

髓样分化因子 88 在喉癌中的表达及临床意义*

鲁保才¹ 狄文玉² 连荣¹ 卢振民¹ 余文发¹

[摘要] 目的:探讨髓样分化因子 88(MyD88)在喉癌组织中的表达及临床意义。方法:收集喉癌患者 51 例,所有患者术后均经病理诊断结果证实,通过免疫组织化学方法检测 MyD88 蛋白在喉癌及其癌旁组织中的表达,并探讨 MyD88 表达量与临床病理特征和患者预后的相关性。结果:MyD88 在喉癌组织中阳性表达率为 68.6%,明显高于癌旁正常组织中的阳性表达率 11.8%($P<0.01$);MyD88 的阳性表达率与喉癌患者的年龄、性别、分化程度和肿瘤部位无关($P>0.05$),与临床分期($P<0.01$)和淋巴结转移($P<0.05$)呈正相关。MyD88 的表达量与患者的 5 年生存率呈反比,高表达 MyD88 的患者 5 年生存率显著低于低表达者($P<0.05$)。结论:MyD88 可能是喉癌发病机制中的重要参与者,靶向 MyD88 的治疗有可能改善喉癌患者的预后。

[关键词] 喉肿瘤;髓样分化因子 88;免疫组织化学

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.16.017

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

The expression and clinical significance of MyD88 in laryngeal cancer

LU Baocai¹ DI Wenyu² LIAN Rong¹ LU Zhenmin¹ YU Wenfa¹

(¹Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, 453100, China; ²Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University)

Corresponding author: YU Wenfa, E-mail: yuwf7683@163.com

Abstract Objective: To investigate the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) expression in laryngeal carcinoma and its clinical significance. **Method:** Fifty-one patients with laryngeal carcinoma were collected, and all patients were confirmed by pathological diagnosis results. The expression of MyD88 protein was detected by immunohistochemical method in laryngeal cancer and its adjacent tissues to investigate the correlation among MyD88 expression, clinicopathological characteristics and prognosis of patients. **Result:** The positive expression rate of MyD88 in laryngeal cancer tissues was 68.6%, significantly higher than that in normal tissues adjacent to carcinoma of which positive expression rate was 11.8%; MyD88 positive rate had nothing to do with laryngeal cancer patients age, sex, differentiation and tumour location (all $P>0.05$), but correlated with clinical stage ($P<0.01$) and lymph node metastasis ($P<0.05$). In addition, the study also found that the expression of MyD88 quantity was inversely proportional with the five-year survival rate. The survival rate of patients with higher expression of MyD88 was significantly lower than that of patients with lower expression ($P<0.05$). **Conclusion:** MyD88 may be an important participant in the pathogenesis of laryngeal carcinoma, MyD88 targeted therapy may improve the prognosis of patients with laryngeal cancer.

Key words laryngeal neoplasms; myeloid differentiation factor 88; immunohistochemistry

喉癌是头颈部常见的肿瘤之一,多起源于喉黏膜上皮组织,以鳞状细胞癌多见,男性患者多于女性,以往研究发现喉癌的发生与吸烟、饮酒和乳头状瘤病毒的感染等因素相关,近年来喉癌的发病率和死亡率呈现逐年增加的趋势^[1],其中转移和复发是导致喉癌治疗失败的重要原因^[2]。因此,深入研究喉癌发生、发展的分子病理学机制对其治疗可能具有重要意义。最近大量研究表明髓样分化因子 88(MyD88)在多种肿瘤的发生、发展和侵袭中发

挥重要的作用^[3],本文通过研究 MyD88 在临床喉癌患者肿瘤组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的相关性,以期对喉癌的治疗提供新的思路和方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2001-01—2008-01 在我院接受手术治疗的喉癌患者 51 例,其中男 36 例,女 15 例;年龄 45~75 岁,平均(61.2±7.6)岁。所有患者诊断均经病理结果证实,具有完整的临床病历资料,并均行手术治疗,患者一般资料见表 1。排除检查前做过放疗和化疗的患者,每隔 2 个月通过电话或来院随访,随访期限为 5 年。本研究经我院伦理委员会批准,并与患者术前签署知情同意书。

* 基金项目:河南省高等学校青年骨干教师资助计划(No: 2010GGJS-120);河南省卫生科技创新人才工程(No: 2010141)

¹ 新乡医学院第一附属医院耳鼻咽喉科(河南卫辉,453100)

² 新乡医学院第一附属医院病理科

通信作者:余文发, E-mail: yuwf7683@163.com

1.2 免疫组织化学染色

所有新鲜术中切除标本均经 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,以 3 μ m 切片,60℃ 烘箱中烤片 4 h 备用。将石蜡切片依次放入二甲苯和无水乙醇中进行脱蜡和水化,1×PBS 冲洗 3 次,5 min/次。然后将石蜡切片放入柠檬酸盐修复液中进行组织抗原修复,采用高压修复方式,高压锅开始喷气后计时 2 min,自然冷却压力锅至室温,取出切片。蒸馏水冲洗 2 次后,PBS 冲洗 2 次,3 min/次。滴加过氧化酶阻断溶液,室温孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 3 次,3 min/次。滴加动物非免疫血清,室温孵育 10 min,倾去。滴加一抗 caspase-1(1:150,1:300 和 1:400),室温孵育 60 min,阴性对照用 PBS 代替。PBS 冲洗 3 次,3 min/次。滴加生物素标记的二抗(中山金桥,羊抗兔 IgG),室温孵育 10 min。PBS 冲洗 3 次,3 min/次。滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液,室温孵育 10 min。PBS 冲洗 3 次,3 min/次。DAB 显色剂显色。自来水冲洗后,苏木精复染,自来水冲洗返蓝,乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。苏木精-伊红染色按照标准流程操作。

免疫结果判断标准:MyD88 以细胞质中出现棕黄色沉淀为阳性,由两位有经验的病理科医师分别判读,采用双盲法对每张切片在高倍镜下($\times 400$)计数 15 个视野,平均 100 个细胞中 MyD88 阳性细胞的个数作为阳性细胞率。免疫组织化学阳性结果(细胞核或细胞质中出现棕黄色颗粒)的判读参照以往文献^[4],主要根据以下两方面:①阳性细胞的百分比:<1% 为 0 分,1%~10% 为 1 分,>10%~30% 为 2 分,>30%~60% 为 3 分,>60% 为 4 分;②阳性细胞的染色强弱:阴性为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。最终结果判定:0~2 分为阴性,3~7 分为阳性。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,计数资料采取 χ^2 检验,用 Kaplan-Meier 法进行生存分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 喉癌和癌旁组织中 MyD88 蛋白的表达

免疫组织化学检测结果表明,喉癌组织中 MyD88 阳性细胞胞质呈棕黄色或胞核呈棕褐色,且呈弥漫性表达,MyD88 在癌旁正常组织中的表达则显著减少(图 1)。统计结果发现 MyD88 在喉癌组织中的阳性表达率为 68.6%(35/51),癌旁正常组织中的阳性表达率为 11.8%(6/51),两者差异有统计学意义($\chi^2=34.3, P<0.01$)。

2.2 MyD88 的表达与喉癌临床病理参数间的关系

MyD88 的阳性表达率与喉癌患者的性别、年

龄、分化程度和肿瘤部位无关($P>0.05$),与临床分期($P<0.01$)和淋巴结转移($P<0.05$)呈正相关,临床分期越高,有淋巴结转移,MyD88 的表达量越高(表 1)。

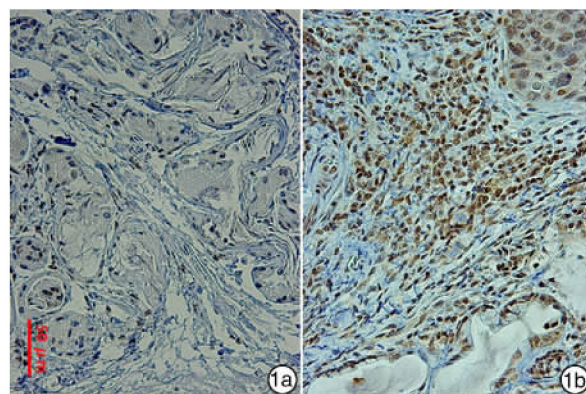


图 1 癌旁正常组织(1a)和喉癌组织(1b)中 MyD88 的免疫组织化学染色结果

表 1 MyD88 与喉癌临床病理参数间的关系

例(%)

临床病理参数	例数	MyD88 表达	
		阳性	阴性
性别			
男	36	27(75.0)	9(25.0)
女	15	8(53.3)	7(46.7)
年龄/岁			
<60	30	20(66.7)	10(33.3)
≥60	21	15(71.4)	6(28.6)
分化程度			
低	15	9(60.0)	6(40.0)
中	20	14(70.0)	6(30.0)
高	16	12(75.0)	4(25.0)
临床分期 ²⁾			
I	10	3(30.0)	7(70.0)
II	9	4(44.4)	5(55.6)
III	11	9(81.8)	2(18.2)
IV	21	19(90.5)	2(9.5)
淋巴结转移			
有	27	20(74.1)	7(25.9)
无	24	10(41.7)	14(58.3) ¹⁾
肿瘤部位			
声门型	34	23(67.6)	11(32.4)
声门上型	17	12(70.6)	5(29.4)

与有淋巴结转移比较,¹⁾ $P<0.05$;临床分期 I~IV 期之间比较,²⁾ $P<0.01$ 。

2.3 MyD88 的表达与患者 5 年生存率之间的关系

Kaplan-Meier 生存分析结果表明,MyD88 高表达的患者 5 年生存率明显低于低表达者($P<0.05$)。见图 2。

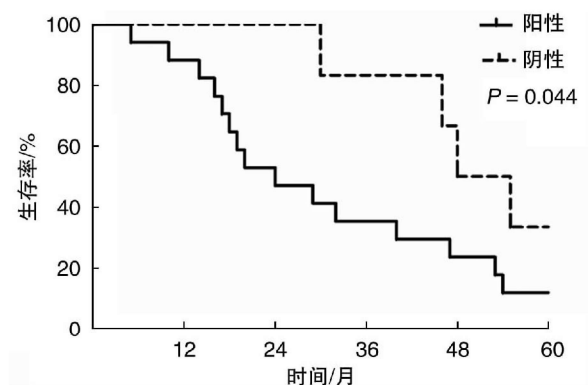


图 2 MyD88 的表达与患者 5 年生存率之间的关系

3 讨论

核因子 κ B(NF- κ B)在头颈部鳞状细胞癌的发生、发展和侵袭中发挥重要的作用^[5],在喉癌组织中 NF- κ B 的功能单位 p65 的表达量显著高于癌旁正常组织^[6],NF- κ B 的表达量是影响喉癌患者预后的重要因素^[7]。在体外细胞实验研究中发现,抑制 NF- κ B 的活性可以显著抑制喉癌细胞的增殖和侵袭,促进肿瘤细胞的凋亡,表明靶向调节 NF- κ B 的活性可以作为喉癌治疗的手段。MyD88 是 NF- κ B 信号通路激活的关键性衔接蛋白^[8],当细胞信号传导至 MyD88 时,MyD88 可与下游的丝/苏氨酸蛋白激酶 IRAK1 和 IRAK2 结合,导致 IRAK 自身磷酸化,磷酸化的 IRAK 脱离 MyD88 与 TRAF6 结合,TRAF6 活化 MPKKK 家族成员 NIK,后者的磷酸化激活 IKK 激酶,导致 κ B 的泛素化而从 IKK/NF- κ B 复合物释放,NF- κ B 由此活化转位进核,从而引起一系列特定基因的表达^[9]。本组研究发现 MyD88 表达部位主要在胞质中,且在喉癌肿瘤组织和癌旁正常组织中均存在表达,统计结果表明 MyD88 在喉癌组织中的表达明显升高,显著高于癌旁正常组织,提示 MyD88 可能在喉癌的发生、发展中同样发挥重要的作用。

证实 MyD88 在喉癌组织中高表达后,本研究进一步分析了 MyD88 的表达量与喉癌患者临床病理特征之间的相关性,研究发现 MyD88 的阳性表达与患者的年龄、性别、分化程度及肿瘤部位无关,而与患者的临床分期存在显著相关性,提示 MyD88 可能是影响喉癌发展的重要因素。此外,本研究结果表明 MyD88 高表达的患者 5 年生存率显著低于低表达者,提示 MyD88 可能是影响喉癌患者预后的重要因素。近年来,MyD88 已经证实存在多种肿瘤细胞中存在异常的高表达,其表达量增加可促进肿瘤细胞的侵袭和增殖,抑制或者敲除 MyD88 蛋白的表达可显著抑制肿瘤的发展和侵袭^[10-11]。结合本研究结果,提示 MyD88 有潜质成为喉癌治疗的新靶点,为了进一步探讨其在喉癌中

的作用,未来需要在体外细胞实验和动物体内实验中进一步去探讨。

综上所述,MyD88 在喉癌组织中的表达明显升高,并与患者的临床分期存在显著相关性,同时是影响患者临床预后的重要因素,提示 MyD88 可能在喉癌的发生和发展中发挥重要作用。此外,术后检测 MyD88 的表达对于判断患者的预后可能也具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] 胡尚英,陈万青,赵方辉,等. 中国 2003—2007 年口腔和咽喉癌发病与死亡分析[J]. 中华流行病学杂志,2013,34(2):164—167.
- [2] FOCHT K L, MARTIN-HARRIS B, BONILHA H S. Stroboscopic Parameters Reported as Voice Outcome Measures in Patients Treated for Laryngeal Cancer: A Systematic Review [J]. J Med Speech Lang Pathol, 2013,21:5—5.
- [3] KFOURY A, VIRARD F, RENNO T, et al. Dual function of MyD88 in inflammation and oncogenesis: implications for therapeutic intervention [J]. Curr Opin Oncol,2014,26:86—91.
- [4] 马丹,满晓华,高军,等. 胰腺癌组织 Shh、Gli1、Sufu、TAK1、p-TAK1 蛋白的表达及其临床意义[J]. 中华胰腺病杂志,2013,13(4):240—243.
- [5] STARSKA K, FORMA E, LEWY-TRENDI I, et al. The expression of SOCS1 and TLR4-NFkappaB pathway molecules in neoplastic cells as potential biomarker for the aggressive tumor phenotype in laryngeal carcinoma [J]. Folia Histochem Cytobiol,2009,47:401—410.
- [6] YOSHIDA K, SASAKI R, NISHIMURA H, et al. Nuclear factor-kappaB expression as a novel marker of radioresistance in early-stage laryngeal cancer[J]. Head Neck,2010,32:646—655.
- [7] HUANG C, HUANG K, WANG C, et al. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase 4 and nuclear factor-kappaB in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis [J]. Oncol Rep,2009,22:89—95.
- [8] WANG J Q, JEELALL Y S, FERGUSON L L, et al. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation[J]. Front Immunol,2014,5:367—367.
- [9] BEG A A, FINCO T S, NANTERMET P V, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation[J]. Mol Cell Biol,1993,13:3301—3310.
- [10] KFOURY A, VIRARD F, RENNO T, et al. Dual function of MyD88 in inflammation and oncogenesis: implications for therapeutic intervention [J]. Curr Opin Oncol,2014,26:86—91.
- [11] LOIARRO M, RUGGIERO V, SETTE C. Targeting the Toll-like receptor/interleukin 1 receptor pathway in human diseases: rational design of MyD88 inhibitors[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2013,13:222—226.

(收稿日期:2015-04-16)