

- 4 何跃平,罗晶晶,刘 钊,等.靶向 livin 的 sirna 对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响[J].中国免疫学杂志,2014,30(8):1028-1031.
- 5 Zhang JX, Cai MB, Wang XP, et al. Elevated DLL4 expression is correlated with VEGF and predicts poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. Med Oncol,2013,30(1):390-399.
- 6 Cui RX, Liu N, He QM, et al. Low BRMS1 expression promotes nasopharyngeal carcinomametastasis in vitro and in vivo and is associated with poor patient survival[J]. BMC Cancer,2012, 12(1):113-118.
- 7 Hsueh C, Chang YS, Tseng NM, et al. Expression pattern and prognostic significance of claudins 1, 4, and 7 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Hum Pathol,2010,41(7):944-950.
- 8 Luo WR, Wu AB, Fang WY, et al. Nuclear expression of N-cadherin correlates with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. Histopathology,2012,61(2):237-246.
- 9 Lu X, Fang W, Cai L, et al. TGFβR2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness[J]. Mol Cancer,2014,13(51):1476-4598.
- 10 Wang HY, Li YY, Fu S, et al. MicroRNA-30a promotes invasiveness and metastasis in vitro and in vivo through epithelial-mesenchymal transition and results in poor survival of nasopharyngeal carcinoma patients[J]. Exp Biol Med,2014,239(7):891-898.
- 11 Zhu X, Wang Y, Sun Y, et al. MiR-155 up-regulation by lmp1 DNA contributes to increased nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol,2014,271(9):1939-1945.
- 12 Zhang LY, Ho-Fun Lee V, Wong AM, et al. MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN[J]. Carcinogenesis,2013,34(2):454-463.
- 13 Xia H, Cheung WK, Sze J, et al. Mir-200a regulates epithelial-mesenchymal to stem-like transition via zeb2 and beta-catenin signaling[J]. J Biol Chem,2010,285(47):36995-37004.
- 14 Gao F, Zhao ZL, Zhao WT, et al. Mir-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013,431(3):610-616.
- 15 Lu J, Xu X, Liu X, et al. Predictive value of mir-9 as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma metastasis[J]. Br J Cancer, 2014,110(2):392-398.
- 16 Lu J, Luo H, Liu X, et al. Mir-9 targets cxcr4 and functions as a potential tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma[J]. Carcinogenesis,2014,35(3):554-563.
- 17 Liu N, Tang LL, Sun Y, et al. Mir-29c suppresses invasion and metastasis by targeting tiam1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Lett,2013,329(2):181-188.

[收稿日期 2015-11-20][本文编辑 黄晓红]

课题研究·论著

8-OHdG 与 p-EGFR 在舌鳞癌中的表达及两者的相关性

覃向明, 陈 蕾, 于大海, 梁飞新

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81360403)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

作者简介: 覃向明(1986-), 男, 在读研究生, 研究方向: 口腔肿瘤的诊治。E-mail: 79333172@qq.com

通讯作者: 梁飞新(1973-), 男, 医学博士, 副教授, 研究方向: 口腔癌的分子靶向药物治疗。E-mail: liangfx@hotmail.com

[摘要] 目的 探讨舌鳞状细胞癌组织中活性氧的标志物 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)和磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)的表达水平,并分析二者的相互关系。方法 应用免疫组化法检测 30 例舌鳞癌组织及其癌旁组织中 8-OHdG 和 p-EGFR 表达,通过相关性分析探讨两者之间的关系。结果 8-OHdG 和 p-EGFR 在舌癌组织中高表达,阳性表达率分别为 80.0%、56.7%;两者在癌旁组织中呈低表达,阳性表达率分别为 16.7%、6.7%,它们在癌组织中的阳性表达率均显著高于癌旁组织($P < 0.05$),8-OHdG 的表达与 p-EGFR 的表达具有显著相关性($P < 0.05$)。结论 该研究初步确定活性氧在口腔癌中的表达和作用,以及其与磷酸化

EGFR 的正相关性。

[关键词] 活性氧; 磷酸化表皮生长因子受体; 舌鳞癌; 免疫组化

[中图分类号] R 739.8 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2016)05-0372-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.05.02

Expressions of 8-OHdG and phospho-epithelial growth factor receptor in tongue squamous cell carcinoma and their correlation QIN Xiang-ming, CHEN Lei, YU Da-hai, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To detect the expressions of 8-hydroxydeoxyguanine(8-OHdG) and phospho-epithelial growth factor receptor(p-EGFR) in tongue squamous cell carcinoma(TSCC) and their correlation. **Methods** The expressions of 8-OHdG and p-EGFR in 30 specimens of tongue squamous cell carcinoma tissues and adjacent-carcinoma tissues were detected by immunohistochemistry. The correlation between 8-OHdG expression and p-EGFR expression was analyzed by Spearman rank correlation analysis. **Results** Both 8-OHdG and p-EGFR were highly expressed in the TSCC tissues, and their positive rates were 80.0%, 56.7% respectively, whereas the low expressions which were shown with positive rate of 16.7%, 6.7% respectively, were observed in the adjacent-carcinoma tissues. The expressions of 8-OHdG and p-EGFR in carcinoma tissue were significantly higher than those in the adjacent-carcinoma tissue($P < 0.05$), and the statistically significant correlation was observed between 8-OHdG expression and p-EGFR expression($P < 0.05$). **Conclusion** Reactive oxygen species express in oral cancer, which is positively correlated to p-EGFR.

[Key words] Reactive oxidative species(ROS); Phospho-epithelial growth factor receptor(p-EGFR); Tongue squamous cell carcinoma(TSCC); Immunohistochemistry

随着靶向药物治疗的发展,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)已被作为公认的治疗头颈鳞癌靶向治疗的切入点。磷酸化 EGFR(phospho-epithelial growth factor receptor,p-EGFR)是 EGFR 的活性形式。有文献报道在体外细胞实验中非特异性配体如活性氧(reactive oxidative species,ROS)可以激活 EGFR 磷酸化^[1]。而 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)作为氧化损伤标志物可以检测出组织中 ROS 的表达^[2]。因此,本实验首次在临床体内试验中检测舌鳞癌与癌旁组织中 ROS 标记物 8-OHdG 和 p-EGFR 的免疫组化表达水平及分析其相关性,初步探讨了 ROS 在口腔癌激活 EGFR 的作用,为进一步探讨靶向药物治疗口腔癌的耐药机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2010-01~2010-08 本院口腔颌面外科初治的舌鳞癌患者 30 例。样本为患者手术切除后并已石蜡包埋的组织标本,标本分为癌组织组和癌旁组两组。病例均属单纯根治性手术(无术前放射线治疗和化学药物治疗史),有完整的临床资料,癌旁组织取自肿瘤边缘外 2.0 cm,所有标本的病理性质均经 2 位病理科医生确定。

1.2 试剂与方法 8-OHdG 鼠抗单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-393871),兔抗 p-EGFR(Tyr845)(bs-3111R)购于北京博奥森生物技术有限公司,免

疫组化 SP 试剂盒(SP-9000)购于北京中杉金桥生物技术有限公司。常规脱蜡,梯度乙醇水化处理,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 min×3 次,3% H₂O₂ 孵育 15 min,枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)高压修复,自然冷却,一抗 8-OHdG 和 p-EGFR 抗体工作浓度分别为 1:200 和 1:100,4℃孵育过夜;去除一抗后,PBS 漂洗 3 min×3 次,滴加二抗,37℃孵育 30 min,PBS 漂洗 3 min×3 次,滴加 DAB 显色剂,室温下显色,镜下控制显色时间,蒸馏水洗涤终止反应,苏木素复染、脱水、透明、中性树脂封片,显微镜下观察、拍照,PBS 液代替一抗作为空白对照,并与实验组切片在同一条件下同时进行染色。

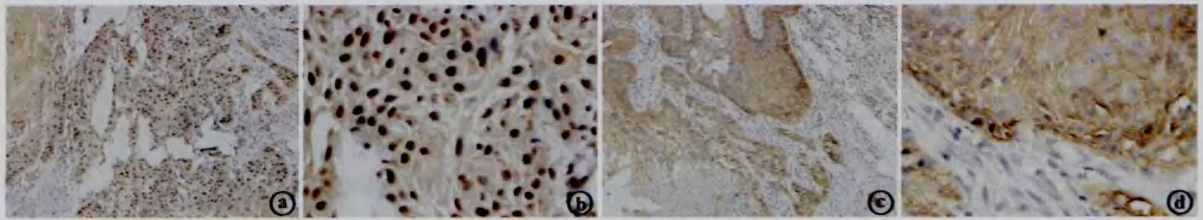
1.3 结果判定 采用双盲法,高倍镜下随机选取 5 个视野,染色强度分数标准:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。同样物镜下计数阳性细胞数,阴性为 0 分,1%~10%为 1 分,11%~25%为 2 分,26%~50%为 3 分,>50%为 4 分。两项得分相乘分数分为 4 个等级:- (0~3 分),+(4~6 分),++ (7~9 分),+++ (10~12 分),定义-和+为阴性表达;++和+++为阳性表达^[3]。

1.4 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行分析,对 8-OHdG 和 p-EGFR 在癌和癌旁组织中的蛋白表达的关系采用 Pearson 卡方检验,8-OHdG 与 p-EGFR 之间的相关性用 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 8-OHdG 和 p-EGFR 在舌鳞癌组织中的表达情况 舌鳞癌中 8-OHdG 主要表达于细胞核, p-EGFR 主要表达于细胞膜或者胞浆中(见图 1)。30 例舌鳞癌组织中, 8-OHdG 阳性表达率为 80.0% (24/

30), p-EGFR 阳性表达率为 56.7% (17/30), 而在其癌旁组织中, 8-OHdG 阳性表达率为 16.7% (5/30), p-EGFR 阳性表达率为 6.7% (2/30), 两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。



①和②:8-OHdG 在舌鳞癌的表达, 主要表达于细胞核;③和④:p-EGFR 在舌鳞癌中的表达, 主要表达于细胞膜或者胞浆中(①和②为 $\times 100$, ③和④为 $\times 400$)

图 1 舌鳞癌中 8-OHdG 和 p-EGFR 的免疫组织化学染色(S-P 法染色)图

表 1 8-OHdG 和 p-EGFR 在舌鳞癌组织中的表达情况[n(%)]

组别	例数	8-OHdG		p-EGFR	
		阳性	阴性	阳性	阴性
癌组织组	30	24(80.0)	6(20.0)	17(56.7)	13(44.3)
癌旁组	30	5(16.7)	25(83.3)	2(6.7)	28(93.3)

注:8-OHdG 的 $\chi^2 = 24.09$, $P = 0.000$; p-EGFR 的 $\chi^2 = 17.33$, $P = 0.000$

2.2 舌鳞癌中 8-OHdG 与 p-EGFR 表达的关系 Spearman 等级相关检验显示, 舌鳞癌中 8-OHdG 与 p-EGFR 的表达程度也存在显著的正相关性($R = 0.445$, $P = 0.014$)。见表 2。

表 2 舌鳞癌中 8-OHdG 与 p-EGFR 表达的关系

8-OHdG	p-EGFR			
	-	+	++	+++
-	3	0	0	0
+	2	0	1	0
++	2	2	5	2
+++	0	4	8	1

注:8-OHdG 与 p-EGFR 的表达呈正相关, $R = 0.445$, $P = 0.014$

3 讨论

3.1 近年来随着靶向治疗在癌症中应用的研究和发展, 在头颈鳞癌中 EGFR 被认为是一个突出的靶点^[4]。有研究显示 90% 的头颈鳞癌患者 EGFR 表达为阳性, 激活的 EGFR 信号通路影响着肿瘤的发生、转移和血管生成^[5]。口腔环境的多种刺激能引起炎症^[6,7], 在慢性炎症期会增加 ROS 的释放和积累^[8,9]。8-OHdG 常被用于检测氧化应激与病变的检测标志物^[10]。而在舌鳞癌临床体内试验中 ROS

标志物 8-OHdG 及 p-EGFR 的表达及相关性的研究报道较少见。

3.2 本实验选择 2010-01 ~ 2010-08 本院口腔颌面外科初治的舌鳞癌患者 30 例标本, 应用免疫组织化学方法检测分析癌组织及癌旁组织中的 ROS 标志物 8-OHdG 及 p-EGFR 的表达。8-OHdG 主要表达于细胞核, 与国内文献报道一致^[11]。其中 30 例舌鳞癌组织中, 8-OHdG 阳性数有 24 例, 阳性表达率为 80.0%, 但癌旁组织中阳性数有 5 例, 阳性表达率为 16.7%, 前者明显高于后者($P < 0.001$), 本实验进一步验证了口腔环境的 ROS 对肿瘤的形成可能存在着重要的作用, 与国内有关文献报道一致^[12]。p-EGFR 主要表达于细胞膜或胞浆中, 而舌鳞癌组织中 p-EGFR 阳性有 17 例, 阳性率为 56.7%, 而在其癌旁组织中, 阳性有 2 例, 阳性率为 6.7%, 前者也明显高于后者($P < 0.001$), 与国外同类文献报道相近^[13]。通过比较可以初步得出, 随着肿瘤的发生, 8-OHdG 和 p-EGFR 的表达逐渐增高, 提示 ROS 和 p-EGFR 在舌鳞癌的发生和发展中起重要作用。而且经 Spearman 相关分析显示 8-OHdG 和 p-EGFR 在舌鳞癌组织中的表达呈正相关($P < 0.05$), 说明口腔癌组织在 8-OHdG 和 p-EGFR 高表达的基础上, ROS 标志物 8-OHdG 的表达能促进 p-EGFR 的表达。因此, 我们可推测在口腔癌中非特异性配体 ROS 与 EGFR 的特异性配体如 EGF、TGF- α 一样参与激活 EGFR 使其发生磷酸化活化, 与国外体外细胞实验的报道相一致^[14]。

综上所述, 本研究推测在口腔癌中非特异性配体 ROS 可能激活 EGFR 使其发生磷酸化, 这可能是临床上已出现针对 EGFR 的靶向药物, 如西妥昔单

抗^[15]的耐药机制之一。然而 ROS 如何激活 EGFR 仍需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Reinehr R, Häussinger D. CD95 death receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver cell apoptosis and regeneration[J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 518(1): 2-7.
- 2 Kimura C, Watanabe K, Iwasaki A, et al. The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset pre-eclamptic women and fetal growth restriction[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, 26(5): 491-496.
- 3 荣焕玲, 孙蕾娜, 董娜, 等. 非小细胞肺癌中 EGFR 和 K-ras 基因突变与蛋白表达相关性的研究[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(7): 486-491.
- 4 Kim S, Grandis JR, Rinaldo A, et al. Emerging perspectives in epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer[J]. Head Neck, 2008, 30(5): 667-674.
- 5 Dietz A, Boehm A, Mozet C, et al. Current aspects of targeted therapy in head and neck tumors[J]. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2008, 265 suppl 1(1 Supplement): 3-12.
- 6 Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(1): 37-49.
- 7 Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(2): 425-430.
- 8 Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(4): 276-285.
- 9 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. Nature, 2002, 420(6917): 860-867.
- 10 Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? [J]. Biochem J, 2007, 401(1): 1-11.
- 11 窦东伟, 李裕波, 苏卡, 等. 肝组织石蜡切片 8-OHdG 免疫组化方法的研究[J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(3): 352-354.
- 12 熊珊珊, 石英英, 石汉平. 活性氧与肿瘤研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(13): 1045-1048.
- 13 Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, et al. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas[J]. Pathol Oncol Res, 2006, 12(2): 87-91.
- 14 Frank GD, Mifune M, Inagami T, et al. Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(5): 1581-1589.
- 15 覃扬达, 司勇锋. 鼻咽癌生物治疗临床研究进展[J]. 中国临床新医学, 2014, 7(7): 670-674.

[收稿日期 2016-01-05][本文编辑 刘京虹]

肝癌患者中 microRNA-378 与 FOXO1 基因表达的相关关系研究

覃彬, 刘顺, 仇小强, 曾小云, 郭雪峰, 张国强, 陈洁华, 谢志春

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81402756); 广西教育厅高校科研项目(编号:YB2014067)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室

作者简介: 覃彬(1989-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肝癌分子流行病学。E-mail: 381541004@qq.com

通讯作者: 谢志春(1963-), 男, 医学博士, 博士研究生导师, 教授, 研究方向: 病毒性肝炎防治。E-mail: 357154887@qq.com

[摘要] 目的 研究 microRNA-378a-3p(miRNA-378)与 FOXO1 基因在肝癌中的表达情况及两者表达的相关性。方法 提取 8 例肝癌患者癌组织及其相对应癌旁组织标本的总 RNA, 采用实时荧光定量 PCR 分别检测 miR-378 和 FOXO1 基因的相对表达量, 通过独立样本 *t* 检验比较癌及癌旁组织中 miR-378、FOXO1 基因表达的差异, 并通过双变量相关分析探索癌组织中两者之间的相关关系。结果 肝癌组织中 miR-378 和 FOXO1 基因的表达量均明显低于癌旁组织中的表达($P=0.0106$ 和 $P=0.000623$), 两者相对表达量在肝癌组织中呈正相关关系($r=0.541$, $P=0.031$)。结论 肝癌组织中 miR-378 与 FOXO1 基因的表达较癌旁组织明显降低, miR-378 与 FOXO1 基因的异常表达及其相互作用网络在肝癌发生发展中可能具有重要的意义。

[关键词] 肝癌; miR-378; FOXO1