

· 基础研究 ·

## Notch1 在喉癌组织中的表达及意义

徐成志<sup>1,2</sup>, 董 频<sup>2</sup>, 王珮华<sup>1</sup>, 阎小军<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 耳鼻咽喉科, 上海 200011; 2. 上海交通大学附属第一人民医院 耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200080)

**摘要:** **目的** 探讨喉癌组织中 Notch1 蛋白的表达及与患者临床病理资料的关系和对预后的影响。**方法** 采用免疫组化 Envision 二步法检测 62 例喉癌标本中 Notch1 的表达, 同时选取 15 例不典型增生、10 例声带白斑、10 例声带息肉标本作对照, 结合患者临床病理资料分别进行分析。**结果** 62 例喉癌组织中 Notch1 蛋白高表达率 61.3% (38/62), 低表达 38.7% (24/62), 其高表达率与不典型增生、声带白斑及声带息肉相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), Notch1 高表达与 T 分级、临床分期及病理分级显著相关 ( $P < 0.05$ )。单因素分析 Notch1 高表达组总生存率较低表达组高 ( $P < 0.05$ ), 无瘤生存率两组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 多因素分析复发、临床分期及 Notch1 表达情况对生存率影响较大, 复发、高分期患者和 Notch1 低表达组生存期短。**结论** Notch1 在喉癌发生、发展中起重要作用, 在评估喉癌预后方面有一定价值。

**关键词:** 喉鳞状细胞癌; Notch1 受体; 免疫组织化学; 生存分析

**中图分类号:** R739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2011)06-0401-05

## The expression of Notch1 in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance

XU Cheng-zhi, Dong Pin, WANG Pei-hua, et al.

(Department of Otolaryngology, Affiliated Ninth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of Notch1 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC), while determine the relationship with clinicopathologic characteristics and prognosis. **Methods** Expression of Notch1 in 62 specimens of laryngeal squamous cell carcinoma and 35 control tissues (15 cases of atypical hyperplasia, 10 cases of leukoplakia of vocal cord and 10 cases of polyp of vocal cord) was examined by immunohistochemical staining (Envision DAKO). The relationship between the expression of Notch1 and the clinicopathological features in LSCC was analysed. **Results** Over-expression of Notch1 was detected in 38 specimens (61.3%), the rate of over-expressions in LSCC was significantly higher than that in atypical hyperplasia, leukoplakia and polyp of vocal cord ( $P < 0.01$ ). Over-expression of Notch1 was significantly correlated with T stage, clinical stage and pathological classification ( $P < 0.05$ ). With univariate analysis, over-expression of Notch1 was significantly associated with a better overall survival ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in disease-free survival ( $P > 0.05$ ). With multivariate analysis, recurrence, advanced stage and low expression of Notch1 were unfavorable prognostic factors. **Conclusion** The expression of

基金项目: 上海交通大学医学院附属第九人民医院院级基金(2009A01)。

作者简介: 徐成志, 男, 博士研究生。

通讯作者: 王珮华, Email: wangpeihua@yahoo.cn.

Notch1 plays an important role in the process of tumorigenesis and development of LSCC, and has potential value in prognostic evaluation.

**Key words:** Laryngeal neoplasms cancer; Receptor, Notch 1; Immunohistochemistry; Survival analysis

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一,其发病率在数十年来也呈不断上升的趋势,尽管其治疗方式及治疗模式也有所改善,但晚期肿瘤的 5 年生存期仍然在 50% 左右<sup>[1]</sup>,因此需要寻找更为有效的治疗靶点,以期改善喉癌的预后。Notch 信号通路在细胞分化、凋亡及肿瘤的发生、发展中具有重要的作用<sup>[2]</sup>。本研究运用免疫组化的方法,检测喉癌组织中 Notch1 蛋白的表达,探讨 Notch1 的表达对喉癌临床病理特点及预后的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对 象

62 例喉癌组织标本取自上海交通大学附属第一人民医院耳鼻咽喉科 1997 年 1 月 ~ 2007 年 4 月手术病例,其中男 59 例,女 3 例;年龄 41 ~ 84 岁,中位年龄 62.6 岁。病理诊断均为鳞状细胞癌,其中高分化 45 例,中分化 17 例。按 AJCC/UICC 2002 年标准分期:声门上型 16 例,声门型 46 例;T1N0M0 16 例,T2N0M0 30 例,T2N1M0 1 例,T3N0M0 6 例,T3N1M0 1 例,T3N2bM0 1 例,T4aN0M0 7 例;I 期 16 例,II 期 30 例,III 期 8 例,IV 期 8 例。全部病例术前均未接受放、化疗,入院后行单纯手术治疗或手术加综合治疗,术后定期以电话、信访、上海市疾病控制中心协助查询等方法进行随访,资料完整。另外选取不典型增生病例标本 15 例(轻中度 11 例,重度 4 例),声带白斑 10 例,声带息肉标本 10 例作对照组。

研究所需临床和病理资料包括年龄,性别,吸烟情况(吸烟指数 = 日平均吸烟支数 × 吸烟年数),是否嗜酒(纳入标准为平均每日酒精摄入 40 g 以上,饮酒年数 5 年以上),原发部位、T 分级、有无淋巴转移、临床分期,有无复发,手术切缘,组织学分级,治疗模式。

### 1.2 实验方 法

采用免疫组化 Envision 二步法染色,鼠抗人 Notch1 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司(工作浓度按 1:100 稀释),通用型二抗购于上海长岛生物技术有限公司。操作步骤均按照说明书进行,以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。

### 1.3 结果判 定

结果由 1 名病理科医师与实验者双盲读片,如有异议复读讨论一致后确定。

Notch1 结果判定参照 Panelos 等<sup>[3]</sup>的方法,以细胞膜或细胞浆内呈现棕黄色颗粒为阳性,综合染色强度和阳性细胞占总细胞数的百分比进行半定量处理,其标准,0 分:阴性染色;1 分:1% ~ 20% 的阳性细胞;2 分:21% ~ 60% 阳性细胞;3 分:> 60% 阳性细胞。染色强度按照弱、中、强分别计 1、2、3 分,最终评分按照两者乘积计算。其中:0 ~ 3 为低表达,≥ 4 分为高表达。

### 1.4 统计分 析

数据使用 SPSS 18.0 版进行统计分析,Notch1 在喉癌中表达差异比较用卡方检验或 Fisher's 确切概率法计算,生存率以 Kaplan-Meier 法计算,单因素分析用 Log-rank 检验,多因素分析用 Cox 回归。

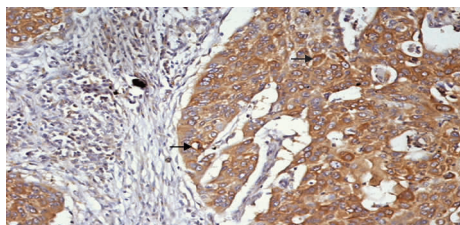
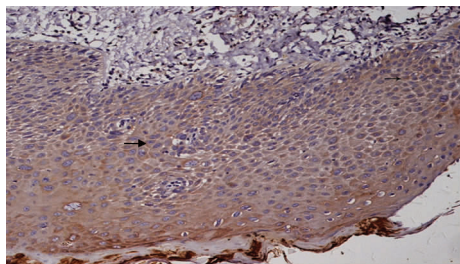
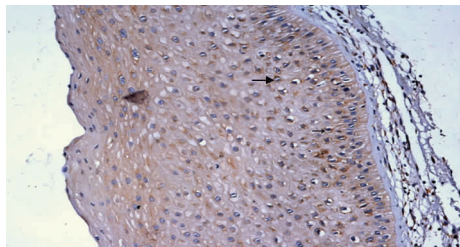
## 2 结 果

### 2.1 Notch1 在喉癌组织、不典型增生、声带白斑及声带息肉中的表达

Notch1 蛋白在喉癌组织中的高表达为 61.3% (38/62),低表达为 38.1% (24/62);在不典型增生中高表达为 13.3% (2/15),声带白斑中高表达为 10.0% (1/10),声带息肉中无高表达。喉癌与各对照组间高表达比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而对照组组间差异比较无统计学意义( $P > 0.05$ )(表 1,图 1 ~ 3)。

表1 Notch1 蛋白在喉癌和对照组间的表达

	例数	Notch1 表达	
		高	低
喉鳞癌	62	38	24
不典型增生	15	2	13
声带白斑	10	1	9
声带息肉	10	0	10

注:喉癌组与各对照组间高表达( $P < 0.05$ )图1 Notch1 蛋白在喉癌中的高表达(Envision 染色,  $\times 200$ )图2 Notch1 蛋白在不典型增生中的低表达(Envision 染色,  $\times 200$ )图3 Notch1 蛋白在声带白斑中的低表达(Envision 染色,  $\times 200$ )

T1、T2 级与 T3、T3 级比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );I、II 期与 III、IV 期比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。组织学高分化组较中分化组表达率高,组间比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )(表2)。

表2 Notch1 表达与喉癌临床病理指标的关系

临床病理资料	例数	Notch1		$\chi^2$ 值	P 值
		高	低		
年龄					
<65 岁	33	12(36.4)	21(63.6)	0.164	0.686
$\geq 65$ 岁	29	12(27.6)	17(71.4)		
性别 <sup>a</sup>					
男	59	22(37.3)	37(62.7)	-	0.554
女	3	2(66.7)	1(33.3)		
吸烟指数					
$\leq 100$	17	7(41.2)	10(58.8)	0.060	0.806
>100	45	17(37.8)	28(62.2)		
嗜酒					
无	43	14(32.6)	29(67.4)	2.238	0.135
有	19	10(52.6)	9(47.4)		
原发部位					
声门	46	15(32.6)	31(67.4)	2.797	0.094
声门上	16	9(56.3)	7(43.8)		
T 分级					
T1 ~ T2 级	47	14(29.8)	33(70.2)	6.519	0.011*
T3 ~ T4 级	15	10(66.7)	5(33.3)		
临床分期					
I ~ II 期	46	14(30.4)	32(69.6)	5.144	0.023*
III ~ IV 期	16	10(62.5)	6(37.5)		
淋巴结转移 <sup>a</sup>					
无	59	23(39.0)	36(61.0)	-	1.000
有	3	1(33.3)	2(66.7)		
组织学分级					
高分化	45	22(48.9)	23(51.1)	7.168	0.007*
中分化	17	2(11.8)	15(88.2)		

注:<sup>a</sup>表示 Fisher's 确切概率法计算,其余采用卡方检验;\* $P < 0.05$ 

## 2.2 Notch1 和喉癌临床病理特点的关系

Notch1 与患者的年龄、性别、吸烟、嗜酒原发部位及有无淋巴结转移比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 T 分级、临床分期及组织学分级有关,Notch1 在 T 分级中 T1、T2 级和临床分期中 I、II 期中表达率高,且

## 2.3 Notch1 对喉癌预后的影响

2.3.1 62 例喉癌患者生存情况 62 例患者失访 2 例(1 例术后 16 个月,1 例术后 68 个月),生存期按最终随访日期计。死亡 14 例,其中局部复发 6 例,颈部转移 2 例,远处转移 2 例,心肌梗死 1 例,意外窒息

1 例,原因不详 2 例。Kaplan - Meier 法统计 3 年累积生存率 82.3%,5 年累积生存率 74.2%;3 年累积无瘤生存率 74.2%,5 年累积无瘤生存率 63.8%。

### 2.3.2 Notch1 表达对喉鳞癌预后的影响

Notch1 在喉癌高低表达组间 3 年总体生存率分别为 87.8% 与 71.4%,两组总体生存率分布间的差异比较具有统计学意义 ( $\chi^2 = 6.732, P < 0.01$ ),高低表达组间 3 年无瘤生存率分别为 78.2% 与 67.1%,Log-rank 检验两组无瘤生存率分布间的比较差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1.920, P > 0.05$ ),生存曲线见图 4,5。

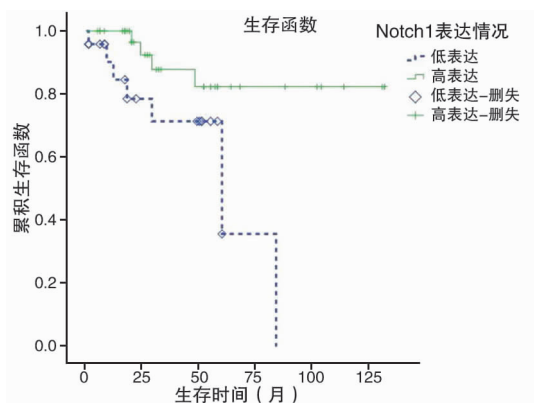


图 4 Notch1 高低表达组总体生存率比较

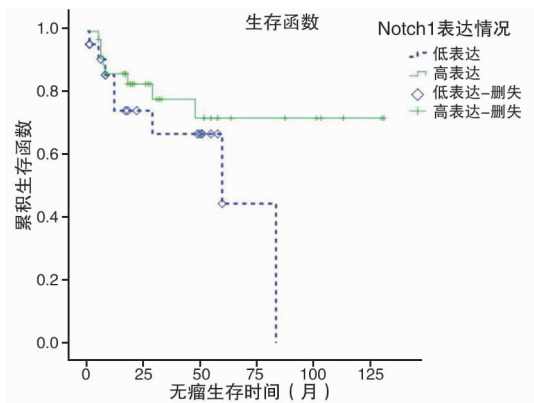


图 5 Notch1 高低表达组无瘤生存率比较

### 2.3.3 Notch1 表达在多因素分析中对喉癌预后的影响

以患者 Notch1 蛋白表达、年龄、性别、吸烟、饮酒、原发部位、T 分级、淋巴结转移、临床分期、复发情况、手术切缘、组织学分级和治疗模式 13 个因素作为

协变量进行 Cox 回归分析,结果复发情况、临床分期及 Notch1 蛋白表达高低对喉癌患者预后的影响具有统计学意义(表 3)。诸多因素中复发情况、临床分期及 Notch1 蛋白表达是影响本组喉癌病例生存率较大的危险因素,复发患者、晚期患者及 Notch1 低表达患者生存期短。

表 3 影响预后相关因素的 Cox 回归分析

协变量	回归系数	标准误	Wald 统计量	显著性水平	相对危险度
复发情况	1.680	0.624	7.255	0.007	5.364
临床分期	1.626	0.737	4.871	0.027	5.084
Notch1	-1.327	0.642	4.273	0.039	0.265

## 3 讨论

Notch 基因发现于 1919 年,其信号通路及家族成员在许多物种中高度保守,并对细胞增殖、分化、凋亡等多种细胞功能起重要作用。目前已有 4 种 Notch 受体 (Notch1 ~ 4) 以及 5 种配体 (Delta1, 3, 4; Jagged1, 2) 在哺乳动物中证实参与其功能<sup>[4]</sup>。Notch1 是 Notch 信号通路中重要的跨膜蛋白,其与 Notch 配体结合后活化,在  $\gamma$ -分泌酶/早老素作用下裂解释放 Notch 胞内段 (NICD),在核内与 DNA 结合转录因子 CLS 协同活化碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 转录因子 Hes1,继而调节下游靶向基因<sup>[5]</sup>。

近年来的研究表明,Notch 信号通路在不同器官的多种细胞类型中对细胞的增殖分化发挥着重要作用,可能诱发包括恶性肿瘤在内的多种疾病。根据肿瘤部位、细胞类型的不同,Notch 信号通路的活化可以表现出不同的功能,在一些实体瘤如宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、头颈部肿瘤、骨肉瘤、胶质瘤等表现为癌基因作用<sup>[6]</sup>;而在另一些肿瘤中又被证实有抑癌作用<sup>[2,7-8]</sup>,这可能与 Notch 信号通路参与多通路、多步骤调节的共享机制有关。在本研究中,笔者检测喉癌中 Notch1 跨膜蛋白相比较不典型增生、声带白斑、声带息肉高表达率差异具有统计学意义,提示 Notch1 在参与喉癌的发生机制中很可能具有重要作用。

Jiao 等<sup>[9]</sup>通过体外喉癌细胞培养并构建 Notch1 载体转染进行对比研究证实在喉癌中,Notch1 信号通路的活化对喉癌细胞的增殖有抑制作用,并能使细胞周期停滞在 G0/G1 期以及诱导细胞凋亡;而类似的发现在舌癌、肾癌、皮肤癌等不同部位肿瘤中也得到了相应验证<sup>[7-8,10]</sup>。笔者研究提示 Notch1 表达高低与喉癌 T 分级、临床分期及病理学分级相关,其高低组间比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),这说明 Notch1 不仅跟喉癌的发生有关,而且在其不同的发展阶段呈现不同的功能作用,浸润范围广、发展晚期的肿瘤 Notch1 表达相应降低,提示 Notch1 在喉癌的发展过程中可能具有抑制肿瘤增殖的能力。本研究结果显示中分化组较高分化组中 Notch1 高表达率更高,提示 Notch1 可能对喉癌的分化有一定抑制作用,但由于缺乏低分化组的对照,其功能还有待进一步探索。

许多研究显示 Notch1 过表达揭示预后不佳<sup>[11-12]</sup>,Joo 等<sup>[13]</sup>通过免疫组化的方法发现 Notch1 在舌癌中表达情况与淋巴结转移情况呈正相关;而 Shi 等<sup>[14]</sup>通过对乳头状膀胱癌的研究发现 Notch1 低表达者无瘤生存期更短。本研究的结果表明 Notch1 低表达组预后不佳,在多因素分析中与临床分期、肿瘤复发情况同为影响预后的重要因素,这可能与 Notch1 密切参与喉癌发展过程并与其抑制肿瘤细胞过度增殖有关。

综上所述,Notch1 在喉癌中的表达情况与其发生、发展有重要关系,并与肿瘤临床分期、复发情况有协同判断预后的价值。近期也有研究利用  $\gamma$ -分泌酶抑制剂成功抑制 Notch 信号通路对肿瘤发展进行干预<sup>[2]</sup>,这都揭示 Notch 信号通路在喉癌中作用值得我们进一步研究,并为 Notch1 成为喉癌治疗的新靶点提供了应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(19): 1945 - 1952.
- [2] Lefort K, Mandinova A, Ostano P, et al. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(5): 562 - 577.
- [3] Panelos J, Tarantini F, Paglierani M, et al. Photoexposure discriminates Notch 1 expression in human cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(3): 316 - 325.
- [4] Yabe Y, Matsumoto T, Tsurumoto T, et al. Immunohistological localization of Notch receptors and their ligands Delta and Jagged in synovial tissues of rheumatoid arthritis [J]. *J Orthop Sci*, 2005, 10(6): 589 - 594.
- [5] Levitan D, Lee J, Song L, et al. PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(21): 12186 - 12190.
- [6] Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(8): 905 - 918.
- [7] Sun S, Du R, Gao J, et al. Expression and clinical significance of Notch receptors in human renal cell carcinoma [J]. *Pathology*, 2009, 41(4): 335 - 341.
- [8] Mazur PK, Grüner BM, Nakhai H, et al. Identification of epidermal Pdx1 expression discloses different roles of Notch1 and Notch2 in murine Kras (G12D)-induced skin carcinogenesis in vivo [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): 13578.
- [9] Jiao J, Qin Z, Li S, et al. Potential role of Notch1 signaling pathway in laryngeal squamous cell carcinoma cell line Hep-2 involving proliferation inhibition, cell cycle arrest, cell apoptosis, and cell migration [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(4): 815 - 823.
- [10] Duan L, Yao J, Wu X, et al. Growth suppression induced by Notch1 activation involves Wnt-beta-catenin down-regulation in human tongue carcinoma cells [J]. *Biol Cell*, 2006, 98(8): 479 - 490.
- [11] Lin JT, Chen MK, Yeh KT, et al. Association of high levels of Jagged-1 and Notch-1 expression with poor prognosis in head and neck cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(11): 2976 - 2983.
- [12] Li J, Cui Y, Gao G, et al. Notch1 is an independent prognostic factor for patients with glioma [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(8): 813 - 817.
- [13] Joo YH, Jung CK, Kim MS, et al. Relationship between vascular endothelial growth factor and Notch1 expression and lymphatic metastasis in tongue cancer [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009, 140(4): 512 - 518.
- [14] Shi TP, Xu H, Wei JF, et al. Association of low expression of notch-1 and jagged-1 in human papillary bladder cancer and shorter survival [J]. *J Urol*, 2008, 180(1): 361 - 366.

(修回日期:2011-10-09)