

# Aurora- A 在喉鳞癌中表达的临床意义

关 中, 陈福进, 陈艳峰, 李秋梨, 田慎之, 孙传政

( 华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心头颈科, 广东 广州 501160 )

**摘 要:** 【目的】了解基因 Aurora- A 在喉癌中的表达情况及了解其作为预测喉癌预后的新指标的可能性。【方法】用免疫组化的方法检测我科 1995- 1999 年 77 例喉癌标本中 Aurora- A 的表达, 随访 3 ~136 月, 中位随访时间为 71.93 月, 用统计软件 SPSS11.0 分析 Aurora- A 的表达与喉癌患者年龄、性别、临床分期、临床分型、肿瘤分化程度等的关系及其与预后的关系。【结果】Aurora- A 在喉癌标本中的表达率为 71.4% (55/77); 在晚期的喉癌中表达率为 87.9% (29/33), 高于早期喉癌中表达率(59.1%, 26/44),  $P=0.006$ 。K- M 法计算分析, Aurora- A 表达阳性者生存时间(中位生存时间 46 月)与 Aurora- A 表达阴性者生存时间(中位生存时间 85 月)有明显差异,  $P < 0.05$ 。Cox 多因素回归分析显示切缘情况、肿瘤分化程度、临床分期及 Aurora- A 表达与喉鳞癌的预后有关,  $P$  值均小于 0.05。【结论】Aurora- A 在喉癌组织中有一定程度表达, 其表达与喉癌临床分期及预后相关。

关键词: 喉癌; 鳞状细胞; 基因; Aurora- A; 预后

中图分类号: R73

文献标识码:A

文章编号: 1672- 3354(2006)06- 0699- 05

## Increased Expression of Aurora- A in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

GUAN Zhong, CHEN Fu- jin, CHEN Yan- feng, LI Qiu- li, TIAN Shen- zhi, SUN Chuan- zheng

( Department of Head and Neck Surgery, Cancer Center, SUN Yat- sen University //State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China )

**Abstracts:** 【Objective】To investigate the expression of Aurora- A in human laryngeal squamous cell carcinoma (HLSCC) and the probabilities of using it as a new indicator for HLSCC prognosis. 【Methods】HLSCC samples from 77 patients treated in department of head and neck surgery, cancer center of SUN Yat- sen University between 1995 and 1999 were analyzed for Aurora- A expression by immunohistochemistry method. The patients were followed- up from 3 ~136 months with median 71.93 months. The relationship between Aurora- A expression and clinical data including age, gender, clinical stage, clinical type, tumor differentiation and prognosis were analyzed using software SPSS11.0. 【Results】The expression rate was 71.4% (55/77) in all 77 cases. The expression rate of 87.9% (29/33) in the advanced staged cases was significantly higher than that in the early staged cases (59.1%, 26/44),  $P=0.006$ . Kaplan- Meier method demonstrated that the patients with positive Aurora- A had significantly shorter survival time (median 46 months) than those with negative Aurora- A (median 85 months),  $P < 0.05$ . Cox multivariate regression analysis revealed that condition of surgical margin, tumor differentiation, clinical stage and Aurora- A expression were significantly related to the prognosis of HLSCC,  $P < 0.05$ . 【Conclusion】Aurora- A is highly expressed in HLSCC especially in the advanced staged cases. Its expression may be associated with the tumor stage and the prognosis of HLSCC.

Key words: Larynx carcinoma, Squamous cell; gene, Aurora- A; Prognosis

[J SUN Yat- sen Univ (Med Sci),2006,27(6):699- 703]

Aurora- A 是一种中心体上的功能性激酶, 属于 Aurora 激酶家族成员, 已被证明是一种癌蛋白,

收稿日期: 2006-07-28

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(31696); 广东省卫生厅科研基金资助项目(B2003036)

作者简介: 关 中(1968-), 男, 广东开平人, 博士生, 主治医师, 现在中山大学附属第二医院耳鼻喉科; 陈福进, 教授, 导师, 通讯作者。

E- mail: gzhong@mail.sysu.edu.cn

其基因定位于 20q13.2, cDNA 全长 1.8 kb, 有 9 个外显子, 编码一种分子质量为 46 ku, 403 个氨基酸组成的蛋白质<sup>[1,2]</sup>。近年来研究显示, Aurora-A 可广泛表达于人类各种肿瘤, 包括肝癌、食道癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌等<sup>[2-9]</sup>, 但未见 Aurora-A 在喉癌中表达与预后关系的报道。本文探讨 Aurora-A 在喉癌中的表达情况, 结合随访资料, 了解其作为喉癌预后预测的新指标及喉癌治疗的分子靶点的可能性。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

取 1995-1999 年我院初治的喉癌病人标本共 77 例, 病理证实均为喉鳞状细胞癌。其中男性 74 例, 女性 3 例; 年龄 37~77 岁, 中位年龄 63 岁; 有淋巴结转移者 16 例; 远处转移 2 例。临床分期按 UICC(1997)分期, 期 14 例, 期 30 例, 期 15 例, 期 18 例; 声门型 52 例, 声门上型 24 例, 声门下型 1 例; 高分化鳞状细胞癌 35 例, 中分化鳞状细胞癌 26 例, 低分化鳞状细胞癌 16 例; 采用单一治疗方式者 28 例 (单纯手术 23 例, 单纯放疗 4 例, 单纯化疗 1 例), 采用综合治疗方式者 49 例 (手术+术后放疗 44 例, 放疗+放疗后手术 1 例, 化疗+放疗 1 例, 手术+化疗+放疗 3 例); 在 71 例含有手术治疗的病例中, 行喉癌联合根治术者 11 例, 行喉裂开+声带切除术者 29 例, 行水平半喉切除术者 4 例, 行垂直半喉切除术者 17 例, 行全喉切除术者 10 例。病人随访 3~136 月, 中位随访时间为 71.93 月。另取癌旁 1 cm 的病理为正常喉上皮的标本 35 例作为对照。

### 1.2 免疫组化检测方法及阳性结果判定

标本用 40 mL/L 福尔马林固定, 常规石蜡病理切片, 脱蜡水化, 用高温高压进行抗原修复, PBS 漂洗 2 min, 置入 30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min, PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, 正常血清 37℃ 孵育 15 min, 加入一抗 (Aurora-A, Santa Cruzs 产品, 1/200) 4℃ 冰箱孵育过夜, 用 PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, 加入二抗 37℃ 孵育 60 min, PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, DAB 显色, 苏木精复染细胞核, 中性树胶封片。结果判断: 镜下观察胞核出现棕黄色颗粒的肿瘤细胞数 >30% 为阳性<sup>[9]</sup>。

### 1.3 统计学方法

结果用 SPSS11.0 进行统计分析, Aurora-A 表达与临床病理参数的关系用  $\chi^2$  检验。以 Kaplan-Meier 计算阳性及阴性患者两组中位生存期, 画出生存曲线, log-rank 法检验之。Cox 单因素回归分析及 Cox 多因素回归分析模型探讨 Aurora-A 表达与喉鳞癌预后的相关性。Cox 单因素回归分析中, 因声门下型例数少, 故将其与声门上型合并与声门型作比较; 低分化鳞癌例数较少, 将其与中分化鳞癌合并与高分化鳞癌比较; 治疗方式 (A) 中各变量为分类变量, 在进行统计分析时行亚变量变换, 把单纯手术组作为参照组。由于某些组病例较少, 遂将其合并为单一治疗组及综合治疗组。

## 2 结果

### 2.1 Aurora-A 在喉癌及癌旁组织中的表达

77 例喉癌中 55 例阳性 (图 1), 阳性率为 71.4%; 35 例喉癌旁组织 9 例阳性, 阳性率为 25.7% ( $\chi^2 = 20.533$ ,  $P < 0.001$ )。

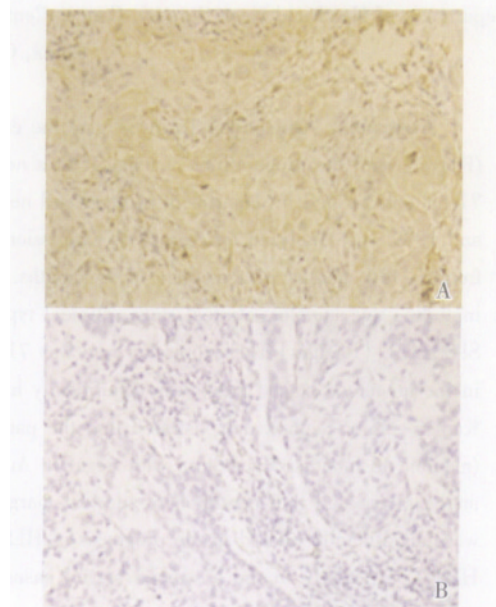


图 1 Aurora-A 在喉鳞癌中的表达  
Fig.1 Expression of Aurora-A in HLSCC  
A: positive; B: negative, DAB  $\times 400$

### 2.2 Aurora-A 表达与临床病理参数的关系

不同临床分期喉癌之间 Aurora-A 表达阳性率的差异有统计学意义 ( $P=0.006$ ), 其中晚期阳性率较高。未发现 Aurora-A 表达阳性率与年龄、性别、分化程度、临床分型有关 (表 1)。

表 1 Aurora- A 表达与临床病理参数的关系  
Table 1 Relation between Aurora- A expression and clinicopathological features

Clinicopathological features		n	Aurora- A expression Positive No.(%)	$\chi^2$	P
Age	60 years	34	24(70.6)	0.021	0.885
	>60 years	43	31(72.1)		
Gender	Male	74	53(71.6)	7.658	0.006
	Female	3	2(66.7)		
Clinical Stage	I+II	44	26(59.1)	2.563	0.278
	III+IV	33	29(87.9)		
Clinical Classification	Glottic	53	35(66.0)	5.292	0.071
	Supraglottic	23	19(82.6)		
	Subglottic	1	1(100)		
Differentiation	Well	35	24(68.6)		
	Moderate	26	16(61.5)		
	Poor	16	15(93.8)		

1) Fisher s exact test

2.3 生存分析结果

2.3.1 Aurora- A 表达阳性及阴性组的生存情况以 Kaplan- Meier 计算 Aurora- A 阳性及阴性患者两组中位生存期分别为 46(标准误  $s_e=13.50$ ) 和 85 ( $s_e=9.27$ ) 月, 95%置信区间为 (19.54, 72.46) 和 (66.83, 103.17) 月。阴性组中位生存期较阳性组为高, 提示 Aurora- A 为负性预后因子。生存曲线如图 2, log rank 检验  $P=0.0159$ , 显示两者生存时间的差异有显著性, Aurora- A 表达阳性的喉癌患者生存时间较短。

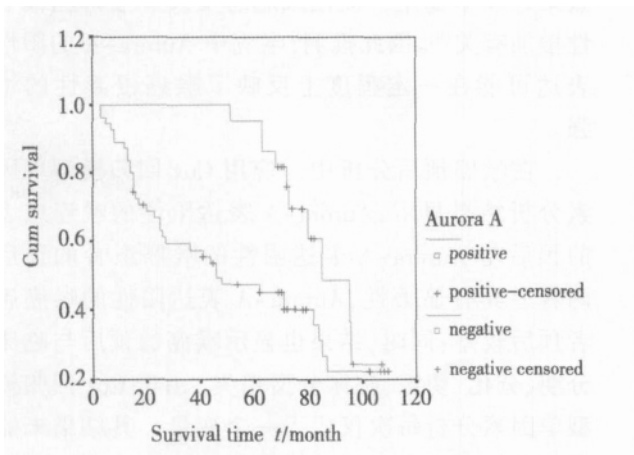


图 2 Aurora- A 表达阳性及阴性组的生存曲线

Fig. 2 Survival curve in the positive and negative Aurora- A groups

2.3.2 Cox 单因素回归分析结果 Cox 单因素回

归分析各个因素与喉癌预后关系的结果显示, 喉癌预后与临床分型、分期、分化程度、Aurora- A 及切缘情况有关, P 值分别为 0.023, 0.000, 0.004, 0.020 及 0.0001。其中, 声门上型+声门下型组预后较声门型组差;晚期喉癌(、期)预后较早期喉癌(、期)差。中分化鳞癌+低分化鳞癌组预后较高分化鳞癌组差。切缘阳性组预后较切缘阴性组差。未发现喉

表 2 各临床病理参数与喉癌预后关系的 Cox 回归单因素分析结果

Table 2 Cox univariate regression analysis of Correlation between clinicopathological features and prognosis of HLSSC

Clinicopathological features	n	Wald	P
Age ( 60/>60 years)	34/43	0.012	0.913
Gender (Male/Female)	74/3	0.725	0.394
Aurora- A (Positive/ Negative)	55/22	5.426	0.020
Differentiation (well/Moderate + Poor)	35/42	8.469	0.004
Clinical Stage (I+II/III+IV)	44/33	17.171	0.000
Clinical Classification (Glottic/Non- glottic)	52/25	5.206	0.023
Treatment(A)	Note	11.643	0.070
Treatment (B) (Mono/Combined Therapy)	28/49	0.210	0.646
Surgical Margin (Positive /Negative)	7/64	11.317	0.001

The numbers of patients accepted surgery alone, radiotherapy alone, chemotherapy alone, surgery plus postoperative radiotherapy, preoperative radiotherapy plus surgery, chemotherapy plus radiotherapy, surgery plus chemotherapy and radiotherapy were 23, 4, 1, 44, 1, 1, 3, respectively

癌预后与年龄、性别及治疗方式有关,其中治疗方式(A)分为7组,未发现喉癌预后与治疗方式有关, $P=0.070$ ,将其合并为单一治疗组及综合治疗组比较,结果仍然未发现喉癌预后与治疗方式有关( $P=0.646$ ,表2)。

2.3.3 多因素分析结果 对Cox单因素回归分析筛选出的显著性变量,纳入Cox模型进行多因素生存分析,在排除临床分期、分化程度、切缘情况、临床分型对喉癌预后关系的干扰后,结果显示Aurora-A为影响喉癌预后的独立预后因素。Aurora-A表达阳性及阴性两者生存时间的差异有显著性( $P=0.020$ ,表3),Aurora-A表达阳性的喉癌患者生存时间较短。同时临床分期、分化程度、切缘情况亦为影响喉癌预后的独立预后因素。

表3 临床病理参数与喉癌预后关系的Cox回归多因素分析结果

Table 3 Cox multivariate regression analysis of HLSSC prognosis against clinicopathological features

Clinicopathological features	Wald	P	Exp( $\beta$ )	95.0% CI for Exp( $\beta$ )
Aurora-A	5.389	0.020	2.452	1.150, 5.229
Differentiation	4.909	0.027	2.385	1.105, 5.146
Clinical stage	10.302	0.001	3.015	1.537, 5.915
Clinical classification	0.041	0.839	0.918	0.402, 2.095
Surgical margin	5.143	0.023	3.151	1.169, 8.495

### 3 讨论

喉癌是一种常见的头颈部肿瘤,近年来发病率有逐渐上升的趋势,其主要病理类型为鳞状细胞癌。目前主要治疗手段为手术及放疗,早期喉癌治疗效果较好而晚期喉癌疗效较差。因此,仍然需要研究新的诊疗手段。中心体作为大多数真核细胞的主要微管组织中心,对确保细胞分裂的对称性和双极性有重要作用,这一功能是正确的染色体分离的必要条件。恶性肿瘤中观察到的细胞极性丢失和染色体分离异常的特点可能是中心体功能缺陷所致。几乎全部人类实体瘤,包括脑部、头颈部、胸部、肺部、结肠、前列腺、胰腺及胆管肿瘤,都有异常数目的中心体<sup>[10]</sup>。

Aurora激酶家族是一组新近发现的调节中心体、微管功能的丝氨酸和苏氨酸激酶。在细胞有丝分裂的正常进行中发挥重要的作用。哺乳动物细

胞Aurora激酶家族迄今发现有3个成员:Aurora-A,Aurora-B及Aurora-C。其中Aurora-A是一种中心体上的功能性激酶,并有高水平的酪蛋白激酶活性。其活化与细胞进入有丝分裂,中心体成熟,分离及染色体的排列有关。Aurora-A在许多肿瘤中有表达,其表达可导致细胞周期G<sub>2</sub>检查点、纺锤体检查点异常及胞质分裂障碍,从而导致染色体不稳定,故被认为是一种癌蛋白,而其精确功能还不十分清楚。

有研究报道显示Aurora-A的mRNA表达水平与乳腺癌的病理分级、雌激素受体(FR)和孕激素受体(PR)有明显相关性,病理分级越高及FR和PR阳性,mRNA表达水平越高。另有报道示,在膀胱癌研究中,发现Aurora-A的表达水平与组织分级、临床分期和患者预后有相关性<sup>[11]</sup>。另外有Aurora基因扩增的胃癌<sup>[12]</sup>及食道癌患者比未发现Aurora基因扩增的患者预后更差。本研究显示,Aurora-A在检测的77例喉癌标本中阳性率为71.4%,而在癌旁组织中阳性率为25.7%,两者差异具有显著性( $P<0.001$ )。这与李英慧等的研究结果相符<sup>[13]</sup>。可见Aurora-A在喉癌组织中表达高于正常喉组织。本研究还显示Aurora-A表达与喉癌的临床分期有关。晚期喉癌中Aurora-A表达的阳性率(87.9%)高于早期喉癌中Aurora-A表达的阳性率(59.1%),两者差异具有显著性, $P=0.006$ 。有报道显示在食道癌中Aurora-A表达亦与临床分期有关,其原因与Aurora-A引起中心体异常,导致染色体不稳定,促使细胞恶变及肿瘤细胞侵袭性增加有关<sup>[9]</sup>。因此推测,喉癌中Aurora-A的阳性表达可能在一定程度上反映了喉癌侵袭性的增强。

在喉癌预后分析中,应用Cox回归模型单因素分析结果显示,Aurora-A表达阳性的喉癌患者的预后与Aurora-A表达阴性的喉癌患者的预后两者差异有显著性,Aurora-A表达阳性的喉癌患者预后较差;同时,结果也显示喉癌的预后与临床分期、分化、切缘、临床分型相关。由于Cox回归模型单因素分析每次仅代入一个变量,其结果未能排除其它因素的干扰,故须进一步Cox回归模型多因素分析,将Cox回归模型单因素分析结果中与预后相关的因素均纳入Cox回归模型,在排除以上因素对Aurora-A表达与预后关系的干扰后,结果仍然显示,Aurora-A表达与喉癌的预后相关,

Aurora-A 表达阳性的喉癌患者的预后较差。因此,本研究显示, Aurora-A 的表达是影响喉癌的独立预后因素。多因素分析中, 喉癌预后还与肿瘤分化、临床分期、及切缘情况有关(表 3)。由于 Aurora-A 表达增高引起中心体扩增, 导致染色体不稳定, 使得肿瘤细胞的生物学行为发生改变, 易于获得高侵袭性的表型, 而肿瘤侵袭性的增加正是肿瘤预后不良的重要原因之一<sup>[14]</sup>。

Aurora-A 在喉癌组织中表达的广泛性及其表达对喉癌预后的影响。为应用 Aurora-A 作为喉癌基因治疗的新靶点及喉癌预后预测的新指标提供了一定的依据。我们已应用 Aurora 的特异性抑制剂 vx-680<sup>[15]</sup>对多株头颈鳞癌细胞株(包括喉癌细胞株)进行体外抗肿瘤实验, 结果 vx-680 对这些细胞株有明显体外杀伤作用, 显示 Aurora-A 作为喉癌基因治疗的新靶点的良好前景, 而其分子水平的具体的机理值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] GOVER D M, LEIBOWITZ M H, MCLEAN D A, et al. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles[J]. *Cell*, 1995, 81(1): 95- 105.
- [2] BISCHOFF J R, ANDERSON L, ZHU Y, et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers [J]. *EMBO J*, 1998, 17(11): 3052- 3065.
- [3] GRITSKO T M, COPPOLA D, PACIGA J E, et al. Activation and Overexpression of Centrosome Kinase BTAK/Aurora-A in Human Ovarian Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4): 1420- 1426.
- [4] DONGHUI LI, JIJIANG ZHU, FIROZI P F, et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(3): 991- 997.
- [5] MIYOSHI Y, IWAO K, EGAWA C, et al. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers [J]. *Int J Cancer*, 2001, 92(3): 370- 373.
- [6] JENG Y M, PENG S Y, LIN C Y, et al. Overexpression and amplification of Aurora -A in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004 , 10(6):2065- 2071.
- [7] FRAIZER G C, DIAZ M F, LEE I L, et al. Aurora- A/ STK15/BTAK enhances chromosomal instability in bladder cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(6): 1631- 1639.
- [8] KAMADA K, YAMADA Y, HIRAO T, et al. Amplification/overexpression of Aurora -A in human gastric carcinoma: potential role in differentiated type gastric carcinogenesis[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(3): 593- 599.
- [9] TANAKA E, HASHIMOTO Y, ITO T, et al. The clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5):1827- 1834.
- [10] 赵 旭,宋宇彤,李福才,综述. 中心体异常相关基因的肿瘤学研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2003, 12(7):400- 404.
- [11] 李国权,宫琳琳. Aurora-A 激酶与恶性肿瘤研究进展 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2004, 31(2): 103- 106.
- [12] SAKAKNRA C, HAGIWARA A, YASNOKA R, et al. Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(6):824- 831.
- [13] 李英慧,李福才,赵 旭,等.喉癌 STK15 基因表达和染色体不稳定的研究[J]. *遗传学报*, 2002, 29(12): 1048- 1051.
- [14] 郭剑锋,陈福进,曾宗渊,等. 声门上喉癌预后的相关因素分析[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(2): 236- 239.
- [15] HARRINGTON E A, BEBBINGTON D, MOORE J, et al. VX-680, a potent and selective small- molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo [J]. *Nat Med*, 2004, 10(3): 262- 267.

(编辑 刘清海)