

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00636

## 口腔鳞状细胞癌组织癌性锚蛋白重复序列蛋白的表达及意义

王 良<sup>1</sup>, 蔡小攀<sup>1</sup>, 王国栋<sup>1</sup>, 徐正耘<sup>1</sup>, 何 金<sup>2</sup>, 吴 洋<sup>1\*</sup>

- 1. 第二军医大学长征医院口腔科, 上海 200003
- 2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨癌性锚蛋白重复序列(gann ankyrin repeats, gankyrin)蛋白在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组化方法检测 55 例口腔鳞状细胞癌组织及癌旁黏膜组织中 gankyrin 蛋白表达水平, 观察口腔鳞状细胞癌不同临床病理特征下 gankyrin 蛋白的表达差异, 分析其可能的临床价值。**结果** 口腔鳞状细胞癌组织中 gankyrin 蛋白表达远高于癌旁黏膜组织( $P=0.000$ )。高、中低分化鳞癌组间 gankyrin 蛋白表达差异有统计学意义( $P=0.006$ ); 不同性别、年龄及有无淋巴结转移鳞癌组 gankyrin 蛋白表达差异无统计学意义。**结论** Gankyrin 蛋白高表达于口腔鳞状细胞癌, 且与肿瘤分化程度相关。

**[关键词]** 口腔肿瘤; 鳞状细胞肿瘤; gankyrin 蛋白; 免疫组织化学; 预后

**[中图分类号]** R 739.85 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0636-04

### Expression of ankyrin repeats in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance

WANG Liang<sup>1</sup>, CAI Xiao-pan<sup>1</sup>, WANG Guo-dong<sup>1</sup>, XU Zheng-yun<sup>1</sup>, HE Jin<sup>2</sup>, WU Yang<sup>1\*</sup>

- 1. Department of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
- 2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of ankyrin repeats in oral squamous cell carcinoma(OSCC) and its clinical significance. **Methods** The expression of gankyrin protein was detected by immunohistochemical method in 55 OSCC specimens and the corresponding para-cancer non-tumor tissues; the differential expression of gankyrin protein was analyzed in OSCC specimens of different pathological characteristics; we also analyzed the possible clinical value of the differential expression. **Results** Expression of gankyrin in the OSCC tissues was significantly stronger than that in the corresponding para-cancer non-tumor tissues ( $P=0.000$ ). Gankyrin protein expression was significantly different between OSCC tissues of high, low and moderate differentiation ( $P=0.006$ ). We also found that the expression of gankyrin was not associated with the sex, age, or lymphatic status of OSCC patients. **Conclusion** Gankyrin protein is over-expressed in OSCC tissues, which might be related to the differentiation degree of OSCC.

**[Key words]** mouth neoplasms; squamous cell neoplasms; gankyrin protein; immunohistochemistry; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6): 636-639]

口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部常见的恶性肿瘤, 由于其所在部位血供丰富, 恶性程度较高, 预后较差。癌性锚蛋白重复序列(gann ankyrin repeats, gankyrin)是一种在肝细胞癌中普遍激活的癌蛋白<sup>[1]</sup>, 是包含 6 个锚蛋白(ankyrin)重复序列的蛋白质<sup>[2]</sup>, 可以与 Rb 蛋白<sup>[1]</sup>、CDK4<sup>[3]</sup>、野生型 p53、mdm2 等结合<sup>[4]</sup>, 作为 Rb 蛋白和野生型 p53 的共同负向调节物, 主要通过抑制 Rb 基因和野生型 p53

活性促进细胞增殖, 同时 gankyrin 还可通过 Ras 通路促使细胞发生恶性转化, 共同促进肿瘤的发生和发展<sup>[1,3,5]</sup>。目前 gankyrin 的研究主要集中在肝癌组织<sup>[1,6-7]</sup>, 鲜有口腔鳞癌的相关研究。本研究采用免疫组化染色观察口腔鳞癌组织中 gankyrin 蛋白的表达, 分析不同临床病理特征下 gankyrin 蛋白的表达情况, 探讨 gankyrin 蛋白在口腔鳞癌发生、发展中的可能作用。

**[收稿日期]** 2011-03-24 **[接受日期]** 2011-04-29

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会科研计划(054119630)。Supported by Project of the Science and Technology Committee of Shanghai (054119630).

**[作者简介]** 王 良, 硕士. E-mail: wlmm1980@sina.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885944, E-mail: oralwuyang@gmail.com

## 1 材料和方法

1.1 一般资料 选择2001年5月至2008年5月在第二军医大学长征医院口腔科接受根治性切除术的病历资料完备的口腔鳞状细胞癌病例标本(病理科存档蜡块)共55例。所有病例术前均未进行化疗、放疗及免疫治疗。其中男38例,女17例;年龄31~85岁,中位年龄58岁。肿瘤位于唇黏膜8例、舌部26例、颊黏膜10例、牙龈11例。参照2002年国际抗癌联盟(UICC)唇及口腔癌分期方案进行临床TNM分期,按WHO分级方案进行病理分级,高分化鳞癌30例,中分化22例,低分化3例。有颈淋巴结转移24例,无颈淋巴结转移31例。截至2009年12月,随访时间为5~98个月,中位随访时间27个月。55例口腔鳞状细胞癌失访4例,有效随访51例。预后评价:以术后局部复发或颈部淋巴结转移为不良预后,其中预后差20例,预后好31例。

1.2 免疫组化染色 兔抗人gankyrin多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Japan, diluted 1:50), DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),即用型免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。石蜡标本连续切片,切片厚度4  $\mu\text{m}$ ,采用EnVision两步法,严格按照免疫组化试剂盒说明书进行操作。以已知gankyrin蛋白阳性表达的肝癌组织作阳性对照;以PBS代替一抗作阴性对照。结果判定:gankyrin蛋白阳性信号均呈棕黄色颗粒样物质,主要位于胞核内。镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个),按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定。由

2位病理专家各自独立进行判断,采用二级计分法统计结果,并取平均值(mean score, MS)。判断标准:根据染色强度将结果分为3级,分别表示为:+, ++, +++;根据单位视野阳性细胞数占相邻切片H-E染色平均总细胞数的百分比分为0~100。然后二者相乘即为最后评分。理论上结果的范围为0~300分<sup>[8]</sup>。

1.3 统计学处理 采用SPSS 18.0统计软件,所有数据根据方差齐性检验结果采用完全随机秩和检验或单因素方差分析,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 口腔鳞状细胞癌组织gankyrin蛋白的表达 免疫组化结果显示,gankyrin蛋白定位于肿瘤细胞的胞核内,呈棕黄色颗粒,阴性对照均无阳性信号显示,阳性对照有明显阳性信号显示。本研究gankyrin阳性表达的标准:经二级评分法评分大于或等于40分者为阳性。在口腔鳞癌组织中,gankyrin蛋白的表达水平相对较高(图1A、1B、1D、1E),阳性表达率为69.09%(38/55);在相应的癌旁上皮组织中,gankyrin蛋白的表达水平则较低,阳性细胞主要分布于基底膜上,角化层细胞未见表达(图1C、1F),阳性表达率为27.27%(15/55),两者间差异有统计学意义( $P=0.000$ ,表1)。

2.2 不同临床病理特征口腔鳞癌组织gankyrin蛋白的表达特点 中分化和低分化口腔鳞癌组织gankyrin蛋白表达水平高于高分化鳞癌组织( $P<0.05$ ),而不同年龄、性别、肿瘤部位、预后及有无淋巴结转移组gankyrin的表达差异无统计学意义(表2)。

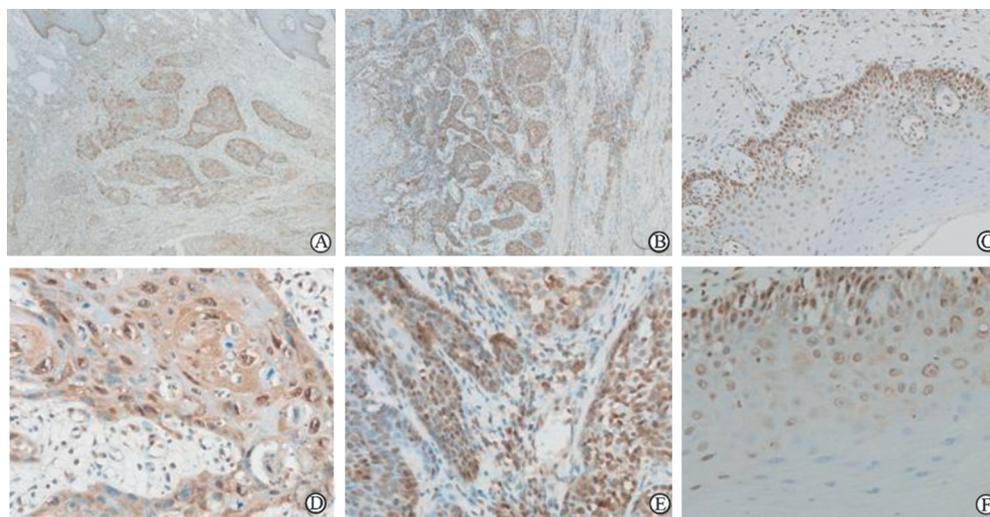


图1 口腔鳞癌组织及癌旁组织gankyrin蛋白的表达

Fig 1 Immunohistochemical staining for gankyrin protein(EnVision)

A, D: Well-differentiated OSCC; B, E: Poorly-differentiated OSCC; C, F: Corresponding para-cancer tissues. Original magnification:  $\times 200$ (A-C),  $\times 400$ (D-F)

表 1 口腔鳞癌及癌旁上皮组织中 gankyrin 蛋白的表达

Tab 1 Immunohistochemical evaluation of gankyrin protein in OSCC and para-cancer tissue

Group	N	Gankyrin expression				P value
		≤40	41-90	91-155	≥156	
OSCC tissue	55	17	7	14	17	0.000
Para-cancer tissue	55	40	9	6	0	

表 2 不同临床病理特征口腔鳞癌组织 gankyrin 蛋白的表达差异

Tab 2 Correlation between gankyrin protein expression and clinicopathological findings of OSCC patients

Group	N	Gankyrin expression				P value
		≤40	41-90	91-155	≥156	
Primary anatomic localization						
Lip	8	4	0	2	2	0.289
Tongue	26	6	4	6	10	
Buccal	10	2	2	4	2	
Gingiva	11	5	1	3	2	
Neck lymph node metastasis status						
Matastasis	24	8	3	7	6	0.732
Non-matastasis	31	9	4	7	11	
Histologic classification						
Well-differentiated	30	14	3	6	7	0.006
Moderately-differentiated	22	2	3	8	9	
Poorly-differentiated	3	0	0	1	2	
Prognosis						
Well prognosis	31	10	4	6	11	0.481
Poor prognosis	20	7	3	6	4	
Gender						
Male	38	11	4	10	13	0.638
Female	17	6	3	5	3	
Age (year)						
≤57	26	6	3	7	10	0.234
>57	29	11	4	8	6	

### 3 讨论

肝癌组织 gankyrin 蛋白的表达及意义是目前研究的热点。Higashitsuji 等<sup>[1]</sup>通过比较肝癌组织与正常肝组织的 cDNA 首次发现肝癌组织中存在 gankyrin mRNA 超表达。Umemura 等<sup>[6]</sup>研究了 gankyrin 在肝细胞癌中的蛋白表达,发现其在肝细胞癌中的蛋白表达水平高于周围非癌肝组织。而 Fu 等<sup>[7]</sup>研究发现,在肝细胞癌组织中 gankyrin 的过表达往往预示着低生存率并且术后易复发。Gankyrin 除了在肝细胞癌中过表达外,在肝再生组织及爆发性肝衰竭(FHF)中亦过表达<sup>[9]</sup>。肝外组织的研究并不多见。研究发现食管鳞癌<sup>[10]</sup>、结肠癌<sup>[11]</sup>及胰腺癌<sup>[12]</sup>等肿瘤中存在 gankyrin 过表达,并且与肿瘤的临床表现及预后关系密切,提示 gankyrin 基因可能是一种在肿瘤中广泛表达的原癌基因。

本研究采用免疫组化技术检测了口腔鳞状细胞癌中 gankyrin 蛋白的表达,结果表明:口腔鳞癌组

织中 gankyrin 蛋白的表达高于癌旁组织,与文献<sup>[10]</sup>结果基本一致。本研究还发现:口腔鳞癌组织分化程度越低,gankyrin 蛋白阳性表达率及表达强度就越高,这提示 gankyrin 蛋白的过表达可能会降低口腔鳞癌分化程度,增强细胞增殖能力,表现出强大的抗分化和抗凋亡的癌基因作用。一般认为,口腔鳞癌分化程度是评价肿瘤生物学行为的重要指标之一,检测 gankyrin 蛋白的表达水平可以帮助临床医师判断肿瘤的分化程度及发展阶段。但 gankyrin 蛋白的表达上调是口腔鳞癌分化所必需的,还是口腔鳞癌分化中的伴随事件,仍需要进一步的研究来证实。本研究未发现 gankyrin 蛋白与口腔鳞癌患者的年龄、性别、肿瘤部位、淋巴结转移和生存时间等指标相关,而在与口腔鳞癌类似的食管鳞癌中发现 gankyrin 与肿瘤低生存率、原发灶大小、淋巴结转移、远处淋巴结转移等临床病理指标相关。这提示 gankyrin 蛋白与口腔鳞癌的发生、发展和预后等方面的作用机制比较复杂,可能有其他基因参与协

同作用,这有待于进一步采用大样本资料研究来证实。

此外,在头颈部鳞状细胞癌的淋巴结转移研究中,有学者建立了一种四基因模型,包括 gankyrin (PSMD10)、HSD17B12、FLOT2 和 KRT17。通过检验,这种四基因模型对头颈部鳞癌淋巴结转移和非转移预测的准确性达 77%。这种预测不依赖于临床标准,如年龄、淋巴结状态、肿瘤分级、分化和部位<sup>[13]</sup>。这提示口腔癌的发生、发展是一个复杂的过程,与多个基因和多个分子水平变化密切相关,联合检测多基因在口腔鳞癌中的表达情况,有助于我们将分子生物学标志物与肿瘤的组织学特征结合起来,为临床诊断和预后判断提供简便有效的方法,为临床选择治疗方法提供更科学合理的依据。

#### [参考文献]

- [1] Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas[J]. *Nat Med*, 2000, 6: 96-99.
- [2] Manjasetty B A, Quedenau C, Sievert V, Büsow K, Niesen F, Delbrück H, et al. X-ray structure of human gankyrin, the product of a gene linked to hepatocellular carcinoma[J]. *Proteins*, 2004, 55: 214-217.
- [3] Krzywda S, Brzozowski A M, Al-Safty R, Welchman R, Mee M, Dawson S, et al. Crystallization of gankyrin, an oncoprotein that interacts with CDK4 and the S6b (rpt3) ATPase of the 19S regulator of the 26S proteasome [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59(Pt 7): 1294-1295.
- [4] Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Nagao T, Sumitomo Y, et al. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8: 75-87.
- [5] Jin B F, He K, Wang H X, Bai B, Zhou T, Li H Y, et al. Proteomics analysis reveals insight into the mechanism of H-Ras-mediated transformation[J]. *J Proteome Res*, 2006, 5: 2815-2823.
- [6] Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, et al. Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2008, 47: 493-502.
- [7] Fu J, Chen Y, Cao J, Luo T, Qian Y W, Yang W, et al. p28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  pathways [J]. *Hepatology*, 2011, 53: 181-192.
- [8] Lombardi D P, Geradts J, Foley J F, Chiao C, Lamb P W, Barrett J C. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 5724-5731.
- [9] Iwai A, Marusawa H, Kiuchi T, Higashitsuji H, Tanaka K, Fujita J, et al. Role of a novel oncogenic protein, gankyrin, in hepatocyte proliferation[J]. *J Gastroenterol*, 2003, 38: 751-758.
- [10] Ortiz C M, Ito T, Tanaka E, Tsunoda S, Nagayama S, Sakai Y, et al. Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122: 325-332.
- [11] Tang S, Yang G, Meng Y, Du R, Li X, Fan R, et al. Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9: 88-95.
- [12] Meng Y, He L, Guo X, Tang S, Zhao X, Du R, et al. Gankyrin promotes the proliferation of human pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2010, 297: 9-17.
- [13] Rickman D S, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasylyk C, Muller D, et al. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 6607-6622.

[本文编辑] 周燕娟, 贾泽军