TNM 分期中的表达 NOK、FGFR2 在 NSCLC 不同 TNM 分期中的

阳性表达率差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 不同 TNM 分期中的表达

TNM 分期	n	NOK				P	FGFR2				P	
		-	+	++	阳性率(%)		-	+	++	+++		阳性率(%)
I	11	8	2	1	27.3	0.000	2	7	1	1	81.8	0.000
II A	26	20	4	2	23.1		9	14	2	1	65.4	
II B	83	19	49	15	77.1		10	53	19	1	88.0	
III A	36	3	17	16	91.7		0	13	20	3	100.0	
III B	7	1	4	2	85.7		0	2	3	2	100.0	

2.4 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 不同病理分级中的表达 NOK、FGFR2 在 NSCLC 不同病理分级间的阳

性表达率差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 不同病理分级中的表达

病理分级	n	NOK				P	FGFR2				P	
		-	+	++	阳性率(%)		-	+	++	+++		阳性率(%)
I 级	32	23	8	1	28.1	0.000	11	18	3	0	65.6	0.000
II 级	93	25	53	15	73.1		9	62	19	3	90.3	
III 级	38	3	15	20	92.1		1	9	23	5	97.4	

2.5 NOK 与 FGFR2 蛋白在 NSCLC 组织中表达的相关性 在 163 例 NSCLC 组织中, NOK 与 FGFR2 蛋白表达呈正相关($r=0.640, P=0.000$)。其中在肺鳞癌中, NOK 与 FGFR2 蛋白表达呈正相关($r=0.684, P=0.000$)；在肺腺癌中, NOK 与 FGFR2 蛋白表达亦呈正相关($r=0.597, P=0.000$)。见表 4。

12q13.2, mRNA 全长 1269bp, 编码含 422 个氨基酸, 分子量约为 47.6kD 的蛋白质^[1]。NOK 在正常肺、脑、结肠、胎盘、骨骼肌组织中低表达, 但在肺癌和肺癌细胞系(A549)、肝癌细胞系(LO2)、乳腺癌(MDA-MB-231)、宫颈癌细胞系(HeLa)、子宫内膜癌细胞系(Ho8910)中高表达^[2-3,5-7]。Amachika 等^[6]报道 NOK mRNA 在 41 例肺癌组织中的阳性检出率达 97.6%；张志培等^[8]报道 NOK 在 NSCLC 中高表达, 且表达与病理分级及 TNM 分期有关；NOK 与 EGFR 在 NSCLC 中的表达有相关性。但 NOK 蛋白在癌组织中的表达及与肿瘤临床病理特征关系方

3 讨论

NOK 属于受体酪氨酸蛋白激酶(RPTK)家族的一员, 与同家族的 FGFR/PDGFR 具有 20% ~ 30% 的同源性, 基因组全长 2.79kb, 位于染色体

表 4 NOK 和 FGFR2 在 NSCLC 中表达的相关性

项目	NOK														
	NSCLC (n = 163)			r	P	鳞癌 (n = 79)			r	P	腺癌 (n = 84)			r	P
	-	+	++			-	+	++			-	+	++		
FGFR2				0.684	0.000				0.640	0.000				0.597	0.000
-	17	3	1			8	1	0			9	2	1		
+	33	53	3			20	28	1			13	25	2		
++	0	15	30			0	4	14			0	11	16		
+++	1	5	2			0	3	0			1	2	2		

面的研究仍较少。

本研究通过免疫组织化学方法检测 NOK 在 163 例 NSCLC 中的表达情况,并分析其表达与肺癌 TNM 分期、病理类型及病理分级的关系。结果显示,NOK 在肺鳞癌和肺腺癌中的阳性表达率分别为 64.5%、72.6%,两组无统计学差异 ($P = 0.215$); NOK 在 NSCLC 不同 TNM 分期及病理分级中的表达,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 NOK 表达可能与 NSCLC 的预后有关,NOK 蛋白可能在肺癌细胞的生长、增殖、侵袭及转移中有重要作用。本研究中 NOK 蛋白在 NSCLC 中的阳性表达率低于 Amachika 等^[6]的研究结果,Amachika 认为 NOK 可能参与 NSCLC 的发生,在肺癌临床早期 NOK mRNA 高表达,因此检测 NOK mRNA 水平可作为肺癌诊断的标志。但 NOK 参与肺癌发生、发展及转移的机制仍不明确。NOK 已被确定为一种癌基因,包含一个单一的跨膜结构域和胞内酪氨酸激酶结构域,可能会激活下游信号传导通路,但缺少胞外结合区,胞外信号通过何种受体激活 NOK 信号通路仍不清楚。RPTK₅ 在细胞增殖、分化和生长中发挥着重要作用,其表达和活性升高可以引起相应的信号通路失调,进而导致肿瘤的发生^[9-10]。实验证实 NOK 可以通过 JAK2 依赖性方式激活下游 STAT3 信号通路^[11],同时 NOK 可以通过磷酸化 Akt 与下游的 GSK-3 β 作用^[12],而 FGFR2 信号传导通路是 RPTK 信号传递的经典途径之一。

FGFR2 在不同肿瘤中的作用是各不相同的,在肺癌中有致癌作用^[13]。在肺鳞状细胞癌中,成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 是受体酪氨酸激酶家族中扩增、突变最频繁的家族之一,而 FGFR2 突变特点的数据表明其可能成为肺鳞状细胞癌治疗的新靶点^[14]。FGFR2 在 NSCLC 中高表达,在癌旁组织中表达正常或轻度异常^[15],在正常肺组织、上皮细胞和肺泡 II 型肺泡中的功能为促进细胞增殖和分

化,从而促进肺形态发育和修复,在肿瘤中可以建立一个旁分泌途径促进癌细胞的存活。同时,FGFR2 高表达促使吉非替尼类药物耐药的发生^[16]。因此,我们通过免疫组化检测 FGFR2 在 NSCLC 组织中的表达,并分析其与 NOK 表达的相关性。研究结果显示 FGFR2 在癌组织中的表达高于正常组织,在肺鳞癌和肺腺癌间的表达差异有统计学意义,在 NSCLC 不同 TNM 分期、病理分级间的表达差异明显;不论在 NSCLC 还是在肺鳞癌、肺腺癌中,FGFR2 与 NOK 表达均存在相关性 ($P < 0.01$)。因此,我们推测 NOK 的激活和信号传导有可能通过 FGFR2 介导细胞外信号发挥作用,但 NOK 与 FGFR2 的相互作用还有待体外实验进一步证实。

参考文献

- [1] Tomoko A, Daisuke K, Ryosuke M, et al. Diagnostic relevance of overexpressed mRNA of novel oncogene with kinase-domain (NOK) in lung cancers [J]. Lung Cancer, 2007, 56 (3): 337 - 340.
- [2] Li XF, Zhang ZP, Chang ZJ. The clinic significance of NOK protein expression in NSCLC [J]. Modern Oncology, 2009, 17 (5): 844 - 846.
- [3] Liu L, Yu XZ, Chang ZJ. A novel protein tyrosine kinase NOK that shares homology with platelet-derived growth factor/fibroblast growth factor receptors induces tumorigenesis and metastasis in nude mice [J]. Cancer Res, 2004, 64 (10): 3491 - 3499.
- [4] Zhang JP, Qian Y, Shen HB. Polymorphisms of fibroblast growth factor receptor 2 and susceptibility of breast cancer [J]. Chin J Control Preu, 2012, 14 (8): 764 - 767.
- [5] Moriai R, Kobayashi D, Amachika T. Diagnostic relevance of overexpressed NOK mRNA in breast cancer [J]. Anticancer Res, 2006, 26 (6C): 4969 - 4973.
- [6] Amachika T, Kobayashi D, Watanabe N. Diagnostic relevance of overexpressed mRNA of novel oncogene with kinase-domain (NOK) in lung cancers [J]. Lung Cancer, 2007, 56 (3): 337 - 340.
- [7] Kimbro KS, Duschene K, Freeman S. A novel gene STYK1/

- NOK is upregulated in estrogen receptor-alpha negative estrogen receptor-beta positive breast cancer cells following estrogen treatment[J]. *Mol Biol Rep*, 2008,35(1):23-27.
- [8] 张志培,姜涛,邓迎春,等. NOK 与 EGFR 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及相关性意义[J]. *中国肺癌杂志*,2009,12(9):983-988.
- [9] Hunter T. Signaling-2000 and beyond[J]. *Cell*,2000,100(1):113-127.
- [10] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases[J]. *Cell*,2010,141(7):1117-1134.
- [11] 李颖华,戎煜,常智杰,等. NOK 通过 JAK2 依赖性方式激活 STAT3 信号通路[J]. *生物化学与生物物理进展*,2008,35(2):143-150.
- [12] Li J, Wu F, Sheng F, et al. NOK/STYK1 interacts with GSK-3 β and mediates Ser9 phosphorylation through activated Akt[J]. *FEBS Lett*, 2012,568(21):3787-3792.
- [13] Ji W, Sun WJ, Zhang HS. Advance in research of human fibroblast growth factor receptor2[J]. *Int J Genet*,2011,34(4):186-195.
- [14] Liao RG, Jung J, Tchaicha J, et al. Inhibitor-sensitive FGFR2 and FGFR3 mutations in lung squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*,2013,73(16):5195.
- [15] Behrens C, Lin HY, Lee JJ, et al. Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(19):6014-6022.
- [16] Ware KE, Marshall ME, Heasley LR. Rapidly acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC cell lines through de-repression of FGFR2 and FGFR3 expression[J/OL]. *PLoS One*,2010[2013-4-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152424>.

收稿日期:2013-05-24; 修回日期:2013-10-11