

鼻咽癌中 Periostin 与 Integrin 蛋白的表达及其相关性

王 晟²,王惠洁¹,贺优延²,肖 婧²,贺祎璇²,颜诗谣²,李美香¹

(1. 南华大学医学院组织胚胎学教研室,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学船山学院)

摘 要: **目的** 探讨鼻咽癌组织中特异性成骨细胞因子-2(periestin)与整合素(integrin)蛋白表达的相关性。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 66 例鼻咽癌组织和 30 例正常鼻咽黏膜组织标本中 periostin 与 integrin 蛋白表达水平,分析 periostin 与鼻咽癌临床病理因素的关系及其与 integrin 表达的相关性。**结果** periostin 在正常鼻咽黏膜及鼻咽癌组织间质中表达,integrin 则主要在细胞膜上表达,两者在鼻咽癌组织中表达的强度均明显高于正常鼻咽黏膜。统计学分析显示 periostin 与鼻咽癌的临床分期、组织学类型及转移有关,Spearman 相关统计学分析结果表明鼻咽癌组织中 periostin 与 integrin 表达呈正相关($r=0.875, P=0.000$)。**结论** periostin 蛋白表达与 NPC 的侵袭和转移相关,在鼻咽癌组织的表达与 integrin 呈正相关,提示 periostin 可能通过与膜上 integrin 受体结合发挥作用。联合检测二者的表达可为鼻咽癌的诊断和治疗提供参考依据。

关键词: 鼻咽癌; 特异性成骨细胞因子-2; 整合素

中图分类号:R739.6 文献标识码:A

Expression of Periostin and Integrin in Nasopharyngeal Carcinoma and Their Correlation

WANG Sheng, WANG Huijie, HE Youyan, et al

(Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the correlation between the expression of periostin and integrin protein in nasopharyngeal carcinoma. **Methods** The expression of periostin and integrin protein were detected by immunohistochemistry in 66 cases of NPC and 30 cases of normal nasopharyngeal mucosa (NNM), statistics analysis were used to evaluate the relationships between periostin expression and clinicopathological factors, and the correlation of periostin and integrin. **Results** Periostin expression can be observed in the stroma of NPC and NNM, integrin expression usually be observed on the cell membrane. The two proteins over-expression was both frequently observed in the stroma of NPC compared with the stroma of NNM. Periostin over-expression was significantly associated with advanced clinical stage, histological type and metastasis in NPC. **Conclusion** The expression of periostin was associated with the invasion and metastasis of NPC, and positively correlated with integrin expression in NPC, which suggested that periostin carry out its function by combined with membrane receptor-integrin. Detection periostin expression combine with integrin expression can provide reference for the diagnosis and treatment of NPC.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; periostin; integrin

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是中国南方及东南亚地区最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居国内头颈部恶性肿瘤之首^[1-2],严重威胁患者的生命和健康。Periostin 蛋白是本研究团队在前期研究中应用蛋白质组学技术筛选到的一种在鼻咽癌间质高表达的间质特异性分泌蛋白^[3]。

收稿日期:2013-09-24

基金项目:国家自然科学基金项目(81072199),湖南省自然科学基金衡阳联合基金资助项目(12JJ9034),湖南省科技厅项目(2011SK3088),湖南省大学生创新课题(2012cshncx1)。

作者简介:王晟,2010 级临床医学专业本科生。通讯作者李美香,博士,副教授,研究方向:细胞分化与肿瘤,E-mail:meixiang@ yahoo. com. cn.

研究表明,periostin 在多种肿瘤组织高表达,与肿瘤的发生发展及转移密切相关^[4-7],通过自分泌或旁分泌方式促进肿瘤的生长转移^[8]。Integrin 是一类位于细胞膜上的细胞粘附受体,能与多种配体结合,已被证实多种恶性肿瘤中高表达,主要介导细胞—基质及细胞—细胞之间的相互作用,参与恶性肿瘤的发生和发展,且与肿瘤的浸润、转移密切相关^[9]。已有学者报道 periostin 通过与肿瘤细胞膜上的 integrin 结合而促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[10]。但有关 periostin 在 NPC 侵袭转移中是否是通过与 integrin 结合而发挥作用目前尚不清楚。本研究拟通过检测 periostin 与 integrin 在 NPC 和正常鼻咽黏膜组织(normal nasopharyngeal mucosa,NNM)中的表达,并分析二者表达的相关性,以期通过联合检测二者的表达为鼻咽癌的诊断和治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

石蜡包埋组织标本包括 30 例 NNM 组织、66 例 NPC 组织(54 例男性和 12 例女性,患者年龄为 27 ~ 78 岁,平均年龄为 48 ± 9 岁,临床分期为Ⅱ到Ⅳ),取自中南大学湘雅医院病理科,用于免疫组化分析。病人为未经放疗和化疗的初诊病人(2006 ~ 2012 年),并经病理诊断确诊。

1.2 主要试剂

兔抗人 Periostin、鼠抗人 Integrin αVβ5 (英国 abcam 公司);免疫组织化学超敏 S-P 试剂盒、DAB 辣根过氧化物酶底物显色剂(福州迈新生物技术开发公司)。

1.3 免疫组织化学检测

所有切片均在相同条件下采用 S-P 法免疫组织化学染色,按试剂盒说明进行,检测 periostin 和 integrin 蛋白的表达。简要步骤如下:石蜡切片常规脱蜡、下行入水;0.1 mol/L 枸橼盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原修复;过氧化酶阻断溶液(试剂 A)阻断内源性过氧化物酶的活性 10 min;非免疫动物血清(试剂 B)室温孵育 10 min;一抗 periostin (1:1000, abcam)、Integrin αVβ5(1:1000, abcam)4℃孵育过夜,阴性对照用 PBS 代替一抗;二抗(试剂 C)室温孵育 15 min;链霉菌抗生物素—过氧化物酶溶液(试剂 D)室温孵育 15 min;DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封片。

1.4 结果判定

免疫组化切片采用双盲法进行评分。为评价 periostin 和 Integrin 在 NPC 和 NNM 组织中的表达情况,每张切片计数 10 个视野,在 40 × 视野下计数阳性细胞数,计算出一个均数^[11]。为了便于分析,分析结果分为两组:阳性细胞数大于平均数的为高表达组(high group),阳性细胞数低于平均数的为低表达组(low group)。

1.5 统计学分析

Periostin 和 integrin 蛋白的表达及 periostin 和 integrin 表达的相关性均应用 SPSS14.0 统计软件对实验结果进行统计学分析,组间多重比较采用 Kruskal-Wallis H test,两两比较用 One-Way ANOVA,相关分析用 Spearman, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Periostin 在 NPC 和 NNM 中的表达及其与 NPC 临床病理特征的关系

采用免疫组织化学方法检测 periostin 在福尔马林固定、石蜡包埋的 NNM 组织、原发 NPC 组织中的表达。结果如表 1、图 1 所示:periostin 在间质中表达,与 NNM 相比,periostin 在原发 NPC 间质中的表达水平明显上调($P < 0.01$)。

采用统计学方法分析 periostin 表达水平与鼻咽癌临床病理特征的关系,结果如表 2 所示:periostin 的表达水平与 NPC 的临床分期、组织学类型(WHO)^[12]、局部淋巴结转移及远处转移有关,与低表达的 NPC 比较,periostin 高表达的 NPC 病人表现更晚的临床分期、更差的组织学类型和更容易发生转移($P < 0.05$, $P < 0.01$);periostin 蛋白的表达水平与病人年龄、性别及肿瘤分期无关。结果提示:periostin 的异常表达可能与 NPC 的发生、发展及转移有关。

表 1 periostin 与 integrin 在 NNM 和 NPC 中的表达(例)

蛋白名称	组别	n	染色强度		P 值
			低	高	
periostin	NNM 组	30	23	7	0.000
	NPC 组	66	21	45	
integrin	NNM 组	30	20	10	0.008
	NPC 组	66	25	41	

单向方差分析,与 NPC 组比较

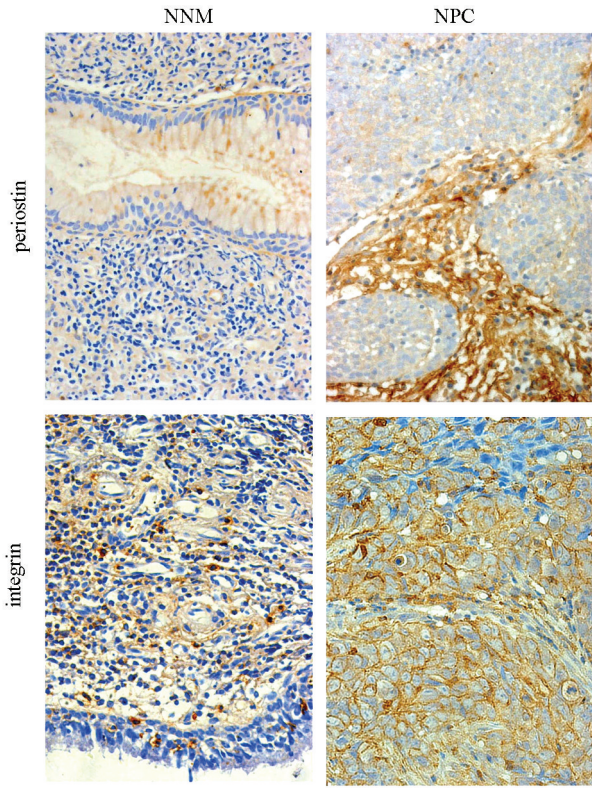


图1 免疫组化检测 Periostin 和 integrin 在 NNM、NPC 和 LMNPC 组织中的表达 (苏木素复染, ×200 倍)

表2 特异性成骨细胞因子-2 表达水平与 NPC 病理特征的关系(例)

临床因子	n	染色强度		P 值
		低	高	
年龄				0.325
≤50 岁	31	9	22	
>50 岁	35	12	23	
性别				0.451
男	54	17	37	
女	12	4	8	
组织学类型				0.015
WHO Type II	12	7	5	
WHO Type III	54	14	40	
原发肿瘤分期				0.889
T1	18	5	13	
T2	23	8	15	
T3	20	7	13	
T4	5	1	4	
局部淋巴结转移				0.003
N0	7	5	2	
N1	11	7	4	
N2	31	7	24	
N3	17	2	15	
远处淋巴结转移				0.034
M0	61	30	31	
M1	5	0	5	
临床分期				0.015
II	7	5	2	
III	38	14	24	
IV	21	2	19	

秩和检验或单向方差分析

2.2 Integrin 在 NPC 和 NNM 中的表达

采用免疫组织化学方法检测 Integrin 在福尔马林固定、石蜡包埋的原发 NPC 组织和 NNM 组织中的表达。结果如图 1、表 1 所示: Integrin 在 NNM 组织、原发 NPC 组织中均有不同程度的表达。Integrin 主要在细胞膜上表达, 呈黄色至棕褐色, 少数病例出现细胞膜和细胞浆均表达。与正常鼻咽粘膜组织比较, Integrin 在 NPC 组织中强表达, 两者有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 NPC 组织中 Integrin 表达强度与 Periostin 表达强度的相关性

为探讨 NPC 组织中 Integrin 表达强度与 periostin 表达强度的相关关系, 将 Integrin 与 periostin 的染色强度作为变量, 分析等级资料的相关性, 采用 Spearman 相关分析, 结果如表 3 所示: NPC 组织中 Integrin 的表达强度与 periostin 的表达强度呈正相关($r = 0.875, P = 0.000$)。

表3 NPC 组织中 Integrin 表达强度和 periostin 表达强度之间的关系(例)

Pericstin	integrin		合计
	低	高	
低	16	5	21
高	9	36	45
合计	25	41	66

3 讨 论

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是国内南方及东南亚常见的上皮恶性肿瘤。目前, 鼻咽癌病人死亡的主要原因是癌细胞的远处转移或颅底侵犯。因此, 早发现、早诊断、控制其转移是提高鼻咽癌病人生存期的一个重要手段。

研究发现 periostin 是一种间质分泌蛋白, 在多种肿瘤组织中高表达, 能促进肿瘤的侵袭和转移^[13-15], 在结肠癌的成纤维细胞和腺周成纤维细胞上高表达^[13], 在胰腺癌细胞的增殖和侵袭中起了非常重要的作用^[14, 16], 在多种肿瘤中通过自分泌或旁分泌方式促进肿瘤的生长和转移^[17]。Utispan 等^[18] 研究发现 periostin 通过与肿瘤细胞表面的整合素(integrin)起作用, 促进肿瘤的生长、增殖及转移。但 periostin 在 NPC 发生发展过程中的作用途径尚未阐明。

研究报道 Integrin 是一类位于细胞膜上, 由两

条跨膜多肽链 α 和 β 以非共价方式结合而成的异二聚体,是一类重要的粘附分子,同时是一类重要的细胞粘附受体,主要介导细胞—基质及细胞—细胞之间的相互作用,并可通过独特的信号转导途径,影响细胞的增殖、凋亡、分化以及运动,参与恶性肿瘤的发生和发展^[19]。研究报道 periostin 通过与肿瘤细胞膜上的 Integrin 结合而促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[18],Kudo 等^[20]在研究中发现 periostin 主要与 Integrin 结合发挥作用。Integrin 能与多种细胞活动过程中的多种配体结合,已被证实在多种恶性肿瘤中高度表达,且与肿瘤的浸润、转移密切相关^[18]。

为探讨 periostin 与 NPC 细胞的作用途径,本文采用免疫组织化学技术检测了 periostin 和 integrin 在 NPC 和正常鼻咽黏膜组织 (NNM) 上的表达水平,并用 Spearman 相关分析法分析了 periostin 和 Integrin 在鼻咽癌组织中表达强度的相关性。研究结果显示:periostin 和 Integrin 在 NPC 组织中的表达均高于正常 NNM 组织。Spearman 分析结果显示 periostin 的表达强度与 Integrin 的表达强度呈正相关,且关系十分密切($r = 0.814, P < 0.01$),提示在 NPC 中,periostin 可能也是通过与 Integrin 结合而发挥功能,periostin 表达上调可引起 Integrin 的表达上调,periostin 和 Integrin 同时高表达在 NPC 的侵袭、转移中起着重要作用。因此,联合检测二者的表达可能为鼻咽癌的诊断和治疗提供参考依据。

参考文献:

- [1] Feng BJ, Huang W, Shugart YY, et al. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4 [J]. *Nat Genet*, 2002, 31 (4): 395-399.
- [2] Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2005, 365 (9476): 2041-2054.
- [3] Li MX, Xiao ZQ, Liu YF, et al. Quantitative proteomic analysis of differential proteins in the stroma of nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal epithelial tissue [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106 (4): 570-579.
- [4] Xu D, Xiao ZQ, Liu YF, et al. Cancer stem cell-related gene periostin: a novel prognostic marker for breast cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10): e46670.
- [5] Kudo Y, Xu H, Ren Y, et al. Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e44488.
- [6] Zhang Y, Zhang G, Li J, et al. The expression analysis of periostin in human breast cancer [J]. *J Surg Res*, 2010, 160 (1): 102-106.
- [7] Liu Y, Liu BA. Enhanced proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of nicotine-promoted gastric cancer by periostin [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17 (21): 2674-2680.
- [8] Riener MO, Fritzsche FR, Soll C, et al. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas [J]. *Histopathology*, 2010, 56 (5): 600-606.
- [9] Knowles LM, Gurski LA, Engel C, et al. Integrin α 5 β 3 and fibronectin upregulate Slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (20): 6175-6184.
- [10] Lin CY, Chen HJ, Li TM, et al. β 5 Integrin up-regulation in brain-derived neurotrophic factor promotes cell motility in human chondrosarcoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (7): e67990.
- [11] Sheikh AA, Vimalachandran D, Thompson CC, et al. The expression of S100A8 in pancreatic cancer-associated monocytes is associated with the Smad4 status of pancreatic cancer cells [J]. *Proteomics*, 2007, 7 (11): 1929-1940.
- [12] Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear, a commentary on the second edition [J]. *Cancer*, 1993, 71 (8): 2689-2697.
- [13] Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, et al. Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon [J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56 (8): 753-764.
- [14] Kanno A, Satoh K, Masamune A, et al. Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122 (12): 2707-2718.
- [15] Morra, L. Rechsteiner M, Casagrande S, et al. Characterization of periostin isoform pattern in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76 (2): 183-190.
- [16] Erkan M, Kleeff J, Gorbachevski A, et al. Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (4): 1447-1464.
- [17] Bao S, Ouyang G, Bai X, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5 (4): 329-339.

(上接第 558 页)

- [18] Utispan K, Sonongbua J, Thuwajit P, et al. Periostin activates integrin $\alpha 5 \beta 1$ through a PI3K/AKT dependent pathway in invasion of cholangiocarcinoma[J]. Int J Oncol, 2012, 41 (3) : 1110-1118.
- [19] Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, et al. Integrins in invasive growth [J]. J Clin Invest, 2002, 109 (8) :

999-1006.

- [20] Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, et al. Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66 (14) : 6928-6935.

(此文编辑:朱雯霞)