

Nm23-H1、CD44v6 在 60 例下咽癌组织中的表达及临床意义

Expression of Nm23-H1 and CD44v6 in 60 Cases with Hypopharyngeal Carcinoma and Its Clinical Significance // QIN Shi-cheng, SONG Zhen, HE Hai-yan, PANG Ling-yun, QIU Jie

秦世成^{1,2}, 宋 镇², 何海燕², 逢凌云², 邱 杰¹

(1. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003;

2. 青岛市中心医院, 青岛大学, 山东 青岛 266042)

摘要: [目的] 分析下咽癌组织中肿瘤抑制基因 nm23-H1 和转移相关基因 CD44v6 的表达情况及其意义。[方法] 60 例下咽癌(其中 30 例有颈部淋巴结转移, 30 例无颈部淋巴结转移)及 30 例癌旁组织纳入分析, 采用免疫组织化学 SP 法检测 nm23-H1 和 CD44v6 的表达情况。[结果] Nm23-H1 在下咽癌组的表达阳性率为 53.33%, 较癌旁组织组(90.00%)明显偏低($P < 0.05$); 有颈部淋巴结转移下咽癌组(40.00%)、无颈部淋巴结转移下咽癌组(66.67%)及癌旁组织各组间 nm23-H1 阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD44v6 在下咽癌组的表达阳性率为 76.67%, 较癌旁组(56.67%)明显高($P < 0.05$); 有颈部淋巴结转移组 CD44v6 阳性率(90.0%)较无转移组(63.33%)明显高($P < 0.05$)。下咽癌组织中 nm23-H1 和 CD44v6 表达呈负相关($P < 0.05$)。[结论] 下咽癌中 nm23-H1 表达下调可促使下咽癌发生、推动肿瘤发展及发生颈部淋巴结转移; CD44v6 表达上调可使肿瘤的发展及转移加速。两者的表达失衡与下咽癌发生颈部淋巴结转移关系密切并且可能起协同作用。因此, 联合检测 nm23-H1 和 CD44v6 对判断下咽癌的颈部淋巴结转移有指导意义。

关键词: nm23-H1 基因; CD44v6 基因; 下咽肿瘤; 免疫组化

中图分类号: R739.9 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2020)10-0922-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.10.B014

下咽部恶性肿瘤占全身恶性肿瘤 0.15%~0.24%, 其中大多数为鳞状细胞癌(占 95%)^[1]。下咽在解剖结构上较复杂, 暴露困难, 且下咽癌早期症状缺乏特异性, 疾病初期容易被忽视, 确诊时多已为中晚期(Ⅲ、Ⅳ), 预后不良^[2]。

Nm23-H1 是抑癌基因的一种, CD44v6 被认为是一种“促癌转移基因”。目前在全身多个系统的多种肿瘤组织中对于 nm23-H1 和 CD44 v6 的研究已经取得了一定的研究结果。本研究检测下咽癌组织中 nm23-H1 和 CD44v6 的表达情况, 分析其意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本研究标本为回顾性分析青岛大学附属医院 2014—2016 年下咽癌手术患者资料, 随机选出符合

通信作者: 邱杰, 副主任医师, 硕士研究生导师, 博士; 青岛大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 山东省青岛市市南区江苏路 16 号(266003); E-mail: wfqpeter2000@163.com

收稿日期: 2020-03-05; 修回日期: 2020-06-15

纳入标准的术后石蜡标本共 60 例, 均为鳞状细胞癌。患者于术前均进行了细致深入的全面评估, 未发现远处转移, 且术前均未接受放疗、化疗及其他治疗, 随访期限 3 年, 期间失访 1 例。分 2 组进行研究: ①下咽鳞状细胞癌组 60 例, 所有患者颈部淋巴结转移情况均经手术及术后病理证实。进一步将病例分成 2 组: 有颈部淋巴结转移组 30 例, 无颈部淋巴结转移组 30 例。②癌旁组织 30 例作为对照组, 标本为切除下咽癌肿瘤时切取的距肿瘤边缘 2cm 以上、病理证实为无癌细胞的癌旁下咽黏膜组织。

1.2 主要试剂及方法

采用 4% 中性缓冲福尔马林固定所有标本, 石蜡包埋, 4 μ m 间距连续切片, 采用免疫组织化学 SP 法分别予以染色, DAB 显色。鼠抗人 nm23-H1 单克隆抗体及 CD44v6 单克隆抗体购自丹麦 DAKO 公司, SP 试剂盒为武汉珈源生物有限公司产品。

1.3 结果判定

两位主任医师职称病理科医师在双盲下对切片标本进行阅片并记录结果。高倍显微镜下(10 $\times$ 40)

观察 nm23-H1 和 CD44v6 蛋白染色情况;nm23-H1 于细胞质内观察到染色阳性信号 (Figure 1),CD44v6 主要于细胞膜显色,也可于少量细胞质中观察到棕黄色细颗粒样物 (Figure 2)。随机选取 50 个高倍 (10×40 倍) 视野观测、计数阳染肿瘤细胞数并计算其比值,取其平均值评判、记录每张免疫组化切片。按阳性细胞比例分为阴性(-):无阳性细胞;弱阳性(+):阳性细胞数<25%;中等阳性(++):阳性细胞数为 25%~50%;强阳性 (+++):阳性细胞数≥50%。最终(+)以上为阳性表达,余为阴性表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 25.0 统计软件对数据行统计分析,计数资料应用 χ^2 检验,应用 Spearman 等级相关分析进行相关性测算, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nm23-H1 和 CD44v6 蛋白在下咽癌中的表达

Nm23-H1 在癌旁组织中的阳性表达率(90.00%)较下咽癌组(53.33%)高,差异有统计学意义($\chi^2=11.908$, $P<0.001$)。下咽癌中,有颈部淋巴结转移者 nm23-H1 阳性率较无颈部淋巴结转移者低 (40.00% vs 66.67%, $\chi^2=4.286$, $P=0.035$),有颈部淋巴结转移者阳性率低于癌旁组 (40.00% vs 90.00%, $\chi^2=16.484$, $P<0.001$),无颈部淋巴结转移者阳性率低于癌旁组 (66.67% vs 90.00%, $\chi^2=4.812$, $P=0.029$) (Figure 1, Table 1)。

CD44v6 在下咽癌组组织中的阳性表达率 (76.67%) 较癌旁组织 (56.67%) 明显偏高 ($\chi^2=3.810$, $P=0.045$)。有淋巴结转移组、无淋巴结转移组阳性率分别为 90.00%、63.33%。差异有统计学意义 ($\chi^2=5.963$, $P=0.015$),有淋巴结转移组与癌旁组比较差异有统

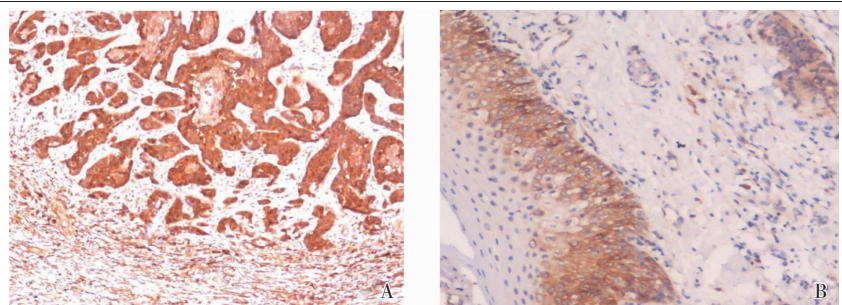


Figure 1 Expression of nm23-H1 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (A) and paracancerous tissue (B) (10×40)

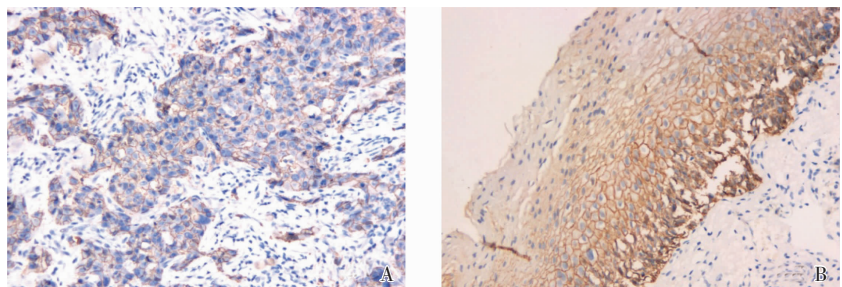


Figure 2 Expression of CD44v6 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (A) and paracancerous tissue (B) (10×40)

Table 1 Positive expression rate of nm23-H1 and CD44v6 protein (cases, %)

Group	Lymph node metastasis	n	Positive expression of nm23-H1		Positive expression of CD44v6	
			Positive (%)	P	Positive (%)	P
Hypopharyngeal carcinoma tissue	Positive	30	12 (40.00)	<0.001	27 (90.00)	0.045
	Negative	30	20 (66.67)		19 (63.33)	
Paracancerous tissue	-	30	27 (90.00)		17 (56.67)	

计学意义 ($\chi^2=8.523$, $P=0.004$),无淋巴结转移组与癌旁组比较差异无统计学意义 ($\chi^2=0.278$, $P=0.396$) (Figure 2, Table 1)。

2.2 Nm23-H1 和 CD44v6 表达与下咽鳞状细胞癌临床病理特征的关系

Nm23-H1 表达与下咽鳞状细胞癌淋巴结转移、临床分期相关 ($P<0.05$);CD44v6 表达与淋巴结转移、临床分期、病理分级相关 ($P<0.05$);nm23-H1 表达与病理分级和年龄无关,CD44v6 表达与年龄无关 (Table 2)。

2.3 下咽鳞状细胞癌中 nm23-H1 和 CD44v6 表达相关性分析

Spearman 等级相关分析显示,下咽鳞状细胞癌组织中 nm23-H1 和 CD44v6 蛋白表达呈负相关 ($r=-0.279$, $P=0.031$) (Table 3)。

Table 2 Relationship between nm23-H1 and CD44v6 protein expression and clinicopathological characteristics

Clinicopathological factors	n	Positive expression of nm23-H1		Positive expression of CD44v6	
		Positive(%)	P	Positive(%)	P
Age (years)					
<60	29	14(48.27)	0.792	24(82.76)	0.897
≥60	31	18(58.06)		22(70.97)	
Lymph node metastasis					
Negative	30	20(66.67)	0.039	19(63.33)	0.014
Positive	30	12(40.00)		27(90.00)	
Clinical stages					
I + II	25	18(72.00)	0.014	15(60.00)	0.009
III + IV	35	14(40.00)		31(88.57)	
Pathological grade					
High and medium differentiation	48	23(47.92)	0.096	40(83.33)	0.014
Low differentiation	12	9(75.00)		6(50.00)	

Table 3 Correlation of nm23-H1 and CD44v6 protein expression in hypopharyngeal carcinoma

Expression of nm23-H1	Expression of CD44v6		Total
	Negative	Positive	
Negative	3	25	28
Positive	11	21	32
Total	14	46	60

3 讨 论

下咽癌在耳鼻咽喉头颈外科中较少见、但发病呈逐步上升且年轻化的恶性肿瘤,由于其解剖部位相对隐匿、早期症状不明显,常常在已发生局部或远处转移时才引起重视,造成诊断困难,漏诊误诊率高,确诊时已发展到中晚期,错失最佳治疗时机,是预后较差的恶性肿瘤之一^[3]。寻找新的诊断方式、方法及合理有效的治疗方案具有重要临床意义。

Nm23 是一种抑癌基因,至少可分成 10 个亚型,其中 H1 亚型与 nm23 基因的肿瘤抑制功能密切相关,其指导编码产生一种核苷二磷酸激酶(NDPK)^[4],NDPK 生物学功能复杂多样,参与催化多种反应,其发挥抑制肿瘤作用的途径和节点主要有 2 个:(1)介入跨膜信息传递过程,该过程由 G 蛋白调控,NDPK 通过对 GTP 合成的调控影响 G 蛋白,从而阻断肿瘤生长信号的传导,起到阻止癌基因转化及细胞分化的作用;(2)通过介入催化核苷三磷酸与核苷二磷酸的可逆转化,影响肿瘤细胞微管蛋白的聚合与解聚,

致使细胞构架形态发生变化,从而让肿瘤细胞的移动性遭到遏制并下降^[5]。果蝇研究表明,nm23-H1 的果蝇对应物 AWD,通过与 Shibire/Dynamin 合作调节迁移细胞表面趋化受体的内吞作用,是细胞运动的负调节因子;n timer23-H1 通过磷酸化丝裂原活化激酶(MAPK)支架抑制肿瘤细胞的增殖,MAPK 支架是 Ras(KSR)的激酶抑制因子,导致 MAPK 信号的抑制。nm23-H1 和 NDK-1 都促进细胞凋亡,NDK-1、nm23-H1 和它们的小鼠对应物 nm23-M1 显示出以进化保守的方式促进吞噬作用。总之,抑制细胞迁移和增殖,以及凋亡和吞噬作用都是 nm23-H1 抑制转移进展的机制^[6]。目前已有研究表明,人体许多系统的恶性肿瘤与 nm23-H1 基因发生异常变化有关,包括乳腺癌^[7-8]、胃癌^[7]、肝癌^[7,9]、鼻咽癌^[7,10]、黑色素瘤^[7,11]等。这些研究中大多数的观点认为:n timer23-H1 基因的异常表达,与许多癌症的不良预后有关;n timer23-H1 在癌组织中的表达可能是评估淋巴结转移的一个重要因素^[7];与肿瘤的发生、分化、发展及转移呈负相关。

本研究结果表明:n timer23-H1 在下咽癌中低表达,且肿瘤颈淋巴结转移倾向性更强,生物学行为表现的更为恶劣。

CD44 基因是一种存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,分布广泛,主要在细胞间质之间特异性粘连过程中参与介入并发挥作用,又被称为 Hermes 抗原。1980 年由 Dalchau 等^[12]最先用单克隆抗体技术检测并发现了人类 CD44 基因,人类 CD44 基因全长约 50kb,位于 11 号染色体短臂,可分为两大类,其中 CD44s 存在于正常细胞中,肿瘤组织中存在的是 CD44v。CD44v 作为一种黏附分子,以不同的分子表达形式出现在许多恶性肿瘤组织中。CD44v6 被认定是一种推动肿瘤转移的相关基因,CD44v6 的表达增高可能将肿瘤细胞伪装成似淋巴细胞的正常细胞,有效躲过人体免疫系统的识别,从而免遭杀伤清除,使肿瘤细胞更加容易通过血液和淋巴系统发生远处转移及淋巴结转移,已被证实在肺癌、胃癌、胰腺癌、食管癌和甲状腺癌等人体许多系统的恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移过程中具有正向推进作用^[13,14],因此被划入促癌基因序列。

本研究结果显示,CD44v6 阳性率在下咽鳞状细

胞癌组织中高于癌旁组织,但是无颈部淋巴结转移组与癌旁组织间的差异无统计学意义,出现这种情况可能与CD44v6在有颈部淋巴结转移组的超表达拉高了其在整个下咽癌组表达的阳性率有关,因此尚不能推断CD44v6参与了肿瘤的发生过程,它的高表达是否可引起细胞畸变并促进肿瘤的发生还需要进一步研究。CD44v6在下咽癌组有、无颈部淋巴结组间差异有统计学意义;结合相关性分析结果,提示CD44v6在下咽癌的进展过程中具有推动和促进肿瘤进展、更早发生转移的恶性效应。

本研究结果显示,CD44v6阳性表达伴nm23-H1阴性表达者颈部淋巴结转移率明显高于CD44v6阴性表达伴nm23-H1阳性表达者,前者的临床分期及预后更差,说明CD44v6阳性表达伴nm23-H1阴性表达者颈部淋巴结转移发生的时间更早、可能性更大、疾病表现更为恶劣。因此我们判定nm23-H1和CD44v6的表达异常,在下咽癌发生颈部淋巴结转移过程中起重要作用,对其进行联合检测对于判断淋巴结转移有指导意义。

综上所述,nm23-H1的抑制肿瘤作用贯穿于下咽癌发生、发展、分化及转移的整个过程中,其低表达既可触发细胞畸变导致促进肿瘤的发生,又可视作推动加速肿瘤的进展及转移的动力因素之一。虽然CD44v6在肿瘤发生过程中是否发挥作用不能断定,但它的高表达可加速肿瘤的发展及转移。Nm23-H1和CD44v6在下咽鳞状细胞癌组织中的表达呈负相关。因此,联合检测nm23-H1和CD44v6对判断下咽癌的颈部淋巴结转移有指导意义。

参考文献:

- [1] Subspecialty Group of Head and Neck Surgery, Editorial Board of Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery; Subspecialty Group of Head and Neck Surgery, Society of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Chinese Medical Association. Expert consensus on surgery and comprehensive treatment of hypopharyngeal carcinoma[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2017, 52(1): 16-24. [中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会头颈外科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会头颈外科学组. 下咽癌外科手术及综合治疗专家共识 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 52(1): 16-24.]
- [2] Mura F, Bertino G, Occhini A, et al. Surgical treatment of hypopharyngeal cancer: a review of the literature and proposal for a decisional flow-chart [J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2013, 33(5): 299-306.
- [3] Cao YJ, Zhou L, Wu HT, et al. Clinical characteristics and efficacy analysis of 386 cases of hypopharyngeal cancer[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2016, 51(6): 433-439. [曹轶俊, 周梁, 吴海涛, 等. 下咽癌 386 例临床特征及疗效分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 51(6): 433-439.]
- [4] Khan MH, Yasuda M, Higashino F, et al. nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression [J]. Am J Pathol, 2001, 158: 1785-1791.
- [5] Tang ZF, Li CM. Research progress on the relationship between nm23 recombinant plasmid and tumor [J]. Chinese Journal of Practical Diagnosis and Treatment, 2016, 30(1): 12-14. [唐泽飞, 李春鸣. nm23 重组质粒与肿瘤关系研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(1): 12-14.]
- [6] Mátyási B, Farkas Z, Kopper L, et al. The function of NM23-H1/NME1 and its homologs in major processes linked to metastasis[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(1): 49-61.
- [7] Liu L, Li M, Zhang C, et al. Prognostic value and clinicopathologic significance of nm23 in various cancers: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Surg, 2018, 60: 257-265.
- [8] Ning DB, Qi HH, Zhao YZ. Expression and clinical significance of VEGF and nm23 in breast cancer and breast cancer recurrence [J]. China Maternal and Child Health Care, 2014, 29 (30): 4983-4985. [宁殿宾, 祁红辉, 赵玉哲. 乳腺癌与乳腺癌复发患者 VEGF 及 Nm23 的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(30): 4983-4985.]
- [9] Lee MJ, Xu DY, Li H, et al. Pro-oncogenic potential of NM23-H2 in hepatocellular carcinoma [J]. Exp Mol Med, 2012, 44(3): 214-224.
- [10] Zhang JP, Fan JP, Deng Y, et al. Expression and clinical significance of Ki67 and nm23 proteins in nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngo, 2015, 15(1): 20-24. [张继屏, 范静平, 邓月, 等. Ki67 和 nm23 蛋白在鼻咽癌中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻喉科杂志, 2015, 15(1): 20-24.]
- [11] Li ZH, He XL, Liu Y, et al. Adenovirus mediated nm 23-H1 to human malignant black Study on the inhibition of melanoma a 375 in vitro [J]. Foreign Medicine, 2011, 32(6): 273-276, 286. [李宗河, 何学令, 刘艳, 等. 腺病毒介导的 nm23-H1 对人恶性黑色素瘤 A375 体外抑制作用的研究[J]. 国外医药(抗生素分册), 2011, 32(6): 273-278, 286.]
- [12] Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW. Monoclonal antibody to a human brain- granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W3/13 antigen of the rat [J]. Eur J Immunol, 1980, 10(10): 741-749.
- [13] Kodama H, Murata S, Ishida M, et al. Prognostic impact of CD44- positive cancer stem- like cells at the invasive front of gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2017, 116(2): 186-194.
- [14] Wu G, Zhou Y, Li T, et al. Immunohistochemical levels of matrix metalloproteinase-2 and CD44 variant 6 protein in the diagnosis and lateral cervical lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma[J]. J Int Med Res, 2013, 41 (3): 816-824.