

· 基础研究 ·

β-连环蛋白表达在鼻咽癌 癌变过程中作用的研究

郑军^{1,2}, 徐丽娜¹, 石磊¹, 范松青¹

(1. 中南大学湘雅二医院 病理科, 湖南 长沙 410011; 2. 长治医学院 生化教研室, 山西 长治 046000)

摘要: 目的 研究 β-连环蛋白(β-catenin)在鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)癌变过程中的作用。方法 免疫组化结合组织微阵列检测 β-catenin 蛋白在 174 例 NPC、71 例异型增生鼻咽黏膜上皮、48 例单纯增生鼻咽黏膜上皮及 63 例正常鼻咽黏膜上皮组织中的阳性表达及其阳性信号的定位。结果 β-catenin 在 NPC 组织细胞浆/细胞核中高表达(71.3%),但其细胞膜呈低阳性表达(19.0%); β-catenin 在 NPC 组织中的细胞浆/细胞核阳性表达率显著高于异型增生鼻咽黏膜上皮、增生鼻咽黏膜上皮和正常鼻咽黏膜上皮($P < 0.01$)。非角化性鼻咽癌和未分化癌组织的 β-catenin 蛋白细胞浆/细胞核异常阳性表达率显著高于角化性鼻咽癌($P < 0.01$)。临床 III 和 IV 期 NPC 组织中 β-catenin 蛋白的细胞浆/细胞核阳性表达率显著高于临床 I 和 II 期($P < 0.01$),有淋巴结转移的 NPC 组织中 β-catenin 蛋白的细胞浆/细胞核阳性表达率显著高于无淋巴结转移 NPC($P < 0.01$)。结论 β-catenin 蛋白在癌细胞细胞浆/细胞核中的过表达在 NPC 发生、发展过程中起重要作用;β-catenin 蛋白细胞浆/细胞核阳性可作为预测鼻咽癌临床进展和侵袭、转移的分子标志。

关键词: 鼻咽癌;组织微阵列;免疫组化;β-连续蛋白

中图分类号: R739.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)02-0085-05

Role of aberrant expression of β-catenin protein in carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma

ZHENG Jun, XU Li-na, SHI Lei, et al.

(Department of Pathology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To study the role of β-catenin protein in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** Immunohistochemical method combined with tissue microarrays were used for detecting the expression and localization of β-catenin protein in nasopharyngeal tissue with different pathological morphology. **Results** Low positive percentage of β-catenin protein expression in cell membrane of NPC (19.0%) and high expression of β-catenin protein in the cytoplasm/nucleus of NPC (71.3%) were detected. The aberrant positive percentage of cytoplasm/nucleus of β-catenin expression in the NPC was significantly higher than those in atypically hyperplastic nasopharyngeal epithelium ($P < 0.01$), simply hyperplastic nasopharyngeal epithelium ($P < 0.01$) and normal nasopharyngeal epithelium ($P < 0.01$), respectively. Expression of β-catenin protein in the cytoplasm/nucleus of keratinizing nasopharyngeal squamous cell carcinoma was significantly lower than that in the undifferentiated nasopharyngeal carcinoma and no keratinizing nasopharyngeal squamous cell carcinoma ($P < 0.01$). The aberrant expression of cytoplasm/nucleus of β-catenin protein in clinical III and IV-staged NPC and NPC with lymph node metastasis was evidently higher than that in I and II-staged NPC ($P < 0.01$) and that without lymph node

基金项目:国家自然科学基金资助(81071820)。

作者简介:郑军,男,助理讲师。

通讯作者:范松青,Email:fansongqing2000@yahoo.com.cn.

metastasis ($P < 0.01$). **Conclusion** The aberrant expression of β -catenin protein in the cytoplasm/nucleus of NPC maybe play an important role in the carcinogenesis, invasion, metastasis and development of nasopharyngeal carcinoma. The cytoplasm/nucleus positive expression of β -catenin might be used as a molecular marker to predict clinical progress and invasive metastasis of NPC.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Tissue microarrays; Immunohistochemistry; β -catenin

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 起源于鼻咽黏膜的多潜能干细胞即柱状上皮的储备细胞和鳞状上皮的基底细胞。鼻咽癌的发生发展涉及多个基因、多条信号传导通路参与的极其复杂的生物学过程^[1-2]。 β -连环蛋白 (β -catenin) 是 Wnt/ β -catenin 经典通路的重要信号传递分子, Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活是以 β -catenin 的结构或功能变化为中心, β -catenin 在多种肿瘤的发生、发展中起重要作用^[3-5]。组织微阵列为大规、高通量同时检测鼻咽黏膜细胞癌变不同阶段组织中相关蛋白的原位表达提供了高通量研究工具^[6]。本研究基于前期的工作基础, 利用已制备的高通量 NPC 组织微阵列^[5-6], 免疫组化检测 β -catenin 蛋白在鼻咽黏膜细胞癌变过程不同病理形态组织中的原位表达水平和表达定位, 探讨 β -catenin 在 NPC 发生、发展中的作用, 评估 β -catenin 是否可作为预测鼻咽癌侵袭、转移和临床进展的分子标志物。

1 材料与方 法

1.1 材 料

高通量鼻咽癌组织微阵列切片是中南大学肿瘤研究所李桂源教授实验室和湘雅二医院病理科联合研制的专利产品^[5-6]。组织微阵列切片 (含 360, 390 个组织点阵两种型号) 共有 174 例 NPC 和 182 例非 NPC 标本 (其中异型增生鼻咽黏膜上皮 71 例、单纯增生鼻咽黏膜上皮 48 例、正常鼻咽黏膜上皮 63 例), 每个标本含 1~3 个组织点。174 例 NPC 中, 男 101 例, 女 73 例; 年龄 23~75 岁, 平均年龄 40.23 岁。根据 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 鼻咽癌分类方案进行临床分期, 其中 I 期 49 例、II 期 60 例、III 和 IV 期 65 例; NPC 伴颈部淋巴结转移 118 例, 无颈部淋巴结转移 56 例。按 WHO NPC 组织学分类^[7], 非角化性癌 167 例, 其中分化型 147 例、未分化型 20 例; 分化差的角化

性癌 7 例。

1.2 免 疫 组 化

免疫组化 S-P 法检测 β -catenin 在组织微阵列切片中的蛋白表达。即用型鼠抗人单克隆抗体 β -catenin 和 AEC 显色试剂盒购于福州迈新生物技术有限公司, S-P 法 (Two-StepTM Anti-Mouse Detection Reagent, HRP) 免疫组化检测试剂盒为 Novocastra Laboratories, Ltd 产品。组织微阵列切片脱蜡、水化后, 3% H_2O_2 室温阻断内源性过氧化物酶 30 min, 切片置于 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中, 高温高压抗原修复 15 min; 正常非免疫血清封闭 30 min; 切片滴加一抗 β -catenin 置密封湿盒 4℃ 孵育过夜。二抗, 25℃ 室温 30 min。AEC 显色, 苏木素复染、水性封片剂封片。试剂提供的阳性对照片作阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结 果 判 断

β -catenin 蛋白阳性表达存在 3 种表达形式, 即细胞膜、细胞浆和细胞核染色。免疫组化评分标准参照文献并稍作修改^[5-6], 由两位病理学专家分别按以下两种方法进行评分: ①根据阳性染色强度判断, 即细胞无染色记 0 分; 细胞呈浅红色, 弱阳性, 记 1 分; 红色并无背景染色, 或细胞呈深红色有浅红色背景, 为中等阳性, 记 2 分; 细胞呈深红色无背景着色, 为强阳性, 记 3 分。②根据阳性细胞百分数计分, 即无阳性细胞计 0 分; 阳性细胞数 $\leq 25\%$ 计 1 分; 阳性细胞数 26%~50% 计 2 分; 阳性细胞数 $> 50\%$ 计 3 分。最终计分结果为上述两种判断标准得分乘积。0、1 分归为阴性病例, 2、3、4、6、9 分归为阳性病例。本实验中用于分析的结果分为阳性和阴性两组, 分别统计比较分析其阳性和阴性百分率。

1.4 统 计 学 方 法

利用 SPSS 16.0 软件进行 χ^2 检验 β -catenin 蛋白表达与 NPC 癌变过程中的临床病理特征的相关性, 以双侧检验水准 $P < 0.05$ 确定为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 β -catenin 蛋白表达和定位与 NPC 癌变过程中不同病理形态组织的相关性

β -catenin 蛋白阳性信号在非肿瘤性鼻咽黏膜上皮细胞主要位于细胞膜,而 NPC 组织中 β -catenin 蛋白存在 3 种表达形式:细胞膜弱阳性染色、细胞核阳性或细胞浆和细胞核共同阳性染色。 β -catenin 在正常鼻咽黏膜上皮和异型增生鼻咽黏膜上皮主要表达于细胞膜,阳性率为 92.1%,33.8% (图 1A,1C), β -catenin 在 NPC 组织细胞膜的阳性表达减弱或缺失,阳性率仅为 19.0%;呈异常的细胞核阳性或细胞浆和细胞核共同阳性为 71.3% (图 1B,1D)。 β -catenin 蛋白在 NPC、异型增生鼻咽黏膜上皮、增生鼻咽黏膜上皮和正常鼻咽黏膜上皮中的表达情况见表 1。鼻咽癌组织中异常 β -catenin 细胞浆/细胞核阳性表达率显著高于异型增生鼻咽黏膜上皮、单纯增生鼻咽黏膜上皮和正常鼻

咽黏膜上皮 ($P < 0.01$);异型增生鼻咽黏膜上皮组织中的 β -catenin 细胞浆/细胞核阳性表达率也显著高于单纯增生鼻咽黏膜上皮和正常鼻咽黏膜上皮 ($P < 0.05$);但正常鼻咽黏膜上皮组织中的 β -catenin 细胞膜阳性率显著高于单纯增生鼻咽黏膜上皮,异型增生鼻咽黏膜上皮和鼻咽癌组织 ($P < 0.01$)。

2.2 β -catenin 蛋白细胞浆/细胞核阳性表达与 NPC 临床病理特征的关系

临床 III 和 IV 期 NPC 组织的 β -catenin 蛋白细胞浆/细胞核异常阳性表达率高于临床 I 和 II 期 ($P < 0.01$), β -catenin 蛋白细胞浆/细胞核异常阳性表达率在淋巴结转移 NPC 组织中显著高于无淋巴结转移 NPC ($P < 0.01$);低分化非角化性鼻咽癌和未分化鼻咽癌组织的 β -catenin 蛋白细胞浆/细胞核异常阳性表达率显著高于分化性角化性鼻咽癌 ($P < 0.05$)。NPC 的组织病理学分型但 β -catenin 蛋白的细胞浆/细胞核异位阳性表达率与 NPC 患者年龄和性别无显著相关 ($P > 0.05$),见表 2。

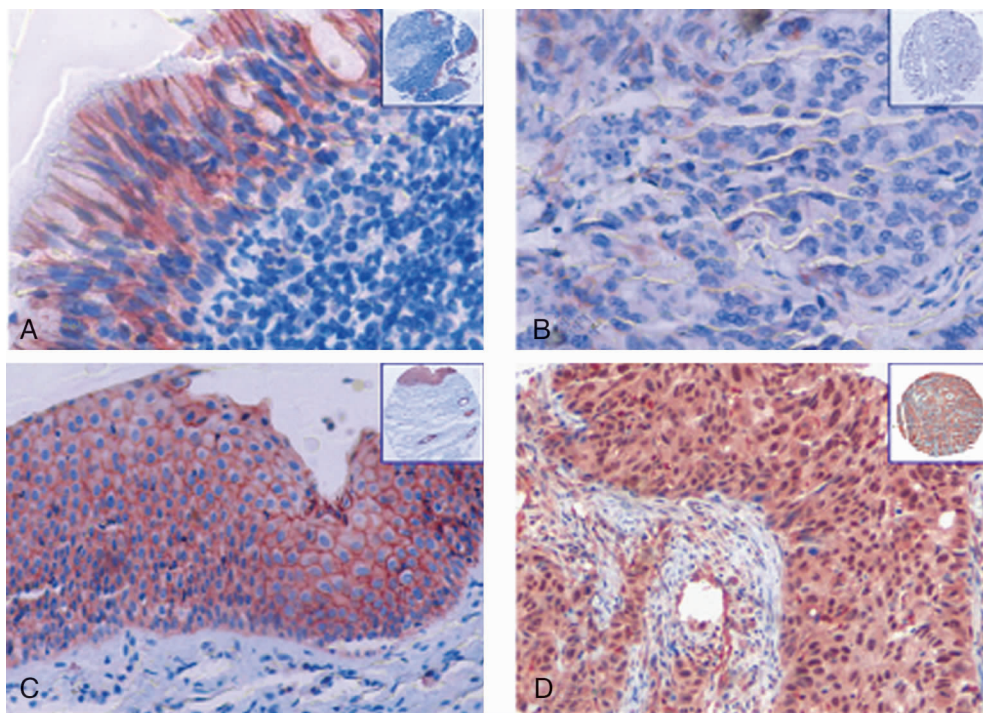


图 1 A: β -catenin 在正常鼻咽黏膜上皮细胞膜的强阳性表达(AEC 染色, $\times 400$);B: β -catenin 在鼻咽癌细胞膜的弱阳性表达(AEC 染色, $\times 400$);C: β -catenin 在异型增生鼻咽黏膜上皮细胞膜的强阳性表达(AEC 染色, $\times 200$);D: β -catenin 在鼻咽癌细胞浆/细胞核强阳性表达(AEC 染色, $\times 200$)

表 1 不同阶段 β -catenin 蛋白的表达 (n, %)

分组	例数	β -catenin 阳性表达	
		细胞膜	细胞核/细胞浆
鼻咽癌	174	33(19.0)	124(71.3)*
异型增生鼻咽黏膜上皮	71	24(33.8)###	36(50.7)**
单纯增生鼻咽黏膜上皮	48	32(66.7)##	4(8.3)
正常鼻咽黏膜上皮	63	58(92.1)#	2(3.2)

注:①#:正常鼻咽黏膜上皮 β -catenin 蛋白细胞膜阳性表达与单纯增生鼻咽黏膜上皮、异型增生鼻咽黏膜上皮和鼻咽癌比较, $P < 0.05$;##:单纯增生鼻咽黏膜上皮与异型增生鼻咽黏膜上皮和鼻咽癌比较, $P < 0.01$;###:异型增生鼻咽黏膜上皮与鼻咽癌比较, $P < 0.01$ 。②*:鼻咽癌 β -catenin 细胞浆/细胞核阳性表达与异型增生鼻咽黏膜上皮、单纯增生鼻咽黏膜上皮和正常鼻咽黏膜上皮比较, $P < 0.01$; **:异型增生鼻咽黏膜上皮与单纯增生鼻咽黏膜上皮和正常鼻咽黏膜上皮比较, $P < 0.05$

表 2 β -catenin 细胞浆/细胞核异位表达与 NPC 临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	β -catenin	
		阳性	阴性
年龄			
≤40 岁	80	56	24
> 40 岁	94	68	26
性别			
男	101	70	31
女	73	54	19
组织类型			
非角化性			
分化型	147	106	41
未分化型	20	16	4
角化性	7	2**	5
临床分期			
I、II	109	69	40
III、IV	65	55#	10
淋巴结转移			
有	118	98	20
无	56	26*	30

注:#:临床 I 和 II 期与临床 III 和 IV 期比较, $P < 0.01$; *:有淋巴结转移与无淋巴结转移比较, $P < 0.01$; **:角化性鳞状细胞癌与非角化性鳞状细胞癌比较, $P < 0.05$

3 讨论

正常成熟组织中的 Wnt/ β -catenin 信号通路处于关闭状态,细胞浆中的 β -catenin 大部分与细胞膜上的 E-cadherin 胞内肽段以及细胞内的 α -catenin 结合,使之附着于细胞骨架蛋白

actin,介导同型细胞间粘附。Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活促进细胞增殖,在多种肿瘤的发生发展中起重要作用。肿瘤细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路异常改变的关键因素是 β -catenin 降解障碍导致细胞浆内游离的 β -catenin 聚集并进入细胞核与 Tcf/Lef 结合,激活下游靶基因 c-myc、cyclinD1、COX-2 等蛋白质的翻译^[3-4]。Zeng 等^[5] 研究发现 Wnt/ β -catenin 通路异常激活可能在 NPC 的癌变中起重要作用。Wnt/ β -catenin 信号通路异常大致分 3 种情况:①组成 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的蛋白或基因被破坏或突变,导致该通路局部异常活跃;②过多的 Wnt/ β -catenin 信号使整个通路都异常活跃,导致细胞异常增殖;③无 Wnt/ β -catenin 信号时,细胞内其他异常因素通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路中一些关键分子,刺激或诱发细胞发生不正常的反应,例如 EB 病毒 LMP-1 能够激活 PI3K/Akt 通路,而 Akt 的激活能引起 GSK3 β 的磷酸化和失活,影响 Wnt/ β -catenin 通路的关键点 β -catenin 的活性,使 β -catenin 在细胞浆内表达增加并发生细胞核移位。研究发现 β -catenin 蛋白膜表达缺失或下降,出现异位核表达与多种肿瘤的发生、发展和侵袭、转移相关^[8-11]。本实验研究结果显示 β -catenin 在 NPC 组织中细胞膜表达减弱或缺失,阳性表达主要位于细胞浆和同时表达于细胞浆和细胞核,NPC 组织呈现细胞浆/细胞核异位高表达,分析发现 NPC 组织中 β -catenin 细胞浆/细胞核阳性表达率显著高于异型增生鼻咽黏膜上皮、增生鼻咽黏膜上皮和正常鼻咽黏膜上皮,这提示 β -catenin 异位高表达于细胞浆/细胞核在 NPC 的发生、发展中起重要作用。下一步需从大样本量的同一患者癌变发展过程的标本中研究细胞浆/细胞核阳性 β -catenin,进一步证实异位高表达于细胞浆/细胞核的 β -catenin 是否可作为鉴别鼻咽部良恶性病变的分子标志物。

文献报道 β -catenin 细胞核异常表达与肠癌、NPC 及神经内分泌癌的转移相关^[8-11]。本实验研究结果进一步分析发现 NPC 中 β -catenin 异常细胞浆/细胞核表达与 NPC 临床分期和淋巴结转移相关。非角化性鼻咽癌组织的 β -catenin 细胞浆/细胞核异常阳性表达率显著高于分化差的角化性癌。 β -catenin 属于黏附分子家族,具有两种明确的功能:①作为 Wnt/

β-catenin 信号通路中下游分子参与转录调节,与胚胎发育及肿瘤的发生有关。生理状态下,β-catenin 通过与跨膜蛋白 E-cadherin 的胞浆区相连接而定位于细胞膜,少量游离的 β-catenin 可被细胞浆内的蛋白酶系统降解,使 β-catenin 在细胞浆内保持较低水平。NPC 组织中存在细胞核 β-catenin 水平高表达,表明细胞核 β-catenin 异常增加在 NPC 发生中起重要作用;②维持组织结构的完整性和极性,介导细胞间同质粘附。肿瘤细胞从原发部位脱落作为肿瘤转移的重要环节与细胞黏附功能降低密切相关。β-catenin 除参与 Wnt/β-catenin 信号转导外,还作为细胞黏附分子与上皮细胞钙黏蛋白 E-cadherin 结合,介导同种细胞间粘附。β-catenin 与 E-cadherin 形成复合体,细胞粘附功能增加,E-cadherin/β-catenin 复合体的表达及功能障碍与上皮肿瘤的恶性分化、侵袭和转移有关^[3-4,8-11]。本研究结果提示 β-catenin 的表达水平与 NPC 的侵袭、转移和病变的临床进展相关,β-catenin 异常表达可能是 NPC 获得高侵袭和转移潜能的原因之一。笔者计划下一步利用分子生物学方法失活或抑制 β-catenin 表达,从细胞和动物模型水平进一步研究阐明 β-catenin 在鼻咽癌侵袭、转移中的作用。

β-catenin 在细胞浆/细胞核异位高表达可能在 NPC 的发生、发展过程中可能起重要作用,其可作为 NPC 临床进展和转移预测的分子标志物。

参考文献:

- [1] Chou J, Lin YC, Kim J, et al. Nasopharyngeal carcinoma-review of the molecular mechanisms of tumorigenesis[J]. *Head Neck*, 2008, 30(7): 946-963.
- [2] Zong YS, Zhong BL, Liang YJ, et al. Advancement of studying the biological characteristics of nasopharyngeal carcinogenesis[J]. *Ai Zheng*, 2002, 21(6): 686-695.
- [3] Fu Y, Zheng S, An N, et al. β-catenin as a potential key target for tumor suppression[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(7): 1541-51.
- [4] 徐丽娜,范松青. Wnt/β-catenin 信号转导通路异常及其在鼻咽癌发生中的作用[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(4): 316-320.
- [5] Zeng ZY, Zhou YH, Zhang WL, et al. Gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(1): 120-133.
- [6] 黄东海,田勇泉,肖健云,等. 组织微阵列研究 eIF4E 在鼻咽癌中的表达及其临床意义[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2005, 11(1): 1-4.
- [7] Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition[J]. *Cancer*, 1993, 71(8): 2689-2697.
- [8] Li Z, Ren Y, Lin SX, et al. Association of E-cadherin and beta-catenin with metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chin Med J*, 2004, 117(8): 1232-1239.
- [9] Cheng H, Liang H, Qin Y, et al. Nuclear beta-catenin overexpression in metastatic sentinel lymph node is associated with synchronous liver metastasis in colorectal cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2011, 6(1): 109.
- [10] Suzuki H, Masuda N, Shimura T, et al. Nuclear beta-catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(3B): 1821-1830.
- [11] Chetty R, Serra S, Asa SL. Loss of membrane localization and aberrant nuclear E-cadherin expression correlates with invasion in pancreatic endocrine tumors[J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(3): 413-419.

(修回日期:2012-02-20)

(上接第84页)

- [7] Derya Gumurdulu, Seyda Erdogan, Fazilet Kayaselcuk, et al. Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and P53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters[J]. *World journal of gastroenterology*, 2007, 13(3): 426-431.
- [8] Joo YE, Rew JS, Seo YH, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 37(1): 28-33.
- [9] 费素娟,朱祖安,刘莹,等. 胃癌组织中 COX-2 的表达及其与 P53 和 VEGF 的关系[J]. *徐州医学院学报*, 2004, 24(6): 498-501.
- [10] Huang SP, Wu MS, Shun CT, et al. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma[J]. *J Biomed Sci*, 2005, 12(1): 229-241.

(修回日期:2012-03-01)