

EHD2 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义

鲁科利,江青山,刘志锋*,彭 静,黄 芳,周泉君

(南华大学附属第一医院耳鼻咽喉科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: 检测喉鳞癌组织中 EHD2 的表达情况,探讨其与喉鳞癌患者的临床病理特征的相关性,并探讨其与增殖细胞核抗原 Ki-67 表达的相关性。采用免疫组织化学法(SP 法)检测 50 例喉鳞癌组织和 50 例声带息肉组织中 EHD2、Ki-67 的表达水平,分析 EHD2 表达水平与喉癌患者的临床相关参数和预后的关系,并分析 EHD2 和 Ki-67 表达水平的关系。结果显示喉鳞癌组织中 EHD2 表达水平低于声带息肉组织($P<0.05$),EHD2 的表达与喉癌患者的肿瘤分化状况、淋巴结转移情况紧密相关($P<0.05$),与患者的性别、年龄、肿瘤范围和 TNM 分期无明显相关性($P>0.05$)。生存分析显示 EHD2 表达与喉癌患者预后关系密切,高表达组患者生存率高于低表达组($P<0.01$)。EHD2 表达与 Ki-67 表达呈负相关($P<0.05$)。EHD2 在喉鳞癌组织中的低表达,其很可能作为一种抑癌因子参与抑制喉癌发生发展的过程,且 EHD2 低表达对喉癌患者的预后具有重要意义。

关键词: 喉; 鳞状细胞癌; EHD2; Ki-67; 免疫组化

中图分类号:R739.65

文献标识码:A

The expression and clinical significance of EHD2 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC)

LU Keli, JIANG Qingshan, LIU Zhifeng, PENG Jing, HUANG Fang, ZHOU Quanjun

(Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: To examine the expression of EHD2 in human laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and investigate the relationship between its expression, clinical characteristics of LSCC and the cell proliferative factor Ki-67. Immunohistochemical method (SP) to was used detect the expression level of EHD2 and Ki-67 in 50 laryngeal squamous cell carcinoma and 50 laryngeal polyps, and the relationship between its expression, clinical pathological parameters and Ki-67 expression was analyzed. Analyze the relationship between EHD2 expression, clinical parameters and prognosis in patients with laryngocarcinoma. Immunohistochemical results showed the expression of EHD2 in laryngeal carcinoma was lower than in vocal polyps ($P<0.05$). Moreover, the expression level of EHD2 protein in LSCC was significantly related to tumor differentiation, lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with gender, age, range and TNM stage of tumor ($P>0.05$). Survival analysis showed the expression of EHD2 was closely related to the prognosis of patients with laryngeal cancer, high survival rate was higher than that of patients with low expression group ($P<0.01$). The expression of EHD2 was negatively correlated with Ki-67 ($P<0.05$). EHD2 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) has low expression, which may inhibit laryngeal cancer as a tumor suppressor factor, and EHD2 expression is of great significance to the prognosis of laryngeal squamous carcinoma.

Key words: larynx; squamous cell carcinoma; EHD2; Ki-67; immunohistochemistry

喉癌是常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全身肿瘤中占比 1%~5%,在耳鼻咽喉头颈外科的恶性

肿瘤中位居第三,仅次于鼻咽癌^[1-2],喉癌发生主要源自喉部黏膜上皮细胞,喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)是喉癌最为常见的病理学类型^[3]。目前关于喉癌发生、发展的病因和机制尚未完全阐明,以往的研究发现原癌基因被激活、抑癌基因被抑制、EB 病毒感染、吸烟、环境污染

收稿日期:2018-06-07;修回日期:2018-10-25

基金项目:湖南省卫生计生委科研课题(B20180186)。

* 通信作者, E-mail: liuzhifengnhfy@163.com.

等相关因素在喉鳞癌的发生发展中都有一定的影响^[4-5]。EHD 家族蛋白 2 (Eps15 homology domain containing 2, EHD2) 是一种膜转运调控蛋白, 目前研究已发现 EHD2 在食管癌、乳腺癌、肝细胞癌和神经胶质瘤等多种肿瘤中表达下调, 其作为一种抑癌基因参与肿瘤的发生发展^[6-9]。目前 EHD2 在喉癌中的研究在国内外尚未见报道。本研究采用免疫组化法检测 EHD2 在喉鳞状细胞癌中的表达水平, 并探讨其临床意义和 Ki-67 的关系, 为将来喉癌的防治开拓新思路 and 提供新的潜在治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 研究材料 收集 2012 年 1 月~2016 年 6 月期间南华大学附属第一医院的喉鳞癌患者的石蜡包埋标本 50 例, 各患者均接受手术治疗且有完整病理档案资料; 并收集同一医院 2017 年 1~12 月期间手术切除的声带息肉标本 50 例。喉鳞癌患者女性 2 例, 男性 48 例, 年龄 41~85 岁 (平均 58.3 岁)。声带息肉患者女性 23 例, 男性 27 例, 年龄 29~69 岁 (平均 48.8 岁)。所有喉癌患者均由病理确诊为喉鳞状细胞癌, 且临床病史资料收集完整, 所有患者在术前均未接受过放化疗和其他特殊治疗, 在术后都完善了跟踪随访, 随访时间 2~5 年, 其随访中位数 2.3 年 (0.8 年, 6.3 年), 患者的生存时间以手术日期为起始点。在喉鳞癌中, 声门型 25 例, 声门上型 15 例, 声门下型 10 例; TNM 分期 (UICC2002) I~II 期 32 例, III~IV 期 18 例; 不伴淋巴结转移 38 例, 伴淋巴结转移 12 例; 低分化 13 例, 高中分化 37 例。

1.2 方法 喉鳞癌组织石蜡切片均由南华大学附属第一医院病理科提供。声带息肉组织组标本经 4% 多聚甲醛固定 24 h, 送至南华大学病理教研室进行石蜡包埋、脱水, 再连续切片 (厚度约为 4 μm)。按 SP 试剂盒 (北京中杉金桥公司) 说明书执行操作流程, 石蜡组织切片经过常规脱蜡水化, 柠檬酸钠抗原修复液 (0.01 mol/L) 进行抗原修复, 冷却后 PBS 冲洗, 3% 过氧化氢液浴洗封闭内源性过氧化物酶。PBS 冲洗后滴加稀释的 EHD2 和 Ki-67 抗体 (1:100, 美国 Proteintech 公司), 孵育后 PBS 冲洗; 滴加反应增强剂后孵育, PBS 冲洗; 滴加适量的增强酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物, 孵育后 PBS 冲洗; DBA 显色剂 (北京中杉金桥公司) 显色, 复染、分化、冲洗, 脱水干燥、透明、封片, 光学显微镜下观察。采用双盲法读片, EHD2、Ki-67 分别以细胞质 (或细

胞膜) 和细胞核中有棕黄色或棕黄色颗粒标志为阳性细胞。每张组织切片观察 5 个高倍视野 (200 倍或 400 倍), 并都随机计数 200 个肿瘤细胞。EHD2 依据阳性细胞百分率和着色强度评分 (0~3 分) 综合评定。最终根据综合评分定为两个等级: ≥ 2 分为阳性、高表达, < 2 分为阴性、低表达^[8]。Ki-67 依据阳性细胞百分率将其分为四个等级 (I~IV 级), 并综合评定: I 级~II 级评为阴性和低表达, III 级~IV 级评为阳性和高表达^[2]。

1.3 统计学处理 本研究数据采用 SPSS19.0 统计软件进行数据的处理和分析, 计数资料组间比较采用 χ^2 检验, EHD2、Ki-67 间的表达关系分析用 Spearman 法检测。5 年总生存率用 Kaplan-Meier 方法进行分析并绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EHD2 在喉鳞癌及声带息肉组织中的表达情况 EHD2 阳性表达主要被显示在细胞膜和细胞质中, 呈棕黄色 (图 1)。喉鳞癌组织 50 例中, 阳性或强阳性 17 例, 阳性率为 34% (图 1B), 而对应的声带息肉组织 50 例中, 阳性或强阳性 34 例, 阳性率为 68% (图 1A)。EHD2 在喉鳞癌组织中的表达水平低于声带息肉组织 ($\chi^2 = 11.565$, $P = 0.001$)。而 Ki-67 的表达情况与 EHD2 相反 (图 2), Ki-67 蛋白在喉鳞癌组织中阳性率 62% (31/50), 在声带息肉组织中阳性率 22% (11/50), 两者差异有显著性 ($\chi^2 = 16.420$, $P = 0.001$)。

2.2 喉鳞癌组织中 EHD2 的表达与临床相关参数的关系 EHD2 在 38 例不伴淋巴结转移的喉鳞癌中, 有 16 例阳性表达, 而在 12 例有转移淋巴结的喉鳞癌中, 有 1 例阳性表达, 表达率分别为 42.1% (16/38)、8.3% (1/12), 无转移组阳性表达率明显较高, 其差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.635$, $P = 0.031$), 表明喉鳞癌 EHD2 的表达水平与有无淋巴结转移相关。在高中、低分化喉鳞癌组织中 EHD2 阳性表达率分别为 43.2% (16/37)、7.7% (1/13)。随着分化程度越低, 阳性表达率越低 ($\chi^2 = 5.418$, $P = 0.020$)。EHD2 的表达水平与患者的年龄、性别、肿瘤部位、TNM 分期均无明显相关性 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.3 喉鳞癌组织中 EHD2 与 Ki-67 表达的关系 采用 Spearman 法分析喉鳞癌组织中 EHD2 与 Ki-67 表达的相关性, 结果显示, 两种蛋白表达明显呈负相关 ($r = -0.382$, $P < 0.01$), 见表 2。

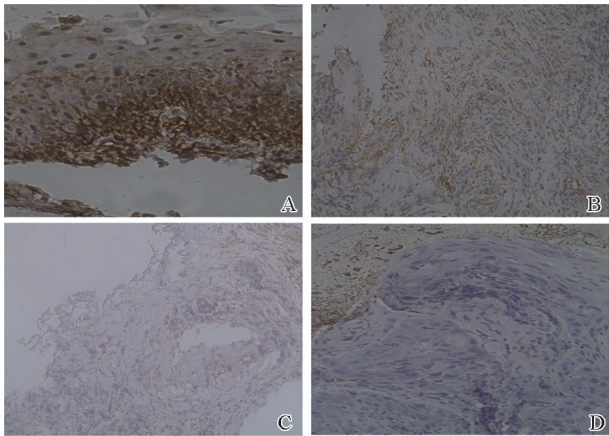


图 1 EHD2 在喉鳞癌组织及声带息肉组织中的表达 (SP 200×)

A: 在声带息肉组织中阳性表达; B: 在喉鳞癌组织中阳性表达; C: 在声带息肉组织中阴性表达; D: 在喉鳞癌组织中阴性表达

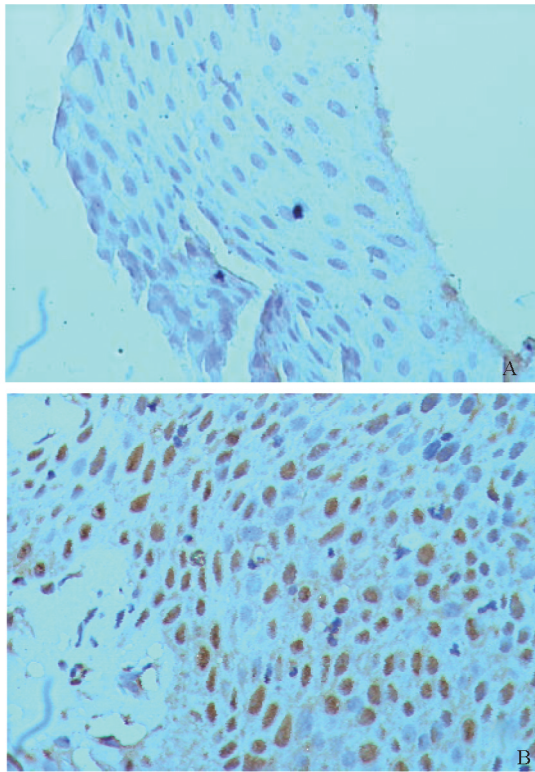


图 2 Ki-67 在声带息肉组织和喉鳞癌组织中的表达 (SP 400×)

A: 在声带息肉组织中阴性表达; B: 在喉鳞癌组织中阳性表达

2.4 EHD2 表达水平和喉鳞癌预后的相关性 50 例喉鳞癌患者共完成随访 45 例(失访率 10%), 采用 Kaplan-Meier 方法进行分析 5 年总生存率, 结果显示, EHD2 阳性组患者的生存率为 82.3% (14/17), 而阴性组为 42.8% (12/28), EHD2 高表达组的患者生存率明显高于低表达组 ($\chi^2 = 6.010, P = 0.014$)。其生存曲线见图 3。

表 1 EHD2 的表达与喉鳞癌临床相关参数的关系

临床参数	分类	EHD2		P
		阳性	阴性	
年龄(岁)	≤60	10	13	0.192
	>60	7	20	
性别	男	16	32	0.626
	女	1	1	
肿瘤部位	声门上型	5	10	0.942
	声门型	9	16	
	声门下型	3	7	
组织类型	高、中分化	16	21	0.020
	低分化	1	12	
临床分期	I-II	12	20	0.486
	III-IV	5	13	
淋巴结转移	有	1	11	0.031
	无	16	22	

表 2 EHD2 和 Ki-67 在喉鳞癌中表达相关性

Ki-67	EHD2		合计	r	P
	阳性	阴性			
阳性	6	25	31	-0.382	0.001
阴性	11	8	19		
合计	17	33	50		

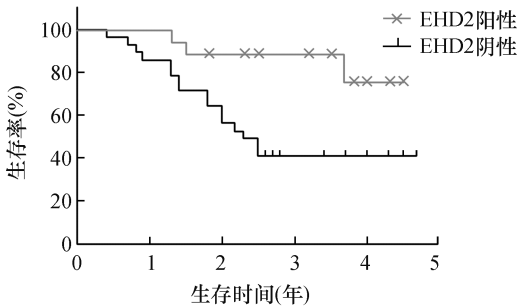


图 3 EHD2 表达水平和喉鳞癌患者预后的相关性

3 讨 论

目前喉癌的治疗主要采取以手术为主, 放化疗联合的综合治疗方案^[10], 但整体治疗情况仍不容乐观, 且大多数患者术后声音嘶哑、甚至失声, 生存质量仍欠佳, 目前尚无一种令人满意的治疗方案^[3,5]。喉癌的发生、侵袭、转移等一系列演变过程, 不是单一因素所致, 是由一系列癌基因、抑癌基因及环境因素共同触发而介导的复杂进程^[11]。因此, 寻找和探索新基因的功能对明确喉癌的发生发展机理有

着重要意义。

胞吞作用可通过调控细胞的核信号、核转录和成瘤性从而促进肿瘤的发生发展^[12]。EHD2 作为新发现的膜转运蛋白,与 EHD1、EHD3 和 EHD4 共同组成 EHD 蛋白家族亚类^[13],在其 C 端包含 EH 域(Eps 15 homology domain),由 543 个氨基酸残基构成,可通过连接不同的蛋白而发挥相应的作用,其主要功能是作为膜内吞调控蛋白,参与调节吞噬作用^[13-14]。它可调节多种人体组织中多类受体,从而调节各种生理过程,如调节肌动蛋白细胞骨架、小 GTP 酶和多种膜受体,从而使相应配体转运至质膜^[15-16]。EHD2 在多种恶性肿瘤中被发现存在异常表达,在食管鳞状细胞癌中发现其高表达可以抑制肿瘤的发生发展^[17-18]。在乳腺癌表达水平随着其肿瘤病理学分级的升高而逐渐降低,与其不良预后密切相关^[19]。

本研究采用免疫组化方法发现 EHD2 可能与喉癌的发生发展密切相关,并分析 EHD2 表达情况与各临床相关参数之间的关系,发现 EHD2 表达水平与肿瘤组织分化、淋巴结转移呈负相关,生存率分析发现 EHD2 高表达患者较低表达者生存率高。本研究 EHD2 与 Ki-67 在喉鳞癌组织中的表达呈负相关,EHD2 可以穿梭至细胞核抑制转录,并且已有报道在前列腺癌中 EHD2 缺失可以促进肿瘤细胞的增殖,与本研究结果基本一致。提示 EHD2 是喉癌潜在抑制因子,但其具体机制尚需进一步实验研究验证。综上所述,本研究 EHD2 在喉鳞癌及声带息肉组织中的表达具有差异性且与喉癌预后相关,提示其对于喉癌预后判断有一定帮助,是喉癌治疗的潜在治疗靶点,但相关的分子机制仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LYHNE NM, JOHANSEN J, KRISTENSEN CA, et al. Incidence of and survival after glottic squamous cell carcinoma in Denmark from 1971 to 2011-a report from the Danish Head and Neck Cancer Group[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 59: 46-56.
- [2] 谢金龙, 罗招阳, 袁恩健, 等. Bcl-2 与 Ki-67 蛋白在喉鳞癌中的表达检测及临床相关性分析[J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(6): 549-53.
- [3] DUBAL PM, MARCHIANO E, KAM D, et al. Laryngeal spindle cell carcinoma: a population-based analysis of incidence and survival[J]. *Laryngoscope*, 2015, 125(12): 2709-14.
- [4] YANG CW, WANG SF, YANG XL, et al. Identification of gene expression models for laryngeal squamous cell carcinoma using co-expression network analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(7): e9738.
- [5] MA J, WANG J, FAN W, et al. Upregulated TIMP-1 correlates with poor prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(1): 246-54.
- [6] LI M, YANG X, ZHANG J, et al. Effects of EHD2 interference on migration of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 396.
- [7] YANG X, REN H, YAO L, et al. Role of EHD2 in migration and invasion of human breast cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3717-26.
- [8] LIU J, NI W, QU L, et al. Decreased expression of EHD2 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(9): 2554-67.
- [9] SMITH JS, TACHIBANA I, POHL U, et al. A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region[J]. *Genomics*, 2000, 64(1): 44-50.
- [10] VU HL, SIKORA AG, FU S, et al. HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy[J]. *Cancer Lett*, 2010, 288(2): 149-55.
- [11] 章永, 戈伟. MUC1 在喉癌中的表达及临床意义[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(8): 105-8.
- [12] MARITZEN T, SCHACHTNER H, LEGLER DF. On the move: endocytic trafficking in cell migration[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(11): 2119-34.
- [13] NASLAVSKY N, CAPLAN S. EHD proteins: key conductors of endocytic transport[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(2): 122-31.
- [14] DOHERTY KR, DEMONBREUN AR, WALLACE GQ, et al. The endocytic recycling protein EHD2 interacts with myoferlin to regulate myoblast fusion[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20252-60.
- [15] HOERNKE M, MOHAN J, LARSSON E, et al. EHD2 restrains dynamics of caveolae by an ATP-dependent, membrane-bound, open conformation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(22): E4360-9.
- [16] BAHL K, NASLAVSKY N, CAPLAN S. Role of the EHD2 unstructured loop in dimerization, protein binding and subcellular localization[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123710.
- [17] 朱红珍, 施公胜, 茅国新, 等. EHD2 蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(7): 950-4.
- [18] ZHU T, JI Z, XU C, et al. Expression and prognostic role of SG-TA in human breast carcinoma correlates with tumor cell proliferation[J]. *J Mol Histol*, 2014, 45(6): 665-77.
- [19] 李磊, 施育华. 乳腺癌中抑癌基因 EHD2 表达的临床意义与预后关系[J]. *交通医学*, 2017, 31(6): 515-9.

(本文编辑:蒋湘莲)