

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)20-1834-04

食管鳞癌多阶段癌变中 14-3-3 σ 和 P53 表达特征及相关性分析

齐义军^{1,2}, 马远方^{1,2}, 杜耀武^{1,2}, 刘广超^{1,2}, 张蕾蕾³, 张国民³, 施巩宁⁴, 张双林⁴, 李勇⁴, 何占锋⁴, 何庆瑜⁵ (河南大学: ¹免疫学研究所, ²细胞与分子免疫学重点实验室, ³淮河医院病理科, ⁴淮河医院胸心外科, 河南 开封 475000, ⁵暨南大学生命与健康工程研究院, 广东 广州 510632)

Characterization and correlation of 14-3-3 σ and P53 protein expressions in multi-stage carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma

QI Yi-Jun^{1,2}, MA Yuan-Fang^{1,2}, DU Yao-Wu^{1,2}, LIU Guang-Chao^{1,2}, ZHANG Lei-Lei³, ZHANG Guo-Min³, SHI Gong-Ning⁴, ZHANG Shuang-Lin⁴, LI Yong⁴, HE Zhan-Feng⁴, HE Qing-Yu⁵

¹Institute of Immunology, ²Key Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, ³Department of Pathology, Huaihe Hospital, ⁴Department of Cardiothoracic Surgery, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475000, China, ⁵Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

【Abstract】AIM: To characterize the 14-3-3 σ and P53 protein expressions during multi-stage carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and in normal esophageal mucous epithelium. **METHODS:** Immunohistochemistry (ABC) methods were used to determine 14-3-3 σ and P53 protein expressions in 60 cases of ESCC, nearby matched normal esophageal epithelium and a variety of ESCC precursors. **RESULTS:** High expression of 14-3-3 σ was found ubiquitously in normal esophageal epithelium with a digitalized average value of 8.22 in expression. Protein 14-3-3 σ was down-regulated stepwise during the development of esophageal carcinoma from normal epithelium. Sixty-four percent of poorly-differentiated squamous cancer lost 14-3-3 σ expression with the digitalized value of 0.45. However, pattern of P53 protein expression was in contrast to 14-3-3 σ . Sixty-seven percent of esophageal cancer expressed P53 at a high level with a quantitated amount of 4.8. In nearby normal epithelium of esophagus, the P53 protein expression was low with a digitalized value of 0.42. Significant negative correlation between 14-3-3 σ and p53 expressions was revealed by Spearman rank correlation analysis ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The aberrant expression pattern of 14-3-3 σ and

p53 may contribute to the formation and progression of ESCC and may predict the prognosis of ESCC patients. Proteins 14-3-3 σ and P53 have the potential to become biomarkers for early diagnosis of esophageal cancer and end-point molecules of ESCC prevention.

【Keywords】 esophageal neoplasms; carcinoma, squamous cell; 14-3-3 σ ; genes, p53; biomarkers

【摘要】目的:探讨 14-3-3 σ 和 P53 蛋白表达在食管鳞癌和癌旁正常黏膜上皮、各级癌前病变中的变化特征及相关性。方法:采用免疫组织化学方法检测 14-3-3 σ 和 P53 蛋白在 60 例不同分化程度食管鳞癌和癌旁正常食管黏膜上皮、各级癌前病变中的表达变化。结果:癌旁正常食管黏膜上皮中均可检测到不同程度的 14-3-3 σ 蛋白表达(表达量 8.22),随着癌前病变进展,14-3-3 σ 的表达率和表达量逐渐下降,低分化鳞癌中 14-3-3 σ 的表达量最低(表达量 0.45),完全失表达率为 64%(7/11)。P53 蛋白在鳞癌中表达率最高 67%(27/40),表达量为 4.86,而只有 25%(6/24)癌旁正常上皮表达 P53 蛋白(表达量 0.42)。14-3-3 σ 和 P53 蛋白的相关性分析表明二者呈显著负相关($P < 0.05$)。结论:P53 蛋白可能通过负调控 14-3-3 σ 基因的表达参与食管癌变多阶段演进过程,14-3-3 σ 和 P53 可能成为食管癌早期诊断及高危人群筛查的分子指标,同时也可能成为食管癌生物预防和疗效评价的新靶点。

【关键词】 食管肿瘤;癌,鳞状细胞;14-3-3 σ ;基因,P53;分子标记物

【中图分类号】 R730.231

【文献标识码】 A

0 引言

食管癌是我国常见的四大恶性肿瘤之一^[1]。由于目前缺乏特异、敏感的食管癌早期诊断的分子指标,临床上首次就诊的食管癌患者大多数已发展到中晚期阶段,因此鉴定食管癌早期阶段异常的分子改变具有重要的意义^[2]。14-3-3 σ 是一新的候选肿瘤抑制基因,野生型 P53 可诱导 14-3-3 σ 表达上调^[3]。14-3-3 σ 蛋白的失表达发生于人类多种肿瘤^[4]。我们运用免疫组化技术检测了 14-3-3 σ 和 P53 在不同分化程度的鳞癌和相应癌旁正常食管黏膜上皮、各级癌前病变中的表达特征,为探索食管癌发生发展的分子机制及食管癌早期诊断的分子指标奠定基础。

收稿日期 2007-04-16; 接受日期 2007-06-15

基金项目 国家自然科学基金(30700366)

通讯作者:马远方. Tel: (0378) 3880398 Email: mayf@henu.edu.cn

作者简介:齐义军. 博士,副教授. Tel: (0378) 3880398 Email: qiqiyi-jun@yahoo.com.cn

1 对象和方法

1.1 对象 收集河南省食管癌高发区食管癌手术标本 60(男 31,女 28)例,年龄 46~70(58.2 ± 6.8)岁;同时收集相应的癌旁食管上皮标本。患者术前均未接受任何化疗或放疗。所有标本离体后立即用 40 mL/L 甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋,连续切片,切片厚 5 μm 。病理学诊断全部为食管鳞状细胞癌(ESCC)其中,高分化 22 例,中分化 26 例,低分化 12 例。癌旁食管黏膜上皮包括正常食管黏膜上皮组织 44 个,基底细胞过度增生病灶 38 个,不典型增生病灶 53 个,原位癌 22 个。多克隆羊抗人 14-3-3 σ 抗体(Santa Cruz 公司),兔抗羊二抗、ABC 试剂盒、DAB 底物试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 方法 免疫组化采用 ABC 法。石蜡切片脱蜡,梯度乙醇至水,PBS 洗 3 次,柠檬酸盐抗原修复液(pH 6.0)微波处理 30 min 后用 3 mL/L H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶,用 1:50 的正常马血清室温孵育 20 min,加 20 mL/L BSA 稀释至 1:200 的 14-3-3 σ 一抗和 1:500 的 p53 一抗置于湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜(12 h)。分别加 2% BSA 稀释至 1:200 的生物素标记的抗山羊和抗鼠二抗,孵育 45 min,ABC(1:1:50)室温孵育 1h,二氨基联苯胺(DAB)和 H_2O_2 孵育,显微镜下观察,适时终止反应,最后苏木素复染 15~30 s 和封片。阳性对照采用已知阳性切片,以 PBS 代替一抗做为阴性对照。免疫组化染色结果评分标准如下。染色强度评分:无染色为 0 分,细胞核、细胞膜或胞质呈现淡黄色颗粒,明显高于背景为 1 分;呈现浅棕黄色颗粒为 2 分;出现大量深棕黄色颗粒为 3 分。然后根据阳性细胞百分数进行评分:每片随机观察 5 个视野,计数 100 个细胞中染色阳性细胞数,阳性细胞数 <5% 为 0 分,阳性细胞数 5%~25% 为 1 分,26%~75% 为 2 分;>75% 为 3 分。染色强度评分与阳性细胞数比例的评分相乘所得之积为最终总评分(0~9 分)。

统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件包处理,独立样本 t 检验用于各组间差异的分析,运用 Spearman 等级相关分析处理 14-3-3 σ 和 p53 之间的相关性分析,检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 14-3-3 σ 在鳞癌及癌旁不同组织类型中的表达

14-3-3 σ 阳性免疫反应复合物呈淡黄色至深棕不同的棕黄色颗粒,主要分布于细胞膜和细胞质,有时亦可见于细胞核(图 1)。癌旁形态学正常的食管黏膜

上皮组织中免疫染色呈深棕黄色,80% 以上组织中的阳性细胞百分数大于 75%,14-3-3 σ 蛋白在癌旁正常上皮表达量的均值为 8.22(表 1)。在癌旁食管黏膜上皮发生不同程度的病变时免疫反应的染色强度和阳性反应的细胞数均较正常上皮降低。随着病变程度加重,14-3-3 σ 蛋白表达进行性下降,尤其是原位癌时,阳性反应主要呈浅淡黄色,大部分的免疫阳性反应的病灶内阳性细胞百分比在 5%~25%,CIS 时免疫染色总评分的均值为 2.78。在不同分化程度的鳞癌,14-3-3 σ 蛋白的表达亦不同。在高分化鳞癌,14-3-3 σ 的免疫阳性反应以中强度为主,免疫染色总评分的均值为 5.69。在低分化鳞癌,14-3-3 σ 蛋白的表达降至最低点,约 64% 的低分化鳞癌失去 14-3-3 σ 蛋白表达。统计学分析表明:正常食管黏膜上皮与各级病变、BCH 与较重各级病变之间均有显著性差异($P < 0.01$)。不同分化程度的鳞癌之间,14-3-3 σ 蛋白表达亦有显著的统计学差异($P < 0.01$)。随病变进行性发展,从正常食管上皮至各级病变中 14-3-3 σ 蛋白表达逐渐下降,在低分化鳞癌时表达量最低,免疫染色评分的均值为 0.45(图 2)。

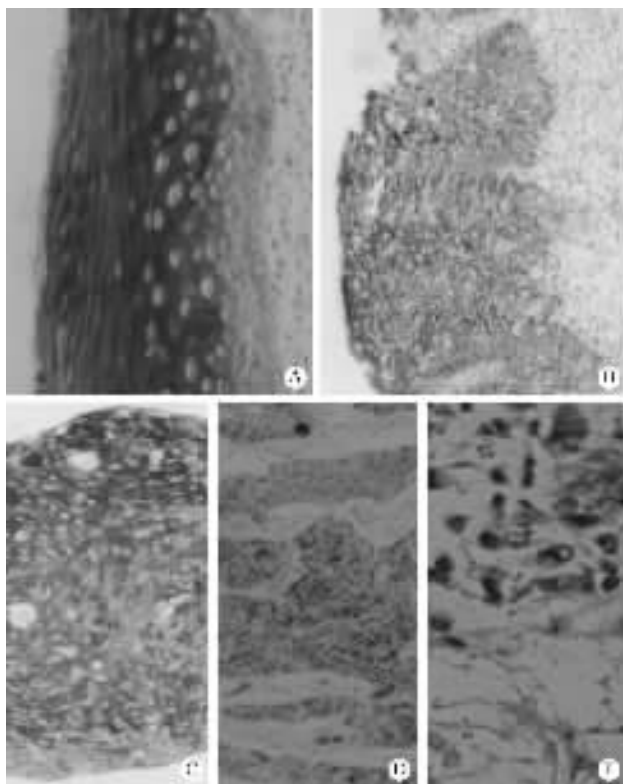
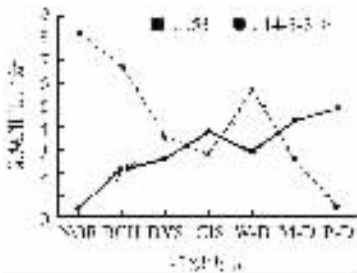


图 1 14-3-3 σ 在正常食管黏膜上皮(A),不典型增生(B),高分化鳞癌(C),中分化鳞癌(D),低分化鳞癌(E)中的表达 ABC $\times 100$

表1 食管鳞癌和癌旁正常上皮、各级癌前病变中 14-3-3 σ 免疫反应情况[n (%)]

| 组织类型 | n | 染色强度 | | | | 阳性反应细胞百分数 | | | | 评分均值 |
|--------------------|-----|-------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|---------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| NOR | 41 | 0 | 0 | 1(3) | 40(97) | 0 | 2(5) | 6(15) | 33(80) | 8.2 \pm 1.7 |
| BCH ^a | 32 | 0 | 0 | 6(19) | 26(81) | 0 | 3(9) | 13(41) | 16(50) | 6.7 \pm 2.0 |
| DYS ^b | 37 | 2(5) | 9(24) | 17(47) | 9(24) | 2(5) | 12(32) | 17(47) | 6(16) | 3.6 \pm 2.7 |
| CIS ^b | 18 | 0 | 11(61) | 3(17) | 4(22) | 0 | 10(55) | 5(28) | 3(17) | 2.8 \pm 2.6 |
| W-D ^b | 13 | 0 | 2(15) | 8(62) | 3(23) | 0 | 0 | 3(23) | 10(77) | 5.7 \pm 1.9 |
| M-D ^{bd} | 23 | 2(9) | 12(52) | 4(17) | 5(22) | 2(9) | 8(35) | 9(39) | 4(17) | 2.6 \pm 1.8 |
| P-D ^{bdf} | 11 | 7(64) | 4(36) | 0 | 0 | 7(64) | 3(27) | 1(9) | 0 | 0.5 \pm 0.7 |

^a $P < 0.05$ vs DYS, CIS, W-D, M-D, P-D 组, ^b $P < 0.01$ vs NOR 组, ^d $P < 0.01$ vs W-D 组, ^f $P < 0.01$ vs M-D. NOR: 癌旁正常食管上皮, BCH: 基底细胞过度增生, DYS: 不典型增生, CIS: 原位癌, W-D: 高分化鳞癌, M-D: 中分化鳞癌, P-D: 低分化鳞癌.



NOR: 癌旁正常食管上皮; BCH: 基底细胞过度增生; DYS: 不典型增生; CIS: 原位癌; W-D: 高分化鳞癌; M-D: 中分化鳞癌; P-D: 低分化鳞癌.

图2 14-3-3 σ 和 P53 在鳞癌及癌旁组织中免疫组化评分与不同组织类型的关系

2.2 p53 在鳞癌及癌旁不同组织类型中的表达仪表

P53 主要表达于细胞核, 免疫反应依强弱不等呈不同程度的棕黄色颗粒(图3). 在癌旁正常的上皮组织, P53 免疫反应阳性细胞主要为散在分布, 呈镶嵌型, P53 阳性反应率约为 25%, 免疫染色评分均值为 0.42(表2). 在基底细胞过度增生、不典型增生和原位癌癌前病变时, P53 蛋白表达逐渐增强, 并且与正常上皮表达比较, 有显著的统计学差异($P < 0.01$). 在鳞癌中 P53 蛋白明显高表达, 并且表达 P53 蛋白的细胞多呈弥漫性分布, 染色强度亦是强阳性. 在正常食管黏膜上皮和各级病变中, P53 蛋白与病变明显相关, 随病变进行性发展, P53 蛋白表达逐渐增强, 在低分化鳞癌中表达量最高, 免疫染色评分的均值达到 4.86(图2).

2.3 14-3-3 σ 和 P53 相关性分析 14-3-3 σ 蛋白表达模式与 P53 蛋白表达模式明显不同, 14-3-3 σ 表达高时, p53 表达低, 反之亦然. 经 Spearman 等级相关分析, 14-3-3 σ 与 P53 蛋白表达显著负相关($r = -0.226, P < 0.05$).

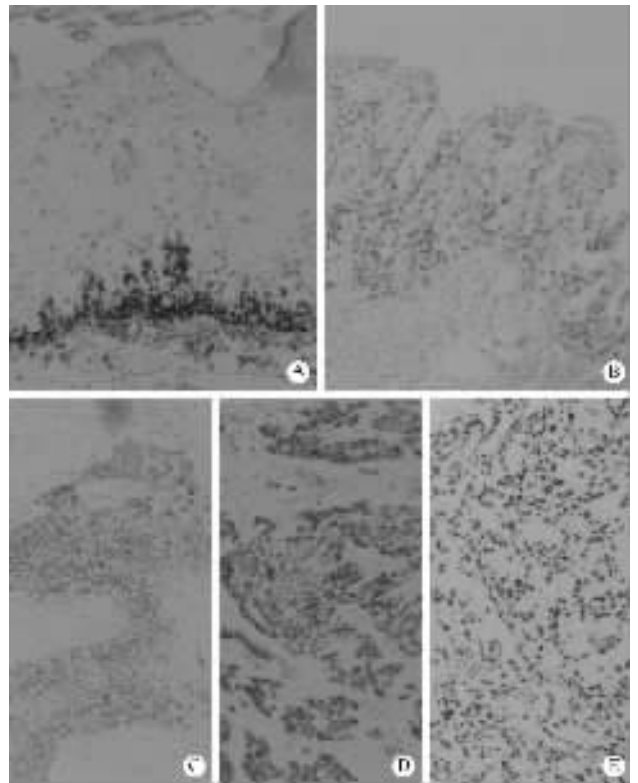


图3 P53 在正常食管黏膜上皮(A)、不典型增生(B)、高分化鳞癌(C)、中分化鳞癌(D)、低分化鳞癌(E)中的表达 ABC $\times 100$

3 讨论

我们首次报道了 14-3-3 σ 蛋白在食管鳞癌和癌旁正常食管黏膜上皮、各级癌前病中的表达, 发现 14-3-3 σ 蛋白在正常上皮中大量表达, 14-3-3 σ 蛋白表达随病变进展进行性下降, 64% 低分化鳞癌完全失去 14-3-3 σ 蛋白表达, 提示 14-3-3 σ 可能参与了食管鳞癌多阶段的演变过程, 并可能与病变严重程度相关; 14-3-3 σ 蛋白可能成为食管癌早期诊断和高危人群监测的分子标志. 此外, 在不同分化程度的鳞癌中, 14-

表2 食管鳞癌和癌旁正常上皮、各级癌前病变中 p53 免疫反应情况

[n (%)]

| 组织类型 | n | 染色强度 | | | | 阳性反应细胞百分数 | | | | 评分均值 |
|------------------|----|--------|-------|--------|--------|-----------|-------|--------|-------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| NOR | 24 | 16(67) | 4(17) | 2(8) | 2(8) | 17(71) | 7(29) | 0 | 0 | 0.4±0.8 |
| BCH ^a | 54 | 23(43) | 6(11) | 13(24) | 12(22) | 25(46) | 9(17) | 16(30) | 3(6) | 2.1±2.6 |
| DYS ^a | 41 | 21(51) | 0 | 10(24) | 10(24) | 21(51) | 2(5) | 15(37) | 3(7) | 2.6±2.9 |
| CIS ^a | 15 | 7(47) | 0 | 3(20) | 5(33) | 7(47) | 0 | 2(13) | 6(40) | 3.8±3.8 |
| W-D ^a | 19 | 8(42) | 0 | 8(42) | 3(16) | 8(42) | 1(5) | 7(37) | 3(16) | 2.9±2.9 |
| M-D ^a | 14 | 4(29) | 2(14) | 3(21) | 5(36) | 4(29) | 2(14) | 2(14) | 6(43) | 4.3±3.9 |
| P-D ^a | 7 | 2(29) | 1(14) | 1(14) | 3(43) | 2(29) | 0 | 1(14) | 4(57) | 4.7±4.2 |

* $P < 0.05$ vs NOR 组。NOR:癌旁正常食管上皮,BCH:基底细胞过度增生,DYS:不典型增生,CIS:原位癌,W-D:高分化鳞癌,M-D:中分化鳞癌,P-D:低分化鳞癌。

3-3 σ 蛋白的差异表达具有显著的统计学意义,提示 14-3-3 σ 蛋白的缺失可能与肿瘤细胞的侵袭性、转移能力相关。

14-3-3 σ 又称为 HME-1 或 stratifin,是一新的候选抑癌基因^[3],其主要生理功能是参与细胞周期调控、凋亡、有丝分裂信号传导等。细胞 DNA 受到损伤时,高表达的 14-3-3 σ 可阻止 cdc2-cyclinB1 进入细胞核启动有丝分裂,为细胞完成修复 DNA 损伤提供可能^[5]。14-3-3 σ 基因功能缺陷细胞的基因组的不稳定性增高。研究发现 14-3-3 σ 的低表达与人类多种肿瘤形成与发展相关,如乳腺^[6]、膀胱^[7]、前列腺^[8]、肝^[9]、肺^[10]等。在食管多阶段癌变进程中,14-3-3 σ 的表达进行性下降,提示低表达或不表达 14-3-3 σ 细胞的修复机制可能受损,增加了病变细胞进一步蓄积突变 DNA 分子的可能。

细胞周期 G1 期阻滞部分是由 p53 激活 p21/WAF1 蛋白表达而介导,G2 期的阻滞是由 p53 激活 14-3-3 σ 基因的表达而实现的^[5]。14-3-3 σ 基因转录起始点上游 1.8 kb 处含有 p53 反应元件^[5]。 γ 射线可诱导含有野生型 p53 结肠癌细胞系中 14-3-3 σ 蛋白表达增加,而 p53 基因突变结肠癌细胞系中没有检测到 14-3-3 σ 蛋白表达的变化。我们检测 P53 蛋白在食管癌变中的表达,发现正常上皮内 P53 蛋白少量表达,随着食管上皮细胞病变加重 P53 蛋白表达增加,低分化鳞癌中表达量最高。P53 蛋白有野生型和突变型,免疫组化检测到的 P53 蛋白主要是突变型,与野生型的抑癌功能不同,突变型 P53 蛋白能够促进细胞的增殖,加速了癌变进程。我们发现 14-3-3 σ 和 P53 蛋白表达具有显著的负相关($P < 0.05$)。突变型 P53 蛋白可能通过结合 14-3-3 σ 基因转录调控区 p53

反应元件,导致了 14-3-3 σ 基因失活和 14-3-3 σ 蛋白的低表达。

【参考文献】

- [1] Yang CS. Research on esophageal cancer in China: a review [J]. *Cancer Res*, 1980, 40: 2633-2644.
- [2] 王国清. 食管癌高发地区早诊早治 30 年临床研究研究经验 [J]. *中国医学科学院学报*, 2001, 23: 69-72.
- [3] Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, et al. Molecular cloning and expression of the transformed sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signaling pathway [J]. *J Mol Biol*, 1993, 231: 982-998.
- [4] Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 931-943.
- [5] Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al. 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression [J]. *Mol Cell*, 1997, 1: 3-11.
- [6] Simpson PT, Gale T, Reis-Filho JS, et al. Distribution and significance of 14-3-3 σ , a novel myoepithelial marker, in normal, benign, and malignant breast tissue [J]. *J Pathol*, 2004, 202: 274-285.
- [7] Moreira JM, Gromov P, Celis JE, et al. Expression of the tumor suppressor protein 14-3-3 σ is down regulated in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder undergoing epithelial mesenchymal transition [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3: 410-419.
- [8] Cheng L, Pan CX, Zhang JT, et al. Loss of 14-3-3 σ in prostate cancer and its precursors [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 3064-3068.
- [9] Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, et al. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 σ gene in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 5298-5302.
- [10] Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, et al. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3 σ in human lung cancers [J]. *Oncogene*, 2002, 21: 2418-2424.

编辑 王 睿