

Claudin-1 与 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

李武杰¹, 李勇强¹, 张樊苹¹, 杨振刚¹, 李大军¹, 潘新良²

(1. 泰安市中心医院 耳鼻咽喉科 山东 泰安 271000; 2. 山东大学齐鲁医院 耳鼻咽喉头颈外科, 山东 济南 250012)

摘要: **目的** 研究 Claudin-1 与 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达情况, 分析它们与下咽鳞状细胞癌各临床因素及患者预后之间的关系。**方法** ①选取 97 例下咽鳞状细胞癌组织学标本及 90 例癌旁正常黏膜组织标本, 采用免疫组化的方法比较 Claudin-1 和 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌及正常黏膜组织中表达的差异, 分析两者在下咽鳞状细胞癌中的表达与临床因素及患者预后之间的关系; ②选取 30 位下咽鳞状细胞癌患者术后的癌组织及癌旁正常黏膜, 采用 RT-PCR 方法, 检测 Claudin-1 和 cyclinB1 的表达并定量分析, 探讨两者的相关性。**结果** ①Claudin-1 与 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌中的阳性表达率均明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$); ②Claudin-1 蛋白表达与肿瘤的分化程度 ($P = 0.004$) 和淋巴结转移 ($P = 0.026$) 有关, 与患者的生存率相关 ($P = 0.003$); ③CyclinB1 蛋白表达与肿瘤的分化程度 ($P < 0.001$) 有关; ④Claudin-1 与 cyclinB1 呈明显正相关关系 ($r = 0.482, P < 0.001$)。**结论** Claudin-1 和 cyclinB1 具有协同作用, 二者的高表达可能促进了下咽癌的发生与发展。**关键词:** 下咽鳞状细胞癌; Claudin-1; CyclinB1; 免疫组化; RT-PCR
中图分类号: R739.63

Expressions of claudin-1 and cyclinB1 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and their clinical significance

LI Wujie¹, LI Yongqiang¹, ZHANG Fanping¹, Yang Zhengang¹, LI Dajun¹, PAN Xinliang²

(1. Department of Otorhinolaryngology, Taian Central Hospital, Taian 271000, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of claudin-1 and cyclinB1 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma(HSCC) and its adjacent tissues, and to analyze their relationship with clinical factors and prognosis of patients with HSCC. **Methods** ①The histological specimens of 97 cases with complete clinical pathological data of the patients with HSCC were selected as the research object, and 90 cases of adjacent normal mucosa tissues as the control group. The expressions of claudin-1 and cyclinB1 in HSCC and normal mucosa were analyzed by immunohistochemistry. It was analyzed for the relationship between the clinical factors and the prognosis of patients. ②The expressions of claudin-1 and cyclinB1 in 30 cases of HSCC and its adjacent tissues were analyzed by RT-PCR, and to explore the correlation between them. **Results** ①Both Claudin-1 and cyclinB1 were highly expressed in HSCC compared to adjacent tissues ($P < 0.05$). ②Claudin-1 protein expression was correlated with tumor differentiation ($P = 0.004$) and lymph node metastasis ($P = 0.026$). Kaplan-Meier analysis showed that Claudin-1 was associated with patient survival($P = 0.003$). ③The expression of cyclinB1 was correlated with the differentiation degree of tumor ($P < 0.001$). Claudin-1 was positively correlated with cyclinB1 ($P < 0.001$). ④The relationship between claudin-1 and cyclinB1 was significantly positive correlation($r = 0.482, P < 0.001$). **Conclusion** The highly expressions of claudin-1 and cyclinB1 with synergistic effects may contribute to the carcinogenesis and development of hypopharyngeal carcinoma.
Keywords: Hypopharyngeal squamous cell carcinoma; Claudin-1; CyclinB1; Immunohistochemical; RT-PCR

基金项目:山东省泰安市科技发展计划(引导计划)项目(2018NS)。
第一作者简介:李武杰,男,博士,副主任医师,Email:ta3709@126.com

下咽癌发病率较低,约占头颈部恶性肿瘤的 3%~5%^[1],90% 以上为鳞状细胞癌。因原发肿瘤位置隐蔽,不易发现,多数下咽鳞状细胞癌患者就诊时已是晚期。目前多采用手术治疗,同时辅以放射治疗和/或化学药物治疗等综合治疗方法,但患者预后仍然较差^[2]。下咽鳞状细胞癌患者的总体生存率相对较低,5 年总生存率为 30%~45%^[1]。因此,寻找理想的肿瘤标志物成为新的研究热点,为寻求肿瘤靶向治疗提供研究方向和理论依据。

紧密连接是位于上皮细胞及内皮细胞间的一种重要结构,在维持细胞稳态、维系上皮细胞间黏附和保持细胞的极性中发挥重要作用^[3],claudin 蛋白是紧密连接的主要封闭蛋白^[4],其表达数量和分布结构的变化直接影响细胞膜表面功能区紧密连接的结构和功能。Claudin-1 属于 claudins 蛋白家族成员之一,在多种肿瘤中出现异常表达,这种异常的表达方式已被证实与肿瘤的发生、发展密切相关。

CyclinB1 是一个经典的细胞周期蛋白,参与细胞周期检查点调控,促进 G2/M 期转换而加速细胞周期进程^[5]。研究显示,cyclinB1 失控性的表达与肿瘤细胞的转化和恶性增殖密切相关^[6],所以 cyclinB1 有可能成为一个潜在的肿瘤诊断标志。本研究采用免疫组化和实时定量 PCR 的方法,测定 claudin-1 和 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌组织及癌旁组织中的表达情况,分析 claudin-1 和 cyclinB1 与下咽鳞状细胞癌的临床病理特征之间的关系,同时分析它们与患者预后之间的关系,以期为下咽鳞状细胞癌的早期诊断和预后判断提供分子生物学指标,为寻求肿瘤靶向治疗提供研究方向。

1 材料与方法

1.1 标本收集

实验标本来自于 2008 年 1 月—2011 年 4 月在山东大学齐鲁医院耳鼻咽喉头颈外科住院并手术治疗的 97 例下咽鳞状细胞癌患者,同时取癌旁组织 90 例作为对照,癌旁组织均距肿瘤切缘 2 cm 以上,形态学观察为正常的黏膜组织,常规石蜡包埋;同时收集 30 例配对的下咽鳞状细胞癌患者新鲜癌组织和癌旁组织,标本切取后迅速放入液氮罐中并转移置 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。所有患者术前均未接受放射治疗、化疗或免疫治疗;均行标准根治性手术,且手术切缘均为阴性,术后均行放射治疗,剂量为 50~65 Gy。所有病例均按国际抗癌联合会

(UICC,2002)的 TNM 分期标准进行临床病理分期和分型。患者随访时间为 3~5 年,所有患者均具有完整的临床病理资料;按照以下临床项目进行分组:年龄、性别、吸烟史、饮酒史、病理分化程度、TNM 分期及淋巴结转移情况。所有病例标本收集前,均告知患者或家属,征得书面同意,均经过山东大学齐鲁医院伦理委员会审核通过。

1.2 试验材料与方法

1.2.1 免疫组化 Claudin-1 (ZA-0365) 和 cyclinB1 (ZA-0384) 试剂均购于北京中衫金桥生物公司。免疫组织化学染色 PV9000 二步法

1.2.2 定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 引物设计:引物由上海生工公司合成。GAPDH 为内参照物,引物序列分别见表 1。

表 1 引物序列

分类	基因双向引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	片段长度(bp)
claudin-1	F CAG CTG TTG GGC TTC ATT CTC	60	260
	R ATC ACT CCC AGG AGG ATG CC		
cyclinB1	F CAG TCA GAC CAA AAT ACC TAC	62	191
	TGG GT		
GAPDH	R ACA CCA ACC AGC TGC AGC ATC	60	102
	TTC TT		
GAPDH	F CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG	60	102
	R GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G		

1.3 免疫组化结果判定

经两位有经验的病理科医生分别阅片,独立观察并记录免疫组化的染色结果,claudin-1 阳性颗粒为黄色,cyclinB1 阳性颗粒呈棕黄色或淡黄色,定位于细胞膜/细胞质。参照标准^[7],按照至少 10 个 400 倍视野下染色细胞计数所占比例进行分级。综合染色强度和阳性细胞所占比例进行半定量测定。染色强度评分标准:见表 2。两者评分相加,0~2 分为阴性(-),2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。所有结果均进行双盲读片,3 分及以上为高表达,2 分及以下为低表达。

1.4 实时定量 PCR 结果的计算

明确 RT-PCR 的扩增曲线和溶解曲线,记录每个样本的 Ct 值(通过 Rotor-Gene 3000 程序计算所得)。内参为 GAPDH,以配对的癌旁黏膜组织为对照,以采用比较循环阈值($2^{-\Delta\Delta Ct}$)分析样本中 claudin-1 和 cyclinB1 的相对表达量^[8]。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计分析软件进行统计分析。

应用 Pearson χ^2 检验分别分析两个标志物与各临床因素之间的关系。两组样本间的比较分别采用独立样本 Mann-Whitney 双尾检验。生存分析采用 Log Rank test 方法。当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。用单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型,研究下咽鳞状细胞癌各临床因素及 claudin-1、cyclinB1 的表达水平对下咽鳞状细胞癌患者预后的影响。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,确定影响下咽鳞状细胞癌患者预后的独立危险因素。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 2 染色强度及阳性细胞数测定

评分标准	分数
染色强度	
不着色	0
黄色	1
棕黄色	2
黄褐色	3
阳性细胞数	
< 10%	0
10% ~ 40%	1
41% ~ 70%	2
> 70%	3

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

2.1.1 Claudin-1 与 cyclinB1 免疫组化分析 应用免疫组织化学染色方法,对 97 例下咽鳞状细胞癌组织和 90 例癌旁黏膜组织进行检测,结果显示 claudin-1 在细胞膜和细胞质中都有表达,但是主要表达在细胞质(核膜周围)。CyclinB1 蛋白阳性表达产

物位于细胞浆,呈棕黄色颗粒。Claudin-1 在 73.2% (71/97) 的癌组织中高表达,而仅在 30% (27/90) 的癌旁组织中高表达。CyclinB1 蛋白在 64.9% (63/97) 的下咽鳞状细胞癌组织中呈现高表达,而仅在 23.3% (21/90) 的癌旁组织中呈高表达。应用统计学分析发现,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.1.2 Claudin-1 和 cyclinB1 蛋白在下咽鳞状细胞癌中的表达与各临床因素的相关性分析 应用 Pearson χ^2 检验进行统计学分析,结果显示 claudin-1 蛋白表达与下咽鳞状细胞癌的分化程度 ($P = 0.004$) 和淋巴结转移 ($P = 0.026$) 有关系;cyclinB1 蛋白表达与下咽鳞状细胞癌的分化程度 ($P < 0.001$) 有关系,与其他临床因素间无明显相关性(表 3)。

2.1.3 Claudin-1、cyclinB1 与患者生存分析 97 例下咽鳞状细胞癌患者,术后均获得随访。采用 Log Rank test 方法进行生存分析,发现 claudin-1 高表达组与低表达组的 5 年生存率分别为 30.99% (22/71) 和 50.00% (13/26),差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.879, P = 0.003$) (图 2A);cyclinB1 高表达组与低表达组的 5 年生存率分别为 38.09% (24/63) 和 41.18% (14/34),差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.051, P = 0.305$),见图 2B。

2.1.4 Claudin-1、cyclinB1 表达水平在单因素及多因素分析中对下咽鳞状细胞癌患者预后的影响 以下咽鳞状细胞癌患者的 5 年累计总生存率为因变量 (Y),以年龄、性别、病理分化程度、临床分期、淋巴结转移及 claudin-1、cyclinB1 蛋白表达水平 7 个因素为协变量 (X),建立 Cox 回归模型进行单因素及多因素分析。单因素分析结果发现病理分化程度、

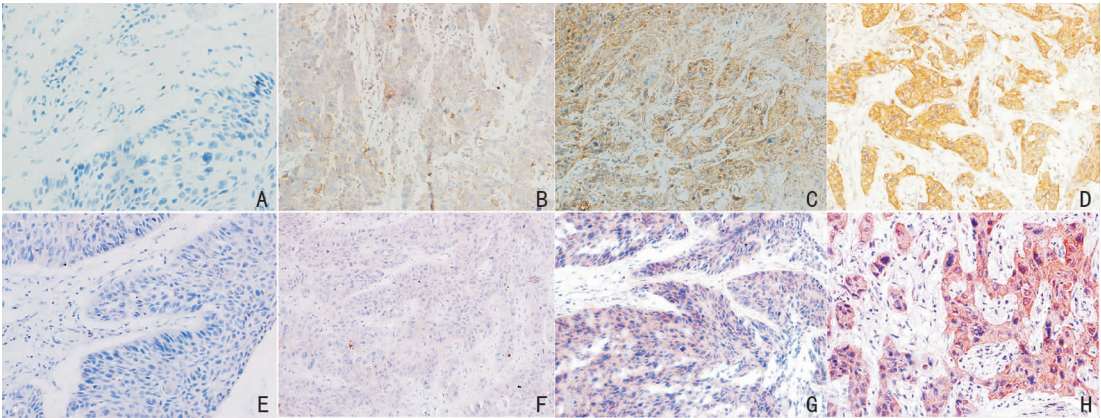


图 1 Claudin-1 与 cyclinB1 免疫组化染色结果 (× 200) A:claudin-1 在肿瘤中阴性表达; B:claudin-1 在肿瘤中弱阳性表达; C:claudin-1 在肿瘤中的中度阳性表达; D:claudin-1 在肿瘤中强阳性表达; E:cyclinB1 在肿瘤中的阴性表达; F:cyclinB1 在肿瘤中的弱阳性表达; G:cyclinB1 在肿瘤中的中度阳性表达; H:cyclinB1 在肿瘤中的强阳性表达

表 3 实验组 claudin-1 及 cyclinB1 的表达与各临床因素的关系 [例(%)]

临床因素	例数	claudin-1				cyclinB1			
		低表达	高表达	χ^2	P	低表达	高表达	χ^2	P
年龄(岁)									
<60	54	17(17.5)	37(38.1)			22(22.7)	32(33.0)		
≥60	43	9(9.3)	34(35.1)	1.832	0.175	12(12.4)	31(32.0)	2.061	0.135
性别									
女	9	5(5.2)	4(4.1)			5(5.2)	4(4.1)		
男	88	21(21.6)	67(69.1)	3.695	0.055	29(29.9)	59(60.8)	1.751	0.162
吸烟史									
无或少量	19	8(8.2)	11(11.3)			8(8.2)	11(11.3)		
大量	78	18(18.6)	60(61.9)	3.020	0.085	26(26.8)	52(53.6)	0.845	0.322
饮酒史									
无或少量	35	13(13.4)	22(22.7)			16(16.5)	19(19.6)		
大量	62	13(13.4)	49(50.5)	3.281	0.069	18(18.6)	44(45.4)	3.075	0.077
病理分化									
高、中分化	62	20(20.6)	42(43.3)			26(26.8)	36(37.1)		
低、未分化	35	6(6.2)	29(29.9)	10.297	0.004*	8(8.2)	27(27.8)	22.561	<0.001*
TNM 分期									
I、II	18	3(3.1)	15(15.5)			6(6.2)	12(12.4)		
III、IV	79	23(23.7)	56(57.7)	1.442	0.221	28(28.9)	51(52.6)	0.344	0.548
淋巴结转移									
无	35	14(14.4)	21(21.6)			15(15.5)	20(20.6)		
有	62	12(12.4)	50(51.5)	4.860	0.026*	19(19.6)	43(44.3)	1.932	0.161

注：* $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

淋巴结转移、临床分期及 claudin-1 蛋白表达水平对下咽鳞状细胞癌患者预后的影响具有统计学意义(P 均 < 0.05)。多因素分析结果发现淋巴结转移及 claudin-1 蛋白表达水平是下咽鳞状细胞癌患者独立的预后因子,具有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 4。

表 4 Cox 比例风险回归模型分析下咽鳞状细胞癌患者预后的危险因素

临床因素	单因素分析		多因素分析	
	Exp(B)	P	Exp(B)	P
年龄(<60/≥60岁)	0.062	0.803	0.503	0.478
性别(男/女)	0.391	0.532	0.330	0.566
病理分化程度(高、中/低、未)	5.804	0.016*	0.393	0.530
临床分期(I、II/III、IV)	4.211	0.040*	2.733	0.098
淋巴结转移(有/无)	0.226	<0.001*	29.241	0.001*
claudin-1 表达(高/低)	6.259	0.011*	4.934	0.026*
cyclinB1 表达(高/低)	1.346	0.246	4.249	0.119

注：* $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.1.5 Claudin-1 和 cyclinB1 蛋白的相关性 在 71 例 claudin-1 阳性高表达的下咽鳞状细胞癌组织中,有 56 例 cyclinB1 呈阳性高表达。而在 34 例 cyclinB1 低表达的患者中有 19 例 claudin-1 低表达,应用 spearman 相关关系进行检验分析,显示在下咽鳞状细胞癌组织中,claudin-1 和 cyclinB1 蛋白的表达呈显著正相关($r = 0.482, P < 0.001$),见表 5。

表 5 CyclinB1 与 claudin-1 蛋白在下咽鳞状细胞癌组织中表达的相关性分析

蛋白名称	cyclinB1		合计
	低表达	高表达	
claudin-1	低表达	19	7
	高表达	15	56
	合计	34	63
			97

2.2 实时定量 PCR 结果

2.2.1 RT-PCR 结果分析 本实验通过 RT-PCR 实验观察 claudin-1(图 3)及 cyclinB1(图 4)在下咽鳞状细胞癌组织和癌旁黏膜组织中均有表达。

2.2.2 Claudin-1mRNA 与 cyclinB1mRNA 表达的检测 对 30 例配对资料获得的数据处理成相对定量值。结果显示:在下咽鳞状细胞癌中,与癌旁正常黏膜组织相比,claudin-1 mRNA 在肿瘤组织中的表达增高(2.58 ± 1.42 vs $1.74 \pm 1.08, P = 0.001$),见图 5A;cyclinB1mRNA 在肿瘤组织中的表达明显增高(3.39 ± 1.11 vs $2.34 \pm 1.26, P = 0.008$),见图 5B;应用统计学分析显示,差异均有统计学意义。同时,在下咽鳞状细胞癌组织以及癌旁正常黏膜组织中,claudin-1mRNA 与 cyclinB1mRNA 之间均呈正相关,Spearman 等级分析结果显示具有统计学意义(图 6)。

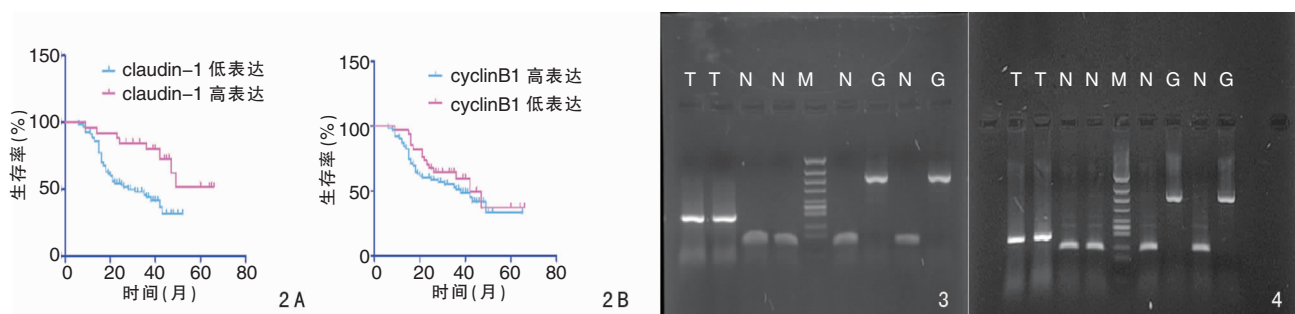


图 2 Kaplan-Meier 生存曲线分析 claudin-1 与 cyclinB1 表达水平对下咽鳞状细胞癌患者预后的影响 2A: claudin-1 高表达组患者 5 年生存率显著低于低表达组患者 ($P=0.003$); 2B: cyclinB1 高表达组患者 5 年生存率略低于低表达组患者 ($P=0.305$)

图 3 Claudin-1 在下咽癌组织和癌旁组织中的表达

图 4 CyclinB1 在下咽癌组织和癌旁组织中的表达

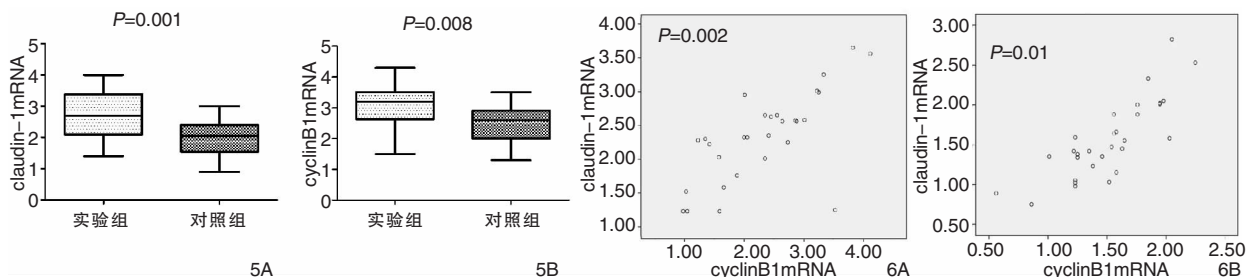


图 5 两种蛋白在肿瘤组织中的表达增高 5A: claudin-1mRNA 在肿瘤组织中的表达; 5B: cyclinB1mRNA 在肿瘤组织中的表达 图 6 在两组组织中 claudin-1mRNA 与 cyclinB1mRNA 之间均呈正相关 6A: 实验组; 6B: 对照组

3 讨论

人类 claudin-1 定位于人染色体 3q28-q29, 编码 211 个氨基酸, 参与细胞间的黏附调节^[9]。目前研究发现, claudin-1 在不同的肿瘤中有不同的表达方式(上调或下调), 其异常表达使上皮细胞渗透屏障功能破坏、细胞极性丧失、细胞间黏附力下降, 从而导致肿瘤的发生发展^[10]。

Jung 等^[11]用免疫组化的方法检测发现 claudin-1 蛋白在肠型胃癌中表达量低于周围正常组织。Chao 等^[12]通过检测肺腺癌患者 claudin-1mRNA 的表达发现, claudin-1 在肺腺癌发生转移和侵袭的组织中表达下调, 呈弱表达; claudin-1 蛋白表达低者总体生存率低。而张承敏等^[13]研究发现, claudin-1 在卵巢癌中高表达, claudin-1 的高表达可能是卵巢癌重要的标志物。贾志伟等^[14]用免疫组化研究发现: claudin-1 在大肠癌中的表达较正常组织明显增高, 并且与大肠癌的发生发展关系密切。

本研究发现在 mRNA 水平及蛋白水平上, claudin-1 在下咽鳞状细胞癌中的表达均高于癌旁组织, 且 claudin-1 蛋白表达与肿瘤的分化程度有关 ($P =$

0.004), 提示 claudin-1 在下咽鳞状细胞癌的发生、发展过程中具有重要的作用。Claudin-1 蛋白表达与下咽鳞状细胞癌的淋巴结转移有关 ($P = 0.026$); 其原因考虑为 claudin-1 的高表达可能促进了细胞迁移活性, 提高了肿瘤的侵袭能力, 可能通过淋巴管发生局部或远处转移, 参与了下咽鳞状细胞癌的淋巴结转移过程, claudin-1 有可能成为判断下咽鳞状细胞癌淋巴结转移的一个重要指标。Kaplan-Meier 分析显示: claudin-1 高表达患者的生存率明显低于低表达患者, 二者差异具有统计学意义 ($P = 0.003$); Cox 多因素分析结果发现 claudin-1 蛋白表达水平是下咽鳞状细胞癌患者独立的预后因子, 这个发现为下咽鳞状细胞癌的诊断、预后评估和治疗方案的选择提供了重要依据, claudin-1 高表达患者术后需要更多的干预措施。

CyclinB1 是一个经典的细胞周期蛋白, 是控制细胞进入 G2/M 期的主要调控元件^[15], 其表达水平和位置随细胞周期的进展而发生变化。Yuan 等^[15]研究发现, 应用 RNA 干扰抑制 cyclinB1 表达, 使其低表达或表达缺失, 细胞周期的 G2/M 期受到阻滞, 细胞的生长受到了抑制, 同时诱导细胞出现了凋亡, 提示 cyclinB1 影响了细胞的有丝分裂, 其正常表达

在细胞有丝分裂起始调控中起重要作用。

目前研究表明,肿瘤是一类细胞周期疾病,细胞周期调控失常是细胞失控性增殖导致癌变的重要原因^[16],与肿瘤的恶性增殖有着密切的关系,主要表现为细胞的分裂失控和凋亡障碍。CyclinB1/细胞周期依赖性激酶2 (cell division cycle2, CDC2) 复合物是细胞周期 G2/M 期检查点的关键调节因子^[17]。CyclinB1 在癌细胞中出现过表达,与 CDC2 形成 cyclinB1/CDC2 复合物,启动有丝分裂,越过了细胞周期检查点,致使细胞有丝分裂及生长失控,导致了细胞的失控性增殖,并最终导致肿瘤形成^[18]。目前已有报道 cyclinB1 在多种肿瘤中都出现高表达,在肿瘤的发生发展过程中起重要作用。

Yasuda 等^[19]应用免疫组化检测胃癌时发现 cyclinB1 呈高表达,考虑 cyclinB1 可能参与了胃癌的发生。申漫里等^[20]在对人类乳腺癌细胞株的研究中发现, cyclinB1 的过度表达使细胞周期关键点的转化时期缩短,细胞周期的进程加快,使细胞出现失控性增殖,从而导致细胞癌变。另外,在脑星形细胞瘤^[21]、宫颈癌^[22]、舌鳞癌^[23]、结肠癌^[24]等肿瘤中, cyclinB1 都出现高表达,导致细胞失控性生长,从而促进了肿瘤细胞的发生和进展, cyclinB1 有可能成为一个潜在的肿瘤诊断标志。

我们研究发现在 mRNA 水平及蛋白水平上, cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌中的表达均高于癌旁组织中的表达,且差异均具有统计学意义,考虑在下咽鳞状细胞癌中, cyclinB1 过度表达导致了细胞周期控制缺失,进入 G2/M 期的细胞百分比增加,使细胞出现失控性增殖,从而导致细胞癌变,可能与下咽鳞状细胞癌的发生、发展有关。

在蛋白水平上, cyclinB1 与肿瘤的分化程度有关,而与其他临床指标无关,考虑 cyclinB1 过度表达可能与更具有侵袭性的细胞表型及更高的恶性潜能有关^[25],可作为肿瘤恶性潜能的指征。在舌鳞癌^[23]研究中显示: cyclinB1 过表达与患者的生存率有关。而我们研究发现在下咽癌中 Kaplan-Meier 分析显示: cyclinB1 高表达患者的生存率略低于低表达患者,但二者差异没有统计学意义,考虑生存率与患者的自身条件、精神状态、就诊时间及经过、治疗方式、术中术后并发症及临床分期均有关,影响因素很多,同时不同肿瘤组织器官的特异性、分期或异质性不同, cyclinB1 的表达亦不同,在患者生存因素中所占的比重也不同,我们认为 cyclinB1 不能独立作为下咽鳞状细胞癌患者预后的判断指标。

Yoon 等^[26]研究发现 claudin-1 过表达可增强基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2) 的表达和活性,而 cyclinB1 也可促进 MMP-2 的分泌,通过后者降解间质为癌细胞的转移提供基础^[27]。Claudin-1 高表达可导致 T 细胞因子 (T cell factor, Tcf) - 淋巴样增强因子 (lymphoid enhancing factor, Lef) / β -链蛋白 (β -catenin) 激活^[28],该复合物作为转录因子能够诱导与细胞增殖、存活和侵袭相关的癌基因表达^[29],从而调控细胞周期。本研究也发现: claudin-1 及 cyclinB1 两者在下咽鳞状细胞癌组织中的表达呈正相关 ($r = 0.482, P < 0.001$),推测 claudin-1 可能参与了细胞周期调控和细胞分化过程, claudin-1 与 cyclinB1 共同作用促进了肿瘤的发生发展。

综上所述,两种标志物 (cyclinB1 和 claudin-1) 在下咽鳞状细胞癌中都存在高表达现象, cyclinB1 与下咽鳞状细胞癌的分化程度有关, claudin-1 与下咽鳞状细胞癌的分化程度及淋巴结转移均有关, cyclinB1 和 claudin-1 在下咽鳞状细胞癌组织中的表达呈正相关,两者结合对下咽鳞状细胞癌患者术后辅助治疗及预后判断有一定的指导意义。此外, claudin-1 与患者的生存率相关,可作为下咽鳞状细胞癌术后的监测指标,可能成为下咽鳞状细胞癌治疗的一个新的靶点。

参考文献:

- [1] 周梁. 下咽癌的治疗进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2019, 25(4): 333 - 338.
- [2] 徐鸥, 贾巧静, 王建星, 等. GPR81 与 TOMM20 在下咽癌中的功能研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2019, 25(5): 498 - 503.
- [3] 项航, 王伟, 林文楚. Claudin 蛋白在胃癌中的作用及其临床研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(8): 910 - 915.
- [4] Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport[J]. Traffic, 2001, 2(2): 93 - 98.
- [5] Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, et al. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4344 - 4349.
- [6] Song Y, Zhao C, Dong L, et al. Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(2): 307 - 315.
- [7] Ishida M, Kushima R, Okabe H. Claudin expression in rectal well-differentiated endocrine neoplasms (carcinoid tumors)[J]. Oncol Rep, 2009, 21(1): 113 - 117.

- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [9] 金浩, 谈斌, 庞青. 下调 claudin-1 对胆囊癌细胞 SGC996 生物学行为的影响[J]. *中国继续医学教育*, 2019, 11(11): 167–171.
- [10] 翁立强, 陈俊, 张春萍, 等. 紧密连接蛋白 Claudin-1, 2, 3, 4 在表皮肿瘤中的表达[J]. *福建医药杂志*, 2018, 40(5): 8–11.
- [11] Jung H, Jun KH, Jung JH, et al. The Expression of Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, and Claudin-4 in Gastric Cancer Tissue [J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): e185–191.
- [12] Chao YC, Pan SH, Yang SC, et al. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(2): 123–133.
- [13] 张承敏, 斯琴, 贾立周. Claudin-1 与卵巢癌相关性的研究进展[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2014, 36(2): 193–196.
- [14] 贾志伟, 邢贺楠, 刘晓川, 等. claudin-1 和 E-cadherin 蛋白在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *癌症进展*, 2019, 17(13): 1583–1585.
- [15] Yuan J, Krämer A, Matthess Y, et al. Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo[J]. *Oncogene*, 2006, 25(12): 1753–1762.
- [16] Karagoz ID, Ozaslan M, Cengiz B, et al. CDC 25A gene 263C/T, -350C/T, and -51C/G polymorphisms in breast carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2010, 31(6): 597–604.
- [17] 赵春玲, 宋咏梅, 樊飞跃, 等. 细胞周期蛋白 cyclin B1 与肿瘤[J]. *肿瘤*, 2007, 27(4): 322–326.
- [18] Barascu A, Besson P, Le Floch O, et al. CDK1-CyclinB1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(2): 196–208.
- [19] Yasuda M, Takesue F, Inutsuka S, et al. Overexpression of CyclinB1 in gastric cancer and its clinicopathological significance: an immunohistological study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(8): 412–416.
- [20] 申漫里, 冯永东, 高纯, 等. 细胞周期蛋白 B1 在肿瘤细胞中的非时相表达[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(3): 215–218.
- [21] Badie C, Bourhis J, Sobczak-Thépot J, et al. p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(3): 642–650.
- [22] 郑健, 王琨. CyclinB1, HPV16 蛋白在宫颈组织芯片中的表达及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(3): 1050–1052.
- [23] Hassan KA, El-Nagar AK, Soria JC, et al. Clinical significance of cyclin B1 protein expression in squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(8): 2458–2462.
- [24] 赵钰, 卢启明. PTTG1 和 cyclinB1 在结肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(10): 943–945.
- [25] Yin XY, Grove L, Datta NS, et al. Inverse regulation of cyclin B1 by c-Myc and p53 and induction of tetraploidy by cyclin B1 overexpression [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(17): 6487–6493.
- [26] Yoon CH, Kim MJ, Park MJ, et al. Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(1): 226–233.
- [27] Kawamoto H, Uozumi T, Kawamoto K, et al. Type IV collagenase activity and cavernous sinus invasion in human pituitary adenomas [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 1996, 138(4): 390–395.
- [28] Dhawan P, Singh AB, Deane NG, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(7): 1765–1776.
- [29] Arabzadeh A, Troy TC, Turksen K. Role of the Cldn6 cytoplasmic tail domain in membrane targeting and epidermal differentiation in vivo [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(15): 5876–5887.

(收稿日期: 2019–11–26)

本文引用格式: 李武杰, 李勇强, 张樊苹, 等. Claudin-1 与 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2020, 26(5): 537–543. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202005013

Cite this article as: LI Wujie, LI Yongqiang, ZHANG Fanping, et al. Expressions of claudin-1 and cyclinB1 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and their clinical significance [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2020, 26(5): 537–543. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202005013