

## 喉癌病变过程中细胞周期调控因子的 流式检测及意义\*

陈彩凤<sup>1</sup> 李云英<sup>1</sup> 黄羽<sup>2</sup> 何青莲<sup>3</sup> 林文敏<sup>1</sup> 卢标清<sup>4</sup>

**[摘要]** 目的:探讨细胞周期调控基因 cyclin E、cyclin D1、p21、p16 在喉癌发生、发展中的作用。方法:选取 23 例声带息肉、69 例喉癌前病变、33 例喉癌石蜡包埋组织为研究对象,切片脱蜡后制备成细胞悬液,采用流式细胞术检测 cyclin E、cyclin D1、p21、p16 基因的荧光表达情况。结果:在声带息肉、喉癌前病变、喉癌组织中,cyclin E 的阳性表达率分别为 13.04%、20.29% 和 42.42%;cyclin D1 的阳性表达率分别为 26.09%、43.48% 和 93.94%;p16 的阳性表达率分别为 61.90%、40.98% 和 14.28%;p21 的阳性表达率分别为 47.62%、23.81% 和 26.23%。提示 cyclin D1、cyclin E 的阳性率表达形成声带息肉→喉癌前病变→喉癌组织阳性强度逐渐增强的梯度现象,而 p21、p16 的阳性表达强度则呈逐渐减弱的现象。结论:①细胞周期调控因子的异常表达是喉癌发生的分子事件;②阳性调控因子 cyclin D1、cyclin E 高表达,负性调控因子 p16、p21 低表达,即多个与细胞周期相关的正负调控因子失衡在喉癌的发生中可能起着重要作用。

**[关键词]** 喉肿瘤;癌前病变;细胞周期;流式细胞术

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.09.014

**[中图分类号]** R739.6 **[文献标志码]** A

### Expression and significance of the cell cycle regulators in laryngeal carcinogenesis detected by flow cytometry

CHEN Cai feng<sup>1</sup> LI Yunying<sup>1</sup> HUANG Yu<sup>2</sup> HE Qinglian<sup>3</sup> LIN Wenmin<sup>1</sup> LU Biaoqing<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, the Guangdong Hospital of Chinese Medicine, the Second Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510120, China; <sup>2</sup>The Central Laboratory, the Guangdong Hospital of Chinese Medicine; <sup>3</sup>Department of Pathology, the Guangdong Hospital of Chinese Medicine, the Second Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine; <sup>4</sup>Department of Otorhinolaryngology, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhongshan, Zhongshan Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine)

Corresponding author: LI Yunying, E-mail: docliyuning@126.com

**Abstract Objective:** To investigate the expression and clinicopathological significance of the cell cycle regulators cyclin E, cyclin D1, p21, p16 in laryngeal carcinogenesis tissue. **Method:** The expression of cell cycle regulators were detected by flow cytometry method in 23 cases of polyps of vocal cord, 69 cases of laryngeal precancerous change and 33 cases of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC), which tissue was paraffin-embedded, sliced, dewaxed, and prepared into the cell suspension, then fluorescently labeled by cyclin E, cyclin D1, p21 and p16. **Result:** In polyps of vocal cord, laryngeal precancerous change and LSCC, The positive expression rate of cyclin E and cyclin D1 were respectively 13.04%, 20.29%, 42.42% and 26.09%, 43.48% and 93.94%. The positive expression rate of p16 and p21 were respectively 61.90%, 40.98%, 14.28% and 47.62%, 23.81%, 26.23%. Those showed the positive expression rate of cyclin D1, cyclin E gradually decreased from vocal cord polyps, laryngeal precancerous change to LSCC, ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the positive expression rate of p21 and p16 gradually decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The abnormal expression of cell cycle regulatory factors is the molecular events of laryngeal carcinoma. High expression of positive regulatory factors cyclin D1 and cyclin E, and low expression of negative regulatory factors p16 and p21, which showed the imbalance of multiple positive and negative regulatory factors related with cell cycle play an important role in the occurrence of laryngeal cancer.

**Key words** laryngeal cancer; laryngeal precancerous lesions; cell cycle; flow cytometry

\* 基金项目:国家自然科学基金(No:30873288)

<sup>1</sup> 广州中医药大学第二附属医院 广东省中医院耳鼻咽喉科 (广州, 510120)

<sup>2</sup> 广东省中医药科学院(广东省中医院)中心实验室

<sup>3</sup> 广州中医药大学第二附属医院 广东省中医院病理科

<sup>4</sup> 广州中医药大学附属中山医院 中山市中医院耳鼻咽喉科

通信作者:李云英, E-mail: docliyuning@126.com

喉癌发病率有逐年升高趋势,研究证实细胞周期调控异常是肿瘤发生(发展)的一个重要前提。本研究利用流式细胞术方法,检测喉癌前病变标本中细胞周期因子(cyclin E、cyclin D1、p21、p16)的表达情况,同时取声带息肉组织及喉癌标本作对

照,检测组间细胞周期调控因子的表达差异,现报告如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 临床资料

标本源于 2008-03—2011-08 期间广州中医药大学第二附属医院耳鼻咽喉科的喉癌前病变病理标本,按诊断标准,共有 69 例喉癌前病变纳入本研究,男 42 例,女 27 例;年龄 29~64 岁,中位年龄 43 岁。其中喉角化症(声带白斑)9 例,成人喉乳头状瘤 19 例,成人肥厚性喉炎(喉黏膜上皮不典型增生)41 例。取 23 例声带息肉及 33 例术前未行放化疗的喉癌手术标本作对照,23 例声带息肉中,男 15 例,女 8 例;年龄 23~56 岁。33 例喉癌组织中,男 31 例,女 2 例;年龄 41~65 岁。所选病例的石蜡标本均由经验丰富的病理医师作出明确诊断,每例取 50 μm 厚的石蜡切片。

#### 1.2 试剂及仪器

FITC 荧光标记的 cyclin D1、纯化的 cyclin E 抗体均购自美国 BD 公司, p21 购自美国 SANTA CRUZ 公司, p16 购自英国 Abcam 公司,二抗为 PE、FITC 标记的 IgG 均购自美国 MULTISCIENCE 公司。流式细胞仪为美国贝克曼-库尔特公司 FC-500 型号产品。胶原消化酶 Accutase 购自美国 eBioscience 公司。

#### 1.3 石蜡标本单细胞液的制备

在切片机上切取 10 μm 的组织片 5 片;将组织片放入试管,加入二甲苯脱蜡后,梯度乙醇水化;每个试管中加入胶原消化酶 Accutase 3~5 ml,放入 37℃ 恒温水浴锅孵育 30 min,每隔 10 min 振荡吹打 1 次;消化后,立即加入生理盐水至 10 ml,1 500 r/min 离心沉淀 5 min,弃上清,再加入纯净水漂洗,以 100 目尼龙网过滤,除去未消化完的组织片,以短时低速离心沉淀,弃上清,加入冰冷 70% 乙醇固定,放冰箱备检。

#### 1.4 免疫荧光标记

单细胞悬液分别进行免疫标记, cyclin D1-FITC 采用直接荧光标记法, cyclin E、p21、p16 采用间接免疫荧光标记法,二抗分别为 PE 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 1 000 稀释)、FITC 标记的羊抗兔 IgG (1 : 1 000 稀释)。阴性对照为不加一抗的二抗 IgG。流式细胞仪单参数检测,分别计数各指标的荧光强度。

#### 1.5 结果判断

以荧光指数 (fluorescence index, FI) 表示 cyclin E、cyclin D1、p21、p16 蛋白的相对含量。FI = (实验样品平均荧光强度 - 阴性对照样品平均荧光强度) / 正常喉黏膜组织平均荧光强度。以本实验结果为例, FI = 0.99~1.01 为正常, FI < 0.99 为阴性, FI > 1.01 为阳性。

#### 1.6 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,数值的比较采用方差分析及 *t* 检验,率的比较根据具体情况采用  $\chi^2$  检验、校正  $\chi^2$  检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 cyclin D1、cyclin E 在声带息肉、喉癌前病变、喉癌组织中的表达

cyclin D1、cyclin E 在声带息肉、喉癌前病变、喉癌组织中表达的比较见表 1。cyclin D1、cyclin E 的表达 3 组比较均差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 7.953, 31.435, P < 0.05, P < 0.01$ )。

#### 2.2 p16、p21 在声带息肉、喉癌前病变、喉癌组织中的表达

p16、p21 在声带息肉、喉癌前病变、喉癌组织中表达的比较见表 2。p16 的表达 3 组比较差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 10.023, P < 0.05$ ), p21 的表达 3 组间差异无统计学意义。

表 1 声带息肉、喉癌前病变和喉癌组织中 cyclin D1、cyclin E 表达的比较

$\bar{x} \pm s$

例数	cyclin D1			cyclin E			
	FI	阳性例数	阳性率/%	FI	阳性例数	阳性率/%	
声带息肉	23	1.01 ± 0.04	3	13.04	1.06 ± 0.10	6	26.09
癌前病变	69	1.02 ± 0.04	14	20.29	1.08 ± 0.19	30	43.48
喉癌组织	33	1.03 ± 0.05	14	42.42	1.21 ± 0.25	31	93.94

表 2 声带息肉、喉癌前病变和喉癌组织中 p16、p21 表达的比较

$\bar{x} \pm s$

例数	p16			p21			
	FI	阳性例数	阳性率/%	FI	阳性例数	阳性率/%	
声带息肉	23	1.02 ± 0.03	13	61.90	1.05 ± 0.13	10	47.62
癌前病变	69	0.99 ± 0.08	25	40.98	0.95 ± 0.14	16	26.23
喉癌组织	33	0.97 ± 0.05	3	14.28	0.87 ± 0.20	5	23.81

### 3 讨论

喉癌同所有肿瘤性疾病一样,其上皮细胞癌变机制不明。细胞周期中, $G_1/S$ 期的调控点是细胞内外信号经过传递、整合汇集到细胞核,对细胞的增殖进行调控的关键点,该点调控异常与肿瘤的发生、发展关系密切。细胞周期调控异常与肿瘤的关系提示肿瘤是一种细胞周期病,其中 cyclin D1、cyclin E 是细胞周期  $G_1/S$  期转换过程中重要的正性调节信号,通过与 CDK2 结合形成活化的 cyclin D1/CDK2、cyclin E/CDK2 复合物,引起一系列与 S 期有关的靶分子的表达,从而促使细胞完成 DNA 复制,促进细胞增殖。p16 是 INK4(CDK4 的抑制剂)家族成员,p21 是 CKIs(激酶抑制剂)中的 Cip/Kip 家族成员之一,两者具有广泛的激酶抑制剂活性,可与几乎每一个 cyclin/CDK 复合物结合并抑制其活性,在细胞周期中发挥着负性调节作用。现已发现 cyclin E、cyclin D1 在多种肿瘤中表达上调<sup>[1-4]</sup>,而 p16、p21 在多种肿瘤中表达下调也见报道<sup>[5-8]</sup>;但 p21 在某些肿瘤中的表达报道不一致<sup>[9]</sup>。同时观察 cyclin D1、cyclin E 和 p16、p21 基因蛋白产物在喉癌癌变过程中的表达国内外报道较少<sup>[10]</sup>。

本实验研究结果显示,cyclin D1、cyclin E 的阳性率表达形成声带息肉→喉癌前病变→喉癌组织阳性强度逐渐增强的梯度现象;p21、p16 在声带息肉→喉癌前病变→喉癌组织中阳性表达强度呈逐渐减弱的现象。但 p21 整体表达较弱,3 组比较差异无统计学意义。本研究中喉癌组织 cyclin E 平均表达量明显高于声带息肉组织,p16 平均表达量明显低于声带息肉组织;而在喉癌前病变组织的表达处于居中,且与声带息肉区别较小,说明喉癌组织中存在 cyclin E 蛋白表达上调及 p16 蛋白表达下调,与 Shintani 等<sup>[11]</sup>的结果一致。虽然 cyclin D1 与 p21 在 3 组中的表达逐渐上调或逐渐下调的趋势不明显,cyclin D1 过表达及 p21 低表达仅在一定比例喉癌中出现。这种表达情况可能与喉部组织标本相对较小,脱蜡后制成单细胞悬液时细胞数量较少有关。但同时提示与单一细胞周期调控因子表达异常相比,多个与细胞周期相关的正负调控因子失衡在喉癌的发生中可能起着更重要的作用。

本研究结果支持细胞周期调控紊乱在恶性肿瘤发病中起重要作用的观点,由此推测  $G_1/S$  期正负调控因子的失衡(如正性调控因子 cyclin D1、cyclin E 高表达,负性调控因子 p16、p21 低表达)使

正常的细胞周期控制能力丧失,导致细胞恶性增殖而致喉癌发生。

### 参考文献

- [1] ZHANG H. Life without kinase: cyclin E promotes DNA replication licensing and beyond[J]. *Mol Cell*, 2007,25:175-176.
- [2] YAMANOUCHI H, FURIHATA M, FUJITA J, et al. Expression of cyclin E and cyclin D1 in non-small cell lung cancers[J]. *Lung Cancer*, 2001,31:3-8.
- [3] COVERLEY D, LAMAN H, LASKEY R A. Distinct roles for cyclin-E and a during DNA replication complex assembly and activation[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 523-528.
- [4] LODEN M, STIGHAL L M, NIELSEN N H, et al. The cyclin-D1 high and cyclin-E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 4680-4690.
- [5] HU Y X, WATANABE H, OHTSUBO, et al. Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3: 1473-1477.
- [6] ARAP W, NISHIKAMA R, FURNARI F B, et al. Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 1351-1375.
- [7] OHTANI N, YAMA KOSHI K, TAKA HASHI A, et al. The p16 IN K4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression [J]. *J Med Invest*, 2004, 51: 146-153.
- [8] GALLO O, SANTUCCI M, FRANCHI A. Cumulative prognostic value of p16/CDKN2 and p53 oncoprotein expression in premalignant laryngeal lesions [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89: 1161-1163.
- [9] JANG T J, KANG M S, KIM H, et al. Increased expression of Cyclin D1, Cyclin E and p21Cip1 associated with decreased expression of p27Kip1 in chemically induced rat mammary carcinogenesis[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 12: 1222-1232.
- [10] 冯红, 于卫芳, 张立玮, 等. 贲门癌变过程中 Survivin 和 CyclinE 蛋白的表达及相关性研究[J]. *中国综合临床*, 2007, 23(1): 52-54.
- [11] SHINTANI S, MIHARA M, NAKAHARA Y, et al. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity[J]. *Oral Oncol*, 2002, 38: 235-243.

(收稿日期:2013-09-16)