

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.16.011

鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和组织蛋白酶 D 表达水平及其与肿瘤侵袭转移的关系分析*

龚永谦¹,程爱兰²,刘洁¹

(1. 南华大学附属第一医院耳鼻咽喉科,湖南衡阳 421001;2. 南华大学医学院病理学教研室,湖南衡阳 421001)

[摘要] **目的** 探讨鼻咽癌组织表皮生长因子受体(EGFR)、热休克蛋白 90A(HSP90A)和组织蛋白酶 D(cathepsin D)表达水平及其与肿瘤侵袭转移的关系。**方法** 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月南华大学附属第一医院收治的 58 例鼻咽癌患者(A 组),采用免疫组织化学法检测其活检鼻咽癌组织的 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率,并检测同期 30 例鼻中隔偏曲手术患者(B 组)正常鼻甲黏膜组织的 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率。统计 A 组患者的肿瘤 T 分期、N 分期及淋巴管密度(LVD)。比较 A 组鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 表达阳性与阴性患者的 T 分期、N 分期及 LVD,并分析鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 表达与 T 分期、N 分期及 LVD 的关系。**结果** A 组 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率分别 86.21%、82.76%和 87.93%,均高于 B 组的 30.00%、26.67%和 33.33%($P < 0.05$)。A 组 EGFR、HSP90A、cathepsin D 蛋白表达阳性患者 T₃~T₄ 分期患者百分比、N₂~N₃ 分期患者百分比及 LVD 均高于相应蛋白表达阴性患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Spearman 相关分析结果显示,鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率与其 T 分期、N 分期及 LVD 均呈正相关(EGFR: $r = 0.844, 0.795, 0.785$;HSP90A: $r = 0.862, 0.825, 0.822$;cathepsin D: $r = 0.842, 0.815, 0.863, P < 0.05$)。**结论** 鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 表达与肿瘤侵袭转移均密切相关,可能作为评估鼻咽癌侵袭转移的参考指标。

[关键词] 鼻咽肿瘤;受体,表皮生长因子;热休克蛋白 90A;组织蛋白酶 D;肿瘤浸润;肿瘤转移

[中图分类号] R739.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)16-2158-04

Expression of EGFR, HSP90A and Cathepsin D in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with tumor invasion and metastasis*

GONG Yongqian¹, CHENG Ailan², LIU Jie¹

(1. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Pathology, School of Medicine, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of epidermal growth factor receptor (EGFR), heat shock protein 90A (HSP90A) and cathepsin D in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with tumor invasion and metastasis. **Methods** From January 2014 to December 2015, 58 patients with nasopharyngeal carcinoma (group A) in the First Affiliated Hospital of University of South China were selected, and the positive expression rates of EGFR, HSP90A and cathepsin D in biopsy specimens of nasopharyngeal carcinoma were detected by immunohistochemistry method. The positive expression rates of EGFR, HSP90A and cathepsin D in biopsy chronic rhinitis tissues of 30 patients with chronic rhinitis (group B) were also detected. T staging, N staging and lymphatic vessel density (LVD) of patients in group A were analyzed. In group A, the T staging, N staging and LVD of between patients with positive expression of EGFR, HSP90A and cathepsin D and those with negative expression of these indicators were compared, and the correlations of the expression of EGFR, HSP90A and cathepsin D to T staging, N staging and LVD were analyzed. **Results** The positive expression rates of EGFR, HSP90A and cathepsin D in group A were 86.21%, 82.76% and 87.93% respectively, which were higher than 30.00%, 26.67% and 33.33% in group B ($P < 0.05$). In group A, the percentages of patients on T₃-T₄ and N₂-N₃ stages and LVD of patients with positive expression of EGFR, HSP90A and cathepsin D protein respectively were higher than those of patients with negative expression of corresponding protein ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that the positive expression rates of EGFR, HSP90A and cathepsin D in nasopharyngeal carcinoma were positively correlated with the T staging, N staging and LVD (EGFR: $r = 0.844, 0.795, 0.785$;HSP90A: $r = 0.862, 0.825, 0.822$;cathepsin D: $r = 0.842, 0.815, 0.863, P < 0.05$).

Conclusion EGFR, HSP90A and cathepsin D expression in nasopharyngeal carcinoma are closely related to invasion and metastasis of tumor, which may be used as reference indexes for the evaluation of tumor invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma.

[Key words] nasopharyngeal neoplasms; receptor, epidermal growth factor; heat shock protein 90A; cathepsin D; neoplasm invasiveness; neoplasm metastasis

鼻咽癌是临床常见恶性肿瘤,其侵袭性强,常因出现远处转移而危及患者生命安全,导致死亡等不良预后情况的发生^[1-2]。因此,对鼻咽癌侵袭转移进行评估干预对改善患者预后具有重要意义。癌症的发生、发展涉及多个因子的影响,其中表皮生长因子受体(EGFR)参与调节细胞增殖、凋亡及血管形成,从而促进肿瘤的侵袭转移;热休克蛋白 90A(HSP90A)可通过调控 EGFR 等基因影响肿瘤形成和发展,并促进其侵袭转移;而组织蛋白酶 D(cathepsin D)可通过催化、降解基底膜及细胞外基质促进肿瘤细胞移动和进入血液循环,从而促进肿瘤的侵袭转移^[3-4]。因此,EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 均可能与鼻咽癌的侵袭转移相关,可能用于其侵袭转移的评估与干预指导,并可能作为侵袭转移干预的靶基因,目前关于此方向的研究甚少。本研究检测了鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 表达情况,并分析其与肿瘤 T 分期、N 分期及淋巴管密度(LVD)等的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月南华大学附属第一医院收治的 60 例鼻咽癌患者(A 组)及同期 30 例鼻中隔偏曲患者(B 组)。纳入标准:A 组患者均行病理活检检查,结合临床表现和鼻咽部 CT 检查,确诊为鼻咽癌;B 组确诊为鼻中隔偏曲,行手术治疗并取其正常鼻甲黏膜组织用于研究;两组性别不限,年龄大于或等于 18 岁。排除标准:合并其他部位原发性肿瘤、转移癌、免疫功能障碍及其他脏器严重疾病患者;哺乳期或妊娠期女性;精神异常患者等。其中 A 组有 1 例因合并肺转移排除,1 例因妊娠期排除,最终纳入 58 例,均为低分化鳞状细胞癌;B 组未排除患者,最终纳入 30 例。本研究符合伦理学标准,经该院伦理委员会审核批准,患者均知情同意并签署知情同意书。两组患者性别、年龄、体质量指数(BMI)等基线资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 两组基线资料比较

组别	n	性别	年龄	BMI
		(男/女, n/n)	($\bar{x} \pm s$, 岁)	($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)
A 组	58	36/22	45.22 ± 10.87	21.38 ± 2.75
B 组	30	20/10	45.55 ± 10.62	21.62 ± 2.92
t/χ^2		0.181	0.136	0.380
P		>0.05	>0.05	>0.05

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 A 组鼻咽癌患者均常规进行同期放化疗治疗,B 组采用鼻内镜手术结合抗炎等药物治疗。

1.2.2 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 的检测 采用免疫组织化学法检测 A 组活检鼻咽癌组织和 B 组鼻中隔偏曲的正常鼻甲黏膜组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率,相关试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,具体操作如下:常规将活检标本进行石蜡包埋后切成厚度为 4 μ m 的连续切片,检测前微波炉加热后采用二甲苯液脱蜡处理 3 次;无水乙醇、95%和 85%乙醇梯度脱水各 5 min 后流水冲洗 3 min;柠檬酸工作液加热煮沸 15 min 复原后采用 7.2~7.4 pH 值磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 遍;添加 40 μ L 相应的一抗后室温(20 $^{\circ}$ C)孵育 60 min,PBS 洗涤 3 遍;添加 40 μ L 相应的二抗后室温(20 $^{\circ}$ C)孵育 30 min,PBS 洗涤 3 遍。常规行二氨基联苯胺(DAB)显色,2 min 后显微镜下观察,显色满意后以清水终止反应;常规行苏木素复染、返蓝,无水乙醇脱水、吹干、中性树脂封片观察。随机选取 3 个高倍区域($\times 200$)进行观察,cathepsin D 表达定位于细胞质内,EGFR 和 HSP90A 表达定位于细胞质或细胞膜,出现棕黄色、棕褐色或黄色颗粒判为表达阳性,由同一相关检测经验 3 年以上的医师进行检测和结果读取。

1.2.3 淋巴管密度(LVD)的检测 统计患者的肿瘤 T 分期、N 分期,采用 D240 抗体对活检标本进行 LVD 检测,操作严格参照试剂盒说明书进行,每份标本随机选取 5 个高倍区域($\times 200$)观察记录 LVD,并取平均值为最终检测结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,其中计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 t 检验进行组间比较;计数资料以例数或百分比表示,采用 χ^2 检验进行组间比较;采用 Spearman 相关分析法分析鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率与其 T 分期、N 分期及 LVD 的关系;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率比较 A 组 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率分别为 86.21%、82.76%和 87.93%,均高于 B 组(分别为 30.00%、26.67%和 33.33%),差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.2 鼻咽癌组织 EGFR 表达阳性与阴性患者的 T 分

表 2 两组 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率比较[n(%)]

组别	n	EGFR		HSP90A		cathepsin D	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
A 组	58	50(86.21)	8(13.79)	48(82.76)	10(17.24)	51(87.93)	7(12.07)
B 组	30	9(30.00)	21(70.00)	8(26.67)	22(73.33)	10(33.33)	20(66.67)
χ^2		28.272		26.884		27.713	
P		<0.05		<0.05		<0.05	

表 3 鼻咽癌组织 EGFR 蛋白表达阳性与阴性患者的 T 分期、N 分期及 LVD 比较

EGFR 表达	n	LVD($\bar{x}\pm s$, 个)	T 分期[n(%)]		N 分期[n(%)]	
			T _{1~2}	T _{3~4}	N _{0~1}	N _{2~3}
阳性	50	12.82±3.62	2(4.00)	48(96.00)	4(8.00)	46(92.00)
阴性	8	7.57±1.48	7(87.50)	1(12.50)	6(75.00)	2(25.00)
t/ χ^2		4.024	30.587		17.255	
P		<0.05	<0.05		<0.05	

表 4 鼻咽癌组织 HSP90A 蛋白表达阳性与阴性患者的 T 分期、N 分期及 LVD 比较

HSP90A 表达	n	LVD($\bar{x}\pm s$, 个)	T 分期[n(%)]		N 分期[n(%)]	
			T _{1~2}	T _{3~4}	N _{0~1}	N _{2~3}
阳性	48	12.96±2.87	1(2.08)	47(97.92)	3(6.25)	45(93.75)
阴性	10	7.54±1.85	8(80.00)	2(20.00)	7(70.00)	3(30.00)
t/ χ^2		5.708	32.613		19.316	
P		<0.05	<0.05		<0.05	

表 5 鼻咽癌组织 cathepsin D 蛋白表达阳性与阴性患者的 T 分期、N 分期及 LVD 比较

cathepsin D 表达	n	LVD($\bar{x}\pm s$, 个)	T 分期[n(%)]		N 分期[n(%)]	
			T _{1~2}	T _{3~4}	N _{0~1}	N _{2~3}
阳性	51	12.89±3.15	2(3.92)	49(96.08)	4(7.84)	47(92.16)
阴性	7	7.55±1.92	7(100.00)	0	6(85.71)	1(14.29)
t/ χ^2		4.355	36.323		20.985	
P		<0.05	<0.05		<0.05	

期、N 分期及 LVD 比较 鼻咽癌组织 EGFR 蛋白表达阳性患者的肿瘤 T_{3~4} 分期百分比、N_{2~3} 分期百分比及 LVD 均高于 EGFR 蛋白表达阴性患者, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 3。

2.3 鼻咽癌组织 HSP90A 表达阳性与阴性患者的 T 分期、N 分期及 LVD 比较 鼻咽癌组织 HSP90A 蛋白表达阳性患者的肿瘤 T_{3~4} 分期百分比、N_{2~3} 分期百分比及 LVD 均高于 HSP90A 蛋白表达阴性患者, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 4。

2.4 鼻咽癌组织 cathepsin D 表达阳性与阴性患者的 T 分期、N 分期及 LVD 比较 鼻咽癌组织 cathepsin D 蛋白表达阳性患者的肿瘤 T_{3~4} 分期百分比、N_{2~3} 分期百分比及 LVD 均高于 cathepsin D 蛋白表达阴性患者, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见

表 5。

2.5 鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 表达与其 T 分期、N 分期及 LVD 的关系 Spearman 相关分析结果显示, 鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 蛋白阳性表达率与其 T 分期、N 分期及 LVD 均呈正相关(EGFR: $r=0.844, 0.795, 0.785$; HSP90A: $r=0.862, 0.825, 0.822$; cathepsin D: $r=0.842, 0.815, 0.863, P<0.05$)。

3 讨论

鼻咽癌为我国多发恶性肿瘤, 近年来其发病率随着生活方式和居住环境的改变而不断增加, 临床发病率更是居于耳鼻喉科恶性肿瘤首位, 对其进行及时有效的诊治十分重要。鼻咽癌的发生部位为鼻咽部, 其中咽隐窝、侧壁、顶后壁较为常见, 临床可表现为涕中

带血、耳鸣、耳闭塞感等,且其侵袭转移性强,可累及其他重要组织器官而严重危及患者健康和生命安全^[5-6]。本研究亦分析了鼻咽癌的侵袭转移情况,结果显示,鼻咽癌 T₃₋₄ 分期患者比例高, N₂₋₃ 分期患者比例高, LVD 较高, 鼻咽癌侵袭转移发生率高, 严重威胁人类健康和生命安全, 对鼻咽癌侵袭转移进行有效的防治具有重要意义。

肿瘤的发生、发展及侵袭转移均涉及多个因子, 而通过相关因子的检测对鼻咽癌侵袭转移进行评估干预, 从而指导临床干预, 减少肿瘤侵袭转移对预后造成的不良影响可能有助于其预后情况的改善。EGFR 为与肿瘤侵袭转移密切相关的因子, 可通过参与调节细胞增殖、凋亡和促进肿瘤新生血管的形成而促进肿瘤的侵袭转移^[7-8]。HSP90A 亦是与肿瘤密切相关的因子, 可通过调控下游的 EGFR 等基因而影响肿瘤发生和发展^[9]。cathepsin D 则可催化和降解基底膜及细胞外基质, 为肿瘤细胞移动和进入血液循环提供便利, 从而促进肿瘤侵袭转移^[10-12]。因此, EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 均可能影响鼻咽癌侵袭转移, 然而目前关于此方向的研究仍较少。因此, 本研究分析了鼻咽癌患者肿瘤组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 表达情况及其与肿瘤 T 分期、N 分期及 LVD 等侵袭转移指标的关系。

本研究结果显示, 鼻咽癌组织的 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率均在 80% 以上, 远高于正常鼻咽黏膜组织阳性表达率(约 30%), 提示 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 均可能与鼻咽癌的发生、发展相关。且本研究中鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A、cathepsin D 蛋白表达阳性患者的肿瘤 T₃₋₄ 分期百分比、N₂₋₃ 分期百分比及 LVD 均高于相应蛋白表达阴性患者, 提示鼻咽癌组织的 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率可能与其肿瘤 T 分期、N 分期及 LVD 等侵袭转移指标相关。进一步的 Spearman 相关分析结果显示, 鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率与其 T 分期、N 分期及 LVD 均密切相关, 鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达患者需确定其侵袭转移的发生, 及时发现肿瘤侵袭转移并进行干预, 减少肿瘤侵袭转移对预后造成的不良影响, 而采取措施抑制 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 表达可能有助于鼻咽癌肿瘤侵袭转移的预防和治疗, 这需要进一步研究探讨。

综上所述, 鼻咽癌组织 EGFR、HSP90A 和 cathepsin D 阳性表达率高且与肿瘤侵袭转移密切相关, 可能用于鼻咽癌肿瘤侵袭转移的评估, 指导临床进行鼻咽癌肿瘤侵袭转移的防治, 且 EGFR、HSP90A 和

cathepsin D 可能作为鼻咽癌基因治疗的靶基因。

参考文献

- [1] 陈顺金, 陈靖, 吴笑英, 等. 鼻咽癌 EGFL7 的表达与肿瘤侵袭转移的关系[J]. 海南医学, 2016, 27(16): 2618-2620.
- [2] THOMPSON L D, PENNER C, HO N J, et al. Sinonasal tract and nasopharyngeal adenoid cystic carcinoma: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 86 cases[J]. Head Neck Pathol, 2014, 8(1): 88-109.
- [3] CARPENTER B L, CHEN M, KNIFLEY T, et al. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ promotes autocrine epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling to stimulate migration and invasion toward hepatocyte growth factor (HGF)[J]. J Biol Chem, 2015, 290(45): 27228-27238.
- [4] SNIGIREVA A V, VRUBLEVSKAYA V V, SKARGA Y Y, et al. Effect of heat shock protein 90 (Hsp90) on migration and invasion of human cancer cells in vitro[J]. Bull Exp Biol Med, 2014, 57(4): 476-478.
- [5] 王园园, 贺秋艳, 易红梅, 等. RKIP 在鼻咽癌侵袭转移中的作用及机制研究[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(3): 375-381.
- [6] SANG Y, CHEN M Y, LUO D, et al. TEL2 suppresses metastasis by down-regulating SERPINE1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(30): 29240-29253.
- [7] POSCHAU M, DICKREUTER E, SINGH-MÜLLER J, et al. EGFR and $\beta 1$ -integrin targeting differentially affect colorectal carcinoma cell radiosensitivity and invasion[J]. Radiother Oncol, 2015, 116(3): 510-516.
- [8] DA ROSA M R, FALCÃO A S, FUZUI H T, et al. EGFR signaling downstream of EGF regulates migration, invasion, and MMP secretion of immortalized cells derived from human ameloblastoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(11): 11107-11120.
- [9] 王亚飞. 组织蛋白酶 D 在鼻咽癌细胞中相互作用蛋白的筛选与鉴定[D]. 衡阳: 南华大学, 2014.
- [10] PRANJOL M Z, GUTOWSKI N, HANNEMANN M, et al. The potential role of the proteases cathepsin D and cathepsin L in the progression and metastasis of epithelial ovarian cancer[J]. Biomolecules, 2015, 5(4): 3260-3279.
- [11] 王亚飞. Cathepsin D 与恶性肿瘤的关系[J]. 肿瘤基础与临床, 2014, 27(1): 79-81.
- [12] BACH A S, DEROCQ D, LAURENT-MATHA V, et al. Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 28084-28103.

(收稿日期: 2018-01-16 修回日期: 2018-03-24)