

p16、COX-2 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

朱晓城¹, 钱晓云², 顾亚军², 沈晓辉², 宋盼盼², 李慧², 高下^{1,2}

1. 东南大学医学院, 江苏 南京 210000; 2. 南京鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 南京 210000

摘要: **目的** 研究 p16、环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其与临床病理特征、预后的关系, 探讨其在肿瘤发生、发展中的作用及互相关系。**方法** 采用免疫组化方法检测 75 例喉鳞状细胞癌组织以及相对应的癌旁正常组织中 p16、COX-2 蛋白的表达水平, 并分析其与各临床病理特征之间的关系, 再结合临床随访资料, 用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, Log-rank 法比较各组生存率差异, Cox 回归模型分析喉癌预后的独立预测因素。**结果** p16 在喉癌组织中阳性表达率 (20%, 15/75) 高于癌旁组织 (3%, 2/75) ($P < 0.01$); COX-2 在喉癌组织中阳性表达率 (43%, 32/75) 高于癌旁组织 (0, 0/75) ($P < 0.01$)。χ² 检验关联性分析显示 p16 与 COX-2 表达具有相关性 (χ² = 5.181, $P = 0.018$)。喉癌组织中 p16 的表达与喉癌的临床分型相关 (χ² = 16.313, $P < 0.01$), COX-2 的表达与淋巴结转移相关 (χ² = 5.355, $P < 0.05$)。单因素生存分析发现 p16 阳性为喉癌患者总体生存期的有利预后因素 (χ² = 5.614, $P < 0.05$); COX 回归模型多因素分析显示 p16 阳性为喉癌总生存期的独立有利预后因素 ($HR = 0.170$, 95% $CI 0.036 \sim 0.801$, $P < 0.05$)。**结论** p16、COX-2 在喉癌组织中的表达较癌旁组织高, 其高表达分别与喉癌的临床分型、淋巴结转移相关; p16 的表达是影响患者生存的独立有利预后因素。

关键词: 喉鳞状细胞癌; p16; 环氧化酶 2; 病理特征; 人乳头瘤病毒; 预后

中图分类号: R 739.63 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2017)10-1336-04

喉鳞状细胞癌简称喉癌, 是头颈部最常见的恶性肿瘤之一, Siegel 等^[1]报道美国每年有近 12 500 人诊断为喉癌, 其中有超过 3 600 人死于喉癌。尽管诊断水平以及治疗方式 (手术、放疗、化疗) 不断改进, 但喉癌的 5 年生存率仍然低于 50%^[2]。近年来越来越多的报道显示人乳头瘤病毒 (HPV) 感染的头颈部鳞状细胞癌 (squamous cell cancer of the head and neck cancers, SCCHN) 的预后较好, 2016 年头颈部肿瘤临床实践指南 (NCCN) 提出将 HPV 感染情况的检测作为口咽部肿瘤的重要预后指标, p16 的表达与 HPV 的感染有着较高的相关性。p16 蛋白为细胞周期 G1 期的特异性调节蛋白, 其通过与 cyclinD1 竞争性结合细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6 (cyclin dependent kinase 4/6, CDK4/6), CDK4/6 结合抑制视网膜母细胞基因 (retinoblastom gene, Rb) 的蛋白产物 pRb 的磷酸化进而抑制细胞由 G1 期进入 S 期, 调节细胞的增殖^[3], HPV 病毒致癌基因 E7 可以通过抑制 pRb 的磷酸化反馈性地引起 p16 蛋白的表达上调^[4], 因 Q-PCR、原位杂交技术检测 HPV 感染技术的高成本、高难度以及长周期性, 近年来将免疫组织化学检测 p16

蛋白的高表达作为预测 SCCHN 是否有 HPV 感染的指标越来越受到大家的亲睐^[5-6]。环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 可催化花生四烯酸形成前列腺素 E2 (PGE2), 抑制 T 细胞、B 淋巴细胞的增殖起到辅助免疫监视, 还可调节细胞增殖、黏附, 抑制细胞凋亡, 促进血管生成等作用^[7-8]。Partlová 等^[9]对 HPV 阳性与 HPV 阴性 SCCHN 患者的免疫相关指标进行检测, 发现 HPV 阳性的肿瘤组织中 IFN⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞、IL17⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞、骨髓瘤细胞、炎症趋化因子均高于 HPV 阴性的 SCCHN, 而 COX-2 表达较低, 并猜想其可能为 HPV 阳性患者生存率较阴性患者高的原因之一, 而其中机制尚不明确。本研究采用免疫组化方法检测 75 例喉鳞癌组织及相应癌旁组织中 p16、COX-2 两种蛋白的表达水平, 并结合患者的临床资料以及随访资料, 探讨 p16、COX-2 与各临床病理参数和预后的关系及其之间潜在的关联。

1 材料与方法

1.1 材料 75 例标本均选自南京鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科 2008 年 3 月至 2014 年 11 月住院行手术治疗的 75 例患者均为男性, 年龄 41 ~ 86 岁, 平均 63.2 岁, 中位年龄 63 岁。所有患者

术前均未经放疗和/或化疗,入院后根据肿瘤范围行喉垂直部分切除术 4 例、喉水平部分切除术 2 例、喉全切除术 69 例。根据国际抗癌联盟确定肿瘤的 TNM 分期。

1.2 试剂 p16、COX-2 一抗以及 Elivision 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,工作流程按说明书操作。

1.3 免疫组化染色 石蜡标本常规 2 μm 连续切片,常规脱蜡水化,3% H_2O_2 封闭 15 min,漂洗后浸入 pH 7.0 的 PBS 缓冲液中,高压锅加热修复抗原;将切片冷却至室温,画圈,滴加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;滴加二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min;PBS 漂洗后滴加 DAB 显色液,显色 5~10 min;苏木素复染,上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。上述操作以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组化结果判定 p16 阳性细胞表现为细胞核和(或)细胞质着棕黄色,COX-2 阳性细胞表现为细胞质着棕黄色,按着色程度记分:0 分(无着色)、1 分(弱着色)、2 分(中度着色)、3 分(强着色)。肿瘤细胞表达分:随机观察 5 个高倍镜视野肿瘤中阳性细胞 0%~50%;p16 阳性,着色为 2、3 并且肿瘤中阳性细胞 $\geq 30\%$;COX-2 阳性,着色为 2、3 且肿瘤中阳性细胞 $\geq 50\%$ 。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 24.0 软件进行数据统计。各组阳性率比较采用 χ^2 检验,各基因蛋白间的关系采用 χ^2 检验作关联性分析。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-rank 法比较各组生存率差异,Cox 回归模型进行多因素分析喉癌预后的独立危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

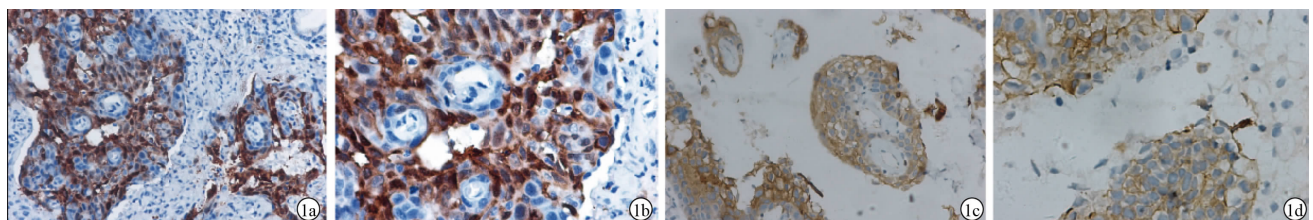
2.1 p16、COX-2 蛋白在喉癌组织中的表达 p16 阳性表达位于胞核及胞质,COX-2 阳性表达位于细胞质(图 1)。p16 在癌旁组织中阳性表达率为 3% (2/75),在喉癌组织中阳性表达率为 20% (15/75),二者存在统计学差异($P < 0.01$);COX-2 在 75 例喉旁组织中阳性表达率为 0(0/75),在喉癌组织中阳性表达

率为 43% (32/75),二者差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 p16、COX-2 在喉癌组织的表达水平与各临床病理参数间的关系 75 例喉癌组织中 p16 表达水平与喉癌临床分型相关($\chi^2 = 16.313, P < 0.01$);p16 阳性患者中主要为声门上型(60%, 9/15),p16 阴性患者中主要为声门型(82%, 49/60);COX-2 的表达与淋巴结转移相关($\chi^2 = 5.355, P < 0.05$),COX-2 阳性患者中 60% (19/32)有淋巴结转移,COX-2 阴性患者中 33% (14/43)有淋巴结转移。见表 1。

2.3 p16 与 COX-2 在喉癌组织中的表达的关联性 p16 的表达与 COX-2 的表达有关联性 [$p16^+ / COX-2^+ (n = 2), p16^+ / COX-2^- (n = 13), p16^- / COX-2^+ (n = 30), p16^- / COX-2^- (n = 30)$]; $\chi^2 = 5.181, P = 0.018$]。p16 阳性患者中 COX-2 阳性比例为 13% (2/15),p16 阴性患者中 COX-2 阳性比例为 50% (30/60)。

2.4 p16、COX-2 在喉癌组织中的表达水平与预后的关系 Log-rank 单因素生存分析显示 p16 阳性表达组生存率高于阴性组($\chi^2 = 5.614, P = 0.018$)(图 2),COX-2 的阳性表达组与阴性表达组生存率无明显差异($\chi^2 = 0.151, P = 0.698$)。COX 回归多因素预后分析显示 p16 阳性为患者总生存期的独立有利预后因素($HR = 0.170, 95\% CI 0.036 \sim 0.801, P = 0.025$),COX 生存曲线如图 3;临床分期为患者总生存期的独立不良预后因素($HR = 3.987, 95\% CI 1.335 \sim 11.911, P = 0.013$),COX-2 不是影响患者总生存期的独立预后指标($HR = 0.702, 95\% CI 0.173 \sim 2.859, P = 0.621$)。p16、COX-2 联合进行 COX 多因素生存分析,因同时满足 p16⁺ 及 COX-2⁺ 的患者较少(2 例),为避免因样本量过少而产生系统误差,我们对 p16⁺/COX-2⁻、p16⁻/COX-2⁻、p16⁻/COX-2⁺ 进行了 COX 多因素生存分析显示:p16⁺/COX-2⁻ 与 p16⁻/COX-2⁻、p16⁻/COX-2⁺ 存在统计学差异($HR = 4.133、5.608; P = 0.042、0.018$),而 p16⁻/COX-2⁻、p16⁻/COX-2⁺ 无统计学差异($HR = 0.251; P = 0.361$),COX 多因素生存分析曲线如图 4。



注:1a:p16 在喉癌组织中的表达($\times 200$);1b:p16 在喉癌组织中的定位,棕黄色为阳性信号,定位于肿瘤细胞的胞核和/或胞质($\times 400$);1c:COX-2 在喉癌组织中的表达($\times 200$);1d:COX-2 在喉癌组织中的定位,咖啡色为阳性信号,定位于肿瘤细胞的胞质($\times 400$)。

图 1 p16、COX-2 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达(HE 染色)

表 1 p16、COX-2 在喉癌组织的表达水平与各临床病理参数间的关系 例(%)

临床病理参数	总例数	p16			COX-2		
		阳性	阴性	P 值	阳性	阴性	P 值
分化程度							
低	15(20)	3(20)	12(20)	0.413	5(16)	10(23)	0.880
中	52(69)	9(60)	43(72)		24(75)	28(65)	
高	8(11)	3(20)	5(8)		3(9)	5(12)	
临床分期							
1	2(3)	1(7)	1(2)	0.547	0	2(5)	0.224
2	6(8)	2(13)	4(6)		1(3)	5(11)	
3	37(49)	6(40)	31(52)		19(59)	18(42)	
4	30(40)	6(40)	24(40)		12(38)	18(42)	
T 分期							
1	6(8)	3(20)	3(5)	0.266	2(6)	4(9)	0.876
2	9(12)	2(13)	7(11)		3(9)	6(14)	
3	45(60)	8(53)	37(62)		20(63)	25(58)	
4	15(20)	2(13)	13(22)		7(22)	8(19)	
淋巴结转移							
阳性	33(44)	5(33)	28(47)	0.398	19(60)	14(33)	0.021
阴性	42(56)	10(67)	32(53)		13(40)	29(67)	
临床分型							
声门	53(71)	4(27)	49(82)	0.000	25(78)	29(67)	0.489
声门上	15(20)	9(60)	6(10)		4(13)	10(23)	
声门下	7(9)	2(13)	5(8)		3(9)	4(9)	

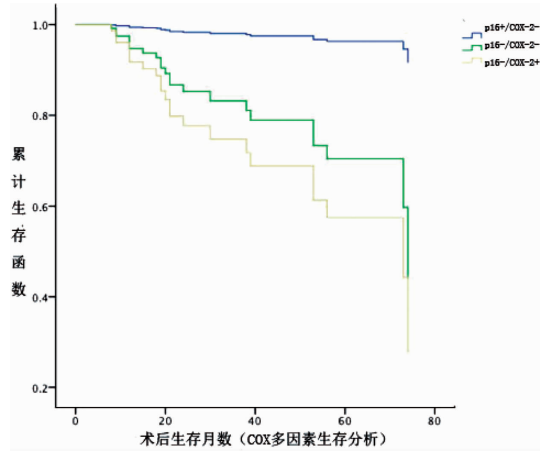


图 4 COX 多因素生存分析曲线

3 讨论

p16 为重要的抑癌基因,其可与 cyclinD1 竞争性结合 CDK4/6,抑制 pRb 的磷酸化,抑制转录活化因子 E2F 的释放,抑制细胞由 G1 期进入 S 期,进而抑制细胞的增殖^[3]。1980 年头颈部肿瘤被首次提到与 DNA 病毒 HPV 的感染相关^[10],近年来越来越多的研究显示大多数 SCCHN 表现为 HPV 阳性,尤其是口腔及咽喉部的鳞状细胞癌,而 HPV 阳性的 SCCHN 中约 90% 为高危型 HPV16^[11-12]。研究表明 HPV 致癌基因 E7 可以通过抑制 pRb 的表达,导致转录活化因子 E2F 的释放,反馈性促进 p16 的表达上调^[6]。大量文献报道 p16 的表达与 HPV 感染呈正相关,p16 阳性可作为 SCCHN 有 HPV 感染的一个重要生物学标志^[13]。而在喉癌中 p16 的研究及其与预后的关系尚无一致结论,有学者认为 p16 的高表达可作为非口腔型头颈部肿瘤^[14]及喉鳞状细胞癌^[15]具有 HPV 感染的标志。Chen 等^[5]对喉鳞状细胞癌中 p16 高表达与 HPV 感染的关系进行研究,发现 SCCHN 肿瘤细胞 p16 阳性率 30% 可作为判断 HPV 感染的临界值,肿瘤细胞中 p16 阳性率 < 30% 则无 HPV 感染。因此在我们的研究中将着色为 2、3 并且肿瘤中阳性细胞 ≥ 30% 作为 p16 阳性的标准,发现 75 例喉癌患者中 p16 阳性患者占 20%,并且 p16 的表达与喉癌的临床分型相关,p16 阳性患者主要为声门上型(60%, 9/15),p16 阴性患者主要为声门型(82%, 49/60),我们猜想这可能与解剖结构相关,声门上型喉癌更加靠近扁桃体、口腔,更容易有 HPV 的感染。同时我们的结果显示 p16 阳性患者生存率较 p16 阴性患者高,p16 阳性为喉癌患者生存率的独立有利预后因素。

COX 是催化花生四烯酸转化为前列腺素和血栓素的关键限速酶,PGE2 可通过其四个受体和其他前列腺素类物质结合调节机体免疫,调节 T 细胞、B 细

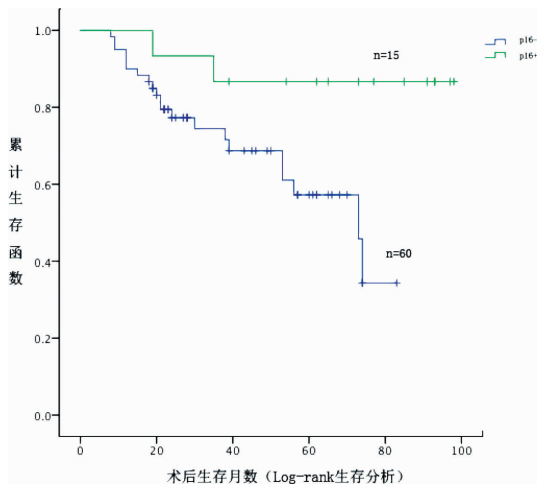


图 2 p16 阳性表达组与阴性表达组 K-M 法生存曲线

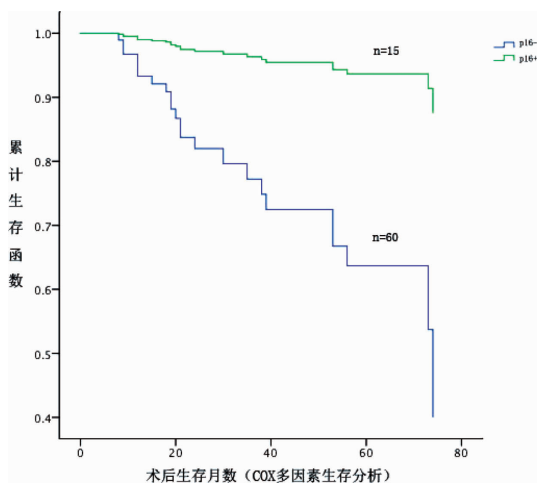


图 3 p16 阳性表达组与阴性表达组 COX 生存曲线

胞等淋巴细胞的活性。COX-2 为环氧化物酶的同工酶之一,其催化产生的 PGE₂ 可抑制 T 细胞、B 细胞的增殖,抑制自然杀伤细胞的活性,从而使机体免疫监视能力下降,肿瘤细胞逃脱免疫监视而继续生长^[7-8]。Partlová 等^[9]对 HPV 阳性与 HPV 阴性的 SCCHN 患者的免疫相关指标进行检测,发现 HPV 阳性的肿瘤组织中 COX-2 表达较低,IFN⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞、IL17⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞、骨髓瘤细胞、炎症趋化因子均高于 HPV 阴性患者,而 COX-2 与 HPV 及 p16 的关系未进一步了解。目前 COX-2 对喉癌预后的影响尚无一致结论,而与 p16 高表达的关系尚无相关研究。有学者发现 COX-2 在喉癌组织中高表达为喉癌不利预后因素^[16],因此我们将着色为 2、3 且肿瘤中阳性细胞 $\geq 50\%$ 判定为 COX-2 阳性。研究发现 COX-2 在喉癌组织中高表达,并且 COX-2 的表达情况与喉癌的淋巴结转移密切相关,可能与 COX-2 抑制免疫应答、促进血管内皮生长因子的表达进而促进肿瘤血管生成有关^[17-18]。Log-rank 单因素生存分析显示 COX-2 阳性患者生存率与 COX-2 阴性患者无统计学差异,COX 多因素生存分析显示 COX-2 不是影响患者总生存期的独立预后指标。在 COX-2 与 p16 的表达关联性分析发现,COX-2 表达与 p16 表达具有关联性。进一步对 p16、COX-2 进行联合分析,发现 p16⁺/COX-2⁻ 者生存率高于 p16⁻/COX-2⁻ 者以及 p16⁻/COX-2⁺ 者的生存率,而 p16⁻/COX-2⁻ 与 p16⁻/COX-2⁺ 无统计学差异。

综上所述,本研究显示 p16、COX-2 在喉癌组织中的表达较癌旁组织高,其高表达分别与喉癌的临床分型、淋巴结转移相关;p16 的表达是影响患者总生存期的独立有利预后因素。p16 的表达与 COX-2 的表达存在关联性;多因素生存分析显示 p16⁺/COX-2⁻ 者生存率高于 p16⁻/COX-2⁻ 者以及 p16⁻/COX-2⁺ 者的生存率。本实验采用免疫组化的方法从蛋白表达层次验证 p16、COX-2 的表达,不能验证 p16、COX-2 在喉癌患者中基因表达水平。

参考文献

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.

[2] Corry J, Rischin D, Cotton S, et al. Larynx preservation with primary non-surgical treatment for loco-regionally advanced larynx cancer [J]. J Med Imaging Radiat Oncol, 2011, 55(2): 229-235.

[3] Adams PD. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1471(3): M123-M133.

[4] Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its

contribution to malignant progression [J]. Oncogene, 2001, 20(54): 7874-7887.

[5] Chen ZW, Weinreb I, Kamel-Reid S, et al. Equivocal p16 immunostaining in squamous cell carcinoma of the head and neck: staining patterns are suggestive of HPV status [J]. Head Neck Pathol, 2012, 6(4): 422-429.

[6] Young R J, Urban D, Angel C, et al. Frequency and prognostic significance of p16INK4A protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2015, 112(6): 1098-1104.

[7] Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis [J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5040-5044.

[8] Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis [J]. Leuk Lymphoma, 2006, 47(9): 1863-1871.

[9] Partlová S, Bouček J, Kloudová K, et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncoimmunology, 2015, 4(1): e965570.

[10] de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, et al. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas [J]. Int J Cancer, 1985, 36(5): 575-578.

[11] Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(9): 709-720.

[12] Elango KJ, Suresh A, Erode EM, et al. Role of human papilloma virus in oral tongue squamous cell carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(4): 889-896.

[13] Ahmed HG, Mustafa SA, Warille E. Human papilloma virus attributable head and neck cancer in the sudan assessed by p16INK4A immunostaining [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(12): 6083-6086.

[14] Dostader EE, Katzenstein AL. The relationship between p16 expression and high-risk human papillomavirus infection in squamous cell carcinomas from sites other than uterine cervix: a study of 137 cases [J]. Hum Pathol, 2012, 43(3): 327-332.

[15] Gheit T, Abedi-Ardekani B, Carreira C, et al. Comprehensive analysis of HPV expression in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. J Med Virol, 2014, 86(4): 642-646.

[16] Chen YF, Luo RZ, Li Y, et al. High expression levels of COX-2 and P300 are associated with unfavorable survival in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2013, 270(3): 1009-1017.

[17] Ogawa F, Amano H, Eshima K, et al. Prostanoid induces premetastatic niche in regional lymph nodes [J]. J Clin Invest, 2014, 124(11): 4882-4894.

[18] Iwata C, Kano MR, Komuro A, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis [J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10181-10189.