

[文章编号] 1000-1182(2009)01-0088-04

口腔黏膜癌变过程中丝氨酸/苏氨酸激酶15的表达及意义

卢虹¹ 蔡扬¹ 于燕妮² 杨宏¹

(1.贵阳医学院附属医院 口腔内科; 2.病理科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的 了解丝氨酸/苏氨酸激酶15(STK15)在口腔黏膜癌变过程中的表达变化, 探讨P53/STK15转激活-非依赖通路在口腔鳞癌(OSCC)发生发展中的作用及意义。方法 正常口腔黏膜8例, 上皮异常增生患者27例, OSCC患者43例, 石蜡包埋组织, 采用免疫组化SABC法了解STK15及P53蛋白表达情况, 分析二者的相关性及其临床病理学意义。结果 STK15在正常口腔黏膜无表达, 在上皮异常增生及OSCC中阳性率分别为40.74%(11/27) 和67.44%(29/43), 各组间差异均有统计学意义($P<0.05$); 口腔鳞癌中STK15阳性率在P53阳性组高于P53阴性组, 在OSCC有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 STK15过表达是口腔黏膜癌变过程的早期事件, 口腔鳞癌STK15过表达可能与p53突变有关并与OSCC淋巴结转移密切相关, P53/STK15转激活-非依赖通路在OSCC发生发展中可能起重要作用。

[关键词] 丝氨酸/苏氨酸激酶15; 癌前损害; 异常增生; 鳞状细胞癌

[中图分类号] R781.5 **[文献标识码]** A

The over-expression of serine/threonine kinase 15 protein in oral carcinogenesis LU Hong¹, CAI Yang¹, YU Yan-ni², YANG Hong¹. (1. Dept. of Oral Medicine, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Dept. of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of STK15 and P53 proteins in oral precancerous lesions and oral squamous cell carcinoma(OSCC) and elucidate the possible role of P53/STK15 switch activation-independent pathway in oral carcinogenesis. **Methods** Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of 8 cases of normal oral epithelium, 27 cases of dysplasia with different degree epithelium dysplasia and 43 cases of OSCC with different differentiation were investigated for the expression of STK15 and P53 proteins by using immunohistochemistry. The clinical and pathological significance of STK15 over-expression in oral carcinogenesis were statistically analyzed by SPSS 12.0. **Results** STK15 protein was not detectable in normal oral epithelium and significantly altered from mild-dysplasia to OSCC. The percentage of STK15 over-expression were 40.74%(11/27) in dysplasia and 67.44%(29/43) in OSCC($P<0.05$). The percentage of STK15 over-expression in OSCC with positive P53 staining was significantly higher than that in OSCC with negative P53 staining($P<0.05$). STK15 over-expression was significantly associated with regional lymph node involvement($P<0.05$), while no correlation was found for STK15 over-expression and tumor differentiation, as well as TNM stages. **Conclusion** STK15 up-regulation was an early event in oral carcinogenesis. The up-regulation of STK15 protein in OSCC may partly result from p53 mutations, which probably contribute a role in lymph node metastasis of OSCC as well. P53/STK15 switch activation-independent pathway may play some roles in oral carcinogenesis.

[Key words] serine/threonine kinase 15; precancerous lesions; dysplasia; squamous cell carcinoma

中心体扩增是口腔黏膜癌变过程中的早期事件^[1]并且与口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma,

OSCC)染色体不稳定形成有关^[2]。丝氨酸/苏氨酸激酶15(serine/threonine kinase 15, STK15)编码一种中心体相关激酶, 有证据证明, STK15过表达与中心体扩增及细胞恶性转化密切相关^[3]; p53作为人类肿瘤中最普遍突变的基因, 其失活也能引起中心体异常及细胞恶性转化, 可能机制之一是通过转激

[收稿日期] 2008-02-18; [修回日期] 2008-08-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30460139); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(N2005-1)

[作者简介] 卢虹(1978-), 女, 贵州人, 主治医师, 硕士

[通讯作者] 蔡扬, Tel: 0851-6774432

活-非依赖性机制影响STK15而发挥作用^[4]。本研究通过了解STK15及P53在口腔黏膜癌变过程中的表达,探讨P53/STK15转激活-非依赖通路在OSCC发生发展中的作用及意义。

1 材料和方法

1.1 材料

标本来自贵阳医学院附属医院口腔诊疗中心,选取2000—2006年存档的病理资料完整且未经任何治疗的手术切除或临床活检标本,包括正常口腔黏膜8例,上皮异常增生组织27例(轻度上皮异常增生13例,中度上皮异常增生9例,重度上皮异常增生5例),口腔鳞癌43例(高分化鳞癌31例,中分化鳞癌9例,低分化鳞癌3例),其中有淋巴结转移组28例,无淋巴结转移组15例。按2002年国际抗癌联盟TNM分期标准:~期13例,~期30例,所有肿瘤标本均为肿瘤原发灶且未经放化疗。每例标本4 μm ,连续切片5~7张,裱于经防脱片剂处理的载玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘烤过夜。其中1张常规苏木精-伊红染色,并由2位病理医生盲法重新作出组织病理学诊断,其余用于免疫组化染色。

1.2 试剂

兔抗人STK15多克隆抗体(Merckbioscience公司,美国),鼠抗人p53单克隆抗体(BP53-12,武汉博士德生物有限公司),SABC免疫组化试剂盒和DAB显色试剂(武汉博士德生物有限公司)。

1.3 方法

严格按SABC免疫组化试剂盒说明书进行,枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)微波抗原修复(STK15先用高火加热10 min后,换中高火加热5 min,最后用中火加热5 min;p53用中高火加热15 min),一抗工作浓度分别为1:250(STK15)及1:150(p53)。每批染色同时设置阳性和阴性对照,STK15阳性对照为乳腺浸润性导管癌标本,PBS代替一抗为阴性对照。免疫组化结果经重复染色进行一次印证。2位独立观察者分别观察计数并取均值,所有染色结果的观察计数均在观察者对切片临床病理资料双盲的情况下进行。

1.4 结果判定

STK15染色定位于细胞质,P53染色定位于细胞核。2种蛋白阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色颗粒。每张切片随机选择5个高倍视野($\times 400$),至少计数500个肿瘤细胞,计算视野内阳性细胞占所计数细胞的百分比。参照文献^[5]及结合本实验结果制定判断标准,按着色细胞百分数计分:不染色0分,<20%为1分,20%~50%为2分,>50%为3分。

按着色强度计分:无着色为0分,淡黄色颗粒为1分,棕黄色颗粒为2分,棕褐色颗粒为3分,将两者计分相乘,总计分0分为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~6分为阳性(++),9分为强阳性(+++)。将弱阳性、阳性、强阳性都归为阳性。

1.5 统计学分析

采用SPSS 12.0统计软件进行分析,率的比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率计算法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STK15表达情况

8例正常口腔黏膜中未见STK15阳性染色(图1),从轻度上皮异常增生开始出现STK15阳性表达,阳性细胞主要分布于基底细胞层、棘细胞深层(图2),随着异常增生程度的增加,阳性细胞可位于上皮全层。高分化鳞癌中阳性染色主要位于癌巢的细胞中(图3),低分化鳞癌中阳性细胞则大量散在分布(图4)。STK15在上皮异常增生和口腔鳞癌中的阳性率分别为40.74%(11/27)、67.44%(29/43),差异有统计学意义($\chi^2=4.828$, $P=0.028$)。

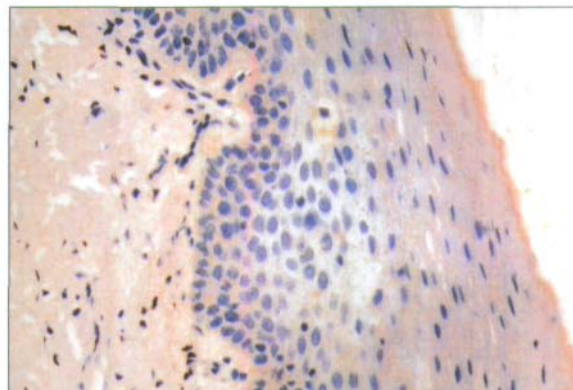


图1 STK15在正常口腔黏膜中阴性表达 SABC $\times 400$
Fig 1 Negative expression of STK15 in oral normal mucosa SABC $\times 400$

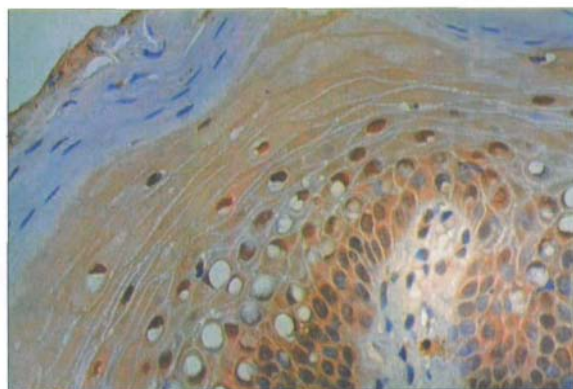


图2 STK15在上皮异常增生组织中的阳性表达 SABC $\times 400$
Fig 2 Positive expression of STK15 in epithelial dysplasia SABC $\times 400$

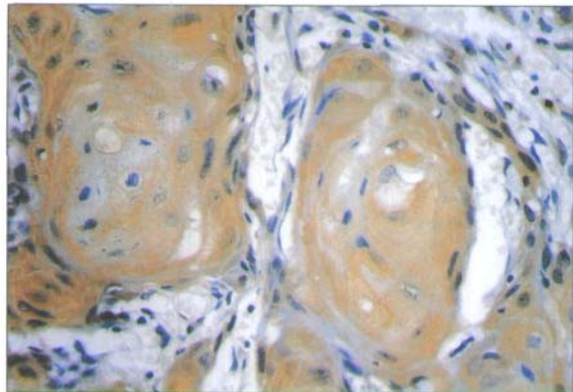


图3 STK15在高分化鳞癌中的阳性表达 SABC ×400
Fig 3 Positive expression of STK15 in well differentiated OSCC SABC ×400

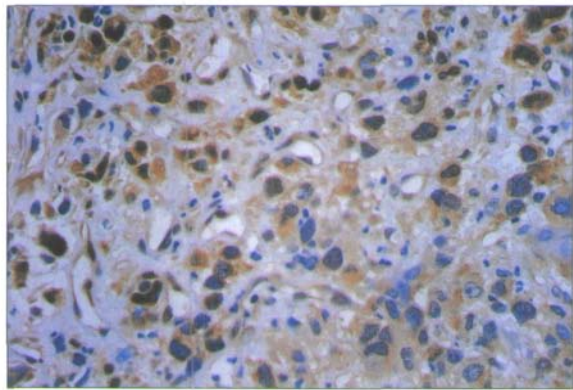


图4 STK15在低分化鳞癌中的阳性表达 SABC ×400
Fig 4 Positive expression of STK15 in poorly differentiated OSCC SABC ×400

2.2 STK15与P53表达相关性

8例正常口腔黏膜中未见P53阳性染色(图5),但在上皮异常增生和口腔鳞癌中P53阳性率分别为37.04%(10/27,图6)及48.84%(21/43,图7)。STK15阳性率在口腔鳞癌P53阳性组(85.71%,18/21)高于P53阴性组(50%,11/22),差异有统计学意义($\chi^2=6.241$, $P=0.012$)。STK15和P53同时阳性率在口腔鳞癌组(41.86%,18/43)高于上皮异常增生组(18.52%,5/27)及正常组(0/8),各组间比较差异有统计学意义($\chi^2=11.211$, $P=0.004$)。

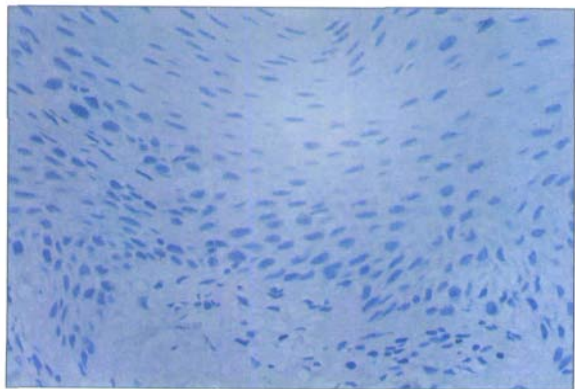


图5 P53在正常口腔黏膜中阴性表达 SABC ×400
Fig 5 Negative expression of P53 in oral normal mucosa SABC ×400

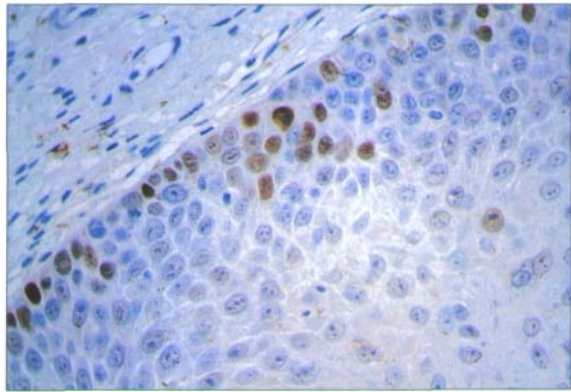


图6 P53在上皮异常增生组织中的阳性表达 SABC ×400
Fig 6 Positive expression of P53 in epithelial dysplasia SABC ×400

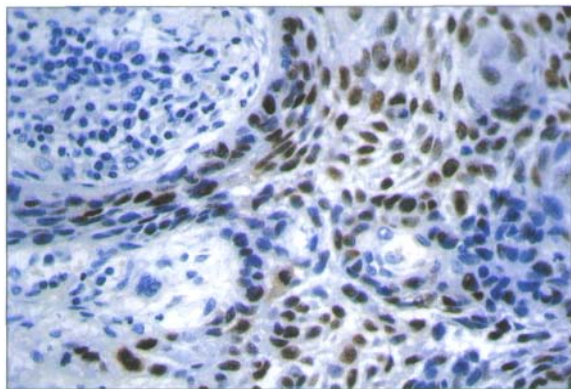


图7 P53在高分化鳞癌中的阳性表达 SABC ×400
Fig 7 Positive expression of P53 in well differentiated OSCC SABC ×400

2.3 STK15表达与口腔鳞癌临床病理学参数的关系

STK15阳性率在OSCC有淋巴结转移组(78.57%,22/28)高于无淋巴结转移组(46.67%,7/15),差异有统计学意义($\chi^2=4.528$, $P=0.033$),但STK15阳性率在OSCC不同分化及不同临床分期之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

STK15基因(丝氨酸/苏氨酸激酶15基因,又称BTAK或Aurora2基因)编码一种相对分子质量为 4.6×10^4 、403个氨基酸组成的蛋白质,其N末端含有3个Aurora box,它们可能参与激酶与其他蛋白质的相互作用^[6]。近年来研究表明,STK15的过表达可导致细胞中心体异常,非整倍体形成,染色体不稳定以及细胞转化^[2],提示STK15基因具备较明显的癌基因特点。迄今为止,STK15的扩增和过表达已在人类多种类型的肿瘤中被检测到^[3-4],但在口腔黏膜癌变过程中的表达情况仍少见报道。本研究中,STK15在正常口腔黏膜上皮无表达,在40.74%的上皮异常增生及67.44%的口腔鳞癌中出现STK15蛋白阳性表达。STK15蛋白的异常表达出现在肿瘤发生

过程中形态学变化的早期阶段,即轻度上皮异常增生组织,提示STK15的表达增高是口腔黏膜癌变过程中的早期事件,可以作为早期发现癌变的分子生物学标志之一;STK15的阳性表达率在口腔鳞癌组高于上皮异常增生组,提示在口腔黏膜癌变过程中存在STK15表达量上的累积,STK15的表达增高不仅可能在口腔鳞癌发生早期有作用,而且可能与口腔癌发生进程有关;STK15的阳性表达率从正常口腔黏膜经上皮异常增生到口腔鳞癌逐渐上调,提示STK15的蛋白表达增高可能与组织恶性度呈正相关。

p53是人类肿瘤中最普遍突变的抑癌基因,p53的突变失活能在一轮细胞周期中触发多轮中心体复制^[7],目前推测可能是通过p53转激活-依赖性和转激活-非依赖性机制完成^[3],前者通过cyclinE/cdk2复合体使中心体复制失控,后者通过影响中心体上的激酶STK15/BTAK而完成;Chen等^[8]的研究证实,野生型P53蛋白能特异地与STK15的Aurora-A盒相互作用,进而以转激活-非依赖性的方式抑制STK15的癌基因活性,即阻断STK15介导的中心体扩增和细胞恶性转化。另外野生型p53能使STK15激酶活性减弱,而STK15的激酶活性被认为是其发挥癌基因作用必不可少的,这也可能是p53抑制STK15癌基因活性的一种解释^[8]。而突变型p53不能与STK15的Aurora-A盒相互作用,故不能抑制STK15介导的中心体扩增和细胞转化,也不能使STK15激酶活性减弱,最终导致肿瘤的发生,提示STK15与p53之间存在密切功能上的联系。本研究中,口腔鳞癌中STK15阳性率在P53阳性组(突变型)高于P53阴性组(野生型),提示口腔鳞癌STK15过表达与p53突变之间可能存在部分机制上的联系,推测是由于口腔鳞癌中突变型P53蛋白不能与STK15的Aurora-A盒结合,丧失了对STK15表达的负调节功能,从而使STK15表达量上升;另一方面,STK15和P53同时阳性表达率从正常口腔黏膜经上皮异常增生到口腔鳞癌逐渐上调,也提示从正常到上皮异常增生最终演变成鳞癌可能有二者协同参与,推测p53突变一方面使STK15表达量上升,另一方面由于突变型P53蛋白不能抑制STK15激酶活性及STK15介导的中心体扩增和细胞转化,从而诱导中心体复制异常,导致基因组不稳定和肿瘤的发生。本研究结果提示P53/STK15的转激活-非依赖性通路可能在口腔鳞癌发生中起一定作用。

本研究结果表明,STK15阳性表达与口腔鳞癌组织分化、临床分期无显著相关性,但与淋巴结转移有关。Tanaka等^[9]对食管癌的研究发现,STK15表达水平与肿瘤的淋巴结转移相关,与肿瘤分期无关,与本研究的结论一致。而Li等^[10]对胰腺癌的研究

结果表明,STK15的表达与肿瘤的组织分化、淋巴结转移无关,与本研究的结果有差异,分析可能与肿瘤部位不同有一定关系。

综上所述,P53/STK15的转激活-非依赖性途径可能参与了口腔鳞癌的发生发展进程,口腔黏膜癌变过程中STK15过表达可能在口腔鳞癌的发生发展中起一定作用,但STK15蛋白过表达与口腔黏膜癌变过程中常见的中心体异常^[1]及染色体不稳定^[2]之间是否存在关联仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 蔡扬,李秉琦,陈谦明. 口腔黏膜癌变过程中中心体的扩增及其意义[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(3): 238-241.
CAI Yang, LI Bing-qi, CHEN Qian-ming. Centrosome hyperamplification oral precancerous lesions and squamous cell carcinomas[J]. West China J Stomatol, 2004, 22(3): 238-241.
- [2] 杨宏,蔡扬,于燕妮,等. 口腔鳞状细胞癌中心体异常与染色体不稳定相关性研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2008, 43(2): 118-120.
YANG Hong, CAI Yang, YU Yan-ni, et al. Centrosome amplification and chromosome instability in oral squamous cell carcinomas[J]. Chin J Stomatol, 2008, 43(2): 118-120.
- [3] Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation[J]. Nat Genet, 1998, 20(2): 189-193.
- [4] 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.
- [5] 于关贞,朱明华,倪灿荣,等. 胰腺癌p53上下游基因mdm2, p21^{WAF/CIP1}以及p14^{ARF}蛋白的表达及相互关系[J]. 中华病理学杂志, 2004, 33(2): 130-134.
YU Guan-zhen, ZHU Ming-hua, NI Can-rong, et al. Expression of proteins in p53(p14^{ARF}-mdm2-p53-p21^{WAF/CIP1}) pathway and their significance in exocrine pancreatic carcinoma[J]. Chin J Pathol, 2004, 33(2): 130-134.
- [6] Andrews PD. Aurora kinases: Shining lights on the therapeutic horizon[J]. Oncogene, 2005, 24(32): 5005-5015.
- [7] Carroll PE, Okuda M, Horn HF, et al. Centrosome hyperamplification in human cancer: Chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression[J]. Oncogene, 1999, 18(11): 1935-1944.
- [8] Chen SS, Chang PC, Cheng YW, et al. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function[J]. EMBO J, 2002, 21(17): 4491-4499.
- [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] Li D, Zhu J, Firozi PF, et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora-A kinase in human pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(3): 991-997.

(本文编辑 汤亚玲)