

# 喉癌切缘中 eIF4E、p53、ras 和 c- myc 表达与预后的研究

雷文斌<sup>1</sup>, 苏振忠<sup>1</sup>, 文卫平<sup>1</sup>, 柴丽萍<sup>1</sup>, 蒋爱云<sup>1</sup>, 廖冰<sup>2</sup>

(中山大学附属第一医院 1. 耳鼻咽喉科医院//耳鼻咽喉科学研究所; 2. 病理科, 广东 广州 510080)

**摘要:** 【目的】探讨 eIF4E、p53、ras 和 c- myc 在喉癌切缘中的表达及其与预后的关系。【方法】42 例临床分期为 I、II 期的喉癌患者被分别行手术治疗, 共得喉癌切缘标本 112 个, 采用免疫组化的方法检测肿瘤原发灶和切缘中 eIF4E、p53、ras 和 c- myc 的表达。【结果】喉癌原发灶 eIF4E、p53、ras 和 c- myc 阳性率分别是 100%(42/42), 57.1%(24/42), 40.5%(17/42)和 33.3%(14/42); 手术切缘 eIF4E、p53、ras、c- myc 和两个以上基因阳性率分别是 42.8% (18/42)、14.3% (6/42)、9.5%(4/42), 9.5%(4/42) 和 21.4%(9/42), 生存分析提示切缘 eIF4E、p53 或两个以上基因阳性组复发率高, 5 年生存率低; COX 回归分析提示切缘 eIF4E 表达阳性与预后相关。【结论】喉癌切缘 eIF4E 阳性的患者复发率高, 预后不良。eIF4E 在喉癌手术切缘的表达可考虑作为预测喉癌预后的独立风险指标。

关键词: 喉肿瘤; eIF4E; p53; ras; c- myc; 预后

中图分类号: R73

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)05- 0545- 05

## Expression and Significance of eIF4E, p53, ras, and c- myc in Larynx Cancer Surgical Margins

LEI Wen- bin<sup>1</sup>, SU Zheng- zhong<sup>1</sup>, WEN Wei- ping<sup>1</sup>, CHAI Li- ping<sup>1</sup>, JIANG Ai- yun<sup>1</sup>, LIAO Bing<sup>2</sup>

(1. Otorhinolaryngology Hospital//Otorhinolaryngology Institute, 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the expression and prognosis significance of eIF4E, p53, ras, and c- myc in laryngeal cancer surgical margins. 【Methods】Forty- two cases of laryngeal cancer patients whose clinical stage were I or II underwent surgical procedure and 112 pathological negative surgical margin specimens were gotten. Immunohistochemical method was used to detect expression of eIF4E, p53, ras, and c- myc of the tumor primary sites and surgical margins. 【Results】100% (42/42) tumor primary sites were found eIF4E positive, 57.1% (24/42) in p53, 40.5% (17/42) in ras and 33.3% (14/42) in c- myc. The rate of positive margin of eIF4E, p53, ras, c- myc and more than two genes were 42.8% (18/42), 14.3% (6/42), 9.5% (4/42), 9.5% (4/42), and 21.4% (9/42), respectively. Kaplan- Meier survival analysis showed that the recurrent rate of the cases with eIF4E, p53 or more than two genes positive margin were higher than those of negative, and their five years survival rate was lower. Cox regress survival analysis showed that expression of eIF4E in surgical margin were related to survival. 【Conclusion】Laryngeal cancer patients with eIF4E positive margin would have a higher recurrent rate and worse prognosis. The expression of eIF4E of surgical margin may be used as an independent prognosis- correlative tumor marker of laryngeal cancer.

Key words: laryngeal neoplasms; eIF4E; p53; ras; c- myc; prognosis

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):545- 549]

喉癌是常见的恶性肿瘤之一, 治疗以手术和放疗为主, 喉癌治疗后复发仍常见报道。目前研究

收稿日期: 2007-01-11

基金项目: 广东省自然科学基金(A31739)

作者简介: 雷文斌(1971-), 男, 广东台山人, 博士, 主治医师, 课题负责人, E- mail: leiwb2003@yahoo.com.cn; 苏振忠, 教授, 博士生导师, 通讯作者, E- mail: suzhzh@163.com

认为 *elF4E*、*p53*、*ras* 和 *c-myc* 等癌基因与喉癌的发生相关<sup>[1-5]</sup>。本研究拟通过对本院既往多年喉癌患者的手术切缘标本进行上述指标表达的检测,结合临床资料,利用多因素模型,探讨与喉癌预后相关的独立指标,以期更准确地预测喉癌复发的风险,指导综合治疗方案的实施。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

选取 1994 年 1 月 1 日~2001 年 5 月 1 日间在我科进行手术治疗,临床与病理资料齐全的喉癌患者 42 例,男 40 例,女 2 例,平均年龄 60(S=9)岁,年龄范围 39~83 岁,所有病例均为首次手术,术前均未做过放疗和化疗,原发灶均为鳞状细胞癌,术中留取手术切缘标本 112 个,全部病理学检查阴性,切缘不含有黏膜上皮的病例弃用。病理类型:高分化鳞癌 23 例,中分化鳞癌 13 例,低分化鳞癌 6 例。声门上型 12 例,声门型 26 例,跨声门型 4 例。TNM 分期: $T_2N_0M_0$  11 例  $T_3N_0M_0$  22 例,  $T_2N_1M_0$  2 例,  $T_3N_1M_0$  7 例。42 例患者中垂直部分喉 18 例,扩大垂直半喉 15 例,水平部分喉切除术 6 例,喉水平垂直部分切除术(喉 3/4 切除术) 3 例。颈淋巴结清扫术 17 例:功能性颈清扫术 10 例,择区性颈清扫术 7 例,42 例患者中 18 例术后复发(经病理证实),单纯局部复发 13 例,局部复发伴颈部淋巴结转移 4 例,局部复发伴远处转移 1 例,为肺转移。随访时间为 18 至 119 个月,平均 63 个月。本组资料中死于原发肿瘤或转移的 9 例,自然死亡 4 例,气管瘘口阻塞窒息导致死亡 1 例。

### 1.2 实验材料

*p53* 单克隆抗体工作液:由 DAKO 公司提供,产品编号 M7001; *elF4E* 鼠抗人单克隆抗体 IgG1,购于 BD 公司(编号 610269),工作浓度为 1:50,购于 Santa-Crus 公司。P21<sup>ras</sup> 鼠抗人单克隆抗体,由

DAKO 公司提供,产品编号 M0637; *c-myc* 鼠抗人单克隆抗体,由 DAKO 公司提供,产品编号 M3570。三步法免疫组化检测试剂盒,产品编号 PV-9000,购于北京中山生物技术有限公司。

### 1.3 切缘留取的方法

在喉癌手术时,于肿瘤残留风险较大处定向取材,切取少量带黏膜的组织作为手术切缘,手术切缘距肿瘤肉眼边缘约 5~10 mm。标本常规置于 10%福尔马林液中固定,随后石蜡包埋。

### 1.4 实验方法

所有 42 例喉癌患者的原发灶和切缘标本都同时切 5 张玻片,分别用于 HE 染色、*p53*、*elF4E*、*c-myc* 和 *ras* 免疫组化染色。所有切片都采用双盲法由两位病理科医生阅片。*p53*、*c-myc* 和 *ras* 组以 PBS 代替一抗作阴性对照,已知原发灶阳性切片作阳性对照;手术切缘阳性的染色标准是切缘黏膜的基底细胞中可以看到 5%的细胞有相应的 *p53*、*elF4E*、*c-myc* 和 *ras* 特征的染色;同一病例多个切缘中只要有一个阳性,则为切缘该指标阳性。

### 1.5 统计方法

用 SPSS 12.0 软件对结果进行处理。切缘分子指标表达与复发的统计分析采用卡方检验;喉癌预后的因素如年龄切缘分子指标等行 Kaplan-Meier 单因素生存分析;单因素生存分析提示有统计学意义的因素再进行多因素 COX 回归分析。

## 2 结果

### 2.1 四种基因在喉癌原发灶的表达

*elF4E* 在所有标本中表达阳性, *p53* 阳性 24 例,阴性 18 例, *ras* 阳性 17 例,阴性 25 例, *c-myc* 阳性 14 例,阴性 28 例。

### 2.2 手术切缘四种基因表达阳性的免疫组化特征

阳性手术切缘黏膜的基底细胞中可以看到 5%的 *p53*、*elF4E*、*c-myc* 或 *ras* 的阳性细胞(图 1)。

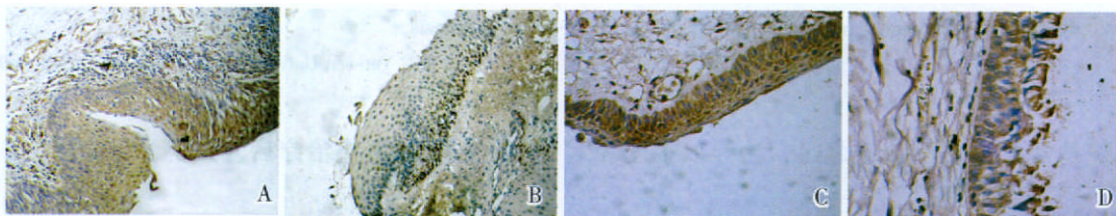


图 1 喉癌手术切缘免疫组化染色阳性

Fig.1 Laryngeal cancer surgical margin was immunohistochemically positive( $\times 400$ )

A: *elF4E*; B: *p53*; C: *c-myc*; D: *ras*

eIF4E 阳性细胞胞核周围或(和)胞浆呈淡黄色或棕黄色染色,胞核没有着色;p53 阳性细胞胞核呈棕黄色染色,胞浆没有着色;ras 阳性细胞胞浆呈淡黄色或棕黄色染色,胞核没有着色;c-myc 阳性细胞胞核和胞浆呈淡黄色或棕黄色染色。

2.3 切缘阳性与复发率

42 例患者中 18 例术后复发(经病理证实),单纯局部复发 13 例,局部复发伴颈部淋巴结转移 9 例,局部复发伴远处转移 1 例,为肺转移;由于后两组例数少,合并为一组进行统计分析。手术切缘 eIF4E、p53、ras、c-myc 和两个以上基因阳性率分别是 42.8% (18/42)、14.3% (6/42)、9.5%(4/42), 9.5%(4/42) 和 21.4%(9/42)。结果提示喉癌手术切缘 eIF4E 阳性组复发率高,差别有显著性的 ( $\chi^2=7.29, P=0.007$ ); 手术切缘 p53 阳性组复发率高 ( $\chi^2=4.68, P=0.030$ ); 手术切缘 ras 或 c-myc 阳性

和阴性组复发的差别没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。切缘中有两个以上基因阳性的共 10 例,其中 8 例局部复发,达 80%,两组的差异比较,  $\chi^2=9.91, P=0.02$ 。

2.4 喉癌预后的单因素分析

将可能影响喉癌预后的因素如年龄、临床分期、在喉癌切缘表达等指标进行 Kaplan-Meier 生存分析。手术切缘 eIF4E 阳性组与阴性组生存率的差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 手术切缘 p53 表达也有类似的结果,切缘中有两个以上基因阳性组的生存分析提示两组间的差异也有显著性意义,切缘 ras、c-myc 阳性组与阴性组生存率的差异没有显著性。Kaplan-Meier 单因素生存分析提示的临床分期(Ⅰ、Ⅱ期组与Ⅲ、Ⅳ期组)、病变部位、淋巴结转移也有统计学意义(表 1)。其余指标都没有统计学意义。

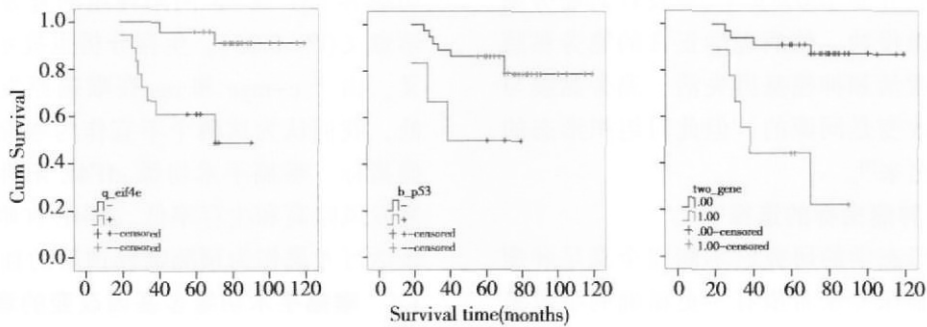


图 2 手术切缘 eIF4E 和 p53 阳性或阴性的生存曲线

Fig.2 Survival curve about surgical margins eIF4E, p53 positive and negative

A: eIF4E positive and negative; B: p53 positive and negative; C: more than two genes positive

表 1 42 例喉癌预后生存分析

Table 1 Survival analysis of the prognosis of 42 cases laryngeal cancer

Group	cases		R <sub>5a</sub> (%)		t <sub>r</sub> (months)		t <sub>s</sub> (months)		log Rank <sup>2</sup>	P
	P	N	P	N	P	N	P	N		
eIF4E	18	24	55.56	91.67	35 ±20	748 ±25	51 ±21	81 ±17	9.77	0.002
p53	6	36	50	80.56	43 ±30	60 ±30	49 ±25	72 ±22	3.99	0.046
ras	4	38	50	78.9	47 ±9	71 ±4	47 ±9	71 ±4	2.70	0.10
c-myc	4	38	50	78.9	36 ±1	60 ±5	66 ±12	69 ±4	1.34	0.247
Two genes +	9	33	33.3	87.8	25 ±5	66 ±5	48 ±8	74 ±4	15.47	0.00
Lymph node metastasis	9	33	33.3	87.8	30 ±7	65 ±5	49 ±7	74 ±4	15.86	0.0001

P: Positive group, N: Negative group; R<sub>5a</sub>: 5 years survival rate; t<sub>r</sub>: survival time without tumor; t<sub>s</sub>: survival time

2.5 喉癌预后的多因素分析

将临床分期、病变部位、淋巴结转移、切缘 eIF4E 和 p53 阳性等 5 个有统计学意义的因素进行 COX 回归分析(表 2), 淋巴结转移和切缘 eIF4E 阳性有统计学意义。

3 讨论

3.1 喉癌的治疗现状

近 20 年来喉癌的 5 年生存率仍波动在 40%~

表 2 影响喉癌预后的多因素 COX 回归分析结果

Table 2 Multivariate Cox regression analysis of the prognosis of laryngeal cancer

Group	Wald	P	Exp(B)
Tumor primary site	0.486	0.486	0.714
Clinical stage	0.009	0.924	0.912
Lymph node metastasis	9.087	0.003	15.114
Surgical margin eIF4E positive	7.875	0.005	16.607
Surgical margin p53 positive	0.381	0.537	1.648

80%之间, 喉癌术后复发是影响预后的主要因素之一。喉癌术后有较高的局部复发率, 原因是多方面的, 其中残留微转移灶或亚临床灶复发是常见的原因之一。临床上常通过留取手术切缘来判断手术的彻底性, 切缘阳性者局部复发率高, 予补救治疗, 如放疗、化疗等, 效果肯定。但手术切缘病理阴性的喉癌患者术后仍有较高的局部复发率<sup>[6]</sup>, 病理学正常的黏膜并非 100%安全, 原发灶对癌旁黏膜的微转移或微侵蚀, 使病理学正常的癌旁黏膜发生原癌基因激活和抑癌基因失活, 癌旁黏膜与原发灶的基因改变是同源的, 但此时组织形态的改变尚未表现出来<sup>[7]</sup>。

### 3.2 喉癌分子肿瘤指标的选择

普通病理形态学的研究已不能完全满足肿瘤研究的需要, 临床专家希望有一更精确的手段来判断切缘安全性, 指导治疗。有关喉癌及其切缘的分子生物学研究是现今科研热点之一。目前喉癌分子生物学研究指标包括 DNA 含量、增殖细胞核抗原(PCNA)、染色体不稳定、微卫星不稳定、原癌基因(*ras*, *c-myc*, *cyclin D1*...) 和抑癌基因(*p53*, *p16*, *p15*, *p21*, *p27* 和 *nm23*...) 等。各种分子肿瘤指标普遍存在敏感性和特异性不高的特点, 难以在临床广泛推广应用。真核生物蛋白合成始动因子 eIF4E (the eukaryotic translation initiation factor 4E) 在头颈鳞癌中 100% 出现异常扩增及过度表达, 敏感性极高, 是目前发现的最为理想的头颈鳞癌分子肿瘤指标之一<sup>[1,5-11]</sup>。*p53* 是喉癌相关基因中被研究最多的分子肿瘤指标<sup>[2,10,12]</sup>, 阳性率为 60% 左右, 国内外不少学者把它作为喉癌手术切缘的研究指标。*c-myc* 和 *ras* 也是研究较多的喉癌相关基因, 且它们可能是 eIF4E 的调控基因<sup>[10-12]</sup>, 因此我们把这两个基因也作为研究指标。

### 3.3 分子肿瘤指标在喉癌手术切缘表达的意义

本组病例原发灶 eIF4E 也是 100% 表达阳性, 单因素分析提示切缘 eIF4E 阳性者复发率高, 生

存分析提示切缘 eIF4E 阳性者生存时间短, 两组的差别有统计学意义。COX 回归多因素分析提示切缘 eIF4E 的表达是喉癌预后的独立影响因素。切缘 eIF4E 阳性者预后不良, 其复发率高, 生存率低, 切缘 eIF4E 的表达是喉癌预后的良好的分子指标, 可考虑用于临床指导喉癌患者的综合治疗。

单因素分析提示切缘 *p53* 阳性者复发率高, 生存分析也提示两组病例的差别有显著性, 但本组病例喉癌 COX 回归多因素分析结果提示 *p53* 不是影响喉癌预后的独立因素。我们认为这可能是由于本组病例只是小样本, *p53* 的作用可能被其他因素掩盖了。另外喉鳞状细胞癌 *p53* 阳性率只有约 60%, 只有原发灶阳性才可出现切缘阳性, *p53* 阳性切缘的发生率并不高。由于它的敏感性差而使部分病例漏诊, 这种现象同样也发生在另两个分子生物学指标 *ras* 和 *c-myc* 上。本组病例喉癌切缘 *c-myc* 或 *ras* 阴阳性组的复发率均没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。生存分析也提示没有统计学意义, 由于 *c-myc* 和 *ras* 在喉癌原发灶的表达也较低, 我们认为这两个不宜作为喉癌切缘的分子肿瘤指标。喉癌手术切缘 eIF4E 阳性可能预示喉癌复发风险高和生存率低。eIF4E 在喉癌手术切缘的表达可考虑作为预测喉癌预后的独立风险指标。

### 3.4 喉癌手术切缘多基因改变的意义

肿瘤的发生常涉及多基因参与, 是一多阶段、多步骤的复杂过程, 在各种致癌因素作用下导致原癌基因激活或抑癌基因失活, 这些基因突变的累积最终导致癌变。切缘中单一癌基因的改变不一定都发展为癌肿, 在原发灶切除后人体正常的免疫机制有可能在这些细胞发生癌变之前将其修复或杀死, 同时癌前病变在主癌灶切除后也可能向正常上皮转化。这可能是本组中部分切缘分子生物学指标阳性而没有复发的原因之一。本研究提示切缘中多个癌基因的改变预示着复发的风险更高, 预后差。

### 参考文献:

- [1] WENDEL H G, DE STANCHINA E, FRIDMAN J S, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy [J]. *Nature*, 2004, 428(6980): 267-269.
- [2] ZHU N, GU L, FINDLEY H W, et al. Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type *p53* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,

- 2005, 335(4): 1272- 1279.
- [3] RINKER-SCHAEFFER C W, AUSTIN V, ZIMMER S, et al. Ras transformation of cloned rat embryo fibroblasts results in increased rates of protein synthesis and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(15): 10659- 10664.
- [4] ROSENWALD I B, RHOADS D B, CALLANAN L D, et al. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF- 4E and eIF- 2 alpha in response to growth induction by c- myc[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(13): 6175- 6178.
- [5] 雷文斌, 苏振忠, 刘启才. eIF- 4E 在喉癌和下咽癌组织中的表达和意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(3): 287- 290.
- [6] NATHAN C A, AMIRGHAHARI N, ABREO F, et al. Overexpressed eIF4E is functionally active in surgical margins of head and neck cancer patients via activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(17): 5820- 5827.
- [7] DE BENEDETTI A, GRAFF J R. eIF- 4E expression and its role in malignancies and metastases [J]. *Oncogene*, 2004, 23(18): 3189- 3199.
- [8] LIANG Z, LEI T, LUYING Z, et al. The expression of proto - oncogene eIF4E in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Laryngoscope*, 2003, 113(7):1238- 1243.
- [9] 雷文斌, 苏振忠, 文卫平, 等. 真核生物蛋白合成起始因子在喉癌、喉咽癌手术切缘中的表达及意义 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2005, 12(2): 85- 87.
- [10] 雷文斌, 苏振忠, 文卫平, 等. 喉癌组织中 eIF- 4E、p53、ras 和 c- myc 的表达及意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(3S):68- 71.
- [11] NATHAN C A, AMIRGHAHARI N, RICE C, et al. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. *Laryngoscope*, 2002, 112(12): 2129- 2140.
- [12] NATHAN C A, SANDERS K, ABREO F W, et al. Correlation of p53 and the proto- oncogene eIF4E in larynx cancers: prognostic implications[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3599- 3604.

(编辑 刘清海)

(上接第 528 页 from page 528)

*Rehabil*, 1999, 26(9):715- 721.

- [4] CATANZARITI JF, DEBUSE T, DUQUESNOY B. Chronic neck pain and masticatory dysfunction [J]. *Joint Bone Spine*, 2005, 72(6):515- 519.
- [5] MOTOYOSHI M, SHIMAZAKI T, HOSOI K, et al. Stresses on the cervical column associated with vertical occlusal alteration [J]. *Eur J Orthod*, 2003, 25(2):135- 138.
- [6] D ATTILIO M, FILIPPI M R, Femminella B, et al. The influence of an experimentally- induced malocclusion on vertebral alignment in rats: a controlled pilot study [J]. *Cranio*, 2005, 23(2):119- 129.
- [7] 董妍, 刘洪臣, 王新木, 等. 创伤咬合动物模型的建立和研究 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2003, 13(3):222- 224.
- [8] YABUSHITA T, ZEREDO J L, TODA K et al. Role of occlusal vertical dimension in spindle function [J]. *J Dent Res*, 2005, 84(3):245- 249.
- [9] WINARAKWONG L, MURAMOTO T, SOMA K, et al. Age- related changes and the possible adaptability of rat jaw muscle spindles: immunohistochemical and fine structural studies [J]. *Arch Histol Cytol*, 2004, 67(3): 227- 240.
- [10] CURTIS DA, KAPILA S, CURTIS T, et al. Vertical dimension increases in the adult rhesus monkey: a pilot study [J]. *J Prosthet Dent*, 1992, 67(5):701- 707.
- [11] AKAGAWA Y, NIKAI H, TSURU H. Histologic changes in rat masticatory muscles subsequent to experimental increase of the occlusal vertical dimension [J]. *J Prosthet Dent*, 1983, 50(5):725- 732.
- [12] YAGI T, MORIMOTO T, HIDAOKA O, et al. Adjustment of the occlusal vertical dimension in the bite- raised guinea pig [J]. *J Dent Res*, 2003, 82(2):127- 130.
- [13] 董妍, 郭天文, 王新木, 等. 发育性偏颌畸形患者颈椎姿势特征的研究 [J]. *中国美容医学*, 2002, 11(6): 567- 570.
- [14] FINK M, WAHLING K, STIESCH- SCHOLZ M, et al. The functional relationship between the craniomandibular system, cervical spine, and the sacroiliac joint: a preliminary investigation [J]. *J Cranio*, 2003, 21(3):202- 208.
- [15] MIRALLES R, MOYA H, RAVERA M J, et al. Increase of the vertical occlusal dimension by means of a removable orthodontic appliance and its effect on craniocervical relationships and position of the cervical spine in children [J]. *J Cranio*, 1997, 15(3):221- 228.

(编辑 王晓鹰)