

CK4 与 CK13 在喉咽鳞状细胞癌中的表达及其临床意义*

黄沂传¹ 李鹏¹ 徐艳丽² 李薇¹

[摘要] 目的:探讨喉咽鳞状细胞癌组织中细胞角蛋白 13(CK13)和细胞角蛋白 4(CK4)的表达与喉咽鳞状细胞癌临床病理特征的关系。方法:应用免疫组织化学方法检测 56 例喉咽鳞状细胞癌患者的癌组织标本及癌旁正常组织中 CK13 及 CK4 的蛋白表达,应用 VIDAS 图像分析仪分析其图像的积分光密度,并进行统计学处理。结果:CK4 与 CK13 在癌旁正常组织中均呈强阳性表达,而在喉咽鳞状细胞癌组织中的表达下降($P < 0.01$),且与病理分化程度均呈正相关($P < 0.05$)。CK4 在 T₁、T₂ 期的表达最强,在 T₃、T₄ 期的表达依次减弱($F = 93.814, P < 0.05$);CK4 在 I ~ II 期的表达最强,在 III 期、IV 期中的表达逐渐减弱($F = 127.894, P < 0.05$);CK4 在无淋巴结转移的鳞状细胞癌组织中的表达较强,而在有淋巴结转移的鳞状细胞癌组织中表达较弱($T = 10.678, P < 0.05$)。而 CK13 与肿瘤大小、临床分期及有无淋巴结转移无显著相关。结论:CK4 与 CK13 共同检测对喉咽鳞状细胞癌的早期诊断、手术方法的选择以及判断预后具有指导意义。

[关键词] 细胞角蛋白;喉咽鳞状细胞癌;免疫组织化学

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.12.012

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

The expression of CK4,CK13 in hypopharyngeal squamous cell carcinomas and its clinical significance

HUANG Yichuan¹ LI Peng¹ XU Yanli² LI Wei¹

(¹Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, 266003, China; ²Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Jimo Municipal Hospital)

Corresponding author: LI Wei, E-mail: liweishang2004@aliyun.com

Abstract Objective: To investigate the expressions of cytokeratin (CK) 4 and 13 in hypopharyngeal squamous cell carcinomas(HSCC) and to analyse their relationship with the clinicopathologic features. **Method:** The expressions of CK4 and CK13 were detected by immunohistochemistry in the cancer tissues and pericarcinomatous tissues of 56 cases with HSCC. Then the integral optical density (IOD) was measured by VIDAS image analyser and the data were statistically treated by SPSS 13.0. **Result:** The expressions of CK4 and CK13 were significantly higher in pericarcinomatous tissues than those in cancerous tissues of HSCC ($P < 0.01$). Moreover, the expression levels of CK4 and CK13 were positively related to the extent of differentiation of HSCC ($P < 0.05$). The expression of CK4 were stonger in T₁ - T₂, stage I - II and N0 than in T₃ - T₄, stage III - IV and N+ ($F = 93.814, F = 127.894, and T = 10.678$ respectively, all $P < 0.05$). However the expression of did not correlated to the tumor size, clinical stage and N stage in HSCC. **Conclusion:** The detection of CK4 and CK13 might play an important role in the early diagnosis, surgical procedure selection and prognostic prediction of HSCC.

Key words cytokeratin; hypopharyngeal squamous cell carcinomas; immunohistochemistry

喉咽鳞状细胞癌是头颈肿瘤中预后最差的一种恶性肿瘤,由于其部位隐匿,不易早期发现,且生物学行为恶劣,极易发生颈部淋巴结转移,因而对喉咽鳞状细胞癌患者的早期诊断及干预成为改善预后的关键^[1-2]。研究发现,细胞角蛋白(cytokera-

tin,CK)在上皮细胞中含量丰富而稳定,且具有高度的细胞特异性、组织特异性及分化特异性,因而CK亚型的表达模式成为鉴别肿瘤来源以及判断预后的极具优越性的生物学标记。其中,CK4及CK13“角蛋白对”是黏膜上皮中表达程度最高的CK亚型。而目前对于CK4及CK13基因的表达与喉咽鳞状细胞癌的关系却鲜有报道^[3-4]。本研究采用免疫组织化学方法检测CK4及CK13在56例喉咽鳞状细胞癌及相应正常黏膜中的表达情况,分析其与喉咽鳞状细胞癌恶性生物学行为的关系,

* 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No: Y2007C130)

¹ 青岛大学医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科(山东青岛, 266003)

² 山东省即墨市人民医院耳鼻咽喉头颈外科
通信作者:李薇, E-mail: liweishang2004@aliyun.com

以期应用 CK4 及 CK13 对喉咽鳞状细胞癌作出早期诊断并判断预后提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2005-01—2008-01 在青岛大学医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科手术切除的喉咽鳞状细胞癌存档标本 56 例为实验组。纳入标准:①术前未接受放、化疗及任何生物治疗;②原发于喉咽部,病理确诊为喉咽部鳞状细胞癌;③临床病历记录及病理资料齐全,病理蜡块保存完整;④以颈淋巴结清扫术后病理为依据确定颈淋巴结是否有转移。56 例中,男 54 例,女 2 例;年龄 44~74 岁,平均 57.88(中位数 56)岁;梨状窝癌 50 例,下咽后壁癌 4 例,环后癌 2 例;按 2002 年 UICC TNM 分期标准: T_1 4 例($T_1N_0M_0$ 1 例, $T_1N_1M_0$ 1 例, $T_1N_2M_0$ 2 例); T_2 11 例($T_2N_0M_0$ 2 例, $T_2N_1M_0$ 3 例, $T_2N_2M_0$ 6 例); T_3 26 例($T_3N_0M_0$ 2 例, $T_3N_1M_0$ 10 例, $T_3N_2M_0$ 14 例); T_4 15 例($T_4N_1M_0$ 5 例, $T_4N_2M_0$ 10 例)。临床分期:I 期 1 例,II 期 2 例,III 期 11 例,IV 期 42 例(IVA 37 例,IVB 5 例)。病理分级:高分化 4 例,中分化 32 例,低分化 20 例。52 例行颈淋巴结清扫术,术后病理确诊有淋巴结转移者 48 例,无淋巴结转移者 4 例;4 例未行颈淋巴结清扫术者经 2~3 年随访,其中 2 例有淋巴结转移,2 例失访,本文作为无淋巴结转移病例统计。对照组 56 例选取喉咽癌切除术中癌旁正常组织:指肿瘤边缘外 1~3 cm 的组织,经病理证实未发生癌变。

1.2 主要试剂

一抗为 CK4 及 CK13 的兔抗人单克隆抗体,与一抗都相容的通用二抗(英国 Abcam 公司)。PV9000 二步法免疫组织化学检测试剂盒(美国 Zymed 公司)。即用型免疫组织化学超敏 S-P 试剂盒(武汉博士德公司)。抗体稀释液(北京中杉金桥公司)。

1.3 实验方法、结果判定及图像分析

所有标本均同时选取癌旁正常黏膜组织、肿瘤组织。常规 40 g/L 中性甲醛固定,逐级乙醇脱水,常规石蜡包埋。每例标本用 Leica 石蜡切片机做 3 μ m 连续切片 3 张,1 张空白对照,2 张行免疫组织化学染色。采用免疫组织化学通用型两步法,以细胞膜和(或)细胞质中出现清晰棕黄色颗粒作为阳性判断标准。染色结果半定量判定方法,即以阳性细胞数所占百分比表示,每张切片在 100 倍镜下观察整体染色情况,随机选择含有肿瘤细胞的 5 个区域,400 倍物镜下每个区域记数 200 个细胞。CK13、CK4 阳性细胞率 $\leq 5\%$ 为(-),阳性细胞率 6%~25% 为(+),阳性细胞率 26%~50% 为(++),阳性细胞率 $> 50\%$ 为(+++), $> 25\%$ 示

为高表达。以上均由两位有经验的病理医师在临床和病理资料双盲的情况下评估。然后在 400 倍显微镜下随机选取 3 个视野,拍摄并对图像进行裁剪、分割、过滤和提取。用 VIDAS 图像分析仪分析其图像的积分光密度(integral optical density, iOD),iOD 的值表示抗原的表达水平,iOD 值越大,说明抗原表达的水平越高,反之亦然。相同的方法观测癌旁正常组织。

1.4 统计学处理

结果应用统计软件包 SPSS 13.0 对数据进行统计分析。对 CK13、CK4 在癌旁正常组织和喉咽鳞状细胞癌临床分期、病理分期及有无淋巴结转移中的表达进行比较,所得数据采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对 CK13、CK4 在喉咽鳞状细胞癌高分化、中分化、低分化组织中的表达进行相互比较,采用 Newman-Keuls 法。对各检测指标与临床病理因素的关系采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 CK13、CK4 在癌旁正常组织及喉咽鳞状细胞癌组织中的分布

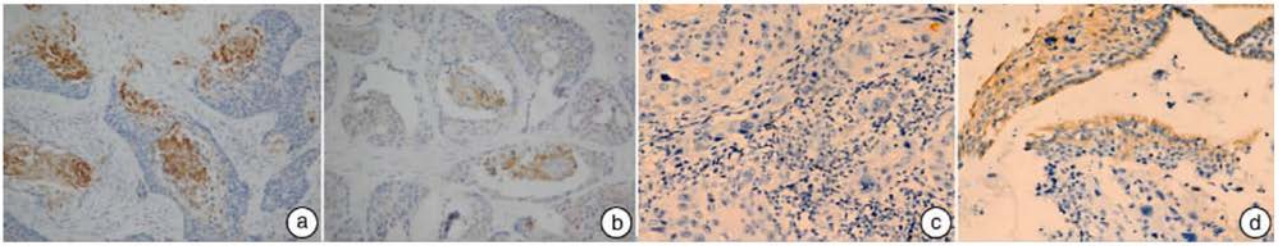
CK13 主要位于胞质,显示棕黄色,主要分布于角质层和棘层,基底层无表达。CK13 在高分化喉咽鳞状细胞癌表达呈阳性,着色部位主要在上皮的浅层和癌巢的角化珠周围的棘细胞内,部分病例可见癌巢周边基膜增厚;在中分化、低分化喉咽鳞状细胞癌组织中,着色结构不明显或消失。CK13 在癌旁正常鳞状上皮中呈强阳性表达(图 1)。CK4 主要位于细胞膜,在成纤维细胞的细胞膜和胞质中呈棕黄色或棕褐色的颗粒或团块状,部分细胞核中也有少量分布,基底层中亦有表达;在癌旁正常组织中呈强阳性表达,在 56 例喉咽癌组织中表达下降(图 2)。

2.2 CK13、CK4 在喉咽鳞状细胞癌组织中的表达

CK13 在高分化喉咽鳞状细胞癌中表达呈阳性,在中分化、低分化喉咽鳞状细胞癌组织中,着色结构不明显或消失。56 例喉咽癌组织中 44 例(-),仅有 12 例(+).在半定量测试中 CK13 随着肿瘤分化程度降低平均积分光密度有明显下降,其差异有统计学意义($F = 57.798, P < 0.05$);CK4 在喉咽鳞状细胞癌组织中也伴随着病理分级由高分化到低分化的变化,表达由减少到消失,其差异有统计学意义($F = 57.995, P < 0.05$)(表 1)。

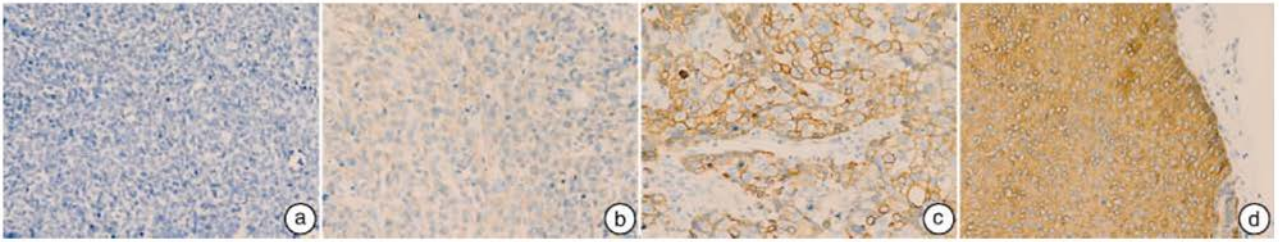
2.3 喉咽鳞状细胞癌中 CK13 与 CK4 的表达与临床特征的关系

喉咽鳞状细胞癌中 CK13 与 CK4 的表达与临床特征的关系见表 2。CK13 在喉咽鳞状细胞癌组织中的表达与肿瘤大小、临床分期、淋巴结转移无



a;CK13 在高分化癌中的表达(++)；b:CK13 在中分化癌中的表达(+)；c:CK13 在低分化癌中的表达(-)；d:CK13 在癌旁正常组织中的表达(+++)。

图 1 CK13 在喉咽鳞状细胞癌组织中的表达及分布(DAB×200)



a;CK4 在低分化 T₁N₀M₀ 癌中的表达(-)；b:CK4 在低分化 T₄N₀M₀ 癌中的表达(+)；c:CK4 在低分化癌中的表达(+++)；d:CK4 在癌旁正常组织中的表达(++++)。

图 2 CK4 在喉咽鳞状细胞癌组织中的表达及分布(DAB×200)

表 1 喉咽鳞状细胞癌组织中 CK13 与 CK4 的表达

组别	例数	CK13	CK4
高分化	4	7.293 9±1.276 4	12.714 1±1.667 4
中分化	32	5.052 0±0.847 1	9.557 2±1.007 4
低分化	20	3.170 0±0.716 3	7.049 6±1.113 3

表 2 喉咽鳞状细胞癌组织中 CK13 和 CK4 的表达与临床特征的关系

临床特征	例数	CK13	CK4
肿瘤大小			
T ₁ ~T ₂	15	5.037 0±0.291 2	14.021 1±1.170 7
T ₃	26	5.106 0±0.678 4	12.465 9±1.331 9
T ₄	15	4.998 2±1.115 7	7.784 3±1.466 0
临床分期			
I~II期	3	5.028 2±0.944 9	14.225 1±1.210 0
III期	11	5.042 1±1.104 3	11.917 6±1.160 3
IV期	42	5.067 4±1.042 7	7.424 3±1.230 4
淋巴转移			
无转移	6	5.100 0±0.109 5	13.962 1±1.175 4
有转移	50	5.168 3±0.885 1	8.529 0±1.508 6

明显相关($P>0.05$)。CK4 在 T₁、T₂ 期的表达最强,在 T₃、T₄ 期的表达依次减弱($F=93.814, P<0.05$)；CK4 在临床分期 I、II 期的表达最强,在 III 期中的表达减弱,在 IV 期中的表达最弱,其差异有统计学意义($F=127.894, P<0.05$)；CK4 在无淋巴结的鳞状细胞癌组织中的表达较强,在有淋巴结转移的鳞状细胞癌组织中的表达较弱,其差异有统

计学意义($T=10.678, P<0.05$)。

3 讨论

CK 由多基因家族编码,主要表达于上皮细胞。已知的 CK 亚型至少有 20 种,根据其相对分子质量(Mr)和等电点不同分为两型, I 型为酸性, II 型为中性或碱性,通常 CK 在上皮中以“角蛋白对”的形式表达,“角蛋白对”由一个 I 型角蛋白分子和比其大 Mr8 000 的 II 型角蛋白分子构成。通常复层上皮的基底层表达 CK5/CK14,角化上皮的基底上层表达 CK1/CK10,非角化上皮的基底上层表达 CK4/CK13。CK4/CK13 免疫阳性定位相同,均在胞膜。

目前,关于 CK13 基因在不同肿瘤中的表达与鳞状细胞癌病理分级、临床分期、淋巴结转移的关系,国内外文献报道不尽一致。Klijanienko 等^[5]在肺癌的研究中证实 CK13 可以作为细胞恶性程度的标志。在所有正常良性增生性病例中可以看到 CK13 的表达,而在不典型增生、原位癌以及癌细胞中,CK13 表达下降或消失。Yanagawa 等^[4]在舌癌中也发现,CK13 表达下降,并且与鳞状细胞癌病理学分级以及淋巴结转移有一定关系。国内研究证实,随大鼠口腔癌变进展,CK4/CK13 在基底上皮表达逐渐减少。通过采用基因表达谱芯片筛选头颈鳞状细胞癌的基因表达谱,发现 CK4/CK13 在头颈鳞状细胞癌中的表达较其对照正常黏膜显著下调^[6]。CK13 基因的杂合性丢失与喉鳞状细胞癌的分化程度相关,而与临床分期、淋巴结转移无显著相关^[7]。本实验中我们也得到了同样结论,在喉

咽鳞状细胞癌中 CK13 的表达亦较癌旁正常组织显著下调,且与喉咽鳞状细胞癌的分化程度相关,而与临床分期、淋巴结转移无显著相关。关于 CK13 基因在鳞状细胞癌组织中表达下调的机制可能是由于其甲基化程度增高所致^[8]。

迄今为止,关于 CK4 的表达与肿瘤关系的研究多限于食管鳞状细胞癌,有报道表明,在食管鳞状细胞癌的演进过程中,CK4 是其重要的生物学标记物。通过对癌前病变和侵袭性肿瘤组织进行免疫组织化学分析证实,CK4 蛋白主要表达在食管上部的非角化复层鳞状上皮细胞内。Chung 等^[9]研究证实,与正常的上皮组织比较,CK4 在食管鳞状细胞癌组织中的表达会下降 80%~85%。Xue 等^[10]研究报道,CK4 在食管鳞状细胞癌组织和异常组织中呈低表达状态,对食管鳞状细胞癌的活检组织研究发现 CK4 在所有食管鳞状细胞癌组织中的表达为阴性,对其他肿瘤组织的活检研究中有 84% 的肿瘤组织中 CK4 的表达为阳性。CK4 与癌的病理学分级密切相关,并在癌的浸润转移等生物学行为中起重要作用。Viaene 等^[11]在 mRNA 的表达研究过程中发现,高分化的食管鳞状细胞癌中 CK4 有局灶性的表达,而在低分化的食管鳞状细胞癌中没有检测到 CK4 的表达,由此可以说明食管鳞状细胞癌组织学分化程度的不同(高分化、中分化、低分化)可以影响 CK4 因子的表达。因而 CK4 可以作为食管鳞状细胞癌早期诊断过程中的重要的生物学标记物^[12]。

本实验研究结果显示,与癌旁正常组织相比,CK4 在喉咽鳞状细胞癌组织中的表达下调,差异有统计学意义($P < 0.05$),此结果与既往关于 CK4 的表达与食管鳞状细胞癌关系的研究相一致。另外,CK4 的表达与喉咽鳞状细胞癌肿瘤的大小、临床分期及是否有淋巴结转移均有关,随着喉咽鳞状细胞癌恶性程度进展的加强,CK4 的表达逐渐减少,提示 CK4 的表达可能与喉咽鳞状细胞癌的演进有关。喉咽鳞状细胞癌组织分化程度的不同会影响 CK4 因子的表达,CK4 在高分化鳞状细胞癌中表达较高,低分化鳞状细胞癌中表达最低,肿瘤细胞的分化程度决定着肿瘤的恶性程度,因此,CK4 可以作为喉咽鳞状细胞癌恶性度的标志。目前关于 CK4 基因的表达在喉咽癌发生、发展过程中的作用机制仍需进一步实验研究。

综上所述,在黏膜上皮中表达程度最高的 CK 亚型——CK4 及 CK13,不仅在喉咽鳞状细胞癌组织中的表达下调,而且与喉咽鳞状细胞癌组织的分化程度呈正相关,其中 CK4 的表达更与喉咽鳞状细胞癌肿瘤的大小、临床分期及是否有淋巴结转移

均有关,因此,二者的检测对于喉咽鳞状细胞癌的早期诊断、手术方法的选择以及预后的判断具有指导意义。

参考文献

- [1] TAKES R P, STROJAN P, SILVER C E, et al. Current trends in initial management of hypopharyngeal cancer; the declining use of open surgery[J]. *Head Neck*, 2012, 34: 270-281.
- [2] EDGE S, BYRD D R, COMPTON C C, et al. *AJCC cancer staging handbook*[M]. 7th ed. Chicago: Springer, 2010: 129-144.
- [3] TAKIKITA M, HU N, SHOU J Z, et al. Fascin and CK4 as biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31: 945-952.
- [4] YANAGAWA T, YOSHIDA H, YAMAGATA K, et al. Loss of cytokeratin 13 expression in squamous cell carcinoma of the tongue is a possible sign for local recurrence[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26: 215-220.
- [5] KLIJANIENKO J, MICHEAU C, CARLU C, et al. Significance of keratin 13 and 6 expression in normal, dysplastic and malignant squamous epithelium of pyriform fossa[J]. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1989, 416: 121-124.
- [6] 丁凯,毛志福,孙作永.食管鳞状细胞癌中细胞角蛋白 13 的表达及临床意义[J]. *疑难病杂志*, 2010, 9(10): 746-748.
- [7] 贺光,富伟能,邱广斌,等.细胞角蛋白基因 13 在喉鳞状细胞癌中缺失和表达的研究[J]. *遗传学报*, 2002, 29(5): 390-395.
- [8] QIU Y, TIAN Y, XIAO J. [The role of cytokeratin 13 gene in human nasopharyngeal carcinoma][J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 1999, 21: 444-446.
- [9] CHUNG J Y, BRAUNSCHWEIG T, HU N, et al. A multiplex tissue immunoblotting assay for proteomic profiling: a pilot study of the normal to tumor transition of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15: 1403-1408.
- [10] XUE L Y, HU N, SONG Y M, et al. Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2006, 22: 296-309.
- [11] VIAENE A I, BAERT J H. Expression of cytokeratin-mRNAs in squamous-cell carcinoma and balloon-cell formation of human oesophageal epithelium[J]. *Histochem J*, 1995, 27: 69-78.
- [12] TAKIKITA M, HU N, SHOU J Z, et al. Fascin and CK4 as biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31: 945-952.

(收稿日期:2013-09-24)