

· 基础研究 ·

SHIP2 在喉鳞状细胞癌中的表达及意义

周小娟^{1,2}, 张俊杰¹, 谭国林², 刘 勇³

(1. 长沙市第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410005; 2. 中南大学湘雅三医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410013; 3. 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** 探讨含 SH2 结构域的 II 型 5' 肌醇磷酸酶 2 (SH2 domain containing 5' - inositol phosphatase - 2, SHIP2) 蛋白在喉鳞状细胞癌 (喉鳞癌) 组织中的表达及与临床病理特征和预后的关系。**方法** 应用免疫组织化学技术检测 SHIP2 蛋白在 54 例喉鳞癌组织及 16 例喉癌旁黏膜组织中的表达。**结果** SHIP2 蛋白在喉鳞癌组织中表达显著升高, 其表达与喉鳞癌 T 分期、临床分期、转移及复发密切相关 ($P < 0.05$); 生存分析表明 SHIP2 高表达组与低表达组患者 5 年无瘤生存率分别为 19.2% 和 64.3%, 5 年总生存率分别为 26.9% 和 85.7%, 两组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。多因素分析示 SHIP2 表达水平为喉鳞癌预后的独立影响因素。**结论** SHIP2 蛋白可能在喉鳞癌的发生、发展中发挥了重要作用, 且具有预后评估价值。

关键词: 喉肿瘤, 癌; 含 SH2 结构域的 II 型肌醇 5' - 磷酸酶 2; 转移; 免疫组化

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2011)05-0321-06

Expression of SHIP2 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance

ZHOU Xiao - juan , ZHANG Jun - jie , TAN Guo - lin , et al .

(Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery , The First Hospital of Changsha , Changsha 410005 , China)

Abstract : **Objective** To investigate the expression of SHIP2 protein in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and its clinical significance . **Methods** Immunohistochemistry was performed on paraffin - embedded tissue specimens to investigate SHIP2 protein expression , which included 54 specimens of LSCC and 16 adjacent tissue samples . **Results** The significantly increased SHIP2 protein expression was identified in both LSCC tissue and cell lines and the overexpression was tightly associated with LSCC T classification , clinical stage , metastasis and recurrence ($P < 0.05$) . The disease - free survival and overall survival rates of patients with SHIP2 overexpression were lower than those with low SHIP2 expression (19.2% vs 64.3% , $P < 0.05$; 26.9% vs 85.7% , $P < 0.05$) . Multivariate analysis revealed that the expression of SHIP2 was an independent prognostic factor for patients with LSCC . **Conclusion** SHIP2 might play a critical role in the initiation and progression of LSCC , and might be a valuable prognostic marker of the tumor .

Key words : Laryngeal neoplasm , carcinoma ; SH2 domain containing inositol polyphosphate 5' - phosphatase - 2 (SHIP2) ; Metastasis ; Immunohistochemistry

SHIP2 为 SHIP 肌醇磷酸酶家族成员之一。最初研究发现, SHIP2 蛋白可抑制胰岛

素分泌、降低机体对胰岛素的敏感性, 从而与胰岛素抵抗及 II 型糖尿病的发生密切相关^[1]。然而近年来, SHIP2 在乳腺癌等恶性肿瘤发生发展中的作用亦逐渐受到关注^[2-3]。因此, 本研究采用免疫组化技术检

测 SHIP2 蛋白在喉鳞癌组织中的表达,并结合临床随访资料,探讨 SHIP2 蛋白与喉鳞癌患者临床病理特征及预后之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2000 年 1 月 ~ 2004 年 9 月湘雅三医院耳鼻咽喉头颈外科经手术切除的喉鳞癌组织标本 54 例,癌旁黏膜组织标本 16 例,其中男 51 例,女 3 例;年龄 27 ~ 76 岁,平均年龄 56.48 岁。全组病例均为第 1 次手术,术前未接受放、化疗。手术切除标本经病理 HE 染色证实为喉鳞状细胞癌或癌旁黏膜组织。其中高分化 29 例,中分化 17 例,低分化 8 例;声门型 37 例,声门上型 16 例,声门下型 1 例。根据 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 喉癌分类方案进行临床分类: $T_1 N_0 M_0$ 8 例, $T_2 N_0 M_0$ 13 例, $T_1 N_1 M_0$ 1 例, $T_2 N_1 M_0$ 4 例, $T_2 N_2 M_0$ 1 例, $T_3 N_0 M_0$ 12 例, $T_3 N_1 M_0$ 6 例, $T_3 N_2 M_0$ 5 例, $T_4 N_0 M_0$ 1 例, $T_4 N_1 M_0$ 2 例, $T_4 N_2 M_0$ 1 例;临床分期: I 期 8 例, II 期 13 例, III 期 22 例, IV 期 11 例。20 例有颈部淋巴结转移(均经术后病理学检查证实),无 1 例出现远处转移。自手术当日起开始计算生存时间。通过门诊、电话及信访等方式进行随访。根据颈部触诊、B 超、纤维喉镜、影像学等检查结果及再次手术病检确定有无临床复发转移。以患者死亡、最后 1 次随访时间(2009 年 10 月 1 日)或失访作为随访结束点。

1.2 试剂

SHIP2 兔抗人多克隆抗体 (C-term) 购于美国 ABGENT 公司。UltraSensitive S-P 免疫组化试剂盒购于福州迈新生物试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 喉鳞癌组织和癌旁黏膜组织分别经 10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋后 4 μm 切片。切片脱蜡水化,并抗原修复后,全部免疫组化过程按照 UltraSensitive S-P 免疫组化试剂盒说明书完成。兔抗人 SHIP2 多克隆抗体按 1: 100 稀释,以 PBS 溶液代替一抗做阴性对照。

1.3.2 免疫组化结果判断 SHIP2 蛋白主要为肿瘤细胞胞浆内表达,以出现棕黄色染色为阳性染色。光镜下观察整个切片,随机观察 5 个高倍镜 (10 $\times$ 40) 视野,以阳性细胞百分率和染色强度二者乘积作为判定标准,结果判定参考 Liu 等^[4] 报道,按阳性细胞采用 9 分评分制: < 10% 计分为 1, $\geq 10\% \sim 50\%$ 计分为 2, $> 50\%$ 计分为 3。按染色的强弱: 阴性为 0; 淡黄色染色为弱阳性,计分为 1; 中度黄色染色为阳性,计分为 2; 棕黄色染色为强阳性,计分为 3。将最终评分 > 3 视为阳性表达。在生存分析中,将最终评分 7 ~ 9 分定义为 SHIP2 高表达; 将小于 6 分定义为 SHIP2 低表达^[4]。所有染色结果的判定均采用统一评分标准,遵从双盲原则,在完全不知临床样本资料的情况下,由 2 名病理科医师分别对实验结果进行评判计分。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验。用 Kaplan-Meier 法计算喉癌患者的无瘤生存率和总体生存率; 采用 Log-rank 法比较两种生存率之间的差异。用单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型研究喉癌患者的年龄、病理分级、肿瘤发生部位、T 分期、临床分期、有无淋巴结转移及 SHIP2 表达水平等因素对喉鳞癌预后的影响。采用逐步回归法建立多因素 Cox 模型,确定影响喉癌患者预后的独立危险因素,分别以 $P < 0.05$ 及 $P > 0.10$ 作为引入和剔除影响因素的筛选水平。所以检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SHIP2 蛋白在喉鳞癌组织及癌旁黏膜中的表达

SHIP2 蛋白阳性均呈棕黄色染色,且染色呈斑片状,主要定位于癌细胞胞浆。54 例喉癌组织标本中,SHIP2 蛋白阳性表达率为 77.78% (42/54); 癌旁黏膜组织中 SHIP2 蛋白阳性表达率为 18.75% (3/16)。 χ^2 检验显示 SHIP2 在喉鳞癌组

织与癌旁黏膜组织中的表达差异具有统计学意义($\chi^2 = 18.731, P < 0.001$)。典型免疫组化结果见图 1A,1B。

2.2 SHIP2 蛋白表达与喉鳞癌临床病理特征的关系

SHIP2 蛋白表达与喉鳞癌临床病理特征之间的相关性见表 1。在 T3、T4 级,临床Ⅲ期,Ⅳ期、有淋巴结转移或复发的喉鳞癌中,SHIP2 蛋白表达显著上调,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。而 SHIP2 蛋白表达水平与患者年龄、病理分级、原发部位参数之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 SHIP2 蛋白表达与喉鳞癌患者预后之间的关系

54 例喉癌患者术后全部得到随访,其中死亡 23 例,26 例术后不同时间出现肿瘤局部复发,5 例术后经 CT 或 MRI 检查发现远处转移。Kaplan-Meier 法统计 SHIP2 蛋白高表达组和低表达组 5 年累积无瘤生存率分别为 19.2% 和 64.3%,5 年累积总生存率分别为 26.9% 与 85.7%;Log-rank 检验两组间均有统计学意义($\chi^2 = 16.336, P < 0.001$,图 2A; $\chi^2 = 19.893, P < 0.001$,图 2B)。

表 1 SHIP2 蛋白表达水平与喉鳞癌各临床病理特征之间的关系

病理参数	样本量	SHIP2 表达水平			χ^2 值	<i>P</i> 值 ^a
		0 ~ 3	4 ~ 6	7 ~ 9		
年龄						
<57	32	10	8	14	3.764	0.152
≥57	22	2	8	12		
病理分级						
高	29	6	9	14	0.018	0.947
中 + 低	25	6	7	12		
原发部位						
声门	33	9	12	12	4.720	0.094
声门上/声门下	21	3	4	14		
T 分级 ^b						
T1,T2	28	10	10	8	10.119	0.006
T3,T4	26	2	6	18		
临床分期 ^b						
I,II	21	9	8	4	13.460	0.001
III,IV	33	3	8	22		
淋巴结转移 ^c						
有	20	2	2	16	12.959	0.002
无	34	10	14	10		
复发 ^c						
有	31	4	6	21	11.241	0.004
无	23	8	10	5		

注:^a 表示 $P < 0.05$ 视为有统计学差异;^b 表示 T 分级及临床分期根据国际抗癌协会(UICC)TNM(2002)分期方案;^c 根据颈部触诊、B 超、纤维喉镜、影像学等检查结果及再次手术病检确定有无临床复发转移

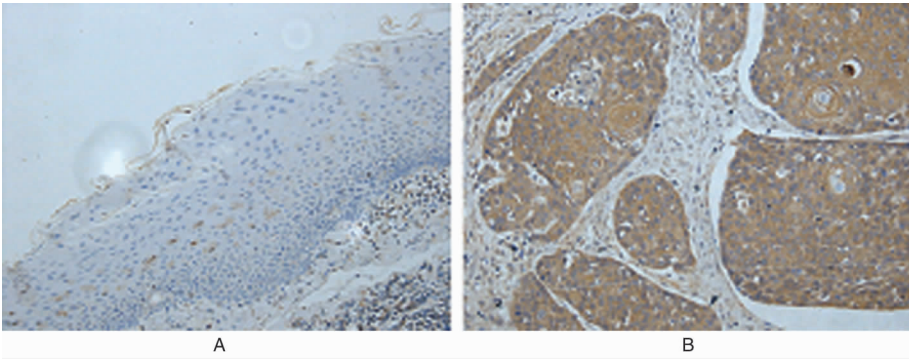


图 1 SHIP2 蛋白在癌旁黏膜及喉鳞癌组织中的表达 (SP 法, × 200)
A. 癌旁黏膜组织中 SHIP2 呈阴性或弱阳性表达; B. 喉鳞癌组织中 SHIP2 呈阳性表达

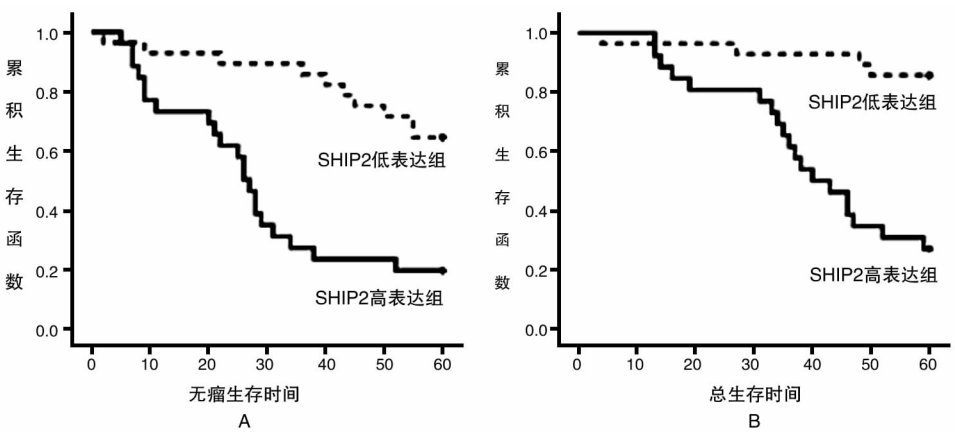


图 2 SHIP2 蛋白的表达与喉鳞癌患者预后的关系
A. 无瘤生存率; B. 总生存率

2.4 SHIP2 蛋白表达在多因素中对喉鳞癌预后的影响

以 5 年累积无瘤生存率及 5 年总生存率为因变量 (Y), 以患者年龄、组织病理分级、肿瘤原发部位、T 分级、临床分期、淋巴结转移及 SHIP2 蛋白表达水平 7 个因素为

协变量 (X), 建立 Cox 回归模型进行多因素分析。结果表明 SHIP2 蛋白表达水平与淋巴结转移情况对喉鳞癌患者预后的独立影响因素 (其中蛋白表达水平的相对危险度为 5.468, 其 95% 可信区间为 1.459 ~ 20.485, $P = 0.012$, 表 2)。

表 2 Cox 比例风险回归模型分析喉鳞癌患者预后的影响因素

临床病理参数	5 年无瘤生存率		5 年总生存率	
	相对危险度 (95% 可信区间)	P 值	相对危险度 (95% 可信区间)	P 值
淋巴结有无转移	4.057 (1.270 ~ 12.959)	0.018	5.833 (1.521 ~ 22.371)	0.010
SHIP2 蛋白水平	3.651 (1.312 ~ 10.162)	0.013	5.468 (1.459 ~ 20.485)	0.012

3 讨论

SHIP2 是一种脂质磷酸酶, 为目前发现

的胰岛素信号途径中重要的负性调节因子^[5]。近年来 SHIP2 蛋白在肿瘤发生发展中的作用逐渐受到关注。SHIP2 与 PTEN 蛋白均为脂质磷酸酶, 分别能使磷脂酰肌醇

3,4,5-三磷酸(PIP3)不同位点的磷酸基团去磷酸化,从而在 PI3K/PIP3/AKT 信号途径发挥负性调节作用^[6]。PI3K/PIP3/AKT 信号通路与恶性肿瘤的多种生物学行为密切相关,为抗癌靶向治疗的潜在靶点^[6]。PTEN 因其自身的脂质磷酸酶作用,通过对 PI3K/PIP3/AKT 信号通路的负调节作用,已在多种恶性肿瘤的组织及体内外实验中均被证实为一种抑癌基因^[7]。SHIP2 与 PTEN 基因同为脂质磷酸酶,且在 PI3K/PIP3/AKT 信号通路中具有相似的作用方式,从该角度出发,SHIP2 是否同 PTEN 基因一样在人类恶性肿瘤中发挥抑癌作用。

然而,本研究通过免疫组织化学技术发现,SHIP2 蛋白在喉鳞癌组织中表达显著升高,其表达与喉鳞癌 T 分级、临床分期、转移及复发密切相关,本研究结果与 Prasad 等^[3]在乳腺癌中的研究结果相符。Prasad 等^[8]进一步发现,沉默 SHIP2 蛋白的表达,能够减缓乳腺癌细胞的体外增殖能力及体内肿瘤的生长与肺转移;在乳腺癌细胞株中上调 SHIP2 蛋白表达能够促进 EGFR - Akt 信号通路的激活,促进趋化因子 CXCR4 的表达及肿瘤细胞的体外迁移能力^[9]。但 SHIP2 与抑癌基因 PTEN 的类似作用方式,且同为 PI3K/PIP3/AKT 信号通路负性调节因子的研究结果与本研究结果并不一致。结合现有研究进展,对该相反的观点可以从如下三个方面解释:① SHIP2 除脂质磷酸酶作用外,还可以通过 p130Cas^[10]、filamin^[11]及 Arap3^[12]等中间分子相互作用,从而调控细胞骨架蛋白的重组。另有报道,SHIP2 通过调控肿瘤细胞骨架重组及伪足形成,影响肿瘤细胞的迁移运动,进而影响转移^[13]。② SHIP2 蛋白在 EGFR、EphA2 等癌基因的配体依赖性降解途径中发挥了重要作用,SHIP2 蛋白量及功能异常,将导致 EGFR 及 EphA2 的降解受阻,从而间接发挥了其促肿瘤作用^[10,14]。③ 研究表明,AKT 除由 PI3K 激活,还可由 EGF/EGFR 途径激活^[15]。SHIP2 高表达可通过阻断 EGFR 的内吞降解,从而又可通过 EGFR 途径激活 AKT^[16]。另一方面,SHIP2 使 PI3P 去磷酸化生成磷脂酰肌醇 3,4-二磷酸,而磷脂酰肌醇 3,4-

二磷酸则是 AKT 信号分子的充分激活所必需^[17]。

SHIP2 对喉鳞癌患者预后的影响,目前国内尚未见报道。本研究经过术后随访及生存分析发现,SHIP2 蛋白高表达组与低表达组患者相比,无瘤生存及总生存时间均显著变短。进一步多因素分析发现 SHIP2 蛋白表达水平为喉鳞癌患者的独立影响因素。该结果表明 SHIP2 蛋白在喉鳞癌患者的预后评估中具有重要价值。然而,本研究仅为组织学上的临床相关性分析,尚有待于进一步细胞及动物体内试验阐明 SHIP2 蛋白在喉鳞癌发生发展过程中的作用及是否能成为下一步基因治疗的干预靶点。

参考文献:

- [1] Dyson JM, Kong AM, Wiradjaja F, et al. The SH2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase-2: SHIP2 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(11): 2260 - 2265.
- [2] Sharrard RM, Maitland NJ. Regulation of protein kinase B activity by PTEN and SHIP2 in human prostate - derived cell lines [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(1): 129 - 138.
- [3] Prasad NK, Tandon M, Handa A, et al. High expression of obesity-linked phosphatase SHIP2 in invasive breast cancer correlates with reduced disease-free survival [J]. *Tumour Biol*, 2008, 29(5): 330 - 341.
- [4] Liu Y, Zhang X, Qiu Y, et al. Clinical significance of EphA2 expression in squamous-cell carcinoma of the head and neck [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(5): 761 - 769.
- [5] Bertelli DF, Ueno M, Amaral ME, et al. Reversal of denervation - induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(4): 679 - 687.
- [6] Gupta A, Dey CS. PTEN and SHIP2 regulates PI3K/Akt pathway through focal adhesion kinase [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 309(1-2): 55 - 62.
- [7] Tang X, Powelka AM, Soriano NA, et al. PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23): 22523 - 22529.
- [8] Prasad NK, Tandon M, Badve S, et al. Phosphoinositol phosphatase SHIP2 promotes cancer development and metastasis coupled with alterations in EGF receptor turnover [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(1): 25 - 34.
- [9] Prasad NK. SHIP2 phosphoinositol phosphatase positively regulates EGFR - Akt pathway, CXCR4 expression, and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Int J*

- Oncol, 2009, 34(1): 97-105.
- [10] Prasad NK, Decker SJ. SH2-containing 5'-inositol phosphatase, SHIP2, regulates cytoskeleton organization and ligand-dependent down-regulation of the epidermal growth factor receptor [J]. J Biol Chem, 2005, 280(13): 13129-13136.
- [11] Wang Y, Keogh RJ, Hunter MG, et al. SHIP2 is recruited to the cell membrane upon macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) stimulation and regulates M-CSF-induced signaling [J]. J Immunol, 2004, 173(11): 6820-6830.
- [12] Raaijmakers JH, Deneubourg L, Rehmann H, et al. The PI3K effector Arap3 interacts with the PI(3,4,5)P3 phosphatase SHIP2 in a SAM domain-dependent manner [J]. Cell Signal, 2007, 19(6): 1249-1257.
- [13] Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathways [J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7443-7454.
- [14] Zhuang G, Hunter S, Hwang Y, et al. Regulation of EphA2 receptor endocytosis by SHIP2 lipid phosphatase via phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Rac1 activation [J]. J Biol Chem, 2007, 282(4): 2683-2694.
- [15] Bonaccorsi L, Marchiani S, Muratori M, et al. Gefitinib (IRESSA, ZD1839) inhibits EGF-induced invasion in prostate cancer cells by suppressing PI3K/AKT activation [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(10): 604-614.
- [16] Wu CJ, O'Rourke DM, Feng GS, et al. The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors [J]. Oncogene, 2001, 20(42): 6018-6025.
- [17] Scheid MP, Huber M, Damen JE, et al. Phosphatidylinositol(3,4,5)P3 is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol(3,4)P2 is required for PKB phosphorylation at Ser-473: studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice [J]. J Biol Chem, 2002, 277(11): 9027-9035.

(修回日期:2011-09-21)

· 消息 ·

关于召开 2011 年第六届全国鼻窦及 颅底内镜微创外科新技术学习班的通知

由中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科、中国耳鼻咽喉颅底外科杂志社联合举办的第六届全国鼻窦及颅底内镜微创外科新技术学习班(全国 I 级继续医学教育项目,编号:2011-07-01-095,学分 10 分)于 2011 年 11 月 17~23 日在湖南长沙召开。届时将邀请国内颅底外科领域的知名专家担任授课嘉宾,采用课件授课、手术录像、病例讨论、互动专题讨论、现场解剖示教、现场手术演示等方式授课。

日程安排:2011 年 11 月 17 日报到,上课时间 11 月 18~23 日。

学习地点:湖南长沙留芳宾馆(中南大学湘雅医院后门)。注册费:1000 元/人,安排食宿,费用自理。

会务组联系:1. 湖南长沙湘雅路 87 号湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科,邮编:410008,联系人:章华,电话:(0)15874182329,邮箱:entxy@126.com;2. 湖南长沙湘雅路 87 号中国耳鼻咽喉颅底外科杂志社,邮编:410008,联系人:李惠清,徐芳,电话:0731-84327469。