

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201402002

· 论著 ·

重组人 p53 腺病毒注射液联合治疗对鼻咽癌组织中 KAI1 和 CD44 v6 表达的影响

王勇利¹, 兰桂萍¹, 司勇锋¹, 孙金杰¹, 韦海明², 杨涌¹, 翁敬锦¹

(广西壮族自治区人民医院 1. 耳鼻咽喉头颈肿瘤科; 2. 病理科, 广西南宁 530021)

摘要: **目的** 探讨重组人 p53 腺病毒注射液(今又生)联合放化疗对鼻咽癌组织中 KAI1 和 CD44 v6 表达的影响,并分析 KAI1 和 CD44 v6 表达与鼻咽癌患者预后之间的关系。**方法** 58 例鼻咽癌患者经直线加速器常规放疗和两个阶段铂类 + 5-Fu 的同步化疗后再分为今又生治疗组(29 例)和对照组(29 例),应用免疫组织化学 S-P 法检测治疗前后癌组织中 KAI1 及 CD44 v6 蛋白的表达情况,比较两组患者的肿瘤消退率及远期生存情况。**结果** 治疗组患者治疗后 KAI1 表达上调、CD44 v6 表达下调,而对照组患者治疗前后比较无明显差异;治疗组局部消退率明显高于对照组;治疗组在 3 年生存率及远期生存情况同对照组比较无明显差异。**结论** 重组人 p53 腺病毒注射液治疗可以明显影响鼻咽癌组织中 KAI1 和 CD44 v6 的表达,提高肿瘤的局部消退率,但无法有效延长期生存率。

关键词: 重组人 p53 腺病毒注射液; KAI1; CD44 v6; 鼻咽癌; 肿瘤转移

中图分类号: R739.63; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2014)02-0096-05

Differential expression of KAI1 and CD44 in nasopharyngeal carcinoma before and after Gendicine combined with radiotherapy and chemotherapy treatment

WANG Yong-li, LAN Gui-ping, SI Yong-feng, SUN Jin-jie, WEI Hai-ming, YANG Yong, WENG Jing-jin
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Tumor, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To study differences in expression of KAI1 and CD44 v6 before and after Gendicine treatment, and to explore the relationship between the expression and the clinical characteristics of patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC), and also the relationship between the expression differences and prognosis. **Methods** 58 NPC patients were randomly divided into two equal groups (treatment group and control group). Expression of KAI1 and CD44 v6 protein in tumor tissue of both groups before and after Gendicine treatment was detected with immunohistochemical SP method. Tumor regression rate and long-term survival rate between the two groups were compared. **Results** After treatment, the expression of KAI1 was up-regulated and that of CD44 v6 was down-regulated in the treatment group with statistically significant differences, while the differences in the control group were insignificant. Local tumor regression rate of the treatment group was significantly higher than that of the control group. The 3-year survival rate and long-term survival in two groups did not differ significantly. **Conclusion** Gendicine therapy can significantly affect the expression of KAI1 and CD44 v6 in nasopharyngeal carcinoma, and increase the local tumor regression rate, but can not prolong the survival rate.

Key words: Gendicine; P53; KAI1; CD44 v6; Nasopharyngeal neoplasm; Tumor metastasis

p53 是重要的肿瘤抑制基因,它的失活与半数以上肿瘤的发生发展密切相关,修正导致异常生物学行为的 p53 基因缺陷是一种新的抗肿瘤途径。2003 年重组人 p53 腺病毒注射

基金项目:广西自然科学基金课题资助(2011GNSFA018235)。
作者简介:王勇利,男,硕士,主治医师。
通信作者:司勇锋,Email:syfkxf@126.com

液上市(商品名今又生)是世界首个获准上市的基因治疗药物,头颈部鳞癌多中心、随机对照临床试验表明今又生能够明显提升局部肿瘤的完全消退率^[1],但其在抑制肿瘤细胞的浸润转移方面的作用尚未明确,本文尝试从与肿瘤转移关系密切的 KAI1 及 CD44 v6 表达情况来观察其可能存在的作用,同时探讨两者的表达与鼻咽癌临床病理特征及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 病例选择

选择 2007 年 7 月~2010 年 8 月在我院经病理确诊为鼻咽部未分化非角化性癌的组织标本共 58 例,其中男 48 例,女 10 例;年龄 27~63 岁,平均 42.4 岁。按照 UICC(2002 年)鼻咽癌临床分期标准,其中 III 期 35 例,IV 期 23 例,排除远处转移。

患者共分为两组:A 组为今又生治疗组 29 例,放射治疗前留取一次鼻咽部病理标本,所有患者均经过直线加速器常规放疗,鼻咽部肿瘤放疗量 ≥ 70 Gy,同时进行两个阶段铂类 +5-Fu 的同步化疗。放疗第 1 周开始今又生(p53)鼻咽部注射($1 \times 10E12$ VP/次,常温下溶解后在硬性鼻咽镜引导下在瘤体内多点注射),每周进行 1 次,持续 6 周,在治疗过程中每周观察鼻咽部病灶,在鼻咽部肿瘤完全消退前取肿瘤标本备检,所取标本均经病理检查证实为鼻咽癌组织。B 组为对照组 29 例,同样取鼻咽部肿瘤治疗前后标本备检。所有患者仅进行直线加速器常规放疗和两个阶段铂类 +5-Fu 的同步化疗(具体步骤同 A 组)。所有患者治疗后 3~6 个月均回院复查,行鼻咽颅底磁共振检查及全身检查,按照 WHO 疗效标准进行评价,对于后期部分未能按时回院复查病例由我科随访室工作人员采用电话或信件回访。患者均随访 7~78 个月(平均 40 个月)。以无瘤生存率及生存时间作为研究指标。

1.2 试剂及检测方法

兔抗人 KAI1/CD82 单克隆抗体和 CD44 v6 单克隆抗体均购于 Santa Cruz 公司,免疫组化试剂盒购自 Dako 公司。免疫组化染色采用 SP 法,步骤严格按照说明书执行。用 PBS 取代

一抗作空白对照。

1.3 结果判定

每张切片由两名病理科医生双盲交换判断:任选 10 个视野,计数 200 个细胞,采用半定量积分法判定结果,KAI1 和 CD44 v6 均定位于细胞膜,以细胞膜染色或细胞质出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。将平均着色程度和着色百分率得分各自相乘为其最后得分,1~2 分为阴性(-),2~3 分为(+),4~6 分为(++),>6 分为(+++)。其中基本不着色为 0 分,着色淡 1 分,着色中等 2 分,着色深 3 分;着色占计数细胞的百分率 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分, $\geq 51\%$ 为 3 分。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件,计数资料应用 χ^2 检验,各组治疗前后及组间的数据比较采取 Wilcoxon 秩和检验,Cox 比例风险模型进行单因素和多因素生存分析,并对有预后意义的指标做 Kaplan-Meier 生存曲线并行 log-rank 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 KAI1 和 CD44 v6 在鼻咽癌组织中的表达

KAI1 主要定位于细胞膜,呈不均匀性灶性胞浆分布,基质有少量染色(图 1)。CD44 v6 亦定位于细胞膜,部分细胞质阳性(图 2)。鼻咽癌组织治疗前 KAI1 的阳性表达率为 32.8(19/58),CD44 v6 的阳性表达率为 75.9%(44/58);表明治疗前鼻咽癌组织中 CD44 v6 的表达明显高于 KAI1($Z = -4.550, P = 0.000$)。两组患者不同的临床特征及分组之间 KAI1 和 CD44 v6 的表达情况见表 1。

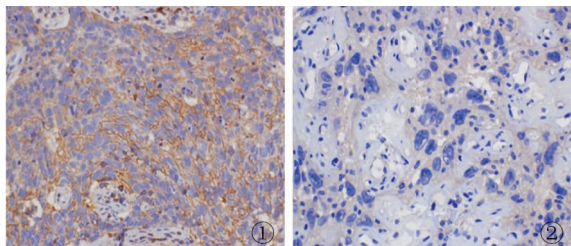


图 1 CD44 v6 在鼻咽癌组织中的表达(SP $\times 400$)

图 2 KAI1 在鼻咽癌组织中的表达(SP $\times 400$)

表1 两组患者临床特征及其治疗前 KAI1 和 CD44 v6 的表达(例,%)

项目	例数	KAI1 阳性表达			CD44 v6 阳性表达		
		例数	阳性率	<i>P</i>	例数	阳性率	<i>P</i>
年龄(岁)							
≤41	29	9	31	0.78	23	79	0.539
>41	29	10	34		21	72	
性别							
男	48	16	33	0.938	37	77	0.634
女	10	3	30		7	70	
分组							
治疗组	29	8	28	0.401	22	76	1
对照组	29	11	38		22	76	
T 分级							
2	10	4	40		9	90	
3	30	10	33	0.8	20	66	0.22
4	18	5	28		15	83	
N 分级							
0	16	2	13		10	62	
1	20	7	35	0.097	15	75	0.2
2	16	6	38		15	94	
3	6	4	67		4	67	
临床分期							
Ⅲ	35	11	31	0.79	25	71	0.33
Ⅳ	23	8	35		19	83	

2.2 治疗前后两组患者 KAI1、CD44 v6 表达的比较

从两组患者治疗前后对比来看,今又生治疗组 KAI1 表达的阳性率为 28% (8/29),而在今又生治疗后 KAI1 表达的阳性率为 52% (15/29),这表明治疗组 KAI1 表达在今又生治疗后明显上调 ($Z = -2.112, P = 0.035$),而对照组治疗前后比较差异无统计学意义 ($Z = -0.587, P = 0.557$);今又生治疗组 CD44 v6 表达的阳性率为 76% (22/29),而在治疗后其阳性表达率下降为 62% (18/29),这也表明 CD44 v6 表达在今又生治疗后有所下降 ($Z = -2.214, P = 0.027$),而对照组 CD44 v6 表达治疗前后比较差异无统计学意义 ($Z = -0.069, P = 0.945$)。

2.3 临床结果及随访

在完成计划治疗后,3~6 个月复查进行鼻咽部检查及鼻咽颅底部 MRI 检查,按照 WHO 疗效标准进行评价^[2]:鼻咽部肿瘤完全消退的称为完全缓解 (CR, complete response),肿瘤的两个最大垂直径乘积缩小 $\geq 50\%$ 称为部分缓解 (PR, partial response),肿瘤的两个最大垂直径乘积增加 $\geq 25\%$ 或出现新病灶,和(或)非目标病灶进展的称为疾病进展 (PD, progressive

disease),鼻咽部肿瘤缩小未达到 PR 或增加未达到 PD 的称为疾病稳定 (SD, stable disease),本研究结果显示两组患者出现了不同程度的肿瘤消退。两组患者的疗效具体见表 2。治疗组的有效率 (CR + PR) 为 93% (27/29),对照组的有效率为 86% (23/29),经 Mann-Whitney 两样本比较秩和检验,结果显示今又生治疗组在疗效上明显优于对照组 ($Z = -2.374, P = 0.018$)。

表2 治疗组与对照组肿瘤消退情况的比较(例,%)

分组情况	例数	疗效情况				有效率
		CR	PR	SD	PD	
治疗组	29	20	7	1	1	93
对照组	29	11	12	5	1	79
总计	58	31	19	6	2	86

结果发现:今又生治疗组中有 3 例在 3 年内死亡,死因均为鼻咽癌局部复发或远处转移,其 3 年生存率为 89.7% (26/29);对照组 3 年内死亡 5 例,其中 4 例死于肝、骨等远处转移,1 例因鼻咽部复发导致大出血死亡,其 3 年生存率为 82.8% (24/29),两组间的比较差异无统计学意义 ($P = 0.353$)。

治疗 3 年以上患者的随访中发现,4 例患者在治疗后 3~5 年死亡,其中治疗组 3 例,对照组 1 例。截止到 2013 年 10 月,今又生治疗组死亡 6 例 (6/29),对照组死亡 6 例 (6/29),我们对两组的生存情况绘制了 Kaplan-Meier 生存曲线 (图 3),发现两组在远期生存方面差异无统计学意义 ($P = 0.918$)。

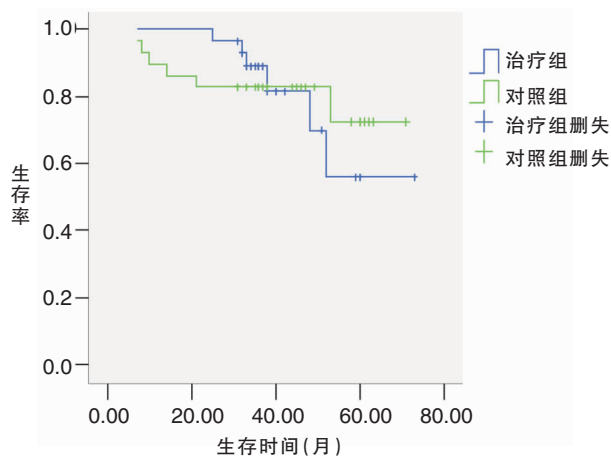


图3 治疗组和对照组远期生存情况的比较

3 讨论

KAI1 基因属于肿瘤转移抑制基因,定位于人染色体 11p11.2 上,表达产物是一种分布在大多数组织细胞表面的糖蛋白即 CD82,主要参与细胞间及细胞与胞外基质的相互粘附^[2]。KAI1 在良性肿瘤中的高表达提示患者预后良好^[3];反之,临床晚期癌症患者肿瘤中 KAI1 的表达总是下调或缺失^[4]。在前列腺癌、消化系统肿瘤、宫颈癌、膀胱癌、肺癌、喉癌、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤等多种恶性肿瘤中的研究均发现 KAI1 的表达与肿瘤的浸润、转移呈负相关^[5-7]。在体外及体内实验中均证实 KAI1 的高表达可以抑制细胞的迁移和肿瘤的浸润。KAI1 除了可以抑制肿瘤的进展外,还可以诱导细胞凋亡^[8]。但 Tohami 等^[9]的研究中发现 KAI1 在白血病和淋巴瘤细胞等非实体肿瘤中的表达是上调的。

KAI1 基因的启动子区没有 TATA 盒或 CAAT 盒,在启动子上游(-892 和 -868)处发现有两个串联重复的 CAAG(5'-AGGCAAGCTGGGGCAGCTC AAGCCT-3')结构,有研究表明,p53 通过与该区域的结合,可激活 KAI1 基因表达^[10-11]。本研究中,鼻咽癌患者的 KAI1 的阳性表达率仅为 32.8%(19/58),同正常人群的比较明显下降(100%,23/23,蔡良真等^[12]),其原因可能为鼻咽癌中 p53 失活,导致目的基因 KAI1 表达下降。同时我们也发现鼻咽癌组织中 KAI1 蛋白表达在今又生治疗后明显上调,而对照组则没有发现相应的改变,其原因可能是:今又生中的外源性 p53 基因进入肿瘤细胞后与 CAAG 结构结合,激活 KAI1 基因的表达,抑制细胞的迁移和肿瘤浸润。但也有研究认为,虽然 KAI1 基因上存在 p53 的结合位点,但在 DNA 损伤后修复的过程中,KAI1 表达的调控并非通过 p53 途径介导^[13]。此外,本研究发现 KAI1 与肿瘤的浸润及临床分期无明显相关性,可能原因为入组患者较少,入组患者的临床分期都为中晚期,需更大样本量的研究来论证两者之间的关系。

CD44 v6 属于 CD44 的一种变异体,被认为是肿瘤转移行为的蛋白标志物。其主要存在于上皮性肿瘤细胞膜上,改变肿瘤细胞表面

黏附分子的构成和功能,使肿瘤细胞侵袭与转移能力增强,其过量表达与肿瘤的发生发展、侵袭和转移密切相关^[14-17],有研究表明 CD44 v6 的表达与 p53 基因突变存在正相关^[18]。本研究发现基因治疗组治疗前后 CD44 v6 表达存在差异,治疗后 CD44 v6 表达有明显的下调,但是对照组 CD44 v6 表达下调不明显。此外,我们还发现 CD44 v6 在鼻咽癌组织中表达高于 KAI1,其原因可能为肿瘤的抑癌基因下调导致促进肿瘤转移相关蛋白的上调有关。因此,本研究发现今又生治疗后 CD44 v6 的表达下调,这可能对减低肿瘤转移风险有一定的意义,但 p53 基因如何影响 CD44 v6 的表达仍需要更深入地研究。

在肿瘤的治疗效果方面,两组存在明显的差异:治疗组在治疗后肿瘤消退情况上明显优于对照组,这个结果同前期的研究结论一致^[1],表明今又生在局部肿瘤的控制方面存在一定的疗效。但两组患者 3 年生存率及远期生存无明显差异,而且死亡病例中绝大多数为鼻咽癌远处转移(10/12),从一定程度上说明今又生治疗并未有效控制肿瘤的远处转移。这点同今又生治疗后抑癌基因 KAI1 表达提升、CD44 v6 表达下调等不相符,其可能的原因:由于肿瘤是多基因异常导致的结果,单纯修正 p53 基因可能并不能完全逆转肿瘤基因的异常;其次,本研究中今又生治疗为鼻咽部肿瘤局部注射,虽然对于局部肿瘤的控制效果较好,但对于早期的潜在远处灶却无法作用,因此如果能在局部治疗同时联合静脉滴注等全身治疗,则可能会给患者带来更大的益处。

以重组人 p53 腺病毒注射液为代表的基因治疗在我国已取得长足的进步,但仍然任重而道远。相信随着分子生物学的发展,以及对 p53、KAI1 及 CD44 v6 等相关生物学指标更深入地研究,人们将会对肿瘤的发生、发展、转移有更深入的认识,从而使肿瘤患者从中获益。

参考文献:

- [1] Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers [J]. Hum Gene Ther, 2005, 16(9): 1016-1027.
- [2] Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, et al. Evidence for

- three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(22): 5390 - 5395.
- [3] Ow K, Delprado W, Fisher R, et al. Relationship between expression of the KAI1 metastasis suppressor and other markers of advanced bladder cancer [J]. *J Pathol*, 2000, 191(1): 39 - 47.
- [4] Rinker-Schaeffer CW, Hickson JA. Stopping cancer before it colonizes [J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 887 - 888.
- [5] 袁红纲, 宋兴福, 董自强. 转移抑制基因 *kai1* 的研究新进展 [J]. *肿瘤*, 2007, 27(12): 1010 - 1014.
- [6] 范开席, 于金明, 张维东, 等. *Kai1* 蛋白和 *cd40* 蛋白的表达与胃癌临床病理因素及预后的关系 [J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(12): 928 - 931.
- [7] 韩秋峪, 张向宁, 李晓翠, 等. *KAI1/CD82* 和 *E-Cadherin* 蛋白在卵巢上皮性癌中表达的临床意义 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2006, 44(7): 729 - 733.
- [8] Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S. The metastasis suppressor gene *C33/CD82/KAI1* induces apoptosis through reactive oxygen intermediates [J]. *FASEB J*, 2004, 18(1): 158 - 160.
- [9] Tohami T, Drucker L, Radnay J, et al. Expression of tetraspanins in peripheral blood leukocytes: a comparison between normal and infectious conditions [J]. *Tissue Antigens*, 2004, 64(3): 235 - 242.
- [10] Mashimo T, Bandyopadhyay S, Goodarzi G, et al. Activation of the tumor metastasis suppressor gene, *KAI1*, by etoposide is mediated by *p53* and *c-Jun* genes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274(2): 370 - 376.
- [11] Bari R, Zhang YH, Zhang F, et al. Transmembrane interactions are needed for *KAI1/CD82*-mediated suppression of cancer invasion and metastasis [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(2): 647 - 660.
- [12] 蔡良真, 支梅芬, 何文艳. *KAI1* 和 *MMP-9* 在鼻咽癌组织的表达及相关性 [J]. *中国现代医生*, 2011, 5(8): 26 - 27, 50.
- [13] Duriez C, Falette N, Cortes U, et al. Absence of *p53*-dependent induction of the metastatic suppressor *KAI1* gene after DNA damage [J]. *Oncogene*, 2000, 19(20): 2461 - 2464.
- [14] Weber GF, Bronson RT, Ilagan J, et al. Absence of the *CD44* gene prevents sarcoma metastasis [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(8): 2281 - 2286.
- [15] Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. *CD44*: from adhesion molecules to signalling regulators [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(1): 33 - 45.
- [16] 赵厚育, 陈乾美, 任婕, 等. *Survivin* 和 *CD44 V6* 在喉癌组织中的表达及意义 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2004, 10(5): 13 - 17, 68.
- [17] 刘志雄, 田勇泉, 肖健云, 等. 人鼻咽癌中 *cd_(44v6)* 蛋白产物的表达及临床意义 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 1999, 5(3): 129 - 131.
- [18] East JA, Hart IR. *CD44* and its role in tumour progression and metastasis [J]. *Eur J Cancer*, 1993, 29A(14): 1921 - 1922.

(修回日期: 2013 - 12 - 30)

· 消息 ·

版权说明

为适应我国信息化建设, 扩大本刊及作者知识信息交流渠道, 本刊已被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 系列数据库收录, 作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录, 请在来稿时向本刊声明, 本刊将做适当处理。