



· 论 著 ·

腺苷酸激酶4在肺腺癌中的表达及其临床意义

田 华¹, 何小勇², 王道猛², 杨永国¹, 梅 霞¹, 钱 斌²

1. 扬州市江都人民医院病理科, 江苏 扬州 225200 ;
2. 扬州市江都人民医院胸外科, 江苏 扬州 225200

[摘要] 背景与目的: 腺苷酸激酶 (adenylate kinase 4, AK4) 是一种调节腺嘌呤核苷酸代谢和体内稳态的关键调节酶。研究发现, AK4可促进肺癌细胞的侵袭与转移, 并与肺癌患者预后不良密切相关, 但AK4在肺腺癌发生、发展过程中的作用尚不清楚。研究AK4在肺腺癌中表达的变化, 以及与患者临床病理学特征之间的关系, 探讨AK4在肺腺癌发生、发展过程中的作用。**方法:** 应用免疫组织化学EnVision法研究江苏省扬州市江都人民医院2017年1月—2019年12月胸外科手术切除的297例肺腺癌不同阶段病变, 其中浸润性腺癌 (invasive adenocarcinoma, IA) 152例, 微浸润性腺癌 (microinvasive adenocarcinoma, MIA) 52例, 原位腺癌 (adenocarcinoma *in situ*, AIS) 60例, 非典型腺瘤样增生 (atypical adenomatous hyperplasia, AAH) 33例, 以及30例正常肺组织中AK4的表达。**结果:** AK4在AAH、AIS、MIA和IA中的表达率分别为63.6%、75.0%、71.1%和81.6%, 均明显高于正常肺组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但AK4表达率在AAH、AIS、MIA和IA之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AK4表达率在有淋巴结转移者高于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$), AK4高表达与肺腺癌pTNM分期密切相关 ($P < 0.05$)。AK4表达率与肺腺癌患者性别、年龄、吸烟状态、肿瘤部位及大小、脉管侵犯和胸膜侵犯无关 ($P > 0.05$)。**结论:** AK4不仅参与肺腺癌的早期发生, 还参与肺腺癌的进展。AK4可望作为肺腺癌早期诊断和评估疾病进展的一种生物标志物。

[关键词] 肺肿瘤; 腺癌; 腺苷酸激酶; 临床病理学特征

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.02.004

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)02-0108-06

Expression of adenylylase kinase 4 in lung adenocarcinoma and its clinical significance TIAN Hua¹, HE Xiaoyong², WANG Daomeng², YANG Yongguo¹, MEI Xia¹, QIAN Bin² (1. Department of Pathology, Jiangdu People's Hospital of Yangzhou, Yangzhou 225200, Jiangsu Province, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Jiangdu People's Hospital of Yangzhou, Yangzhou 225200, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: QIAN Bin E-mail: 18952531085@189.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Adenylylase kinase 4 (AK4) is a key regulation enzyme that regulates the metabolism of adenylylase and maintains homeostasis *in vivo*. Some studies show that AK4 promotes the invasion and metastasis of lung cancer cells and correlates with the poor prognosis of patients with lung carcinoma. However, the role of AK4 in the occurrence and development of early-stage lung adenocarcinoma is not clear. The purpose of this study was to investigate the change of AK4 expression in the carcinogenesis of early-stage lung adenocarcinoma and its relationship with clinicopathologic features, and to explore the role of AK4 in the carcinogenesis and progression of early-stage lung adenocarcinoma. **Methods:** Immunohistochemical EnVision method was used to detect the expression of AK4 in 297 cases of lung adenocarcinoma at different stages treated in Jiangdu People's Hospital of Yangzhou from Jan. 2017 to Dec. 2019, including invasive adenocarcinoma (IA) ($n=152$), minimally invasive adenocarcinoma (MIA) ($n=52$), adenocarcinoma *in situ* (AIS) ($n=60$) and atypical adenomatous hyperplasia (AAH) ($n=33$), and normal tissues ($n=30$). **Results:** The expression rates of AK4 in AAH, AIS, MIA, and IA were 63.6%, 75.0%, 71.1%, and 81.6%, respectively, which were higher than in normal lung tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). However, there was no significant difference in expression of AK4 among AAH, AIS, MIA and IA ($P > 0.05$). The expression rate of AK4 in lung adenocarcinoma with lymph node metastasis was higher compared with those without lymph node metastasis ($P < 0.05$), and expression of AK4 was related to pTNM stage ($P < 0.05$). However, expression of AK4 was related to gender, age, smoking status, tumor location and size, vascular invasion and pleura invasion ($P > 0.05$). **Conclusion:** AK4 may be involved in not only early occurrence of lung adenocarcinoma, but also the progression of lung adenocarcinoma. AK4 may be a biomarker for the early diagnosis of lung adenocarcinoma and

通信作者: 钱 斌 E-mail: 18952531085@189.cn

evaluation of disease progression.

[Key words] Lung neoplasm; Adenocarcinoma; Adenylate kinase; Clinical pathological features

肺癌是世界范围内病死率第一位的恶性肿瘤，而腺癌是肺癌最常见的组织学类型，约占所有肺癌的50%^[1]。目前研究^[2]表明，大多数肺腺癌是通过肺泡上皮非典型腺瘤样增生（atypical adenomatous hyperplasia, AAH）、原位腺癌（adenocarcinoma *in situ*, AIS）、微浸润性腺癌（microinvasive adenocarcinoma, MIA）到浸润性腺癌（invasive adenocarcinoma, IA）这个癌变顺序发展而来，但其具体机制尚不明确。腺苷酸激酶4（adenylate kinase 4, AK4）是一种调节腺嘌呤核苷酸代谢和体内稳态的关键调节酶，研究发现AK4可促进肺癌细胞的转移，且其表达与肺癌患者预后差密切相关。然而，AK4在肺腺癌发生、发展过程中的作用还不十分清楚，本研究应用免疫组织化学方法研究AK4在肺腺癌发生过程中的不同阶段的表达，同时分析其与IA临床病理学特征之间的关系，旨在探讨AK4在肺腺癌发生、发展过程中的作用，为肺腺癌的早期诊断提供一个生物标志物，也为肺IA治疗提供一个潜在的分子靶点。

1 资料和方法

1.1 病例资料

收集江苏省扬州市江都人民医院2017年1月—2019年12月胸外科手术切除的297例肺腺癌不同阶段病变的标本，所有病例均经病理学检查确诊，其中IA 152例，MIA 52例，AIS 60例和AAH 33例。同时选取因肺部非肿瘤性病变进行肺手术切除的肺组织30例作为正常对照。

1.2 免疫组织化学方法

1.2.1 免疫组织化学试剂

鼠抗人AK4单克隆抗体购自美国LifeSpan Biosciences公司，工作浓度为1:150；EnVision法免疫组织化学试剂盒、抗原修复液、DAB显色试剂盒等购自美国Dako公司；H-E染色试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 免疫组织化学方法

所有手术切除标本均采用4%中性甲醛溶液固定，常规石蜡包埋成蜡块，然后使用切片机切片5 μm厚，分别进行H-E染色和免疫组织化学染色。免疫组织化学染色采用EnVision法，主要步骤如下：切片先放置于67℃烤箱中烘片2 h，然后脱蜡至水后用磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline, PBS）冲洗3次，每次3 min；采用高压锅在高温高压下进行抗原修复，抗原修复液为枸橼酸钠缓冲液（pH为6.0），高压锅煮沸后继续加热2 min，然后自来水下自然冷却，冷却后取出玻片，先用蒸馏水冲洗2次，然后用PBS冲洗2次，每次3 min；切片滴加1滴3% H₂O₂，室温下温育10 min，以阻断内源性过氧化物酶活性，然后PBS冲洗3次，每次3 min；切片上滴加一抗，放置湿盒中，4℃冰箱中温育过夜；次日湿盒取出后置于室温下30 min，PBS冲洗3次，每次3 min；滴加试剂A，室温下温育20 min，PBS冲洗3次，每次3 min；滴加试剂B，室温下温育30 min，PBS冲洗3次，每次3 min；滴加新鲜配制的DAB液，镜下控制反应时间，自来水终止染色；苏木精复染，0.1% HCl分化，自来水冲洗，蓝化，梯度乙醇脱水干燥，二甲苯透明，中性树脂胶封固，在显微镜下观察。

1.3 结果判断

所有免疫组织化学染色切片由病理科2名高年资主治医师在双盲条件下进行判读，结果不一致者在多头显微镜下共同阅片并达成一致。AK4阳性表达为颗粒状胞质阳性，结果判断参照参考文献[3]，先根据染色强度分为：无染色，0分；弱阳性，1+；中等阳性，2+；强阳性3+；然后根据阳性细胞百分比为25%进一步分为2组，AK4染色结果分为高表达和低表达，当阳性细胞染色强度为2+或3+且阳性细胞比例>25%为高表达，其余则为低表达。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件对数据进行统计学分析。肺腺癌发生不同阶段病变中AK4表达的差

异采用 χ^2 检验, IA中AK4表达与临床病理学指标之间的关系采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺IA临床病理学特征

152例肺IA中, 患者发病年龄52~73岁, 平均62.6岁; 男性90例, 女性62例; 肿瘤位于左肺66例, 右肺86例; 吸烟者55例, 不吸烟者97例; 肿瘤最大径为1.1~5.3 cm, 其中 ≤ 3 cm者102例, > 3 cm者50例; 肺腺癌组织学类型以主要结构作为该例主要组织学类型, 腺泡型68例、贴壁型30例、微乳头型22例、实体型16例、乳头型16例; 有淋巴血管侵犯者40例, 无淋巴血管侵犯者112例; 有胸膜侵犯者34例, 无胸膜侵犯者118例; 有淋巴结转移者53例, 无淋巴结转移者99例; pTNM分期参照美国癌症联合会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 第8版进行分期, I期92例, II期60例。

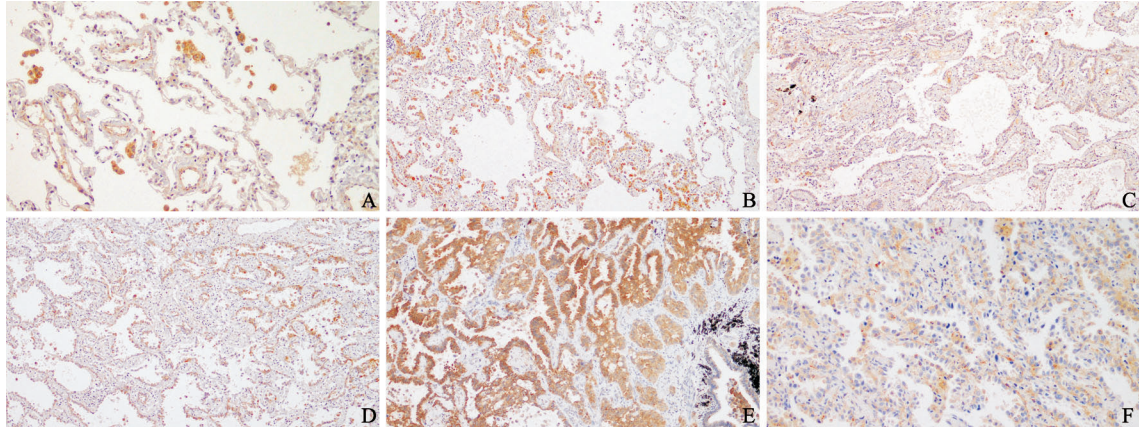


图 1 AK4在肺腺癌发生不同阶段病变中的表达

Fig. 1 Expression of AK4 at different stages of carcinogenesis in lung adenocarcinoma

A: No expression of AK4 in normal lung tissue (EnVision, $\times 100$); B: High expression of AK4 in AAH (EnVision, $\times 100$); C: High expression of AK4 in AIS (EnVision, $\times 100$); D: High expression of AK4 in MIA (EnVision, $\times 100$); E: High expression of AK4 in IA (EnVision, $\times 200$); F: Low expression of AK4 in IA (EnVision, $\times 200$)

2.3 肺腺癌中AK4表达与临床病理学特征之间的关系

AK4高表达与肺腺癌患者的年龄、部位、吸烟状态、肿瘤大小、脉管侵犯和胸膜侵犯无关 ($P>0.05$)。我们根据肺腺癌主要结构作为该例最终的组织学类型, 结果显示, AK4在微乳头型、实体型肺腺癌中高表达率虽然高于腺泡

2.2 AK4在肺腺癌不同阶段病变中的表达

AK4阳性表达为细胞质内颗粒状阳性 (图1)。正常肺组织中, 所有病例均无AK4表达。AK4在AAH、AIS、MIA和IA中的高表达率分别为63.6%、75.0%、71.1%和81.6%, 均明显高于正常肺组织, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。AK4在AIS与AAH、AIS与MIA、MIA与IA之间的高表达率差异无统计学意义 ($P>0.05$, 表1)。

表 1 AK4在肺腺癌发生不同阶段病变中的表达

Tab. 1 Expression of AK4 in different lesions of lung

Group	n	AK4		χ^2	P value
		Low expression	High expression		
Normal	30	30	0	80.161	0.000
AAH	33	12	21		
AIS	60	15	45		
MIA	52	15	37		
IA	152	28	124		

AAH: Adenomatoid hyperplasia; AIS: Adenocarcinoma *in situ*; MIA: Minimally invasive adenocarcinoma; IA: Invasive adenocarcinoma; AAH vs AIS: $\chi^2=1.334$, $P=0.248$; AIS vs MIA: $\chi^2=0.210$, $P=0.647$; MIA vs IA: $\chi^2=2.531$, $P=0.112$

型、贴壁型和乳头型腺癌, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。AK4在有淋巴结转移的肺腺癌中高表达率高于无淋巴结转移者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); pTNM分期中, II期肺腺癌中AK4高表达率高于I期肺腺癌, 差异有统计学意义 ($P<0.05$, 表2)。

表 2 AK4高表达与肺IA临床病理学特征之间的关系

Tab. 2 The correlation between high expression of AK4 and clinicopathological features in invasive adenocarcinoma of lung

Clinicopathological features	n	AK4 expression		χ^2	P value
		High expression	Low expression		
Age/year				2.021	0.155
<60	104	88	16		
≥ 60	48	36	12		
Gender				2.322	0.128
Male	90	77	13		
Female	62	47	15		
Tumor location				0.605	0.437
Left	66	52	14		
Right	86	72	14		
Smoking				1.560	0.212
Yes	55	39	16		
No	97	85	12		
Tumor size D/cm				0.009	0.925
≤ 3	102	83	19		
> 3	50	41	9		
Histologic type				2.457	0.652
Acinar	68	59	9		
Lepidic	30	23	7		
Micropapillary	22	17	5		
Solid	16	13	3		
Papillary	16	12	4		
Vascular invasion				0.090	0.764
Yes	40	32	8		
No	112	92	20		
Lymph node metastasis				4.374	0.037
Yes	53	48	5		
No	99	76	23		
Pleural invasion				0.881	0.348
Yes	34	30	4		
No	118	96	22		
pTNM stage				4.678	0.031
I	92	70	22		
II	60	54	6		

3 讨 论

肺癌是呼吸系统最常见的恶性肿瘤，近年来尽管包括外科手术、放疗、化疗、靶向治疗等多种治疗方法取得了很大进展，但肺癌患者的总体预后仍然很差，所有分期的5年生存率仅为15%，而且仅有16%的肺癌患者可在早期得到诊断^[4]。因此，寻找肺癌发生、发展过程中的基因改变对于评估患者预后、提供肺癌早期诊断的

生物标志物，以及提供肺癌治疗的靶点具有重要价值。

AK是多种生物活细胞中高能量磷酸化转移反应中的一类关键调节酶，在腺嘌呤核苷酸代谢和维持体内稳态中发挥重要作用^[5]。目前在人体组织中发现了9种AK同工酶，它们共同调节不同细胞内的腺嘌呤核苷酸组成，以维持细胞的能量动态平衡^[6]。不同AK在细胞内的定位不同，其中AK3和AK4表达于线粒体基质中，AK4

与AK3具有高度的序列同源。但与AK3不同, AK4已被报道在体外无酶活性, 但仍保留其核苷酸结合能力, 生理上与线粒体ADP/ATP转运子相互作用, 并作为一种应激反应蛋白维持细胞存活^[7]。

AK4在恶性肿瘤中的作用近年来已有相关报道。郭嘉宁等^[8]研究发现, 前列腺癌中AK4阳性表达高于癌旁组织, 且AK4异常表达与前列腺癌复发、远处转移和生存时间短密切相关。庞亮等^[9]对肌肉浸润性膀胱癌AK4的研究发现, AK4在癌组织中高表达率显著高于癌旁正常组织, AK4高表达率与远处转移和脉管内瘤栓有关, 生存分析显示, AK4高表达患者生存时间短于低表达者。李辰运等^[10]研究发现, AK4在胰腺癌组织中的表达高于癌旁组织, AK4的异常表达与肿瘤分期、淋巴结转移、神经受侵犯、脉管内瘤栓相关, 而且生存分析也提示AK4高表达患者生存时间短。Xin等^[11]应用免疫组织化学和分子生物学方法研究发现, AK4高表达不仅与膀胱癌的肿瘤分期、远处转移和血管侵犯有关, 还与膀胱癌患者不良预后相关, 体外实验研究显示, AK4可促进膀胱癌细胞系的生长、侵袭和转移。Zhang等^[12]研究发现, AK4可促进HER2阳性乳腺癌的进展。这些研究结果表明, AK4可以通过多种机制促进多种类型癌细胞的侵袭转移。

AK4与肺癌的相关研究目前国外较少, 而国内尚未见相关报道。Jan等^[13]首先采用微阵列数据库研究发现, AK4在肺腺癌中表达明显高于正常肺组织, 肺癌中AK4高表达与肿瘤分期晚、疾病复发及预后差有关, 进一步分析显示, AK4是通过下调ATF3从而促进肺癌细胞的侵袭转移。由于AK4的基因位于线粒体基质中, 可能涉及到代谢相关的基因, Jan等^[3]进行的另一项研究结果发现, HIF-1 α 活性在具有AK4代谢基因特征的肺癌中被显著激活, AK4过度表达使代谢向有氧糖酵解方向转变, 增加细胞内活性氧水平, 从而稳定HIF-1 α 蛋白水平, 并以HIF-1 α 依赖性方式促进肺癌细胞的上皮-间质转化。他们通过分析癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中肺腺癌RNA序列数据发现,

相比于其他AK的基因, AK4和AK1的基因高表达者肺腺癌患者的预后更差, 采用shRNA降低AK4的表达可降低表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的基因突变细胞中EGFR的蛋白表达^[14]。这些研究中虽然发现AK4在肺腺癌中高表达, 但在肺腺癌发生过程中是早期还是晚期事件尚不清楚。我们应用免疫组织化学方法分析了肺腺癌发生不同阶段病变中AK4表达的变化, 结果显示从AAH到IA中, AK4表达均明显高于正常肺组织, 进一步分析显示, 随着病变从AAH到腺癌进展, AK4表达率趋于增高, 但它们之间差异无统计学意义。本研究结果提示AK4可能参与了早期肺腺癌的发生, 提示AK4检测可以作为肺腺癌诊断的一个早期生物标志物。

本研究对AK4高表达与肺腺癌临床病理学特征之间的关系进行了分析, 结果显示, AK4高表达与肺腺癌淋巴结转移和pTNM分期密切相关, 淋巴结转移阳性及高pTNM分期者的肺腺癌中AK4表达率明显增高, 本研究也进一步证实了AK4表达可以促进肺腺癌的侵袭转移。AK4高表达与患者年龄、性别、吸烟状态、肿瘤部位和脉管侵犯无关。本研究发现, 肿瘤最大径>3 cm和有胸膜侵犯者中AK4表达率高于肿瘤最大径 \leq 3 cm和无胸膜侵犯者, 但差异无统计学意义, 可能与本组资料中>3 cm和有胸膜侵犯的肺癌病例数少有关, 尚有待于后期进一步积累病例研究。肺腺癌具有高度的异质性, 同一肺腺癌可含有多种形态学结构, 我们以肺腺癌主要结构进行AK4表达分析, 结果发现, AK4表达率在实体型和微乳头型腺癌中高于其他类型的腺癌, 但差异无统计学意义, 需要进一步扩大样本量明确其意义。然而实体型和微乳头型已被明确为具有侵袭性的组织学结构, 因此, AK4表达肺腺癌在临床生物学行为上可能具有高度侵袭能力, 需要给予积极处理。

目前研究已经证实肺腺癌可存在多个驱动基因改变, AK4与这些驱动基因改变是否存在相关性还不清楚。由于本组病例中仅有少数病例进行了肺癌驱动基因的检测, 我们未能进行这方面的

相关分析,待以后肺癌驱动基因检测的病例数足够再进行深入的研究。

总之,AK4高表达在肺腺癌早期病变AAH中已经开始出现,提示AK4可能在肺腺癌的早期发生阶段发挥作用,AK4检测可以作为早期肺腺癌诊断的一种生物标志物。AK4高表达与肺腺癌的脉管侵犯、淋巴结转移和pTNM分期密切相关,通过肺腺癌AK4的检测可以更好地评估肺腺癌的恶性程度及预后。

[参 考 文 献]

- [1] 陈万青,张思维,邹小农.中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J].中国肺癌杂志,2010,13(5):488-493.
CHEN W Q, ZHANG S W, ZOU X N. Estimation and projection of lung cancer incidence and mortality in China [J]. Chin J Lung Cancer, 2010, 13(5): 488-493.
- [2] TRAVIS W D, BRAMBILLA E, NICHOLSON A G, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(9): 1243-1260.
- [3] JAN Y H, LAI T C, YANG C J, et al. Adenylate kinase 4 modulates oxidative stress and stabilizes HIF-1 α to drive lung adenocarcinoma metastasis [J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 12.
- [4] PARKIN D M. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. Lancet Oncol, 2001, 2(9): 533-543.
- [5] DZEJA P, TERZIC A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing [J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(4): 1729-1772.
- [6] PANAYIOTOU C, SOLAROLI N, KARLSSON A. The many isoforms of human adenylate kinases [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 49: 75-83.
- [7] LIU R, STROM A L, ZHAI J, et al. Enzymatically inactive adenylate kinase 4 interacts with mitochondrial ADP/ATP translocase [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(6): 1371-1380.
- [8] 郭嘉宁,李慧,胡占东,等.前列腺癌中腺苷酸激酶4的表达及临床意义[J].国际生物医学工程杂志,2018,41(1):51-55.
GU J, LI H, Z, HU Z, et al. Expression of adenylate kinase 4 in prostate cancer and its clinical significance [J]. Int J Biomed Eng, 2018, 41(1): 51-55.
- [9] 庞亮,刘光明,荆振,等.肌肉浸润性膀胱癌中腺苷酸激酶4的表达及临床意义[J].医学综述,2018,24(4):812-819.
PANG L, LIU G, JIN Z, Expression of AK4 in muscle infiltrating bladder cancer and its clinical significance [J]. Med Recap, 2018, 24(4): 812-819.
- [10] 李辰运,孙彤,卓娜,等.胰腺导管腺癌中腺苷酸激酶4的表达及临床意义[J].天津医科大学学报,2018,24(1):43-46.
LI C, SUN T, ZHUO N, et al. Expression of AK4 in pancreatic ductal carcinoma and its clinical significance [J]. J Tianjin Med Univ, 2018, 24(1): 43-46.
- [11] XIN F, YAO D W, FAN L, et al. Adenylate kinase 4 promotes bladder cancer cell proliferation and invasion [J]. Clin Exp Med, 2019, 19(4): 525-534.
- [12] ZHANG J, YIN Y T, WU C H, et al. AK4 promotes the progression of HER2-positive breast cancer by facilitation cell proliferation and invasion [J]. Dis Markers, 2019, 2019: 8186091.
- [13] JAN Y H, TSAI H Y, YANG C J, et al. Adenylate kinase-4 is a marker of poor clinical outcomes that promotes metastasis of lung cancer by downregulating the transcription factor ATF3 [J]. Cancer Res, 2012, 72(19): 5119-5129.
- [14] JAN Y H, LAI T C, YANG C J, et al. A co-expressed gene status of adenylate kinase 1/4 reveals prognostic gene signature associated with prognosis and sensitivity to EGFR targeted therapy in lung adenocarcinoma [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 12329.

(收稿日期:2020-09-10 修回日期:2021-01-02)