维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0053-03

AR与cyclinD1、p16在喉鳞癌发病中作用及其相互关系

李康泰，吴家廉，骆文龙，曹 前，冷 志
（重庆医科大学第二临床学院耳鼻咽喉科 重庆 400010）

【摘 要】目的：探讨雄激素受体（AR）与细胞周期蛋白D1（cyclinD1）、p16基因三者在喉鳞癌中的作用及相互关系。方法：应用AR、cyclinD1、p16单克隆抗体，通过免疫组化S-P法检测44例喉鳞癌和11例癌旁组织中的AR、cyclinD1、p16的表达。结果：AR、cyclinD1、p16在喉鳞癌上皮组织中阳性表达分别是68.2%，56.8%，52.3%，与癌旁正常组织对照，两者差异有显著性（$P<0.05$），AR与cyclinD1的表达呈正相关，同样cyclinD1与p16的表达呈正相关，而AR与p16之间无相关性，同时发现AR、cyclinD1、p16的阳性表达与临床及病理分级无相关性（$P>0.05$）。结论：AR、cyclinD1、p16蛋白阳性表达在喉鳞癌的发生和发展中起重要作用。AR在喉鳞癌上皮细胞的阳性表达可作为诊断喉鳞癌的辅助指标。

【关键词】喉肿瘤；鳞状细胞癌；雄激素受体；细胞周期蛋白D1；p16
【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-06-06

Study on the effect of AR, cyclinD1, p16 in laryngeal squamous cell carcinoma and their interaction

LI Kangtai, et al
(Department of Otorhinolaryngology, Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: In order to explicate the effect of AR, cyclinD1, p16 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and their relation between each other. *Methods*:The expressions of AR., cyclinD1 and p16 in 44 specimens of laryngeal squamous cell carcinoma and 11specimens of normal tissue adjacent to tumors were studied immunohistochemically. *Results*: The positive rate of AR, cyclinD1, p16 in tumors was 68.2%. 56.8%, 52.3%. But only one or two of eleven normal tissues adjacent to tumors expressed AR, cyclinD1, p16. There was statistical correlation between laryngeal carcinoma and normal tissues adjacent to tumors ($P<0.05$); The positive expression of AR, cyclinD1, p16 protein expression rate did not correlate with sex, age position, TNM staging , differentiation grading and lymph node metastasis of the tumors($P< 0.05$). There were positive correlation between AR and cyclinD1 ($P>0.05$), cyclinD1 and p16 ($P<0.05$), no correlation between AR and p16. *Conclusion*: The expression of AR, cyclinD1 and p16 protein might play an important role in the oncogenesis and development of LSCC.The expression of AR protein on epithelial cells of the tumors may be a new indicator of diagnosis of LSCC.

【Key words】Tumors of larynx; Squamous cell carcinoma; Androgen receptor; cyclinD1; p16

喉鳞癌的发病率有显著性别差异（男女之比10:1），女性喉鳞癌发病率同样明显受到体内雄激素水平影响。故推测喉鳞癌是雄激素依赖性肿瘤，雄激素受体（Androgen receptor AR）也可能是喉鳞癌的生长刺激因子，它与靶基因上雄激素应答元件相互作用，参与调控基因转录。细胞周期D1基因(cyclinD1基因)被认为是一种癌基因，受某些生长刺激因子启动,与CDK4蛋白结合，并经磷酸/脱磷酸化后，促使与细胞周期相关蛋白基因表达，从而加速对细胞生长分裂的正相作用。另一种抑癌基因p16与cyclinD1竞争结合CDK4，从而导致cyclinD1失活。如果二者调节失控，细胞有可能呈现自主性增殖和分裂，形成肿瘤。为了进一步认识AR与cyclinD1、p16三者在喉鳞癌中的作用和相互关系，我们应用免疫组化方法，对44例喉鳞癌患者标本中AR、cyclinD1、p16的表达进行检测分析，并探讨其表达的临床意义。

1 材料与方法

作者介绍：李康泰（1961- ），男，副主治医师。
主要研究方向：头颈肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

44例石蜡标本取自于我科1998－1999年喉癌手术患者。男42例，女2例，平均年龄60岁（47～82岁），44例均未接受放疗或化疗；按照UICC（1987年）临床分期：Ⅰ、Ⅱ期28例，Ⅲ、Ⅳ期16例，声门上型6例，声门型38例，伴有颈淋巴结转移4例、肺转移1例。喉鳞癌标本均经病理诊断，癌旁正常组织标本取自44例中的11例。

1.2 方法

标本经10%甲醛固定、石蜡包埋、4μm连续切片、作HE和S-P法免疫组化染色。p16、cyclinD1、AR单克隆抗体和S-P免疫组化即用型试剂盒均购自福建Maxim公司。组化染色前，切片经0.01M柠檬酸盐为缓冲剂的高温高压抗原修复。用已知上述抗体染色阳性的组织作阳性对照，PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。凡肿瘤细胞内出现棕色颗粒/团块为阳性、阳性细胞为0记作（－），阳性细胞数占肿瘤细胞数<30%为（+），31%-60%为（++），>60%为（+++）。

1.3 统计方法

统计学处理采用 x^2 检验。

2 结 果

2.1 AR、cyclinD1 和p16 在喉鳞癌中的表达（见表1）

AR阳性表达主要是在喉鳞癌上皮细胞核中、可见浆核型，阳性表达占68.2%（见图1）。癌旁正常上皮细胞中AR表达均为浆型，阳性表达仅占9.09%。两者差异有显著性（P <0.05）。另外发现癌旁正常上皮组织中腺体有AR表达，阳性表达为72.7%。cyclinD1主要是喉鳞癌上皮细胞的浆型表达，无浆核型和核型，阳性表达占56.8%（见图2），癌旁正常上皮细胞阳性表达为18.2%。p16在喉鳞癌上皮细胞中以核型表达为主（见图3），阳性表达为52.3%（见图3），癌旁正常上皮细胞阳性表达占9.09%。

2.2 AR，cyclinD和p16阳性表达与喉鳞癌患者的临床及病理的关系

由表2可见喉鳞癌的AR，cyclinD1 和p16蛋白阳性表达率与病人的性别、年龄、肿瘤生长部位TNM分期、病理分级和淋巴结转移均无相关性。

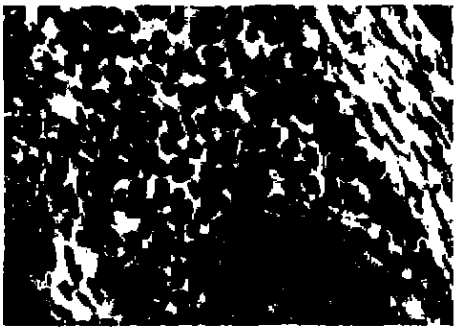


图1 喉鳞状上皮癌，AR胞核阳性染色，S-P染色 × 400

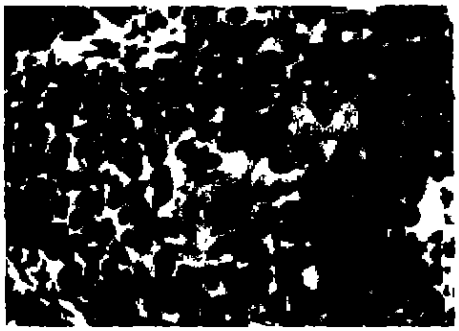


图2 喉鳞状上皮癌，cyclinD1胞浆阳性染色，S-P染色 × 400



图3 喉鳞状上皮癌，p16胞核阳性染色，S-P染色 × 400

3 讨 论

3.1 AR在正常喉组织、喉鳞癌的表达

研究表明，喉癌和正常喉粘膜中均有AR存在，Aufdemort[1]等检测狒狒的正常喉组织，显示声带肌肉和间质中含有大量的AR，而上皮组织呈阴性表达。Marugo[2]等报告了24例正常喉组织中AR阳性高达70.8%，但未说明是上皮或间质。本研究发现AR在正常复鳞上皮细胞中阳性表达极少，但粘膜下腺

表1 喉鳞癌与癌旁正常组织中AR、cyclinD1、p16表达情况

类型	n	AR				CyclingD1				p16			
		－	+	++	+++	－	+	++	+++	－	+	++	+++
喉癌	44	14	15	11	4	19	4	9	12	21	8	12	3
癌旁组织	11	10	1			9	2			10	1		

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 喉鳞癌患者AR,cyclinD1,p16阳性表达与临床及病理特征的关系

临床和病理特征		n	AR(+)染色		cyclingD1(+)染色		p16(+)染色		P
			n	%	n	%	n	%	
1性别	男	42	28	66.70	24	57.10	22	52.40	>0.05
	女	2	2	100	1	50	1	50	
2年龄	≤60岁	17	11	64.70	13	76.50	10	52.90	>0.05
	>60岁	27	19	70.30	12	44.40	13	51.90	
3.喉癌部位	声门型	38	25	65.80	22	57.60	19	50	>0.05
	声门上型	6	5	83.30	3	50	4	66.70	
4.TNM分期	Ⅰ-Ⅱ期	28	18	64.30	15	53.60	17	60.70	>0.05
	Ⅲ期	16	12	75.00	6	62.50	6	37.50	
5.分化程度	Ⅰ-Ⅱ级	26	18	69.20	14	53.80	11	42.30	>0.05
	Ⅲ级	18	12	75.00	11	61.10	12	66.70	
6.淋巴结转移	有	4	4	100.00	3	75.00	3	75.00	>0.05
	无	40	26	65.00	1	2.50	2.50	18	

体中阳性表达较高，占72.7%，这说明喉组织为了维持正常的生长、分化、形态和功能，一直受雄激素的调节。国外学者相继报导测定喉鳞癌组织中AR阳性水平不等，近期国内学者王静清等运用DCC法证明了33例喉鳞癌上皮组织中均存在AR，蛋白含量较高，kd3-16.9fmol/mg蛋白[3]。我们运用S-P免疫组化技术发现AR在喉鳞癌上皮细胞中阳性表达为68.2%，这说明一旦AR大量表达在喉复鳞上皮细胞中时，就有可能导致上皮细胞的异常增殖。因此，有可能将AR在喉复鳞上皮细胞中的表达状况作为判断喉上皮癌变的临床辅助指标之一。至于大量阳性表达的AR是究竟如何呈现在喉上皮中的，其确切机理尚待进一步阐明。

有研究表明，喉癌患者的体内血清睾丸酮水平与正常相比明显升高，且无性别差异。Vihko等认为体内的雄激素水平，可能影响细胞内的AR的合成和分布，胞浆中的AR与激素结合后，形成激素-受体复合物，在一定条件下，被运输到胞核，作用于染色体，诱导RNA合成[4]。从切片染色结果中来看，正常喉组织主要是胞浆染色，喉鳞癌除了胞浆染色外，主要是胞核着色。正常体内睾丸酮激素水平较低，不能使AR形成激素-受体复合物转运到胞核，因此，Vecerina认为检测胞核AR比胞浆AR更重要[5]。

3.2 AR, cyclinD1, p16阳性表达与临床相关性

有报告p16蛋白与TNM分期、组织学分级程度有显著性差异，呈负相关。Schuuring[6]认为cyclinD1及基因扩增与预后差和淋巴结转移有关，但也有研究表现AR、p16、cyclinD1过度表达与肿瘤大小，分级，淋巴结转移无显著关系。本文资料显示AR、cyclinD1、p16三者的阳性表达与临床和病理分级的差异无显著性意义（$P>0.05$）。由于AR在喉鳞癌上皮细胞中过量表达，不少学者认为喉鳞癌抗激素治疗是有效的。Sogami[7]等用氟硝丁酰胺治疗21例PC，其中19例取得了较满意的临床疗效。然而Douglas仍用氟硝丁酰胺治疗10例晚期喉癌，其结果令人失望[8]。通过PC组织和体外培养的肿瘤细胞中发现AR基因突变达40种，PC中AR突变可造成①AR失活，②AR的配体结合特异性降低，多发于外显子8中Thr 877-Ala，使得抗雄激素剂也能激活该突变体AR[9]，③突变使AR转录活性增强。所以，雄激素治疗是否有效，并不完全依赖于AR的扩增，还有得于AR基因突变后的类型来确定。这可能是临床上抗雄激素治疗效果不理想的原因。本实验结果证实AR、cyclinD1、p16三者在喉鳞癌发生，分化及发展中起重要作用。AR在喉鳞癌上皮组织的过量表达，与癌旁正常组织有显著性差异，有可望将其作为临床诊断指标之一。

参 考 文 献

[1] Aufdemort TB, sheridan PJ, Holt GR, et al. Audior adiographic evidence of sex steroid receptors in laryngeal

（下转第58页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

3.2 结肠各段癌肿阳性率明显高于直肠癌

本组（表1）资料显示结肠各段癌肿阳性率明显高于直肠癌。结肠癌与对照组均值有显著性的差异（$P<0.05$），直肠癌与对照组的差异无显著性（$P>0.05$），结肠癌与直肠癌的差异有显著性（$P<0.05$），但结肠癌不同部位之间的差异无显著性（$P>0.05$）。提示血浆DD水平检测，结肠癌较直肠癌更有临床意义。本组中3例结肠癌（1例升结肠、1例横结肠、1例降结肠），1例直肠癌出现下肢深静脉血栓形成、术前血浆DD水平均较高。提示结肠癌较直肠癌患者更易出现血栓形成，是否与结肠癌患者凝血和纤溶系统异常比直肠癌变化更明显有关，有待进一步研究。大肠癌患者术前应注意凝血纤溶系统的变化，以防术中、术后出现栓塞或血栓形成，甚至DIC等并发症。

3.3 病理分期与DD阳性率和均值呈递增关系

本组（表2）结果显示病理分期与DD阳性率和均值呈递增关系，与对照组比较，差异有显著性（$P<0.05$），但A期均值水平较正常对照组低，有待研究。B期、C期与A期间差异有显著性（$P<0.05$），但B期和C期间差异不明显。Bothaso[6]报道DD水平变化与黑色素瘤的临床分期有关。本组亦显示B、C期DD水平显著高于A期，我们认为术前DD水平检测可帮助了解大肠癌的临床分期及预后判断。

3.4 癌肿分化程度越低，DD阳性率和均值则递增

本组（表3）结果显示癌肿分化程度越低，DD阳性率和均值则递增，与对照组差异有显著性（$P<0.05$），中分化、低分化、粘液腺癌DD水平明显高于高分化腺癌（$P<0.05$），虽然中分化与低分化之间、低分化与粘液腺癌之间无明显差异，但中分化与粘液腺癌之间有显著性差异（$P<0.05$），提示大肠癌分化越差，DD水平升高越明显，患者纤溶系统异常越严重、更易出现DIC和静脉血栓形成。因此，术前对DD的检测有助于了解大肠癌分化程度、帮助判断其病情和预后。

参 考 文 献

[1] 郭永亮、孙秉中、袁跃传. D-二聚体与恶性肿瘤[J]. 临床血液学杂志，1999;12(2):95-96.

[2] 裘法祖，孟承伟. 外科学[M]. 第四版. 北京：人民卫生出版社，1997;517-521.

[3] Edoute Y, Haim N, Rinkevich D, et al. Cardiac valvular vegtations in cancer patients: a prospective echocardiographic stuny of 200 patients[J]. Am J Med, 1997; 102(3):252-258.

[4] Zurborn KH, Duscha H, Gram J, et al Investigation of coagulation system and fibrinolysis in patients with disseminated adenocarinomas and non-Hodgkin's lymphomas [J]. Oncology, 1990;47(5): 376-380.

[5] Nakashima J, Tachibana M, Ueno M, et al. Tumor necrosis factor and coagulopathy in patients with prostate cancer[M]. Cancer Res, 1995; 55(21):4881-4885.

[6] Adamson AS, Francis JL, Witherow RO, et al. Coagulopathy in prostate. cancer patients: provalence and clinical relevance[J]. Am R Coll Surg Engl, 1993; 75(2):100-104.

（上接第55页）

tissues of the baboon[J]. Laryngoscope,1983; 93:1607-1611.

[2] Marugo M .Cytosolic and nuclear androgen receptor activity in the cancer of the larynx[J]. J Endocrinal Invest, 1987; 10:465-470.

[3] 王静清，董 震，朱建国，等. Androgen receptors in Laryngeal Carcinoma and their clinical significance[J].Clin Medical J,1991;104:992-995.

[4] Vihko R,Vieriko P . Determinations of steroid receptors and their clinical applications[J].Acta Obstet Gynecol Scand Suppl, 1981;101:21-28.

[5] Vecerina Volic S, Sott J,Mckihaa GE,et al .Androgen receptors in normal and neoplastic Laryngeal tissue[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg , 1987;113:411-413.

[6] Schuuring E,Verhoeven E, Tinteren H, et al . Amplification of genes within the chromosome llq13 region is indicative of poor prognosis in patients with operable breast cancer[J]. Cancer Res, 1992;52:5229-5234.

[7] Sogami PC,Kleiger RE,Helm G,et al .Experience with flutamide in previonsly untreated patients with advanced prostatic cancer[J]. J Urol,1979;122:640-634.

[8] Donglas E,Mattox DE,Miller J, et al. Androgen receptors and antiandrogen therapy for laryngeal carcinoma[J]. Arch Otolaryngol 1984;110:721-724.

[9] Gottlieb B,Trifiro M, Lumbroso R, et al. The androgen receptor gene mutations database[J] . Nucleic Acids Res ,1997; 25:157-161.