

# p53、RAR-β2、Ki-67 和 EGFR 在口腔鳞癌化疗前后的变化及临床意义

刘士霞

沙河市人民医院口腔科, 河北 邢台 054100

**摘要:** **目的** 探讨 p53、RAR-β2、Ki-67 和 EGFR 在新辅助化疗前后口腔鳞癌组织细胞中的表达情况及其临床意义。**方法** 纳入 2010 年 4 月至 2014 年 3 月收治的 45 例口腔鳞癌患者, 采集新辅助化疗前后的口腔黏膜肿瘤组织标本, 采用 SP 免疫组织化学方法检测 p53、RAR-β2、Ki-67 和 EGFR 的表达情况, 并进行相关性比较。**结果** 新辅助化疗前口腔鳞癌患者 p53、Ki-67 和 EGFR 的阳性表达率分别为 55.56%、88.89% 和 77.78%, 显著高于化疗后的 31.11%、53.33% 和 55.56% ( $P$  均  $< 0.05$ )。但化疗前 RAR-β2 阳性率 (28.89%) 显著低于化疗后的 51.11% ( $P > 0.05$ )。新辅助化疗前后口腔鳞癌组织中的 Ki-67 表达情况均与 EGFR 和 p53 呈正相关 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 但与 RAR-β2 不具有相关性 ( $P > 0.05$ )。**结论** 新辅助化疗可能通过抑制 p53 基因突变、降低 Ki-67 和 EGFR 的表达, 上调 RAR-β2 的表达, 从而有效抑制肿瘤细胞的增殖。

**关键词:** 新辅助化疗; 口腔鳞癌; p53; 维甲酸受体-β2; Ki-67; 表皮生长因子受体

**中图分类号:** R 739.85 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2015)07-0929-03

口腔鳞癌的发生是个复杂过程, 常涉及多种基因的表达异常, 导致正常细胞增殖异常或凋亡异常, 从而发展成癌。反映细胞增殖的人抗增殖核细胞抗原 Ki-67 表达异常时, 会导致细胞增殖活跃<sup>[1]</sup>。肿瘤启动基因如表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 表达激活会导致正常细胞增殖失控, 抑癌基因类如维甲酸受体 β2 (retinoic acid receptor-β2, RAR-β2) 和 p53 表达的失活, 会导致正常细胞凋亡的失衡。以顺铂 + 5-氟尿嘧啶的 PF 方案是头颈部鳞癌术前诱导化疗的经典方案, 可以缩小病灶, 减轻肿瘤负荷, 提高化疗敏感性, 提高术后生存率及生存质量<sup>[2]</sup>。本研究从肿瘤细胞增殖和凋亡的角度, 从分子水平上检测口腔鳞癌诱导化疗前后的 p53、RAR-β2、Ki-67 和 EGFR 表达水平的变化, 探讨其临床作用及意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2010 年 4 月至 2014 年 3 月来我院口腔颌面外科放化疗的口腔鳞癌患者 45 例。患者入选标准: (1) 所有患者均病理证实为口腔鳞癌; (2) 术前未进行过放、化疗、及中医药治疗; (3) 鳞癌为首次确诊; (4) 患者术前均进行 PF 诱导化疗; (5) 无严重心、脑血管病史等。排除标准: (1) 口腔鳞

癌复发病例; (2) 具有淋巴结及远处转移者; (3) 5 年前曾患有其他恶性肿瘤者; (4) 严重慢性病, 对诱导不耐受者。纳入 45 例患者, 其中男 24 例, 女 21 例; 年龄 32 ~ 71 岁, 平均 (54.7 ± 12.4) 岁; 按照 WHO 标准进行组织病理分级: I 级 12 例, II 级 26 例, III 级 7 例; TNM 临床分期为: II 期 15 例, III 期 20 例, IV 期 10 例。所有患者行 PF 化疗方案后, 1 周内进行外科手术切除肿瘤部位。

**1.2 仪器、试剂及方法** 主要仪器包括: 恒温培养箱, 石蜡切片机, 光学显微镜, 微波炉和病理图像分析系统等。主要试剂包括: SP 试剂盒 (Dako 公司) 和 3, 3'-DAB 显色盒 (Dako 公司), PBS 缓冲液, 枸橼酸缓冲 (pH 值 = 6), 鼠抗人单克隆抗体 Ki-67 (福州迈新生物技术开发有限公司), EGFR 兔源单克隆抗体 (美国 Abcam 公司) 和单克隆鼠抗人 p53 和 RAR-β2 (美国 SIGMA 公司)。免疫组织化学方法: 化疗前、后的口腔鳞癌标本经切片处理成厚 4 μm, 连续切 5 张。详细操作步骤参照说明书进行<sup>[3]</sup>。步骤简述为: (1) 石蜡切片脱蜡脱水; (2) 组织抗原修复; (3) 消除内源性的过氧化物酶活性; (4) 加入一抗; (5) 加入二抗; (6) DAB 显色; (7) 镜检。

**1.3 结果判定** 根据说明书对 p53、RAR-β2、Ki-67 和 EGFR 进行结果判定。判定标准详见表 1。

**1.4 统计学方法** 数据采用 SPSS 18.0 进行统计分析, 计数资料采用频数表示, Ki-67、EGFR、p53 以及 RAR-β2 在口腔鳞癌中的阳性率比较采用  $\chi^2$  检验。

Ki-67 与 EGFR、p53 和 RAR- $\beta$  之间的相关性采用 Spearman 秩相关。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

表 1 免疫组织化学结果判定标准

检测指标	染色判断	阳性细胞率	判定结果
p53	细胞核棕黄色颗粒	<10%	-
		$\geq 10\%$	+
RAR- $\beta$	细胞核内棕黄色颗粒	<10%	-
		10% ~ 30%	+
		31% ~ 49%	++
		>50%	+++
Ki-67	细胞核呈棕黄色	<10%	-
		$\geq 10\%$	+
EGFR	无红棕色染色 轻度红棕色染色 中度红棕色染色 深度红棕色染色		-
			+
			++
			+++

## 2 结果

2.1 HE 染色结果 经 HE 染色结果发现, Ki-67 阳性蛋白表达于细胞核, 为棕黄色颗粒, 胞浆表达为阴性。EGFR 阳性表达于细胞浆和细胞膜, 阳性表达为红棕色。p53 阳性蛋白表达于细胞核, HE 染色为棕黄色。RAR- $\beta$  阳性表达于细胞核中, 为棕黄色颗粒。化疗后, 除 RAR- $\beta$  阳性表达增强外, Ki-67、EGFR 和 p53 在口腔鳞癌组织中表达均减弱。

### 2.2 新辅助化疗前后阳性蛋白表达情况

2.2.1 p53 在口腔鳞癌组织中表达情况 化疗前 p53 阳性表达数为 25 例, 阳性率为 55.56%, 化疗后

p53 阳性数为 14 例, 阳性率为 31.11%, 化疗前 p53 阳性率显著高于化疗后 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.2.2 Ki-67 在口腔鳞癌组织中表达情况 化疗前 Ki-67 阳性表达数为 40 例, 阳性率为 88.89%, 化疗后 Ki-67 阳性表达数为 24 例, 阳性率为 53.33%, 化疗前阳性率显著高于化疗后 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

2.2.3 RAR- $\beta$  在口腔鳞癌组织中表达情况 化疗前 RAR- $\beta$  阳性数为 13 例, 阳性率为 28.89%, 化疗后 RAR- $\beta$  阳性数为 23 例, 阳性率为 51.11%, 化疗后 RAR- $\beta$  阳性率提高, 显著高于化疗前的阳性率 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

2.2.4 EGFR 在口腔鳞癌组织中表达情况 化疗前 EGFR 阳性表达数为 35 例, 阳性率为 77.78%, 化疗后 EGFR 阳性表达数为 25 例, 阳性率为 55.56%, 化疗前 EGFR 阳性率显著高于化疗后 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

2.2.5 化疗前 Ki-67 与 EGFR、p53 和 RAR- $\beta$  的相关性 Ki-67 表达情况与 EGFR 和 p53 呈正相关 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 但 Ki-67 与 RAR- $\beta$  不具有相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

2.2.6 化疗后 Ki-67 与 EGFR、p53 和 RAR- $\beta$  的相关性 化疗后 45 例口腔鳞癌组织中的 Ki-67 表达情况与 EGFR 和 p53 呈正相关 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 但 Ki-67 与 RAR- $\beta$  不具有相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 5。

表 2 新辅助化疗前后 p53、Ki-67 阳性表达情况比较 (例)

时间	例数	p53 表达			Ki-67 表达		
		-	+	阳性率 (%)	-	+	阳性率 (%)
化疗前	45	20	25	55.56	5	40	88.89
化疗后	45	31	14	31.11	21	24	53.33
$\chi^2$ 值				5.475			13.846
$P$ 值				<0.05			<0.01

表 3 新辅助化疗前后 RAR- $\beta$ 、EGFR 阳性表达情况比较 (例)

时间	RAR- $\beta$ 表达					EGFR 表达				
	-	+	++	+++	阳性率 (%)	-	+	++	+++	阳性率 (%)
化疗前	32	6	5	2	28.89	10	10	13	28.89	77.78
化疗后	22	9	9	5	51.11	20	6	10	51.11	55.56
$\chi^2$ 值					4.630					5.000
$P$ 值					<0.05					<0.05

表 4 新辅助化疗前 Ki-67 与 EGFR、p53 和 RAR- $\beta$  的相关性 (例)

化疗前	Ki-67		$r$ 值	$P$ 值	
	-	+			
EGFR	-	3	7	0.321	0.031
	+	2	33		
p53	-	5	15	0.395	0.007
	+	0	25		
RAR- $\beta$	-	4	28	0.069	0.651
	+	1	12		

表 5 新辅助化疗后 Ki-67 与 EGFR、p53 和 RAR- $\beta$  的相关性 (例)

化疗后	Ki-67		$r$ 值	$P$ 值	
	-	+			
EGFR	-	13	7	0.329	0.027
	+	8	17		
p53	-	18	13	0.340	0.022
	+	3	11		
RAR- $\beta$	-	12	10	0.154	0.311
	+	9	14		

### 3 讨论

口腔鳞癌是口腔癌中最常见的病理类型,约占 90% 以上<sup>[4]</sup>。通过术前 PF 诱导方案可以减少肿瘤体积,缩小病灶,控制肿瘤局部扩散,减轻肿瘤负荷,提高化疗敏感性,提高术后生存率及生存质量。本研究从分子水平上探讨 p53、RAR- $\beta$ 2、Ki-67 和 EGFR 表达水平的变化在临床中的应用。

位于 17q 染色体的 p53 是重要的抑癌基因,参与细胞周期和细胞凋亡的调节过程,分为突变型和野生型。野生型 p53 基因抑制细胞生长同时促进细胞凋亡;而突变型 p53 抑制细胞凋亡<sup>[5]</sup>。RAR- $\beta$ 2 是 RAR- $\beta$  家族中最主要的亚型,是一种肿瘤抑制基因<sup>[6]</sup>。位于 10q 染色体的 Ki-67 是一种非组蛋白性核蛋白,存在于 G1 后期、S 期、G2 期和 M 期。Ki-67 过度表达,提示细胞增殖活跃。EGFR 是一种重要的跨膜受体,是一种血管生成因子,与配体表皮的生长因子、转化生长因子- $\alpha$  结合后与肿瘤的生长、浸润、转移等具有相关性<sup>[7]</sup>。

本研究结果显示,口腔鳞癌患者化疗前 p53 阳性表达率为 55.56%,化疗后阳性表达率降低为 31.11%,提示 PF 辅助化疗可以通过下调 p53 蛋白的表达,降低 p53 突变率,抑制口腔鳞癌细胞的过度增殖。有研究证实 p53 阴性表达患者的化疗有效率高于阳性患者,可作为预测化疗有效率的标记物。化疗前 RAR- $\beta$ 2 阳性表达率为 28.89%;化疗后阳性表达率升高为 51.11%,提示 RAR- $\beta$ 2 表达的缺失与肿瘤发生、发展、预后有关,这与唐曼等<sup>[8]</sup>的研究结果一致。化疗前 Ki-67 阳性率为 88.89%;化疗后阳性率降低为 53.33%。Ki-67 反映细胞增殖活性,诱导化疗能抑制肿瘤细胞的 Ki-67 表达<sup>[1]</sup>。化疗前 EGFR 阳性率为 77.78%;化疗后阳性率降低为 55.56%。提示 PF 化疗药物可通过抑制 EGFR 的表达,从而影响和抑制癌细胞的增殖<sup>[9]</sup>,Tanaka 等<sup>[10]</sup>研究指出,食管癌术前行放化疗后,EGFR 高表达的患者化疗有效率低于 EGFR 低表达者。新辅助化疗前后,45 例口腔鳞癌组织中的 Ki-67 表达情况均与 EGFR 和 p53 呈正相关,即 Ki-67 阳性表达率越高,EGFR 和 p53 阳

性表达率越高,但与 RAR- $\beta$ 2 不具有相关性。有研究证实 p53 与 Ki-67 能互相促进细胞凋亡,p53 通过依赖 Ki-67 基因,才能抑制 PI3k 信号通路,抑制细胞凋亡,促进增殖<sup>[11]</sup>。

本研究表明,新辅助化疗诱导口腔鳞癌细胞后,可能通过抑制 p53 基因突变、降低 Ki-67 和 EGFR 的表达,同时上调 RAR- $\beta$ 2 的表达,从而有效抑制肿瘤细胞的增殖,对术后疗效产生影响。

### 参考文献

- [1] 李培,杨成,顾晓明,等. 口腔鳞癌患者 Ki-67、VEGF 和 P16 表达与平阳霉素诱导化疗疗效间关系的研究[J]. 北京口腔医学, 2014,22(2):89-92.
- [2] Ma J, Liu Y, Huang XL, et al. Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis[J]. Oral Oncol, 2012,48(11):1076-1084.
- [3] 潘树矿,方梅. p-gp170 和 ki-67 在口腔鳞癌中的表达[J]. 中华全科医学, 2014,12(7):1068-1070.
- [4] 梁守建,雷志敏. Cdc6 和 Ki-67 蛋白与口腔鳞癌的相关性研究[J]. 医学综述, 2013,19(5):958-960.
- [5] Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma [J]. J Clin Pathol Mol Pathol, 2000,53(4):165-172.
- [6] Song S, Guan B, Xu XC, et al. Antitumor effect of retinoic acid receptor- $\beta$ 2 associated with suppression of cyclooxygenase-2 [J]. Cancer Prev Res, 2009,2(3):274-280.
- [7] 张敏,侯敏,汤晓飞. 缺氧对口腔癌细胞增殖和凋亡的作用[J]. 北京口腔医学, 2012,20(1):18-21.
- [8] 唐曼,吴强,吴正升,等. COX-2、RAR- $\beta$ 2 在食管鳞状细胞癌组织中的表达及相互关系[J]. 安徽医科大学学报, 2012,47(4):450-453.
- [9] 邱嘉旋,魏军水,朱声荣,等. Ki-67、EGFR、p53 及 RAR $\beta$  在口腔鳞癌化疗前后的变化及临床意义评价[J]. 口腔医学研究, 2011,27(2):127-131.
- [10] Tanaka K, Otake K, Mohri Y, et al. Clinical significance of the gene expression profile in residual tumor cells after neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal cancer[J]. Oncol Rep, 2009,21(6):1489-1494.
- [11] Singh B, Reddy PG, Goberdhan A, et al. P53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas[J]. Genes Dev, 2002,16(8):984-993.

收稿日期:2014-12-15 编辑:王国品