

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201504002

· 论著 ·

Flotillin-2 在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

范双石^{1,2}, 王君宇¹, 文秋元³, 褚书舟³, 罗佳娣³, 黄东海⁴, 范松青³

(1. 中南大学湘雅医院 神经外科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省儿童医院 急诊综合外科, 湖南 长沙 410007; 3. 中南大学湘雅二医院 病理科, 湖南 长沙 410011; 4. 中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科, 湖南 长沙 410008)

摘要: **目的** 检测喉鳞状细胞癌组织中 Flotillin-2 (FLOT-2) 蛋白的表达并分析其与临床病理特征的关系, 探讨 FLOT-2 在喉鳞状细胞癌中的临床意义。**方法** 免疫组织化学检测 74 例喉鳞状细胞癌和 23 例喉鳞状上皮组织中的 FLOT-2 蛋白表达, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。**结果** 喉鳞状细胞癌组织中 FLOT-2 蛋白的阳性表达率显著高于喉鳞状上皮组织 ($P < 0.001$); 有淋巴结转移的喉鳞状细胞癌 FLOT-2 蛋白的阳性表达率显著高于无淋巴结转移患者 ($P = 0.038$); 临床晚期喉鳞状细胞癌组织中 FLOT-2 蛋白的阳性表达率显著高于临床早期鳞状细胞癌 ($P = 0.007$); Kaplan-Meier 生存曲线和 Cox 多因素回归分析结果均显示 FLOT-2 阳性表达的喉鳞状细胞癌患者 5 年总生存率明显低于 FLOT-2 阴性患者 ($P < 0.05$)。**结论** FLOT-2 蛋白高表达提示其可能促进喉鳞状细胞癌的发生、发展和转移, FLOT-2 蛋白有望成为喉鳞状细胞患者预后差的分子标志物。

关键词: 喉肿瘤; 鳞状细胞癌; FLOT-2; 预后

中图分类号: Q786; R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2015)04-0271-04

Clinical significance of expression of Flotillin-2 in laryngeal squamous cell carcinoma

FAN Shuang-shi, WANG Jun-yu, WEN Qiu-yuan, CHU Shu-zhou, LUO Jia-di, HUANG Dong-hai, FAN Song-qing
(Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of Flotillin-2 (FLOT-2) and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). **Methods** The expression of FLOT-2 was detected in 74 specimens of LSCC and 23 of noncancerous squamous epithelial tissues by immunohistochemical staining. The results were analyzed statistically with SPSS 10.0. **Results** The positive expression rate of FLOT-2 protein in LSCC was significantly higher than that in noncancerous squamous epithelial tissues ($P < 0.001$). And the positive expression rate of FLOT-2 protein in LSCC patients with lymph node metastasis was significantly higher than that without lymph node metastasis ($P < 0.05$). The positive expression rate of FLOT-2 protein was positively correlated with clinical stages of LSCC patients ($P < 0.05$). Univariate analysis and multivariate logistic regression analysis revealed that the expression of FLOT-2 protein had obviously negative correlation with 5 years overall survival rates of LSCC patients ($P < 0.05$). **Conclusion** High expression of FLOT-2 may play an important role in the development and metastasis of LSCC. Increased expression of FLOT-2 protein may serve as a novel biomarker to predict the poor prognosis of LSCC.

Key words: Laryngeal neoplasm; Carcinoma, squamous cell; FLOT-2; Prognosis

Flotillin-2 (FLOT-2) 蛋白是细胞膜的重要组成部分, 不仅参与跨膜物质转运和 T、B 淋巴细胞的激活, 也参与调控与细胞生长和恶性转化相关的多种下游信号传导通路, 在维持表皮细胞的结构和粘附

以及丝状伪足的形成方面起重要作用^[1-4]。我们前期的研究发现鼻咽癌组织中存在 FLOT-2 蛋白的高表达^[5], 但目前尚未见有关 FLOT-2 蛋白在喉鳞状细胞癌组织表达的文献报导。本研究利用免疫组织化学检测喉鳞状细胞癌和喉鳞状上皮组织中的 FLOT-2 蛋白表达, 探讨 FLOT-2 表达与喉鳞状细胞癌临床病理特征的关系及其临床意义。

基金项目: 国家自然科学基金资助(81472773)。

作者简介: 范双石, 男, 硕士研究生。

通信作者: 范松青, Email: fansongqing2003@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

组织标本来源于中南大学湘雅医院耳鼻咽喉科 2003 年 1 月 ~ 2007 年 12 月手术切除的喉癌标本 74 例,病理分级和临床分期参照文献^[6]:其中鳞状细胞癌 I 级 19 例,II 级 24 例,III 级 21 例,IV 级 10 例;临床 I 期 13 例,II 期 21 例,III 期 27 例,IV 期 13 例。男 59 例,女 15 例;年龄 24 ~ 74 岁,平均(45.93 ± 11.9) 岁,其中年龄小于或等于 50 岁 24 例,大于 50 岁 50 例;伴淋巴结转移患者 30 例,无转移患者 44 例。所有喉癌患者术后均经系统的放疗、化疗或放化疗联合治疗。全部患者均有完整的临床随访资料,随访时间 5 年(60 个月),随访期间存活 46 例,死亡 28 例。另外从病理资料库中随机选取 23 例非典型增生的声带小结鳞状上皮标本作为实验对照组。

1.2 试剂

免疫组化 Envision™ + Dual Link System-HRP 检测试剂盒以及 DAB 显色试剂盒购买于迈新生物技术开发有限公司,兔多克隆抗体 FLOT-2 (Rabbit polyclonal antibody, Catalog: # S0051, Epitomics, Inc.) 购买于美国 Epitomics 公司。

1.3 方 法

免疫组化 Envision™ 两步法检测 FLOT-2 蛋白表达的具体步骤参考我们先前实验^[5]。所有标本经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 厚切片常规脱蜡至水,利用微波炉在枸橼酸钠缓冲液中对所有切片上的组织进行抗原修复,0.3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,每张切片滴加 50 μl 1:1 000 稀释的 FLOT-2 一抗,置密封湿盒中于 4℃ 过夜,PBST 漂洗 10 min × 3 次,Envision™ (二抗) 室温孵育 30 min,DAB 染色,显微镜下控制染色反应强度,蒸馏水漂洗,苏木素复染,中性树胶封片。先前实验已证实阳性表达 FLOT-2 的鼻咽癌组织切片作为实验的阳性对照,PBS 代替一抗作为本次实验的阴性对照。

1.4 结果判断与分析

1.4.1 结果判断参照文献^[5] 棕色为阳性信号,FLOT-2 阳性表达位于细胞膜,部分细胞浆有少量表达,根据阳性染色强度及染色细胞百分率进行评分:基本不着色者为 0 分、淡着色者为 1 分、中等着色者为 2 分、棕黑色者为 3 分;着色细胞 < 5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为

3 分,每张切片染色强度与染色细胞百分率得分相乘为其最终得分,0 分计为阴性,≥ 1 分计为阳性。

1.4.2 统计学分析 SPSS10.0 统计软件包对 FLOT-2 蛋白表达与喉鳞状细胞癌的临床病理特征进行 χ^2 检验,随访生存率资料进行 Kaplan-Meier 和 Cox 多因素回归分析,以双侧检验水准, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 FLOT-2 在喉鳞状细胞癌表达以及与其临床病理特征的关系

FLOT-2 在喉鳞状细胞癌细胞膜中的阳性表达(图 1),部分病例除癌细胞膜阳性表达外,癌细胞浆也有部分阳性染色。喉鳞状细胞癌中 FLOT-2 蛋白阳性表达百分率为 66.2% (49/74),显著高于喉鳞状上皮组织的阳性百分率 34.8% (8/23) ($P < 0.001$)。FLOT-2 蛋白表达与喉鳞状细胞癌临床病理特征关系见表 1。有淋巴结转移的喉鳞状细胞癌 FLOT-2 阳性表达率显著高于无淋巴结转移患者($\chi^2 = 4.285, P = 0.038$),临床 III 期和 IV 期喉鳞状细胞癌患者 FLOT-2 阳性表达率显著高于临床 I 期和 II 期($\chi^2 = 7.394, P = 0.007$);死亡喉鳞状细胞癌患者的 FLOT-2 的阳性表达率高于无瘤生存的喉鳞状细胞癌患者($\chi^2 = 5.107, P = 0.024$);FLOT-2 阳性表达与患者年龄,性别和病理分级均无显著性相关($P > 0.05$)。

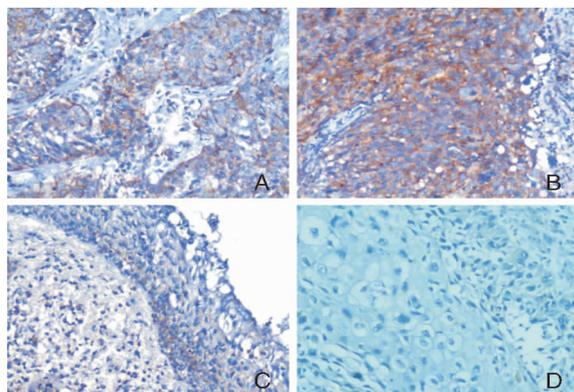


图 1 FLOT-2 在喉鳞状细胞癌中的表达 (DAB × 200) A:喉鳞状细胞癌细胞膜中 FLOT-2 的阳性表达;B:部分喉鳞状细胞癌细胞膜和细胞浆中 FLOT-2 的阳性表达;C:喉鳞状上皮组织中部分细胞中 FLOT-2 的弱阳性表达;D:喉鳞状细胞癌组织中 FLOT-2 的阴性表达

表1 FLOT-2 表达与喉鳞状细胞癌临床参数的关系[例(%)]

临床参数	例数	FLOT-2 表达		χ^2	P
		阳性	阴性		
年龄					
≤ 50 岁	24	18(75.0)	6(25.0)	1.225	0.268
> 50 岁	50	31(62.0)	19(38.0)		
性别					
男	59	39(66.1)	20(33.9)	0.002	0.967
女	15	10(66.7)	5(33.3)		
病理分级					
I、II	43	28(65.1)	15(35.9)	0.056	0.814
III、IV	31	21(67.7)	10(32.3)		
淋巴结转移					
有	30	24(80.0)	6(20.0)	4.285	0.038
无	44	25(56.9)	19(43.2)		
临床分期					
I、III	34	17(50.0)	17(50.0)	7.394	0.007
III、IV	40	32(80.0)	8(20.0)		
生存状况					
存活	46	26(56.5)	20(43.5)	5.107	0.024
死亡	28	23(82.1)	5(17.9)		

2.2 FLOT-2 表达与喉鳞状细胞癌预后关系

74 例喉鳞状细胞癌患者,存活患者 FLOT-2 阳性表达率为 56.5% (26/46)。28 例鳞状细胞癌患者中 FLOT-2 阳性表达率为 82.1% (23/28)。5 年随访期间 49 例 FLOT-2 阳性患者死亡 23 例,25 例 FLOT-2 阴性患者死亡 5 例。Kaplan - Meier

生存曲线显示 FLOT-2 的阳性表达与患者 5 年总生存率存在显著相关性 ($P < 0.05$),见图 2。多因素分析结果见表 2。多因素回归分析结果显示 FLOT-2 蛋白阳性表达、临床分期和淋巴结转移状况临床分期与喉鳞状细胞癌的 5 年总生存率存在显著性差异,是喉鳞状细胞癌的独立预后指标 ($P = 0.009$, $P = 0.013$ 和 $P = 0.001$)。FLOT-2 蛋白表达与喉鳞状细胞癌患者的预后关系中的标准误 (SE),卡方值 (Wald) 和 Exp (B) 死亡风险比与临床分期和淋巴结转移比较,FLOT-2 阳性表达的喉鳞状细胞癌患者的死亡风险比高于淋巴结转移。

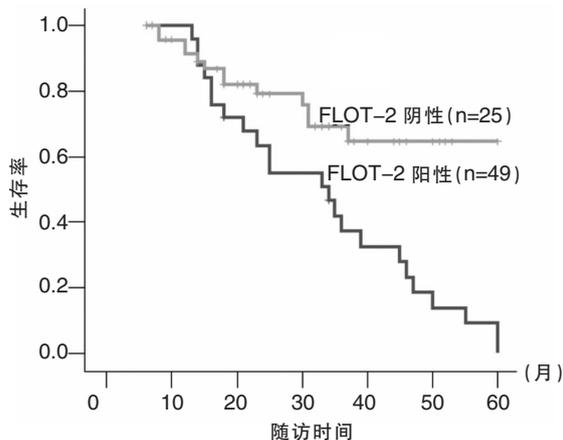


图2 FLOT-2 表达与喉鳞状细胞癌预后的 K-M 生存曲线图

表2 多因素回归分析 FLOT-2 表达与喉鳞状细胞癌预后的关系

临床参数	标准误	Wald χ^2	风险比	P	95% 可信区间	
					下限	上限
年龄	0.526	0.174	1.246	0.676	0.444	3.493
性别	0.413	0.009	0.961	0.923	0.427	2.160
病理分级	0.462	0.851	0.653	0.356	0.264	1.615
淋巴结转移状况	0.553	11.722	0.151	0.001	0.051	0.445
FLOT-2 表达	0.357	6.889	0.392	0.009	0.195	0.789
临床分期	0.364	6.216	1.077	0.013	0.705	1.646

3 讨论

Flotillin-2 基因定位于 17q11-12,其编码的蛋白 FLOT-2 是组成细胞膜的重要成分。研究发现致瘤性、转移性黑色素瘤细胞系中 FLOT-2 mRNA 和蛋白表达增加;体内裸鼠移植瘤模型实验显示 FLOT-2 转染的黑色素瘤细胞 SB2 可使其从非致瘤、不转移性细胞转变成致瘤、转移性瘤细胞^[7-8]。我们前期研究鼻咽癌组织中的 FLOT-2 蛋白表达及其与鼻咽癌临床病理特征的相关性。结果发现鼻咽癌组织中

存在 FLOT-2 蛋白高表达,FLOT-2 促进鼻咽癌的发生与发展,并能作为预测鼻咽癌患者淋巴结转移的敏感指标^[5]。喉鳞状细胞癌是头颈部最常见的上皮性恶性肿瘤,FLOT-2 是否影响喉鳞状细胞癌的发生、发展。因此本研究通过免疫组化检测 FLOT-2 蛋白在喉鳞状细胞癌和非癌喉鳞状上皮组织中的表达。研究结果显示喉鳞状细胞癌组织中存在 FLOT-2 蛋白的高表达,并且其表达阳性表达率显著高于非癌鳞状上皮组织,进一步分析发现 FLOT-2 的阳性表达与患者临床分期以及淋巴结转移相关,FLOT-2 在临床 III 期和 IV 期患者中的阳性表达率明

显高于临床 I 期和 II 期患者;同样,FLOT-2 在伴有淋巴结转移的患者中的阳性表达率也明显高于无淋巴结转移者,这与我们研究 FLOT-2 在鼻咽癌中的结果相一致。上述结果提示 FLOT-2 在喉鳞状细胞癌的发生发展以及促进淋巴结转移方面起着重要作用,但是,FLOT-2 经何种方式促进喉鳞状细胞癌发生、发展及淋巴结转移的具体分子机制,需我们下一步从体内外实验深入探讨。

研究发现乳腺癌、胃癌、肾癌等常见恶性肿瘤中存在 FLOT-2 的高表达,而且 FLOT-2 与这些肿瘤患者的预后不良存在显著相关性^[9-11]。令我们感兴趣的是在本研究中,单因素的 Kaplan-Meier 生存分析结果显示 FLOT-2 阳性表达的患者的 5 年总生存率明显短于 FLOT-2 阴性表达者。基于我们单因素分析发现 FLOT-2 蛋白表达与喉鳞状细胞癌患者的淋巴结转移,TNM 临床分期与生存状况存在显著相关性。这需要我们进一步通过多因素分析 FLOT-2 是否是喉鳞状细胞癌患者的一个独立的预后因素。多因素回归分析结果显示 FLOT-2 蛋白表达,喉鳞状细胞癌临床分期和淋巴结转移与喉鳞状细胞癌患者的预后显著相关($P < 0.05$)。FLOT-2 蛋白表达与喉鳞状细胞癌患者的预后关系中的标准误,卡方值和风险比与临床分期和淋巴结转移比较,FLOT-2 阳性表达的喉鳞状细胞癌患者的死亡风险比高于淋巴结转移,由此可见,FLOT-2 蛋白阳性表达能较好地独立预测喉鳞状细胞癌患者差的预后。

综上所述,FLOT-2 蛋白高表达可能促进喉鳞状细胞癌的发生、发展和淋巴结转移,FLOT-2 蛋白有望成为喉鳞状细胞患者预后差的分子标志物;抑制 FLOT-2 蛋白的表达可能为喉鳞状细胞癌潜在的分子治疗靶。

参考文献:

[1] Schroeder WT, Stewart-Galetka S, Mandavilli S, et al. Cloning

- and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA)[J]. J Biol Chem, 1994, 269(31): 19983 - 19991.
- [2] Hazarika P, Dham N, Patel P, et al. Flotillin 2 is distinct from epidermal surface antigen (ESA) and is associated with filopodia formation[J]. J Cell Biochem, 1999, 75(1): 147 - 519.
- [3] Schulte T, Paschke KA, Laessing U, et al. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration[J]. Development, 1997, 124(2): 577 - 587.
- [4] Lang DM, Lommel S, Jung M, et al. Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasma membrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons[J]. J Neurobiol, 1998, 37(4): 502 - 523.
- [5] Wen Q, Li J, Wang W, et al. Increased expression of flotillin-2 protein as a novel biomarker for lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101676.
- [6] Liu Y, Su Z, Li G, et al. Increased expression of metadherin protein predicts worse disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer. 2013; 133(3):671 - 679.
- [7] Hazarika P, McCarty MF, Prieto VG, et al. Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1[J]. Cancer Res, 2004, 64(20):7361 - 7369.
- [8] Doherty SD, Prieto VG, George S, et al. High flotillin-2 expression is associated with lymph node metastasis and Breslow depth in melanoma[J]. Melanoma Res, 2006, 16(5):461 - 463.
- [9] Wang X, Yang Q, Guo L, et al. Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes[J]. J Transl Me, 2013, 11(2):190.
- [10] Zhu Z, Wang J, Sun Z, et al. Flotillin2 expression correlates with HER2 levels and poor prognosis in gastric cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62365.
- [11] Yan Y, Yang FQ, Zhang HM, et al. Up-regulation of flotillin-2 is associated with renal cell carcinoma progression[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10):10479 - 10486.

(修回日期:2015-05-04)