

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201503008

· 论 著 ·

微囊蛋白-1 在鼻腔鼻窦鳞状细胞癌中的表达及意义

温艳玲,李永团,金 铮,辛 露,王宁宁

(青岛大学医学院附属青岛市市立医院 耳鼻咽喉科,山东 青岛 266011)

摘 要: **目的** 分析微囊蛋白-1(caveolin-1,CAV-1)在鼻腔鼻窦鳞状细胞癌中的表达,探讨其与鼻腔鼻窦鳞状细胞癌的临床病理因素的相关性。**方法** 分别采用免疫组织化学方法及原位杂交技术检测 62 例鼻腔鼻窦鳞状细胞癌与 20 例鼻腔内翻性乳头状瘤及 15 例正常下鼻甲黏膜组织中 CAV-1 mRNA 及蛋白的表达情况,分析 CAV-1 与鼻腔鼻窦鳞状细胞癌患者临床病理参数的关系。**结果** CAV-1 mRNA 与蛋白在正常下鼻甲黏膜、鼻内翻性乳头状瘤及鼻腔鼻窦鳞状细胞癌组织中的阳性率分别为 86.7%、60.0%、32.3% 和 80.0%、55.0%、29.0%。CAV-1 mRNA 和蛋白与病理分级、临床分期相关($P<0.05$),与性别、年龄无关($P>0.05$)。CAV-1 mRNA 与蛋白表达呈正相关($r_s=0.53,P<0.05$)。**结论** CAV-1 mRNA 和蛋白在鼻腔鼻窦鳞状细胞癌中阳性表达率逐渐降低,提示 CAV-1 可能参与了鼻腔鼻窦鳞状细胞癌的发生及发展过程。

关 键 词:微囊蛋白-1;鼻腔;鼻窦;鳞状细胞癌;免疫组织化学;原位杂交
中图分类号:Q786;R739.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-1520(2015)03-0203-05

Expression and its significance of caveolin-1 gene mRNA and protein in sinonasal squamous carcinoma

WEN Yan-ling, LI Yong-tuan, JIN Zheng, XIN Lu, Wang Ning-ning

(Department of Otolaryngology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of caveolin-1 mRNA and protein in different lesions of nose, and to reveal its relation with the clinicopathologic characteristics of sinonasal squamous carcinoma. **Methods** SP immunohistochemical staining and chromogenic in situ hybridization were used for detecting the expression of caveolin-1 protein and mRNA in 62 specimens of sinonasal squamous carcinoma, 20 of sinonasal inverted papilloma and 15 of normal inferior turbinate mucosa respectively. The relationships between expression of caveolin-1 and clinicopathological features were analyzed in patients with sinonasal squamous carcinoma. **Results** The positive expression rates of caveolin-1 mRNA in normal inferior turbinate mucosa, sinonasal inverted papilloma and sinonasal squamous carcinoma were 86.7%, 60.0% and 32.3% respectively, while those of caveolin-1 protein were 80%, 55.0% and 29.0%, which showed gradual decrease tendency. The positive expression rates of caveolin-1 mRNA and protein were correlated with the clinical stages and pathological grades ($P<0.05$) of the tumor, but not with patients' sex and age ($P>0.05$). In addition, the expression of caveolin-1 mRNA was positively related to the expression of the protein ($P<0.05$). **Conclusions** The positive expression of caveolin-1 mRNA and protein in normal inferior turbinate mucosa tissues, sinonasal inverted papilloma and sinonasal squamous carcinoma is reduced gradually, which hints that caveolin-1 may be involved in the pathogenesis of sinonasal squamous carcinoma. The consistency between expression of caveolin-1 mRNA and protein in different lesions indicates that the suppressed expression of caveolin-1 gene in carcinoma tissue taken place at the transcription level or above. And therefore, caveolin-1 gene is expected to become a new target of gene therapy of sinonasal squamous carcinoma.

Key words:Caveolin-1; Nasal cavity; Paranasal sinus; Carcinoma, squamous cell; In situ hybridization; Immunohistochemistry

鼻腔鼻窦鳞状细胞癌(sinonasal squamous carcinoma,SSC)占全部鼻腔鼻窦恶性肿瘤的 55.3%^[1],好发于上颌窦,筛窦和鼻腔癌发病率相当,但相对于上颌窦癌均少见,蝶窦和额窦肿瘤较罕见^[2]。这类肿瘤早期症状不典型,且解剖部位隐蔽,临床确诊者多已处于中晚期,如何及时发现、了解和明确肿瘤范

基金项目:青岛市科技局课题(KJZD-13-20-NSH);青岛市医疗卫生优秀人才培养项目资助。
作者简介:温艳玲,女,硕士研究生。
通信作者:李永团,Email:lytent@126.com

围并尽早治疗具有重要的临床研究价值。目前临床主要通过CT、MRI、病理活检及临床医生的认知水平来诊断这类疾病,这些诊断技术在一定程度上虽能互相弥补,但仍然不能准确的监测SSC的生物学行为及作出预后准确评估。迄今,SSC发病机制尚不明确。肿瘤的发生往往是多因素相互作用的结果,与细胞增殖、分化、迁移、凋亡及血管生成的信号通路异常密切相关。研究发现,微囊蛋白-1(caveolin-1,CAV-1)参与了这些信号通路的调控,从而在多方面、多环节影响肿瘤的发生、发展。这使得CAV-1成为近年来肿瘤研究领域备受关注的一个因子。目前国内外就其在鼻鳞癌中的表达及作用机制还尚未见报道,本研究从基因和蛋白质水平检测SSC组织中CAV-1的表达,探讨其在肿瘤分化、发展以及浸润转移中的潜在作用,以期对SSC早期诊断和靶向治疗提供依据。

1 资料和方法

1.1 临床材料

本研究选取我院耳鼻咽喉头颈外科2007年1月~2014年1月SSC手术患者62例,所有患者临床资料完整,均为第1次手术,术前未接受放、化疗及任何生物制剂治疗,术后病理诊断均为鳞状上皮细胞癌。其中男42例,女20例;年龄23~68岁,中位年龄53岁。临床分期采用国际抗癌协会UICC分期法分:临床I期和II期26例,III期和IV期36例;低分化24例,中分化22例,高分化16例。同期选取20例鼻腔内翻性乳头状瘤患者(病理确诊并未发现癌变倾向)和15例下鼻甲黏膜患者(单纯下鼻甲肥大或鼻中隔偏曲致对侧下鼻甲代偿性肥大行下鼻甲部分切除)作为对照组。手术标本均在离体后即刻置于10%中性甲醛中固定,常规石蜡包埋,制成蜡块备用。

1.2 主要试剂

兔抗人CAV-1多克隆抗体、PBS磷酸盐缓冲液、DAB显色试剂盒、柠檬酸盐抗原修复缓冲液、山羊血清封闭液均购于北京中杉金桥生物技术公司。CAV-1基因寡核苷酸探针:使用Oligo软件设计探针,由上海生工生物技术服务公司合成。CAV-1寡核苷酸探针序列为5'-CTCAG CCAAT AAAGC GATGG A-3',探针片段长度21 bp,3端标记地高辛。

1.3 染色方法

1.3.1 免疫组织化学染色法(SP法) 操作方法:

将备用蜡块4 μm 厚连续切片、烘干,制成新鲜石蜡切片。常规脱蜡、水化,置于柠檬酸盐抗原修复缓冲液中高温高压修复,冷却后滴加3% H_2O_2 ,山羊血清封闭;滴加工作浓度1:100的一抗,4℃孵育过夜;之后滴加生物素化二抗,DAB显色,苏木素复染,常规脱水、透明后,中性树胶封片备用。用已知乳腺癌阳性片作为阳性对照,用PBS液代替CAV-1一抗切片作为阴性对照。结果判定:CAV-1采用Olympus光学显微镜观察CAV-1的表达情况,细胞胞质或胞膜呈棕黄、棕褐色为阳性细胞。取3个不同的视野进行观察,计数每个视野下100个细胞的染色情况,取平均值。按染色强度及阳性细胞数计算评分:①染色强度(0=无色,1=淡黄色,2=棕黄色,3=棕褐色);②阳性细胞数(0=阳性细胞数0%~5%,1=阳性细胞数6%~25%,2=阳性细胞数25%~50%,3=阳性细胞数>50%)。①+②之和即为最后得分,得3~6分者为免疫组化阳性。由同一位病理科医师完成。

1.3.2 原位杂交(CISH法) 操作方法:新鲜制备石蜡切片经常规脱蜡、水化,20%福尔马林缓冲液固定,蛋白酶(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)K 37℃消化15 min,0.1%甘氨酸溶液轻洗终止消化反应;滴加地高辛标记的CAV-1寡核苷酸探针,37℃杂交过夜;封闭液封片,滴加碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体,37℃反应1 h;NBT/BCIP显色,甲基绿复染,中性树胶封片。显微镜下观察结果,细胞核浓染且呈深蓝色者为CAV-1阳性。结果判定:原位杂交的阳性信号位于细胞核内,经NBT/BCIP显色,阳性信号为蓝色,呈细颗粒状。信号越强,颜色越深,呈蓝紫色和紫黑色。阴性对照片内无阳性信号检出。原位杂交的阳性等级按以下方法计算:阳性细胞数:阳性细胞 $\leq 10\%$ 、 $\leq 30\%$ 、 $\leq 70\%$ 和 $> 70\%$ 分别计1、2、3和4分;阳性着色强度:杂交信号强度可分为弱、中、强三级分别计1、2和3分,上述两种计分相加,1~3分者为阴性,4~5分者为阳性,6~7分者为强阳性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行分析,应用 χ^2 检验分别分析CAV-1 mRNA与蛋白在SSC、鼻腔内翻性乳头状瘤和正常下鼻甲黏膜组织中的表达是否有差别,同法分析CAV-1 mRNA和蛋白与SSC患者临床病理特征的关系;应用Spearman等级相关分析分析CAV-1 mRNA与蛋白的相关性; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CAV-1 mRNA 和蛋白在不同病变鼻腔组织中的表达

CAV-1 蛋白在正常下鼻甲黏膜组织、鼻腔内翻性乳头状瘤及 SSC 细胞中的阳性信号表达位于细胞膜和细胞质(图 1),其阳性表达率呈递减趋势, χ^2 检验显示组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.53, P < 0.05$,表 1);CAV-1 mRNA 阳性信号表达于细胞核

内(图 2),在 3 组间阳性表达率亦呈递减趋势,差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.01, P < 0.05$,表 1)。另外,CAV-1 mRNA 和蛋白在鼻腔内翻性乳头状瘤与 SSC 组间阳性率差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

2.2 CAV-1 基因 mRNA 和蛋白在 SSC 中的表达

CAV-1 基因 mRNA 和蛋白在不同病理分级、临床分期组内阳性表达率的差异具有统计学意义($P < 0.05$),在年龄及性别组内表达率的差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。

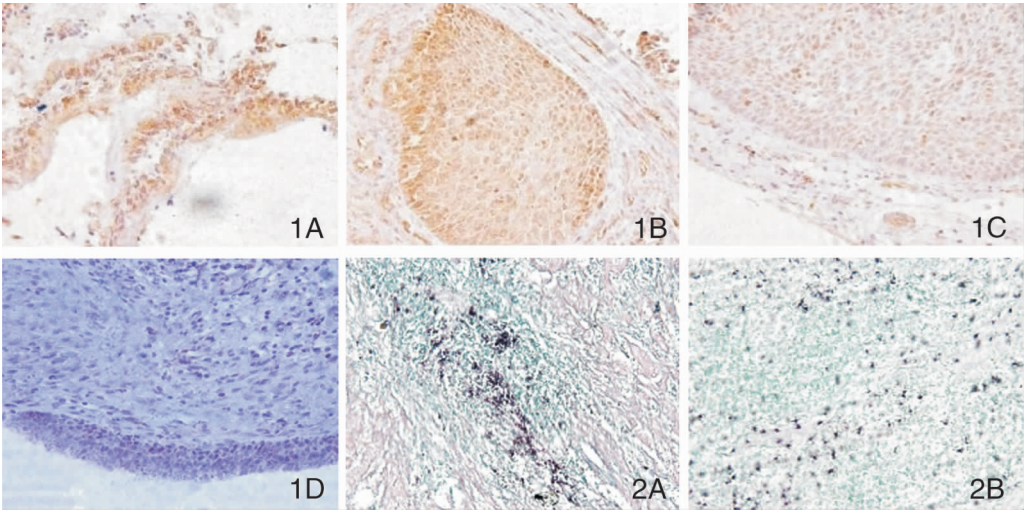


图1 Caveolin-1 蛋白表达 A:正常下鼻甲黏膜细胞(SP ×200); B:鼻腔内翻性乳头状瘤细胞(SP ×200);C:鼻腔鼻窦鳞癌(SP ×200);D:鼻腔鼻窦鳞癌阴性表达(SP ×200) 图2 Caveolin-1mRNA 表达 A:鼻腔鼻窦鳞癌细胞阳性表达(ISH ×200);B:下鼻甲黏膜细胞阳性表达(ISH ×200)

表1 不同鼻腔黏膜组织中 Caveolin-1mRNA 和蛋白表达[例(%)]

组别	例数	Caveolin-1 蛋白				Caveolin-1mRNA			
		+	-	χ^2	<i>P</i>	+	-	χ^2	<i>P</i>
正常下鼻甲	15	12(80)	3(20)			13(86.7)	2(13.3)		
鼻腔内翻性乳头状瘤	20	11(55)	9(45)	14.53▲	<0.05	12(60)	8(40)	16.25▲	<0.05
SSC	62	18(29)	44(71)	4.46*	<0.05	20(32.3)	42(67.7)	4.89*	<0.05

注:▲为3组间比较所得的值,*为鼻鳞癌与鼻内翻组比较所得的值

表2 鼻腔鼻窦鳞癌组织中 Caveolin-1mRNA 及蛋白表达与临床病理参数的关系(例, %)

临床病理指标	例数	Caveolin-1 蛋白					Caveolin-1mRNA				
		+	-	阳性率	χ^2	<i>P</i>	+	-	阳性率	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)											
≥45	40	10	30	25.0	0.89	>0.05	11	29	27.5	1.17	>0.05
<45	22	8	14	36.4			9	13	40.9		
性别											
男	42	12	30	28.6	0.01	>0.05	13	29	31.0	0.10	>0.05
女	20	6	14	30.0			6	14	35.0		
临床分期											
I、II	26	12	14	46.2	6.37	<0.05	14	12	53.8	9.55	<0.05
III、IV	36	6	30	16.7			6	30	16.7		
病理分化											
高分化	16	9	7	56.3	8.97	<0.05	10	6	62.5	9.62	<0.05
中分化	22	6	16	27.3			6	16	27.3		
低分化	24	3	21	12.5			4	20	16.7		

2.3 Caveolin-1 蛋白与 mRNA 在 SSC 组织中表达的相关性分析

Spearman 等级相关分析显示,在 SSC 组织中 Caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达呈正相关关系($\gamma_s=0.53,P<0.05$,表 3)。

表 3 SSC 组织中 Caveolin-1mRNA 和蛋白表达相关性分析(例)

Caveolin-1 蛋白	Caveolin-1mRNA		χ^2	γ_s	P
	+	-			
+	14	4	9.66	0.53	<0.05
-	6	38			

3 讨论

研究表明,CAV-1 在肿瘤发生过程中起到癌基因或抑癌基因的双重作用,如在卵巢癌、肺癌、胃癌等中 CAV-1 表达明显下降,抑制肿瘤发展及转移;在前列腺癌、肾癌、膀胱癌等肿瘤细胞中,CAV-1 表达上调且促进癌细胞的浸润^[3-5]。CAV-1 是 1989 年由 Clenney 发现的一个膜整合蛋白,其相对分子质量为 $(21 \sim 24) \times 10^3$,并且是细胞膜上烧瓶样微囊结构 caveolae 的标志性膜蛋白。Engelman 等^[6]证实了 CAV-1 的编码基因定位于染色体 7q31.1 位点,位于 D7S522 约 100 kb 的范围内,前者在人类恶性肿瘤中常常缺失,后者则被认为是该区域的肿瘤抑制基因的标志。研究证明 CAV-1 的作用机制是通过其脚手架结构域(caveolin-1 scaffolding domain,CSD)与 Caveolae 内许多与细胞增殖相关的信号分子(如 H2Ras、c2Src、eNOS、G 蛋白等)特异性结合,并抑制这些信号分子的活性,形成多条信号通路的枢纽中心,最终对细胞的增殖、迁移和分化产生重要的影响^[7]。

近年来一系列针对 CAV-1 在肿瘤的发生发展和侵袭转移过程及预后评估中作用的研究逐渐展开。研究表明,在乳腺癌、卵巢癌、肉瘤、肺癌、肠癌、胃癌等恶性肿瘤中 CAV-1 表达明显下降,能抑制肿瘤发展及转移,发挥抑癌作用;但在前列腺癌、肾癌、膀胱癌等恶性肿瘤细胞的研究中,人们发现 CAV-1 表达上调且能促进癌细胞的浸润,是一个致癌基因^[8-9]。Ito 等^[10]的研究结果显示,正常的甲状腺滤泡细胞以及甲状腺滤泡癌均不表达 CAV-1,而 67.1% 的甲状腺乳头状癌表达 CAV-1,其中微小癌的表达阳性率又高于巨大甲状腺乳头状癌,表明

CAV-1 主要表达在乳头状癌的早期阶段。这些研究结果表明,CAV-1 作为致癌基因还是抑癌基因,主要取决于肿瘤和肿瘤细胞的类型,而且在致癌作用的不同阶段可能发挥不同的作用。

本研究应用免疫组织化学方法和原位杂交技术检测了 CAV-1 在 SSC、鼻腔内翻性乳头状瘤、正常下鼻甲组织中的表达情况。免疫组化在 29.0% 的 SSC 组织中检测到了 CAV-1 蛋白阳性表达,低于鼻腔内翻性乳头状瘤组织中 CAV-1 蛋白阳性表达 55.0% 和下鼻甲黏膜组织中 CAV-1 蛋白阳性表达 80.0%;原位杂交结果显示,CAV-1 在 SSC 组的阳性表达明显低于鼻腔内翻性乳头状瘤和下鼻甲组。以上结果提示,CAV-1 可能与 SCC 的发生相关,本研究结果与 CAV-1 在乳腺癌、卵巢癌、肉瘤、肺癌、肠癌、胃癌中的低表达相吻合^[7,11],说明 CAV-1 是与多种恶性肿瘤发生有关的癌蛋白,并发挥抑癌基因的作用。研究中还发现,CAV-1 蛋白和 mRNA 在 SSC 中的阳性表达均降低,统计学分析得出两者存在正相关,结果提示 SSC 组织中 CAV-1 基因表达在转录水平受到抑制。我们的研究进一步分析 CAV-1 的表达与 SSC 临床病理参数的关系发现,病理级别中低分化的病例、临床分期Ⅲ期和Ⅳ期的病例 CAV-1 的表达水平分别低于病理级别高分化的病例、临床分期为Ⅰ期和Ⅱ期的病例,但与年龄、性别无关。这一发现与史璐等^[12-18]在涎腺黏液表皮样癌的研究中的结论不谋而合,CAV-1 随着病理级别和临床分期的增高表达下降。提示 CAV-1 可能与 SSC 的发生发展过程有关。

由此,不难看出,CAV-1 的作用不仅为肿瘤的诊断及预后评估提供依据,还将为肿瘤的预防及治疗带来不可估量的价值^[19-22]。但通过检测 SSC CAV-1 的表达来诊断或发现早期 SSC 是否具有特异性,还需要我们踏着前人的足迹,不懈的努力和追求,相信随着对 CAV-1 作用机制的进一步认识,必将对鼻腔鼻窦鳞状细胞癌的基因诊治疗带来新的突破。

参考文献:

[1] 韩德民.耳鼻咽喉头颈外科学[M].北京:北京大学医学出版社,2004:250-251.
[2] 孙彦,王琪.2002 年 AJCC 鼻腔和鼻窦癌分期方案[J].国外医学(耳鼻咽喉科学分册),2004,28(2):123-124.
[3] Senetta R, Stella G, Pozzi E, et al. caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why[J]. J Cell Mol Med,2013, 17(3):325-336.

[4] Mo SJ, Yang SL, Cui Z. New glimpses of caveolin-1 functions in embryonic development and human diseases[J]. Front Biol,2011, 6(5):367-376.

[5] Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, et al. caveolin-1 in tumor progression; the good, the bad and the ugly[J]. Cancer Metastasis Rev,2008, 27(4):715-735.

[6] Engelman JA,Zhang XL,Lisanti MP,et al. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522locus(7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines[J]. FEBS Lett,1999,448(2-3):221-230.

[7] Jasmin JF, Frank PG, Lisanti MP. Caveolins and caveolae; roles in signaling and disease mechanisms[M]. New York:Springer,2012: 381.

[8] Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, et al. Caveolin-1 in tumor progression;the good, the bad and the ugly[J]. Cancer Metastasis Rev,2008,27(4):715-735.

[9] Burgermeister E,Liscovitch M,Röcken C,et al. Caveats of caveolin-1 in cancer progression[J]. Cancer Lett,2008,268(2):187-201.

[10] Ito Y, Yoshida H, Nakano K, et al. caveolin-1 over expression is an early event in progression of papillary carcinoma of the thyroid[J]. Br J Cancer,2002,86(6):912-916.

[11] Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis[J]. J Cell Biol,2003,161(4):673-677.

[12] Shi L, Chen XM, Wang L, et al. Expression of caveolin-1 in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome[J]. Cancer,2007, 109(8):1523-1531.

[13] Shi L, Chen XM, Chen Z, et al. Expression and Significant of caveolin-1 and PCNA in Mucoepidermoid Carcinoma of Salivary Glands[J]. Journal of Oral Science Research,2011, 27(7):596-599.

[14] Patani N, Martin LA, Reis-Filho JS, et al. The role of caveolin-1 in human breast cancer[J]. J Breast Cancer Res Treat,2012, 131(1):1-15.

[15] Roy B, Upal K, Henkhaus RS, et al. caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis[J]. J Int J Cancer,2013,133(1):43-57.

[16] Songserm T, Pongrakhananon V, Chanvorachote P. Sub-toxic cisplatin mediates anoikis resistance through hydrogen peroxideinduced caveolin-1 up-regulation in non-small cell lung cancer cells[J]. Anticancer Res,2012,32(5):1659-1669.

[17] Ochoa-Hernández AB, Juárez-Rez-Vázquez CI, Reynoso MAR, et al. WNT-β-catenin signaling pathway and its relationship with cancer[J]. Cir Cir,2012,80(4):389-398.

[18] Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, et al. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148[J]. J Cell Biol, 2003,161(4):793-804.

[19] Xia X, Ma Q, Li X, et al. Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2011, 11:399.

[20] Saifo MS, Rempinski DR, Rustum YM, et al. Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers[J]. Mol Cancer,2010,9:310.

[21] Guruswamy S, Rao CV. Synergistic effects of lovas tatin and celecoxib on caveolin-1 and its down-stream signaling molecules; Implications for colon cancer prevention[J]. Int J Oncol,2009,35(5):1037-1043.

[22] Kuo SR, Tahir SA, Park S, et al. Anti-caveolin-1 antibodies as anti-prostate cancer therapeutics[J]. Hybridoma,2012,31(2):77-86.

(修回日期:2015-01-30)

· 消息 ·

版权说明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊已被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 系列数据库收录,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时向本刊声明,本刊将作适当处理。