

NOB1 在宫颈鳞癌中的表达及其临床意义

杨桂春, 于丽波, 王玉霞, 包文影, 陈贝贝

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: [目的] 探讨 NOB1 在宫颈鳞癌组织中的表达及其与临床病理因素和预后的关系。[方法] 采用免疫组织化学 SP 法检测 157 例宫颈鳞癌、54 例宫颈上皮内瘤样病变 (CIN) 及 42 例宫颈正常组织中 NOB1 的表达。[结果] 宫颈正常组织、CIN 组织和宫颈鳞癌组织 NOB1 的表达阳性率分别为 5.0%、29.6% 和 73.8%, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。NOB1 在宫颈鳞癌中的表达与肿瘤分化程度及是否淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); 而与患者年龄、肿瘤直径、临床病理分期及浸润深度无明显相关 ($P > 0.05$)。NOB1 阳性表达患者的 5 年累积生存率较阴性表达者低 ($P < 0.01$)。[结论] NOB1 的表达与宫颈鳞癌的临床病理因素及预后有一定关系, 其高表达可能在宫颈癌发生、发展中起重要作用, 并很可能成为潜在的治疗靶点及预测宫颈癌预后的有价值的分子标志物。

关键词: 宫颈肿瘤; 鳞状细胞癌; NOB1; 预后

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)12-0990-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.12.B005

Expression of NOB1 in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance

YANG Gui-chun, YU Li-bo, WANG Yu-xia, et al.

(The Affiliated Cancer Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150040, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of NOB1 in cervical squamous cell carcinoma and its relationship with clinicopathological features and prognosis. [Methods] Expression of NOB1 was detected by immunohistochemistry in 157 cases of cervical squamous cell carcinoma, 54 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 42 cases of normal cervical tissue. [Results] The positive rates of NOB1 in normal cervical tissues, cervical intraepithelial neoplasia tissues and cervical squamous cell carcinoma tissue were 5.0%, 29.6% and 73.8% respectively ($P < 0.001$). The expression level of NOB1 related to tumor differentiation and lymph node metastasis in patients with cervical squamous cell carcinoma ($P < 0.05$), but didn't relate to age, tumor size, FIGO stage and tumor infiltration depth ($P > 0.05$). 5-year survival rate in patients with NOB1 positive expression was lower than that in NOB1 negative expression group. [Conclusion] The high expression of NOB1 may be involved in the carcinogenesis and progression of cervical squamous cell carcinoma. The expression of NOB1 has a certain relationship with clinicopathological factors of cervical squamous cell carcinoma, which is likely to be a potential therapeutic target and valuable prognostic indicator.

Subject words: cervical neoplasms; squamous cell carcinoma; NOB1; prognosis

宫颈癌是全球妇女最常见的恶性肿瘤之一, 在发展中国家妇女中其发病率居第 1 位, 在其病因学中主要因素是 HPV 的持续感染, 感染超过 6 个月易发生癌变^[1], 但 HPV 感染并不一定都会发展为宫颈癌, 也就是说, 除了 HPV 感染, 还有其他因素在宫颈癌的发生中起作用, 本研究采用免疫组化方法检测

NOB1 蛋白在宫颈癌的表达, 以探讨其与宫颈癌病因学的关系。

1 资料与方法

1.1 病例资料

收集 2002 年 5 月至 2008 年 6 月我院宫颈病变标本 253 例, 其中宫颈正常组织 42 例, 宫颈上皮内瘤变 54 例, 宫颈癌 157 例, 所有病例均为首次发病,

通讯作者: 于丽波, 副主任医师, 硕士生导师, 博士; 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院妇三科, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号 (150040); E-mail: sjystudent@126.com

收稿日期: 2014-03-23; **修回日期:** 2014-05-26

术前患者均未接受过抗癌治疗,术后所有标本的石蜡切片均由高年资病理医生作出明确诊断。

1.2 试剂

NOB1 多克隆抗体(工作浓度为 1:50)购自美国 Proteintech Group;SP 免疫组化染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组化法

所有标本均用 10%甲醛固定、石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,常规脱蜡,用 pH6.0 的枸橼酸盐缓冲液经中火档微波处理进行抗原修复。具体按照 SP 免疫组化染色试剂盒说明书进行操作。用已知阳性片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

用双盲法对染色结果进行评估,每张切片均由两位高年资病理科诊断医师独立阅片,两位一致肯定为阳性者方视为阳性。免疫组化染色阳性结果表现为淡黄色或棕黄色、棕褐色颗粒,位于细胞质或细胞核。每例切片选择 5 个有代表性高倍视野($\times 400$),每个视野随机计数 200 个细胞,不少于 1 000 个细胞。根据阳性细胞所占百分比及阳性细胞染色强度,用半定量免疫评分法来判定实验结果。①染色强度:0 分为无着色;1 分为淡黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。②阳性细胞所占百分比:1 分为阳性细胞 $\leq 25\%$;2 分为 26%~50%;3 分为 51%~75%;4 分为 76%~100%。染色强度与阳性细胞所占百分比的乘积:0~2 分为阴性,3~5 分为弱阳性,6~7 分为强阳性,大于 3 分判定为免疫反应阳性。

1.5 随访

本研究随访方式以电话及信件为主,并结合主动随访。末次随访时间为 2013 年 6 月。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件包对数据进行分析。生存率采用 Kaplan-Meier 法计算,并绘制生存曲线,生存期差别的比较采用 Log-rank 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NOB1 在宫颈组织中的表达

免疫组化结果显示,NOB1 主要表达于细胞浆

中,少数细胞核中也有表达,呈现淡黄色或棕黄色、棕褐色颗粒 (Figure 1、2)。宫颈正常组织 42 例,NOB1 呈阳性表达 2 例,阳性率为 5.0%;宫颈上皮内瘤变 54 例,NOB1 呈阳性表达 16 例,阳性率为 29.6%;宫颈鳞癌组织 157 例,NOB1 呈阳性表达 116 例,阳性率为 73.8%;三者间比较差异有统计学意义 ($P<0.001$)(Table 1)。

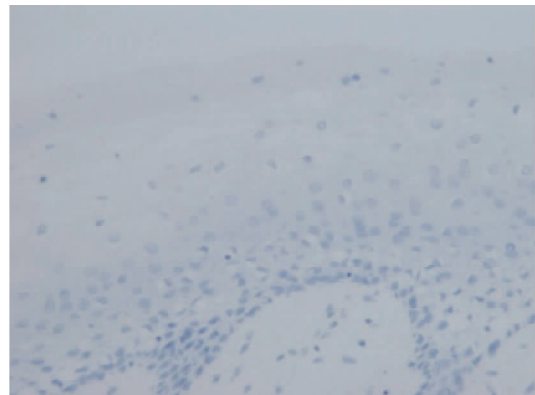


Figure 1 Expression of NOB1 in normal cervical tissue(SP $\times 400$)

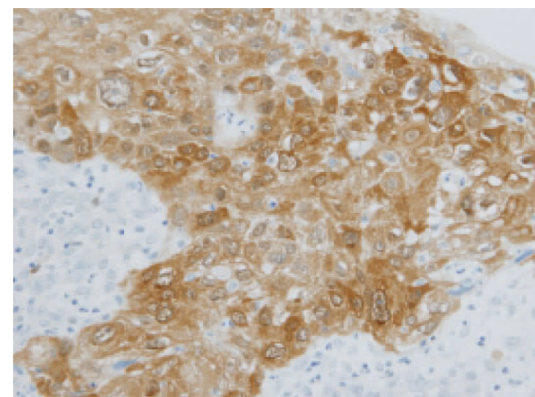


Figure 2 Expression of NOB1 in cervical squamous cell carcinoma tissue(SP $\times 400$)

2.2 NOB1 表达与宫颈癌临床病理因素的关系

免疫组织化学结果显示,NOB1 在宫颈癌中的表达与肿瘤分化及是否淋巴结转移有关($P<0.05$);而与患者年龄、肿瘤直径、临床病理分期及浸润深度无关($P>0.05$)(Table 2)。

2.3 NOB1 表达与宫颈鳞癌患者预后的关系

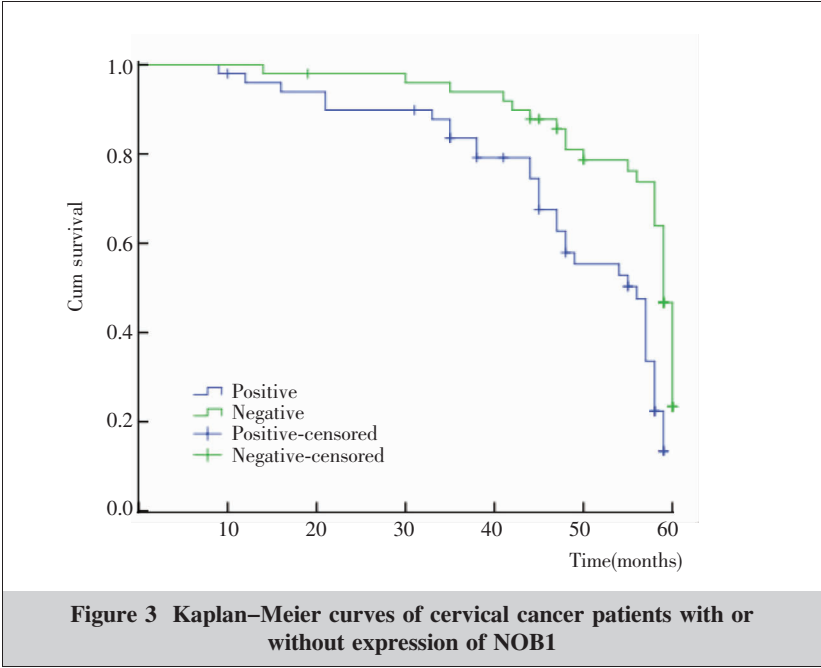
157 例宫颈鳞癌中,NOB1 阳性表达 116 例,平

Table 1 Expression of NOB1 in cervical tissues

Tissues	N	-	+	Positive rate (%)	χ^2	P
Normal cervical tissue	42	40	2	5.0	78.559	<0.001
CIN	54	38	16	29.6		
Cervical cancer tissue	157	41	116	73.8		

Table 2 The relation between expression of NOB1 in cervical cancer tissue and clinicopathologic features

Clinicopathological features	N	-	+	Positive rate (%)	χ^2	P
Age (years)					1.191	0.275
≤50	69	21	48	69.5		
>50	88	20	68	77.2		
FIGO stage					1.588	0.452
I	48	15	33	68.7		
II	51	14	37	72.5		
III	58	12	46	79.3		
Differentiation					3.835	0.001
Well	48	20	28	58.3		
Moderately	56	16	40	71.4		
Poorly	53	5	48	90.5		
Tumor size (cm)					3.044	0.081
<4	89	28	61	68.5		
≥4	68	13	55	80.8		
Lymph node metastasis					5.044	0.025
Yes	81	15	66	81.4		
No	76	26	50	65.7		
Depth of stromal invasion					1.849	0.174
>1/2	87	19	68	78.1		
≤1/2	70	22	48	68.5		



均生存期 48.4 个月,5 年生存率 64%;NOB1 阴性表达 41 例,平均生存期 55.2 个月,5 年生存率 78%。NOB1 阳性表达的生存期及 5 年生存率均低于 NOB1 阴性表达组,经 Log-rank 检验,两者差别具有统计学意义($P<0.01$)(Figure 3)。

3 讨论

NOB1 是酵母基因 (putative Nin one binding protein 1,Nob1p) 的人类同源基因,在核糖体小亚基和 26S 蛋白酶体的生物合成过程中发挥重要作用,而后两者的变化与肿瘤的发生、发展、转移及肿瘤抑制有关^[2]。已有研究发现在慢性宫颈炎、宫颈 CIN 到宫颈鳞癌发展过程中,NOB1 阳性率逐渐升高,差异有统计学意义;且其表达在宫颈癌组织学分级及淋巴结是否转移间的差异有统计学意义;还显示宫颈癌中 HR-HPV 感染与 NOB1 表达呈相关性,揭示 NOB1 过表达可能和 HR-HPV 感染有关,两者协同参与宫颈癌的发生发展过程^[3]。Zhang 等^[2]研究发现人类 NOB1 定位于染色体的 16q22.1, 包含 9 个外显子和 8 个内含子。NOB1(cDNA)全长 1 749bp, 其包含一个开放阅读框;由 33~1 271bp 组成,编码 412 个氨基酸序列的蛋白,分子量为 46kD。在正常人的肝、肺、脾等组织中 NOB1 基因表达量较高,在肾脏、前列腺、卵巢及结肠中处于低表达,在心脏、脑组织、胸腺、胰腺、小肠、睾丸、胎盘、骨骼肌中则无表达。NOB1 与 26S 蛋白酶体的功能、转录及细胞周期的调节有关,与核糖体小亚基和蛋白酶体生物合成有关^[4,5]。其编码的蛋白质

包括一个 PIN 结构域和一个 ZNRD1 结构域, PIN 结构域位于 NOB1 蛋白的氨基酸末端, 与核糖核酸功能相关, Lamanna 等^[6]的研究表明 NOB1 的 PIN 结构域和糖体的装配及蛋白质的合成密切相关。ZNRD1 位于 NOB1 蛋白的 C 末端, 实验证明它有对转录起决定性作用的功能性结构域^[7]。NOB1 对 18S rRNA 的成熟至关重要, 影响到核糖体小亚基的合成。rRNA 合成水平是细胞周期进程的必要条件^[8,9], 因此如果 NOB1 表达异常将导致核糖体不能正确合成, 从而影响细胞生长周期调控^[10,11]。近年来对于 NOB1 在肿瘤方面的研究逐渐增多, Lin 等^[12]证实卵巢癌组织中 NOB1 mRNA 的表达水平明显高于良性肿瘤及正常组织, 并且 NOB1 在卵巢癌组织中的高表达与肿瘤的大小及细胞分化程度相关。贺孝文^[13]证实 NOB1 蛋白在结直肠癌组织中的表达水平明显高于相应的正常组织, 认为其可能作为原癌基因促进了结直肠癌的恶性增殖。

本研究结果显示, NOB1 在宫颈鳞癌及宫颈上皮内瘤变组织中呈高表达, 而在正常宫颈组织呈低表达, 且其表达水平与宫颈鳞癌的肿瘤分化程度、淋巴结转移以及预后 5 年生存率相关, 而与患者年龄、肿瘤直径、临床病理分期及浸润深度无明显相关性, 与卢洪胜等^[3]在宫颈癌中的研究及马丽莉等^[14]在食管鳞癌中的研究结果基本一致, 提示 NOB1 过表达者肿瘤的恶性程度越高, 越容易发生远处转移。据此可以认为 NOB1 在肿瘤的发生及恶性转化过程中其表达水平的上调可能是促进宫颈鳞癌表现侵袭、浸润和转移直至影响预后的重要因素。因此深入研究 NOB1 在宫颈癌中的表达, 将有助于进一步揭示宫颈癌浸润转移的分子机制, 并很可能成为潜在的治疗靶点及预测宫颈癌预后的有价值的分子标志物, 进而对宫颈癌的临床综合治疗方案的选择更有帮助意义。

参考文献:

- [1] Plummer M, Schiffman M, Castle PE, et al. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion[J]. J Infect Dis, 2007, 195(11): 1560-1562.
- [2] Zhang Y, Ni J, Zhou G, et al. Cloning, expression and characterization of the human NOB1 gene[J]. Mol Biol Rep, 2005, 32(3): 185-189.
- [3] Lu HS, Cao XH, Gan MF, et al. The expression of NOB1 in carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia and its relationship with HR-HPV infection[J]. The Journal of Practical Medicine, 2013, 29(12): 1958-1960. [卢洪胜, 曹学会, 甘梅富, 等. 宫颈癌及癌前病变 NOB1 的表达及高危型 HPV 感染的相关性[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(12): 1958-1960.]
- [4] Fatica A, Oeffinger M, Dlakić M, et al. Nob1p is required for cleavage of the 3'-end of 18S rRNA[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(3): 1798-1807.
- [5] Tone Y, Toh EA. Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genes Dev, 2002, 16(24): 3142-3157.
- [6] Lamanna AC, Karbstein K. Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(34): 14259-14264.
- [7] Tubon TC, Tansey WP, Herr W. A nonconserved surface of the TF II recruitment[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(7): 2863-2874.
- [8] Raychaudhuri S, Fontanes V, Barat B, et al. Activation of ribosomal RNA transcription by hepatitis C virus involves upstream binding factor phosphorylation via induction of cyclin D1[J]. Cancer Res, 2009, 69(5): 2057-2064.
- [9] Meraner J, Lechner M, Loidl A, et al. Acetylation of UBF changes during the cell cycle and regulates the interaction of UBF with RNA polymerase I [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(6): 1798-1806.
- [10] Granneman S, Nandineni MR, Baserga SJ. The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(23): 10352-10364.
- [11] Ramos PC, Höckendorff J, Johnson ES, et al. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly[J]. Cell, 1998, 92(4): 489-499.
- [12] Lin Y, Peng S, Yu H, et al. RNAi-mediated downregulation of NOB1 suppresses the growth and colony-formation ability of human ovarian cancer cells[J]. Med Oncol, 2011, 8(2): 2332-2336.
- [13] He XW. Study progress in NOB1 gene[J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2011, 5(8): 2360-2362. [贺孝文. NOB1 基因研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(8): 2360-2362.]
- [14] Ma LL, Wang JS, Li DQ, et al. Expression and clinical significance of NOB1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2011, 20(6): 563-566. [马丽莉, 王金胜, 李代强, 等. NOB1 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 20(6): 563-566.]