

Parkin 蛋白在鼻咽癌中表达及临床意义

倪海峰 周 珍 江 波 李 勇 黄光武

摘 要 **目的** 研究 Parkin 蛋白在鼻咽癌中表达及临床意义。**方法** 运用 Elivision TM S-P 免疫组化技术的方法检测 54 例鼻咽癌组织和 16 例正常鼻咽上皮组织 Parkin 蛋白表达水平,分析 Parkin 蛋白表达与鼻咽癌患者临床病理特征关系。**结果** 54 例鼻咽癌组织 Parkin 蛋白表达水平为“-”23 例,“+”12 例,“++”7 例,“+++”12 例,16 例正常鼻咽上皮组织 Parkin 蛋白表达水平为“-”0 例,“+”0 例,“++”3 例,“+++”13 例,鼻咽癌组织 Parkin 蛋白表达明显降低($P < 0.05$),Parkin 蛋白表达与患者年龄、性别、T 分期、TNM 分期、病理类型无明显关系($P > 0.05$),而与淋巴结转移有关($P < 0.05$)。**结论** Parkin 基因在鼻咽癌的发生发展中起抑癌基因作用,Parkin 蛋白表达可作为判断鼻咽癌临床预后预测指标。

关键词 Parkin 鼻咽癌 蛋白表达

[中图分类号] R739.6 [文献标识码] A

Expression of Parkin Protein in Human Nasopharyngeal Carcinoma and Its Clinical Significance. Ni Haifeng, Zhou Zhen, Jiang Bo, et al. Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To study the expression of Parkin protein in human nasopharyngeal carcinoma (NPC) and its clinical significance. **Methods** The immunohistochemical (Elivision TM S-P) method was used to detect the expression of Parkin protein in 54 cases of human NPC tissues and 16 cases of normal nasopharyngeal epithelia tissues, The relationship between protein expression of the gene and clinical data was analyzed. **Results** The protein expression was significantly reduced in 54 cases of human NPC tissues "- 23 cases, "+ 12 cases, "++ 7 cases, "+++ 12 cases than 16 cases of normal nasopharyngeal epithelia tissues "- 0 cases, "+ 0 cases, "++ 3 cases, "+++ 13 cases($P < 0.05$). The reduced expression of Parkin protein was no correlated with age and sex of patients, T stage, TNM classification, Histopathologic subtype($P > 0.05$), but was correlated with N stage($P < 0.05$). **Conclusion** Parkin gene protein expression may play an important role in the genesis and development of human NPC. The expression of Parkin protein may serve as an important indicator in predicting the biological of human NPC.

Key words Parkin; Nasopharyngeal carcinoma; Protein expression

Parkin 基因最初发现为常染色体隐性遗传性少年型帕金森病的致病基因。Parkin 基因在乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肝癌、急性淋巴性及慢性粒细胞性白血病中被研究证实是一种新的肿瘤候选抑癌基因。然而鼻咽癌研究中未见 Parkin 基因相关报道,本研究通过检测 54 例鼻咽癌组织和 16 例正常鼻咽上皮组织 Parkin 蛋白表达水平,探讨 Parkin 蛋白表达在鼻咽癌发生发展及预后判断中作用。

材料与方法

1. 材料:16 例正常鼻咽部上皮组织标本均取自笔者医院鼻窦内镜手术及扁桃体切除术患者。54 例鼻咽癌癌组织取自广西医科大学第一附属医院和笔者医院自 2008 ~ 2011 年

耳鼻咽喉科门诊及病房就诊的新发鼻咽癌患者,均为新鲜活检病理组织。标本切除后立即用 10% 甲醛液固定备用。本实验通过医院伦理委员会批准后,所有标本在采集前都与患者及志愿者签定知情同意书。

2. 方法:①所收集的标本送病理科做石蜡包埋,采取连续切片,片厚 $3\mu\text{m}$,分别做常规 HE 染色及免疫组织化学染色;②石蜡切片置于电热恒温鼓风干燥箱中, 65°C 下 3h,放置待用;③免疫组化 ElivisionTM SP 法染色,具体步骤按 ElivisionTM SP 试剂盒(福州 Maixin-Bio 公司)操作说明书进行。Parkin 鼠抗人一抗购自 Aabcam 公司,阳性对照用 Aabcam 公司提供正常的肝细胞组织经阳性染色作对照;阴性对照用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。

3. 免疫组化结果判断标准:高倍光学显微镜下(10×40)观察切片组织染色情况,免疫组化染色后,若为阳性则在胞质着色,呈棕色、黄色或棕黄色。每张切片随机选取 4 个高倍视野(10×40),计算每个高倍视野下的阳性细胞率($P = \text{阳性细胞数} / \text{计数细胞总数} \times 100\%$),取其平均值, Parkin 蛋白表达分 4 个等级:平均阳性细胞率 0 ~ 5% 为阴性,记为 1 级;平均

基金项目:浙江省医药卫生科技项目(2011KYA127);浙江省医药卫生骨干平台项目(2012RCB038)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科(倪海峰、周珍、江波、李勇);广西医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科(黄光武)

阳性细胞率 5% ~ 25%, 记为 2 级; 平均阳性细胞率 26% ~ 50%, 记为 3 级; 平均阳性细胞率 $\geq 50\%$, 记为 4 级。染色度评分: 棕色 4 分, 棕黄色 3 分, 黄色 2 分, 浅黄色 1 分, 无染色为 0 分。然后, 将表达等级与染色度分值相乘, 乘积大于或等于 9 为强阳性(+++), 4 ~ 8 为中度阳性(++), 小于或等于 3 为弱阳性(+), 0 为阴性(-)。

4. 统计学方法: 统计学数据采用 SPSS 13.0 分析处理。正常鼻咽上皮组织与鼻咽癌组织间 Parkin 蛋白表达差异、Parkin 蛋白表达与鼻咽癌患者临床病理特征关系均采用秩和检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组人群基线情况: 54 例鼻咽癌组中男性 39 例, 女性 15 例; 患者年龄 20 ~ 78 岁(中位年龄 45.8 岁)。临床 TNM 分期(参照 UICC2010 年第 7 版): TNM 分期: I 期 4 例, II 期 15 例, III 期 23 例, IV a 期 12 例; 淋巴结转移 36 例; 远处转移 0 例。M₀ 54 例, M₁ 0 例, 病理诊断(参照 2005 年 WHO 分型): 非角化性癌 48 例, 角化型鳞状细胞癌 6 例, 基底细胞样鳞状细胞癌 0 例。16 例正常鼻咽部上皮组织健康志愿者组中男性 11 例, 女性 5 例; 年龄 18 ~ 68 岁(中位年龄 42.5 岁)。两组间性别构成及年龄的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2. Parkin 蛋白表达: 54 例鼻咽癌组织 Parkin 蛋白表达水平为“ - ”23 例, “ + ”12 例, “ ++ ”7 例, “ +++ ”12 例, 16 例正常鼻咽上皮组织 Parkin 蛋白表达水平为“ - ”0 例, “ + ”0 例, “ ++ ”3 例, “ +++ ”13 例, 经过统计分析, 鼻咽癌组织和正常鼻咽上皮组织 Parkin 蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 1)。

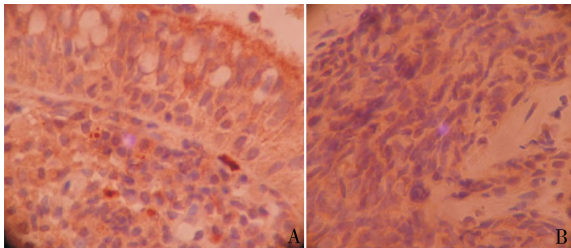


图 1 Parkin 蛋白在鼻咽癌组织和正常鼻咽上皮组织中表达(SP, 10 × 40)

A. 正常鼻咽部假复层柱状上皮细胞胞质着色, 呈棕色或棕黄色;
B. 鼻咽癌组织癌巢中癌细胞胞质着色, 呈黄色或棕黄色

3. Parkin 蛋白表达和临床病理特征的关系: 经统计学分析, Parkin 蛋白表达与鼻咽癌患者性别、年龄、T 分期、TNM 分期、病理类型等临床病理特征均无明显关系($P > 0.05$), 而与有淋巴结转移密切相关($P < 0.05$), 淋巴结转移患者 Parkin 蛋白表达明显下

调, 表明 Parkin 蛋白表达与淋巴结转移呈负相关, 详见表 1。

表 1 鼻咽癌组织 Parkin 蛋白表达与鼻咽癌患者临床病理特征的关系

临床资料	n	Parkin 蛋白表达				P
		-	+	++	+++	
性别						
男性	39	16	10	4	9	>0.05
女性	15	7	2	3	3	
年龄(岁)						
< 50	33	13	8	4	8	>0.05
≥ 50	21	10	4	3	4	
T 分期						
T ₁ ~ T ₂	35	14	9	4	8	>0.05
T ₃ ~ T ₄	19	9	3	3	4	
N 分期						
N ₀	18	0	10	2	6	<0.05
N ₁₋₃	36	23	2	5	6	
TNM 分期						
I ~ II	19	4	8	1	6	>0.05
III ~ IV	35	19	4	6	6	
病理类型						
非角化性癌	48	20	11	6	11	>0.05
角化型鳞癌	6	3	1	1	1	

讨 论

Parkin 基因最初发现为帕金森病的致病基因, Parkin 蛋白主要参与蛋白质的泛素化过程, 其功能缺陷可介导多巴胺能神经元选择性死亡, 导致帕金森病发生。

近年来研究证实 Parkin 基因在乳腺癌、肺癌、肝癌、卵巢癌中存在杂合性缺失, 在急性淋巴细胞性及慢性粒细胞性白血病中存在启动子甲基化, 且 Parkin 基因杂合性缺失或启动子甲基化与其转录表达下调密切相关, 因此 Parkin 基因被认为是一种新的肿瘤候选抑癌基因^[1-5]。

Parkin 蛋白在肿瘤中的具体作用仍不明确, Tay 等^[1]研究发现在 Parkin 基因缺失的乳腺癌细胞系中加入外源性 Parkin 蛋白可导致细胞增殖和迁移能力减弱, 其主要作用机制不是通过改变细胞周期蛋白 D1 和 E 的表达, 而是通过增强细胞周期依赖性蛋白激酶 6 表达抑制乳腺细胞增殖使细胞停留在 G₁ 期来实现其肿瘤抑制功能。Fujiwara 等^[3]研究认为肝癌中 Parkin 并不是通过激活泛素连接酶实现, 也不是通过蛋白体降解实现, 而是通过激活 β 连环蛋白促进卵泡抑素表达, 加速肝细胞增殖。Ikeuchi 等^[6]报道大肠癌中突变 Parkin 主要作用机制是通过减弱蛋白

水解介导的细胞周期蛋白 E 降解调节使细胞增殖。

近年来研究证实 Parkin 蛋白与多种肿瘤关系密切,然而至今国内外未见鼻咽癌中 Parkin 基因相关研究报道。本研究结果显示,与正常鼻咽部上皮组织对照比较,Parkin 在鼻咽癌组织中的蛋白表达水平明显下调,提示 Parkin 在鼻咽癌的发生发展中起抑癌基因作用,与文献报道乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肝癌、急性淋巴细胞性及慢性粒细胞性白血病中 Parkin 为抑癌基因相似。

陈钢等^[7]研究发现 Parkin 蛋白的表达缺失与患者的性别、肿瘤的大小、甲胎蛋白(AFP)、HBsAg 以及有无肝硬化无关,而与肝细胞癌的分化程度、有无门静脉癌栓以及有无包膜关系密切,表明 Parkin 基因可能参与了肝细胞癌细胞的分化、转移和浸润的调节。而本研究结果显示,Parkin 蛋白表达与鼻咽癌患者性别、年龄、T 分期、TNM 分期、病理类型等临床病理特征均无明显关系($P > 0.05$),而与有无淋巴结转移密切相关($P < 0.05$),淋巴结转移患者 Parkin 蛋白表达明显下调,表明 Parkin 蛋白表达与淋巴结转移呈负相关,因此,Parkin 蛋白表达下调或缺失可能有利于鼻咽癌细胞的转移,Parkin 蛋白表达可作为判断鼻咽癌临床预后预测指标。由此可见,Parkin 蛋白在肝细胞癌和鼻咽癌中有着相似的作用。

综上所述,本研究显示鼻咽癌组织中 Parkin 蛋白表达下调,Parkin 在鼻咽癌的发生发展中起抑癌基因

作用,Parkin 蛋白表达与淋巴结转移呈负相关,Parkin 蛋白表达可作为判断鼻咽癌临床预后预测指标。但是 Parkin 蛋白在鼻咽癌发生发展中具体的作用机制仍不明确,有待今后进一步深入研究。

参考文献

- 1 Tay SP, Yeo CW, Chai C, *et al.* Parkin enhances the expression of cyclin - dependent kinase 6 and negatively regulates the proliferation of breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2010, 285 (38) : 29231 - 29238
- 2 Picchio MC, Martin ES, Cesari R, *et al.* Alterations of the tumor suppressor gene parkin in non - small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10 (8) : 2720 - 2724
- 3 Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, *et al.* Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2008, 27 (46) : 6002 - 6011
- 4 Mehdi SJ, Ali A, Rizvi MM. Parkin gene alterations in ovarian carcinoma from northern Indian population [J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17 (3) : 579 - 586
- 5 Agirre X, Roman - Gomez J, Vazquez I, *et al.* Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia[J]. Int J Cancer, 2006, 118 (8) : 1945 - 1953
- 6 Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, *et al.* Attenuation of proteolysis - mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers[J]. Int J Cancer, 2009, 125 (9) : 2029 - 2035
- 7 陈钢, 王怡, 易继林, 等. Parkin 基因在肝细胞癌中的表达与临床意义[J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12 (9) : 619 - 621

(收稿日期: 2013 - 12 - 30)

(修回日期: 2014 - 01 - 09)

阿司匹林对大肠癌 LoVo 细胞增殖、凋亡的影响及机制

李 明 谭诗云

摘 要 **目的** 观察阿司匹林对人结肠癌细胞系 LoVo 细胞增殖、凋亡的影响及探讨可能的作用机制。**方法** 用不同浓度阿司匹林处理体外培养的 LoVo 细胞 24、48、72h, MTT 法检测其对结肠癌 LoVo 细胞增殖的影响, 倒置显微镜下观察细胞的形态学变化, 阿司匹林(浓度分别为 2、4、8mmol/L)分别处理 LoVo 细胞 48h, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 分光光度计检测 caspase - 3 相对活性, 激光共聚焦显微镜检测细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化, Western blot 法检测 bcl - 2、bax 基因表达情况。**结果** 阿司匹林(浓度 1 ~ 10mmol/L)能显著抑制 LoVo 细胞增殖, 呈剂量、时间依赖性; 倒置显微镜下可观察到典型的细胞凋亡形态; 阿司匹林处理 LoVo 细胞 48h 后, 细胞凋亡率分别为 11.4%、22.3%、37.1%, 对照组凋亡率为 2.4%; 阿司匹林处理细胞 48h 后, caspase - 3 相对活性显著增加; 阿司匹林能上调 bax 的表达并下调 bcl - 2 表达, 呈剂量依赖性。**结论** 阿司匹林均能抑制 LoVo 细胞的增殖并诱导其凋亡, 其作用机制可能为增加细胞内 Ca^{2+} 含量、caspase - 3 活性及上调 bax 的表达并下调 bcl - 2 表达。

关键词 阿司匹林 LoVo 细胞 Caspase - 3 Bax Bcl - 2

作者单位: 430060 武汉大学人民医院消化内科

通讯作者: 谭诗云, 教授, 主任医师, 博士生导师, 电子信箱: tanshiyun1962@163.com