

PDCD4 及 CDKN1A/p21 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义

鹿慧 王斌全 李建民 张婕

【摘要】 目的 探讨 PDCD4、CDKN1A/p21 在喉鳞状细胞癌组织中的表达与相关病理参数间的关系及二者间的相关性。方法 使用免疫组化法检测 PDCD4 及 CDKN1A/p21 蛋白在喉鳞癌及癌旁正常组织中的表达, 结合患者性别、年龄、病理分期、淋巴结转移等情况进行 χ^2 检验及 Spearman 秩相关检验。结果 PDCD4 在喉鳞癌组织中阳性表达率为 40.30%, 癌旁正常组织中阳性表达率 58.21%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CDKN1A/p21 在喉鳞癌组织中阳性表达率为 37.31%, 癌旁正常组织中阳性表达率 55.22%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。喉鳞状细胞癌中 PDCD4 表达下调, 与喉鳞癌分化程度、T 分期相关 ($P < 0.05$); CDKN1A/p21 表达下调, 与喉鳞癌分化程度及淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。PDCD4 与 CDKN1A/p21 二者正相关 ($r = 0.478, P = 0.000$)。结论 PDCD4 与 CDKN1A/p21 与喉鳞癌发生及恶性发展密切相关, 可作为喉鳞癌病理诊断、治疗和预后判断的一项指标。

【关键词】 肿瘤, 鳞状细胞; 程序性细胞死亡因子 4; 免疫组织化学; 周期蛋白依赖激酶抑制因子 1A/p21

Expression and clinical significance of PDCD4 and CDKN1A/P-21 in laryngeal squamous cell carcinoma Lu Hui, Wang Binqian, Li Jianmin, Zhang Jie. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, the First Clinical Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: Wang Binqian, Email: wbq-xy@126.com

【Abstract】 Objective To explore the relationship between PDCD4, CDKN1A/p21 expression in laryngeal squamous cell carcinoma(LSCC) and the related pathological parameters. The correlation between them is also studied. **Methods** Protein levels of PDCD4 and CDKN1A/p21 in laryngeal squamous cell carcinoma and normal tissues were determined by immunohistochemistry. Chi-square test and Spearman rank correlation test were conducted by the combination of the patient sex, age, pathologic stage and the lymph node metastasis. **Results** The results showed that the expression rate of PDCD4 in laryngeal squamous cell carcinoma was 40.30%, but in the normal tissues was 58.21%. There had significant difference between these two groups ($P < 0.05$). Similarly, remarkable difference was also found in CDKN1A/p21 expression between laryngeal squamous cell carcinoma and normal tissues ($P < 0.05$), the expression rate was 37.31% and 55.22% respectively. Furthermore, the downregulation of PDCD4 in laryngeal squamous cell carcinoma was correlated with laryngeal squamous differentiation degree and T staging ($P < 0.05$), while CDKN1A/p21 was associated with laryngeal squamous cell carcinoma differentiation and lymphatic metastasis ($P < 0.05$). PDCD4 was positively correlated with CDKN1A/p21 ($r = 0.478, P = 0.000$). **Conclusion** PDCD4 and CDKN1A/p21 have a close relationship with the occurrence and the malignant development of laryngeal squamous cell carcinoma. Thus, PDCD4 and CDKN1A/p21 could be an indicator of the pathology diagnosis, treatment and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.09.005

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第一医院耳鼻咽喉-头颈外科 (鹿慧、王斌全、张婕); 山西省肿瘤医院病理科 (李建民)

通讯作者: 王斌全, Email: wbq-xy@126.com

【Key words】 Neoplasms, squamous cell; Programmed cell death protein 4; Immunohistochemistry; Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A/p21

喉鳞状细胞癌是耳鼻咽喉头颈外科常见肿瘤之一,具有局部侵袭及淋巴结转移等特点,目前其发病机制尚未完全阐明。研究发现,细胞周期调控异常是肿瘤发生发展过程中的关键环节,相关细胞因子表达在肿瘤发生细胞形态学改变之前已有显著变化。其中,程序性细胞死亡因子4(programmed cell death protein 4, PDCD4)、周期蛋白依赖激酶抑制因子1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)/p21在多种肿瘤的生长、侵袭、转移过程中发挥重要作用,但在喉鳞状细胞癌的研究尚少。本研究通过观察人喉鳞状细胞癌中PDCD4、CDKN1A/p21表达,探讨二者相关性及其与临床病理参数的关系,为喉鳞状细胞癌的临床诊治提供理论依据。

资料与方法

一、标本收集

本研究选取2012年1月至2013年10月就诊于山西医科大学第一医院耳鼻咽喉头颈外科及山西省肿瘤医院头颈外科共67例喉鳞癌患者的癌组织及癌旁正常组织石蜡包埋标本。患者临床病理资料完善,均为初诊,手术前未进行放、化疗及生物治疗,术后病理报告均为喉鳞状细胞癌。年龄53~74岁,平均年龄63.6岁;男55例,女12例。根据国际抗癌联盟(UICC)2010年喉癌TNM分期:T1期17例,T2期28例,T3期13例,T4期9例;有淋巴结转移10例,无淋巴结转移57例;高分化32例,中分化29例,低分化6例。肿瘤部位:声门上型22例,声门下型4例,声门型41例。本研究实验已通过山西医科大学第一医院伦理委员会批准,并遵循患者知情同意的原则。

二、主要试剂及仪器

PDCD4兔抗人多克隆抗体、CDKN1A/p21兔抗人多克隆抗体购自福建迈新生物技术有限公司,DAB显色试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。显微镜使用OLYMPUS BX53型。

三、方法

采用免疫组织化学技术检测喉癌组织及癌旁正常组织中PDCD4、CDKN1A/p21蛋白表达。将全部石蜡包埋组织标本连续切片4~5张,4 μm/张,

常规固定、脱蜡、水化。PDCD4、CDKN1A/p21(福州迈新)水化后切片经枸橼酸高压修复抗原4 min, PBS冲洗3次,3 min/次;3% H₂O₂-甲醛溶液浸泡阻断内源性过氧化物酶, PBS冲洗3次,3 min/次。室温封闭40 min后滴加一抗,4℃湿盒孵育过夜,室温复温60 min, PBS冲洗4次,3 min/次;滴加酶标二抗,室温孵育60 min, PBS冲洗4次,3 min/次。DAB(上海生工)显色2~5 min,蒸馏水终止显色,苏木素复染,脱色反蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶、封片。乳腺癌组织作阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照。

四、免疫组织化学结果判定

按阳性细胞百分数及染色强度计分。观察阳性细胞染色区域百分率,<5%为计0分,5%~25%计1分,26%~50%计2分,>50%计3分;染色无着色计0分,淡黄色计1分,棕黄色计2分,棕褐色计3分。上述积分相加,0~2分判断为阴性(-),3~4分判断为弱阳性(+),5~6分判断为强阳性(++),后两者均视为阳性表达。染色切片请两位具有正高级职称的病理科医师以双盲法进行阅片,若二者意见不一致,则经讨论后给出最终结论。

五、统计学分析

实验数据采用 χ^2 检验和Spearman秩相关检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据均采用统计软件SPSS 21.0处理。

结果

一、PDCD4表达

PDCD4表达主要定位于细胞质,偶有核表达。喉鳞癌组织中PDCD4阳性表达率为40.30%(24/67),癌旁正常组织中PDCD4阳性表达率为58.21%(39/67),差异有统计学意义($\chi^2=6.740$, $P=0.009$)。其表达随着喉鳞癌分化程度降低而降低($\chi^2=4.189$, $P=0.041$),T分期低者比T分期高者表达高($\chi^2=7.584$, $P=0.006$),与临床病理学参数性别、年龄、肿瘤部位、淋巴结转移无关。见图1A,表1。

二、CDKN1A/p21表达

CDKN1A/p21表达主要定位于细胞质及细胞

膜。在喉鳞癌组织中 CDKN1A/p21 阳性表达率为 37.31% (25/67)，癌旁正常组织中 CDKN1A/p21 阳性表达率 55.22% (37/67)，差异有统计学意义 ($\chi^2=4.323, P=0.038$)。其表达随着喉鳞癌分化程度降低而降低 ($\chi^2=6.547, P=0.011$)，无淋巴结转移比有淋巴结转移表达高 ($P=0.010$)，与临床病理学参数性别、年龄、肿瘤部位、T 分期无关。见图 1B，表 1。

表 1 PDCD4、CDKN1A/p21 表达及与临床病理学参数间的关系 (例)

临床项目	PDCD4				CDKN1A/p21			
	+	-	χ^2 值	P值	+	-	χ^2 值	P值
性别			- ^a	0.749			- ^a	0.751
男	23	32			20	35		
女	4	8			5	7		
年龄			0.617	0.432			0.999	0.317
<60	7	14			6	15		
≥60	20	26			19	27		
肿瘤部位			0.717 ^a	0.716			1.654 ^a	0.490
声门上	8	14			6	16		
声门型	18	23			17	24		
声门下	1	3			2	2		
T 分期			7.584	0.006			1.412	0.235
T1+T2	24	23			19	26		
T3+T4	3	17			6	16		
分化			4.189	0.041			6.547	0.011
高分化	17	15			17	15		
中低分	10	25			8	27		
淋巴结			- ^a	0.185			- ^a	0.010
有转移	2	8			0	10		
无转移	25	32			25	32		

注：^a为使用 Fisher 确切概率法

三、相关性分析

经 SPSS 21.0 统计学软件 Spearman 秩相关分析，PDCD4 与 CDKN1A/p21 呈正相关 ($r=0.478, P=0.000$)。

讨 论

喉鳞癌是耳鼻咽喉头颈外科常见恶性肿瘤，近年来发病率呈上升趋势。目前喉癌治疗方式主要是以手术为主，综合治疗，病理学常规 HE 染色检查仍为喉鳞癌确诊的主要依据。虽然早期喉癌治愈率较高，但 5 年生存率整体并不满意，喉癌的局部浸润、复发及淋巴转移等均影响患者预后。因此，如

何通过肿瘤发生发展过程中的分子变化机制早期准确诊断、及时发现肿瘤转移，成为解决这一问题的重要途径。

PDCD4，最早是由 Shibahara 等^[1]在小鼠体内发现的细胞凋亡早期上调基因，近期研究发现其也是一种肿瘤抑制因子，与多种肿瘤的发生发展机制有关。研究发现，PDCD4 在乳腺癌、胃癌、肝癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中均有表达下调或缺失^[2-8]。胰腺癌中 PDCD4 表达下降与肿瘤分化程度密切相关^[5]。本研究通过观察 67 例喉鳞癌患者的癌组织与癌旁正常组织，发现喉鳞癌中 PDCD4 表达下降，与肿瘤分化程度及 T 分期有关。研究结果提示 PDCD4 参与了喉鳞癌的发生发展过程，并可能与喉鳞癌的恶性转化密切相关。

CDKN1A/p21 蛋白是具有广泛激酶抑制活性的细胞周期负性调控因子，是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (cyclin-dependent kinases inhibitor, CKI) 家族重要成员。研究发现，CDKN1A/p21 蛋白表达异常会影响细胞增殖与分化等正常调控，促进恶性肿瘤发生。Xie 等^[9]研究表明，在人宫颈癌 HeLa 细胞中 p21 蛋白过表达可以抑制细胞增殖、促进凋亡发生，反之推测，使 p21 蛋白表达下降则细胞凋亡数量下降。另有研究发现，转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF β) 的抑制细胞周期、促进细胞凋亡机制包含了诱导 p21 的表达^[10]；而 p21 的表达下调会反向影响 TGF β 的下游效应信号通路，从而阻断 TGF β 抑癌基因旁路^[11]。目前已有研究证实 CDKN1A/p21 在子宫内膜癌、结直肠癌、胃癌、食管癌等肿瘤组织中为低表达或表达缺失^[12-15]。本研究同上述结论一致，喉鳞癌中 CDKN1A/p21 为低表达，且与分化程度下降及淋巴结转移有关。由此推测，CDKN1A/p21 蛋白表达，与 PDCD4 相同，参与了喉鳞癌的发生发展过程，可能是喉鳞癌恶性转化的重要指标。

研究发现，PDCD4 与 CDKN1A/p21 表达密切相关，在肿瘤发生形态学变化之前 PDCD4 可以通过上调 CDKN1A/p21 的表达抑制有丝分裂启动因子细胞周期蛋白依赖性激酶 1/cdc2 (cyclin dependent kinase1, CDK1/cdc2)，使细胞周期停滞于 G2/M 期，进而抑制肿瘤恶性转化^[16]。本研究首次在喉鳞癌中联合检测 PDCD4、CDKN1A/p21 的蛋白表达，分析发现 PDCD4 与 CDKN1A/p21 蛋白表达呈正相关，且二者与喉鳞癌的分化程度、T 分

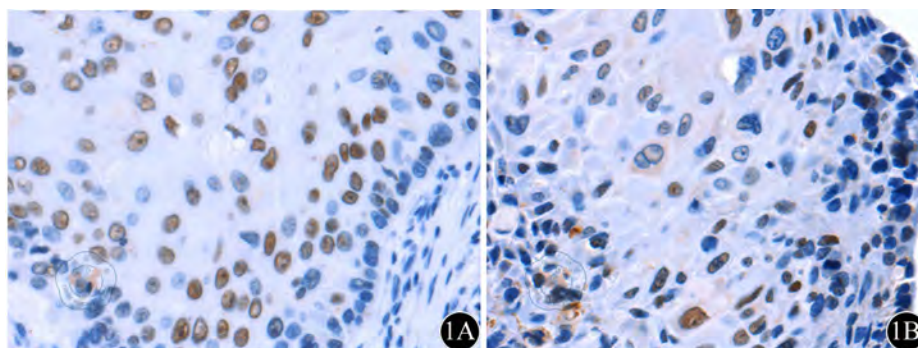


图1 喉鳞状细胞癌PDCD4、CDKN1A/p21表达。1A: 喉鳞状细胞癌标本中PDCD4的阳性表达(SP × 400); 1B: 喉鳞状细胞癌标本中CDKN1A/p21的阳性表达(SP × 400)

期及淋巴结转移有关,提示 PDCD4 可能通过影响 CDKN1A/p21 蛋白的表达,影响细胞周期及细胞凋亡进程,并与喉鳞癌恶性转化、侵袭、转移密切相关。因此,PDCD4、CDKN1A/p21 蛋白表达可以作为喉鳞癌早期诊断、疗效评价、预后判断的重要指标。

综上所述,PDCD4、CDKN1A/p21 在喉鳞癌中表达下降,且与临床病理参数中分化程度、T 分期及淋巴结转移有关,可能成为喉鳞癌治疗的新靶点。联合检测 PDCD4、CDKN1A/p21 表达,对临床喉鳞癌患者的早期诊断、疗效评价、预后判断有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Shibahara K, Asano M, Ishida Y, et al. Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death[J]. *Gene*, 1995, 166: 297-301.
- [2] Wang Q, Sun Z, Yang HS. Downregulation of tumor suppressor Pcd4 promotes invasion and activates both beta-catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27(11): 1527-1535.
- [3] Wen YH, Shi X, Chiriboga L, et al. Alterations in the expression of Pcd4 in ductal carcinoma of the breast[J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(6): 1387-1393.
- [4] 马刚, 刘江, 张浩, 等. 程序性细胞死亡因子 4 在胃癌组织中的表达及临床病理学意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(7): 481-484.
- [5] 马刚, 郭克建, 张浩, 等. 程序性细胞死亡因子 4 在胰腺癌组织中的表达及临床病理学意义[J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(5): 597-600.
- [6] Wang X, Wei Z, Gao F, et al. Expression and prognostic significance of PDCD4 in human epithelial ovarian carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(5B): 2991-2996.
- [7] Gao F, Zhang P, Zhou C, et al. Frequent loss of PDCD4 expression in human glioma: possible role in the tumorigenesis of glioma[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(1): 123-128.
- [8] Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, et al. Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2006, 25(45): 6101-6112.
- [9] Xie J, Bai J, Sheng XF, et al. Proliferation inhibition of human cervical cancer HeLa cells by Casticin in vitro[J]. *Chinese-German Journal Clinical Oncology*, 2011, 10(1): 47-50.
- [10] Van Den Brink GR, Offerhaus GJ. The morphogenetic code and colon cancer development[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(2): 109-117.
- [11] Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8191-8194.
- [12] 韦瑞红, 伍丽群, 任带娇, 等. Cox-2 和 P-21 蛋白在子宫内膜癌中的表达及意义[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(22): 46-48.
- [13] 金建云, 王海波. Cyclin D1、p21 WAF1 在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. *山东医药*, 2011, 51(49): 609.
- [14] Sun Y, Li JY, He JS, et al. Tissue microarray analysis of multiple gene expression in intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma of the stomach[J]. *Histopathology*, 2005, 46(5): 505.
- [15] 张学彦, 景德怀, 刘志强, 等. p21(WAF1) 基因对人食管鳞癌细胞增殖的抑制作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(14): 1384.
- [16] Göke R, Barth P, Schnidt A, et al. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/CDC2 via induction of p21(Waf1/Cip1)[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(6): C1541-1546.

(收稿日期: 2014-03-13)

(本文编辑: 戚红丹)