

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.007

文章编号: 1005-8982 (2019) 07-0034-05

## RKIP、P27 表达与鼻咽癌发生、发展的关系\*

龚永谦, 罗兴谷, 唐洪波

(南华大学附属第一医院耳鼻咽喉科, 湖南衡阳 421001)

**摘要: 目的** 探讨 Raf 激酶抑制蛋白 (RKIP)、P27 蛋白在鼻咽癌组织中的表达及与鼻咽癌发生、发展的关系。**方法** 选取 2012 年 3 月—2016 年 1 月南华大学附属第一医院病理科收集的鼻咽癌黏膜组织 76 例(病例组)和正常鼻咽组织 30 例(对照组), 采用免疫组织化学检测两组标本中的 RKIP、P27 蛋白表达水平, 并分析 RKIP、P27 蛋白与鼻咽癌发生、发展的关系。**结果** 两组 RKIP 蛋白和 P27 蛋白阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 病例组的 RKIP 蛋白阳性表达率 55.26% 低于对照组的 86.67%, 病例组的 P27 蛋白阳性表达率 77.63% 高于对照组的 46.67%; 发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅲ期和Ⅳ期鼻咽癌患者、发生淋巴结转移的鼻咽癌患者病灶组织中的 RKIP 蛋白阳性表达率低于未发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅰ期和Ⅱ期鼻咽癌患者、未发生淋巴结转移的鼻咽癌患者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅲ期和Ⅳ期鼻咽癌患者、发生淋巴结转移的鼻咽癌患者病灶组织中的 P27 蛋白阳性表达率高于未发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅰ期和Ⅱ期鼻咽癌患者、未发生淋巴结转移的鼻咽癌患者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 鼻咽癌组织中 RKIP 蛋白低表达、P27 蛋白高表达, 并且与鼻咽癌肿瘤的发生、发展密切相关。

**关键词:** 鼻咽肿瘤; Raf 激酶抑制蛋白; P27 蛋白; 发生、发展

**中图分类号:** R739.6

**文献标识码:** A

## Clinical role of RKIP and P27 protein in development of nasopharyngeal carcinoma\*

Yong-qian Gong, Xing-gu Luo, Hong-bo Tang

(Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and P27 protein in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and its clinical significance. **Methods** A total of 76 cases of nasopharyngeal carcinoma mucosa (case group) and 30 cases of normal nasopharyngeal tissue (control group) which were collected in our hospital from March 2012 to January 2016 were involved in this study. Immunohistochemistry was performed for detection of RKIP and P27 protein. Clinical significance of RKIP, P27 protein in nasopharyngeal carcinoma including occurrence and development were determined. **Results** The positive expression rates of RKIP and P27 in the two groups were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The positive expression rate of RKIP in the case group (55.26%) was lower than that in the control group (86.67%). The positive expression rate of P27 in the case group (77.63%) was higher than the control group (46.67%); the positive expression rates of RKIP and P27 in lesions of NPC patients with distant or lymph node metastasis, stage III or IV nasopharyngeal carcinoma were significantly lower and higher than those with distant or lymph node metastasis, stage I or II, respectively; the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Decrease of RKIP and increase of P27 may be associated with the occurrence and

收稿日期: 2018-09-29

\* 基金项目: 湖南省财政厅资助项目 (湘财教指 [2017]99 号); 湖南省教育厅科研项目 (No: 16C1399)

development of nasopharyngeal carcinoma.

**Keywords:** nasopharyngeal carcinoma; Raf kinase inhibitor; P27 protein; occurrence; development

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是中国南方及东南亚地区最常见的恶性肿瘤之一,是指发生在鼻咽腔顶部与侧壁的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。鼻咽癌的发病因素还不明确,除了遗传等因素外,还与环境、生活习惯等因素息息相关。Raf激酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitor protein, RKIP)属于磷脂酰乙醇胺结合蛋白的一种,是NF- $\kappa$ B信号通路的内源性抑制子。近来研究发现<sup>[2]</sup>, RKIP在NPC组织中明显下调。P27蛋白是一种细胞周期蛋白激酶抑制蛋白,可参与细胞周期调控<sup>[3]</sup>。研究显示, P27蛋白表达水平与肿瘤的发生、发展、预后密切相关<sup>[4]</sup>。本研究探讨RKIP、P27蛋白在鼻咽癌组织中的表达及与鼻咽癌发生、发展的关系,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2012年3月—2016年1月南华大学附属第一医院病理科收集的鼻咽癌黏膜组织76例(病例组)和正常鼻咽组织30例(对照组)。病例组:男性49例,女性27例;年龄42~78岁,平均(59.3±11.5)岁;临床分期:I期鼻咽癌患者12例、II期鼻咽癌患者20例、III期鼻咽癌患者30例、IV期鼻咽癌患者14例;经检查出现淋巴结转移50例患者。对照组:男性23例,女性7例;年龄44~75岁,平均(57.0±12.0)岁。两组的年龄、性别差异无统计学意义,具有可比性( $P>0.05$ )。

### 1.2 纳入及排除标准

**1.2.1 纳入标准** ①鼻咽癌的诊断标准依据病理学结果;②患者年龄<80岁;③鼻咽癌组织在获取标本前,患者无放疗化疗病史;④正常鼻咽黏膜组织来源于因其他外科手术获取的患者;⑤本研究获得医学伦理委员会的批准。

**1.2.2 排除标准** ①转移性鼻咽癌;②既往具有放疗化疗病史;③患者临床数据、基础资料不完整。

### 1.3 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学染色法检测两组标本中RKIP、P27蛋白的表达,将切片进行二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化处理,使用SP法检测RKIP的表达,使用3%过氧

化氢封闭内源性过氧化物酶15 min, 3%牛血清清蛋白封闭1 h处理,然后分别滴加1:100山羊抗人RKIP多抗和鼠抗人P27单克隆抗体(美国Santa Cruz公司), 4℃过夜。冲洗后滴加生物素标记的驴抗兔IgG工作液(武汉艾美捷科技有限公司),室温孵育1 h,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,孵育1 h。DAB显色处理,苏木精复染,脱色后显微镜下观察。设计空白对照,以PBS代替一抗,其他操作步骤相同。

### 1.4 免疫组织化学染色判断标准

细胞质、细胞膜中定位RKIP、P27蛋白的阳性表达,阳性表达均表现为黄色甚至棕黄色,按照染色强度划分:无色(0分)、淡黄色(1分)、棕黄色(2分)、褐色或者黑色(3分);按照染色阳性的细胞比例划分:≤10%(1分)、11%~50%(2分)、51%~75%(3分)、>75%(4分);染色强度评分与阳性细胞比例评分之积<3分判断为阴性、≥3分判断为阳性。染色强度评分与阳性细胞比例评分之积<3分(-);染色强度评分与阳性细胞比例评分之积3~5分(+);染色强度评分与阳性细胞比例评分之积6~9分(++);染色强度评分与阳性细胞比例评分之积>9分(+++)。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用 $t$ 检验;计数资料采用率(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组RKIP、P27蛋白的表达率比较

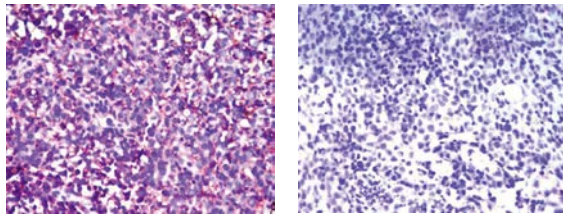
两组RKIP蛋白和P27蛋白阳性表达率比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),病例组的RKIP蛋白阳性表达率低于对照组,病例组的P27蛋白阳性表达率高于对照组(见表1、2)。RKIP蛋白在正常鼻咽组织中呈阳性表达,在鼻咽癌组织中呈阴性表达;P27蛋白在正常鼻咽组织中呈阴性表达,在鼻咽癌组织中呈阳性表达(见图1、2)。

表 1 两组 RKIP 蛋白的表达率比较

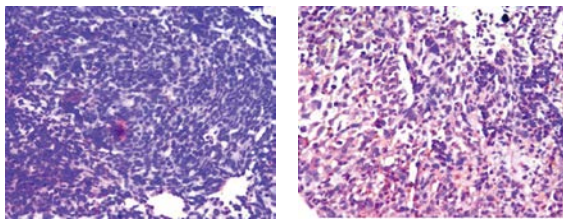
组别	n	-/ 例	+/ 例	++/ 例	+++/ 例	阳性率 例 (%)
病例组	76	34	26	13	3	42 (55.26)
对照组	30	4	10	11	5	26 (86.67)
$\chi^2$ 值						9.224
P 值						0.002

表 2 两组 P27 蛋白的表达率比较

组别	n	-/ 例	+/ 例	++/ 例	+++/ 例	阳性率 例 (%)
病例组	76	17	26	25	8	59 (77.63)
对照组	30	16	10	4	0	14 (46.67)
$\chi^2$ 值						9.619
P 值						0.002



正常鼻咽组织 鼻咽癌组织  
图 1 RKIP 蛋白的表达 (SP×400)



正常鼻咽组织 鼻咽癌组织  
图 2 P27 蛋白的表达 (SP×400)

2.2 两组 RKIP、P27 蛋白的表达与临床病理学特征的关系

发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅲ期和Ⅳ期鼻咽癌患者、发生淋巴结转移的鼻咽癌患者病灶组织中的 RKIP 蛋白阳性表达率低于未发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅰ期和Ⅱ期鼻咽癌患者、未发生淋巴结转移的鼻咽癌患者，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；RKIP 蛋白阳性表达与患者年龄、性别、T 分级无关 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅲ期和Ⅳ期鼻咽癌患者、发生淋巴结转移的鼻咽癌患者病灶组织中的 P27 蛋白阳性表达率高于未发生远处转移的鼻咽癌患者、Ⅰ期和Ⅱ期鼻咽癌患者、未发生淋巴结转移的鼻咽癌患者，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；P27 蛋白阳性表达与患者年龄、性别、T 分级无关 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

表 3 患者临床病理学特征与鼻咽癌组织中 RKIP 蛋白表达的关系 例 (%)

临床病理因素	RKIP 蛋白阳性	RKIP 蛋白阴性	$\chi^2$ 值	P 值
年龄				
≥ 60 岁	15 (35.71)	11 (32.35)	0.094	0.759
<60 岁	27 (64.29)	23 (67.65)		
性别				
男	28 (66.67)	21 (61.76)	0.197	0.657
女	14 (33.33)	13 (38.24)		
T 分级				
T <sub>1</sub> 、T <sub>2</sub>	18 (42.86)	12 (35.29)	0.450	0.502
T <sub>3</sub> 、T <sub>4</sub>	24 (57.14)	22 (64.71)		
远处转移				
是	18 (42.86)	27 (79.41)	10.396	0.001
否	24 (57.14)	7 (20.59)		
TNM 分期				
I、II	22 (52.38)	10 (29.41)	4.067	0.044
III、IV	20 (47.62)	24 (70.59)		
淋巴结转移				
是	22 (52.38)	28 (82.35)	7.499	0.006
否	20 (47.62)	6 (17.65)		

表 4 患者临床病理学特征与鼻咽癌组织中 P27 蛋白表达的关系

临床病理因素	P27 蛋白阳性	P27 蛋白阴性	$\chi^2$ 值	P 值
年龄				
≥ 60 岁	22 (37.29)	4 (23.53)	1.110	0.292
<60 岁	37 (62.71)	13 (76.47)		
性别				
男	37 (62.71)	12 (70.59)	0.357	0.550
女	22 (37.29)	5 (29.41)		

续表 4

临床病理因素	P27 蛋白阳性	P27 蛋白阴性	$\chi^2$ 值	P 值
<b>T 分级</b>				
T <sub>1</sub> 、T <sub>2</sub>	25 (42.37)	5 (29.41)	0.928	0.335
T <sub>3</sub> 、T <sub>4</sub>	34 (57.63)	12 (70.59)		
<b>远处转移</b>				
是	39 (66.10)	6 (35.29)	5.186	0.023
否	20 (33.90)	11 (64.71)		
<b>TNM 分期</b>				
I、II	29 (49.15)	3 (17.65)	5.374	0.020
III、IV	30 (50.85)	14 (82.35)		
<b>淋巴结转移</b>				
是	43 (72.88)	7 (41.18)	5.894	0.015
否	16 (27.12)	10 (58.82)		

### 3 讨论

NPC 是指起源于鼻咽黏膜上皮和腺体的恶性肿瘤。世界卫生组织调查报道,全球有 80% 的鼻咽癌患者在中国<sup>[5]</sup>。近年来鼻咽癌在我国的发病趋势逐渐上升。随着鼻咽癌诊断、治疗水平的不断提高,中晚期鼻咽癌的疗效得到提高,但是患者的 5 年生存率仍然为 70%<sup>[6]</sup>。针对细胞信号途径的分子靶向药物开创了肿瘤治疗的新时代,探索有效的肿瘤诊治靶点具有重要意义。

研究鼻咽癌相关基因是揭示鼻咽癌发生、发展机制的重要基础。RKIP 是一种转移抑制基因,作为调控多种信号转导通路的中心蛋白,参与 G 蛋白偶联受体和 NF- $\kappa$ B 等信号传导通路的调节<sup>[7]</sup>。RKIP 是 NF- $\kappa$ B 信号通路的内源性抑制子,通过抑制 I $\kappa$ B 激酶的活化来发挥 NF- $\kappa$ B 信号通路负性调节的作用。侵袭、转移是鼻咽癌的主要生物学特征,也是影响患者预后的最重要的原因。研究显示<sup>[8-9]</sup>,RKIP 具有促进凋亡,抑制细胞生长和肿瘤转移的重要功能。研究发现<sup>[10]</sup>,RKIP 在多种肿瘤例如前列腺癌、肝癌、胃癌等多种肿瘤组织中表达下调。然而,RKIP 在 NPC 侵袭转移中的作用及其机制仍然不清楚。本研究数据表明,病例组的 RKIP 蛋白阳性表达率低于对照组;发生远处转移的鼻咽癌患者、III 期和 IV 期鼻咽癌患者、发生淋巴结转移的鼻咽癌患者病灶组织中的 RKIP 蛋白阳性表达率低于未发生远处转移的鼻咽癌患者、I

期和 II 期鼻咽癌患者、未发生淋巴结转移的鼻咽癌患者;结果表明 RKIP 蛋白在鼻咽癌的侵袭和转移中起到了重要的促进作用。

细胞周期是生命活动的基本过程,肿瘤细胞的发生、发展与细胞周期密切相关。RKIP 可以加速 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。因此笔者猜测, RKIP 通过影响肿瘤细胞的细胞周期发挥促进凋亡,抑制细胞生长和肿瘤转移的重要功能。P27 蛋白是一种新发现的非特异性的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI)。主要功能是作为细胞周期素依赖性蛋白激酶 (CDK) 抑制因子参与细胞周期调控<sup>[11]</sup>。目前已有关于 P27 蛋白与鼻咽癌临床参数的研究,但是尚无统一的定论,因此本研究在以往研究的基础上,探索鼻咽癌组织中 RKIP 蛋白低表达与 P27 蛋白是否相关。P27 作为抑癌基因的一种,是细胞周期负性调控因子,能抑制各种细胞周期蛋白和激酶的活性<sup>[12]</sup>。实验证明,P27 蛋白主要通过抑制 Cyclin-CDKs 复合物的活性来实现其对细胞周期的调控<sup>[13]</sup>。一方面 P27 蛋白能抑制已被激活的 CDK 活性,另一方面 P27 蛋白也可以抑制 CDK 的激活过程,实现抑癌作用。研究显示<sup>[14]</sup>,P27 蛋白在多种癌症例如胃癌、食管癌、结肠癌等多种肿瘤中有抑癌作用。本研究结果显示,病例组的 P27 蛋白阳性表达率高于对照组;发生远处转移的鼻咽癌患者、III 期和 IV 期鼻咽癌患者、发生淋巴结转移的鼻咽癌患者病灶组织中的 P27 蛋白阳性表达率高于未发生远处转移的鼻咽癌患者、I 期和 II 期鼻咽癌患者、未发生淋巴结转移的鼻咽癌患者。结果提示 P27 的表达上升预示鼻咽癌肿瘤发生的可能性增加,并可能促进鼻咽癌的进展。P27 蛋白的异常表达可以作为评价鼻咽癌是否转移的一个指标。

综上所述,鼻咽癌组织中 RKIP 蛋白低表达、P27 蛋白高表达,并且与鼻咽癌肿瘤的发生、发展密切相关。深入研究 RKIP、P27 蛋白在鼻咽癌细胞侵袭转移中的作用及其机制,对研发相应的靶向药物、提高临床疗效及改善鼻咽癌患者预后具有重要的临床意义。

### 参 考 文 献:

- [1] 邱艳芳,刘志刚,赵宇,等.鼻咽癌的免疫治疗进展[J].中国肿瘤临床,2016,43(23):1053-1057.
- [2] 杨丽萍,何融泉,张昌文,等.表皮生长因子受体靶向治疗鼻咽癌的研究进展[J].广东医学,2015,36(18):2929-2931.
- [3] 莫祥兰,黄永塔.鼻咽癌远处转移分子机制研究进展[J].山东医药,2015(8):103-105.

- [4] 刘畅, 王燮. p27 kip1 亚细胞定位与肿瘤 [J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(5): 522-525.
- [5] 林灿峰, 李东升, 林柏翰, 等. 鼻咽癌治疗后局部复发回顾性研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(3): 188-191.
- [6] 万刚. 局部晚期鼻咽癌新辅助化疗研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(2): 93-99.
- [7] 阴骏, 徐鹏, 冯梅, 等. 鼻咽癌精准治疗转化研究及临床应用现状 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2017, 26(7): 823-827.
- [8] SCHMID E, NEEF S, BERLIN C, et al. Cardiac RKIP induces a beneficial [beta]-adrenoceptor-dependent positive inotropy[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(11): 1298-1306.
- [9] DATAR I, FENG J, QIU X, et al. RKIP inhibits local breast cancer Invasion by antagonizing the transcriptional activation of MMP-13[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134494.
- [10] ESCARA - WILKE J, KELLER J M, IGNATOSKI K M W, et al. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) deficiency decreases latency of tumorigenesis and increases metastasis in a murine genetic model of prostate cancer[J]. *Prostate*, 2015, 75(3): 292-302.
- [11] HAYASHI H, ITO T, YAZAWA T, et al. Reduced expression of p27/Kip1 is associated with the development of pulmonary adenocarcinoma[J]. *Journal of Pathology*, 2015, 192(1): 26-31.
- [12] TIKOO R, OSTERHOUT D J, CASACCIA-BONNEFIL P, et al. Ectopic expression of p27Kip1 in oligodendrocyte progenitor cells results in cell-cycle growth arrest[J]. *Journal of Neurobiology*, 2015, 36(3): 431-440.
- [13] 王军, 赵醒, 赵宇阳, 等. CyclinD1、CDC25B 和 p27 在胃癌组织中的表达 [J]. 广东医学, 2016, 37(10): 1495-1498.
- [14] 王超奇, 侯建全, 欧阳骏, 等. 前列腺癌组织 p27 和 OPN 表达临床意义分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(11): 855-857.

(张蕾 编辑)