

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.05.11

❖ 论著 ❖

KLF6、GPCR124 在舌状鳞癌的表达及其与临床病理特征和预后的相关性

徐志健, 杨晓倩, 吕建建

(青岛市市立医院肿瘤科, 山东 青岛 266011)

【摘要】目的: 探讨舌状鳞癌组织中 Krüxxppel 样转录因子 (KLF6) 和 G-蛋白偶联受体 124 (GPCR124) 表达水平及其与临床病理特征和预后的相关性。**方法:** 64 例手术治疗的舌状鳞癌患者, 术前收集患者血液样本并于术中获取舌状鳞癌组织样本, 采用免疫组织化学方法检测 KLF6 和 GPCR124 的表达水平。对所有患者性别、年龄、临床分期、组织分化程度、预后评分、KLF6 和 GPCR124 蛋白表达情况及其预后情况进行记录, 并比较 KLF6 和 GPCR124 不同表达患者间上述资料间的差异。患者出院后均随访 5 年。**结果:** KLF6 和 GPCR124 蛋白在舌状鳞癌组织中分别呈低表达和高表达, 即舌状鳞癌组织中 KLF6 蛋白阳性率表达低于正常组织, 而 GPCR124 蛋白高于正常组织 ($P < 0.05$)。年龄、性别与舌状鳞癌患者 KLF6 和 GPCR124 蛋白表达无关 ($P > 0.05$); 但临床分期和组织分化程度与舌状鳞癌患者 KLF6 和 GPCR124 蛋白表达有关 ($P < 0.05$)。GPCR124 蛋白高表达和 KLF6 蛋白低表达的患者 5 年总生存率均分别低于其低表达和高表达患者 ($\chi^2 = 4.232, P = 0.014; \chi^2 = 9.218, P = 0.002$)。分析得出不同临床分期、组织分化程度、预后评分、KLF6 和 GPCR124 蛋白表达舌状鳞癌患者的 5 年生存率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 舌状鳞癌患者预后的独立危险因素为临床 III ~ IV 期、低分化组织、预后评分超过 7 分及 KLF6 蛋白低表达和 GPCR124 高表达 ($P < 0.05$)。**结论:** GPCR124 高表达和 KLF6 低表达与患者的肿瘤临床病理特征及预后有关, 呈高表达状态的 KLF6 和低表达状态的 GPCR124 联合预后评分超过 7 分、临床 III ~ IV 期和低分化组织影响舌状鳞癌患者预后, GPCR124 与 KLF6 蛋白有可能作为理想的舌状鳞癌的预后标志物。

【关键词】 KLF6; GPCR124; 舌状鳞癌; 临床病理; 预后

【中图分类号】 R739.8 **【文献标志码】** A

Expression levels of KLF6 and GPCR124 in tissues of ligulate squamous cell carcinoma, and the correlation with clinicopathological characteristics and prognosis

XU Zhi-jian, YANG Xiao-qian, LV Jian-jian

(Department of Oncology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong, China)

【Abstract】Objective: To investigate the expression levels of Krüxxppel-like factor 6 (KLF6) and G pro-tein-coupled receptor 124 (GPCR124) in tissues of ligulate squamous cell carcinoma, and to investigate the correlation with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods:** 64 patients with ligulate squamous cell carcinoma were selected. Blood samples of patients were collected before surgery and tissue samples of ligulate squamous cell carcinoma were obtained during the operation. The expression levels of KLF6 and GPCR124 were detected by immunohistochemistry. All patients' gender, age, clinical stage, degree of tissue differentiation, prognostic score, KLF6 and GPCR124 protein expression and their prognosis were recorded, and the differences in the above data among patients with different expressions of KLF6 and GPCR124 were compared. All patients were followed up for 5 years after treatment. **Results:** The expression of KLF6 and GPCR124 proteins in ligulate squamous cell carcinoma tissues was low and high, respectively. That is, the expression of KLF6 protein in ligulate squamous cell carcinoma tissues was significantly lower than that in normal tissues, while GPCR124 protein was significantly higher than that in normal tissues ($P < 0.05$). The age and gender were not related to KLF6 and GPCR124 protein expressions in patients with ligulate squamous cell carcinoma ($P > 0.05$). However, the clinical stage and the degree of tissue differentiation were related to the expressions of KLF6 and GPCR124 proteins in patients with ligulate squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). The 5-year overall survival rates of patients with high expression of GPCR124 protein and low expression of KLF6 protein

基金项目: 山东省卫计委科研课题 (18J200213)

作者简介: 徐志健 (1987 -), 男, 硕士, 住院医师。E-mail: xu20191119@163.com

通讯作者: 吕建建。E-mail: lvjian_0605@126.com

were significantly lower than those with low expression and high expression, respectively ($\chi^2 = 4.232, P = 0.014$ vs. $\chi^2 = 9.218, P = 0.002$). Analysis showed that there were differences in 5-year survival rates in patients with different clinical stages, the degree of tissue differentiation, prognostic scores, and KLF6 and GPCR124 protein expressions in ligulate squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). The independent risk factors affecting the prognosis of patients with ligulate squamous cell carcinoma were clinical stages III to IV, poorly differentiated tissues, prognostic scores > 7 points, low expression of KLF6 protein and high expression of GPCR124 ($P < 0.05$). **Conclusion:** The high expression of GPCR124 and the low expression of KLF6 are related to the clinicopathological characteristics and prognosis of patients. The high KLF6 level with low GPCR124 level combined with prognostic score > 7 points, clinical stages III to IV and poorly differentiated tissues affect the prognosis of patients with ligulate squamous cell carcinoma. GPCR124 and KLF6 proteins may be ideal prognostic markers of ligulate squamous cell carcinoma.

【Key words】 KLF6; GPCR124; Ligulate squamous cell carcinoma; Clinicopathology; Prognosis

据研究^[1-2]统计,舌状鳞癌在口腔癌中比较常见,起源于舌复层鳞状上皮,早期颈部淋巴结转移易发生,且具有高转移率的特点。我国女性舌状鳞癌的发病率近年来呈逐渐上升趋势,且越来越年轻化。舌状鳞癌可影响患者语言、吞咽和呼吸功能,有时甚至严重威胁患者的生命安全。目前,早期诊断、评估舌状鳞癌病情进展、及时采取治疗措施是提高该病诊疗率的关键^[3]。研究^[4]发现,恶性肿瘤的发生与细胞分子生物学中的原癌和抑癌基因密切相关。鉴于此,早诊断和早治疗的依据可从分子水平机制研究着手。有研究^[5]表明,突变型 Krüxxppel 样转录因子(Krüxxppel-like factor 6, KLF6)与正常生长发育等密切相关,生成肿瘤血管与 G-蛋白偶联受体 124(G-protein-coupled receptor 124, GPCR124)的表达有关,故认为舌状鳞癌病情进展与 Krüxxppel 样家族和 GPCR124 的异常有着一定的联系。本文旨在探讨舌状鳞癌患者 KLF6 和 GPCR124 蛋白的临床病理特征、表达水平及预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2009 年 8 月至 2016 年 1 月青岛市市立医院接受手术治疗的 64 例舌状鳞癌患者。其中,女性 40 例,男性 24 例;年龄 25 ~ 88 岁,平均(64.06 ± 4.32)岁。根据临床分期标准有 I 期 19 例,II 期 9 例,III 期 12 例和 IV 期 24 例。排除标准:(1)手术禁忌症者;(2)心肝肾肺疾病者;(3)术后随访资料不完整者。术前所有确诊患者未进行放疗和化疗。本研究经医院伦理委员会批准,患者及家属均知情同意。

1.2 样本采集及 KLF6 和 GPCR124 蛋白表达水平检测

选取 64 例舌状鳞癌并行手术治疗患者,观察组收集术中切取的 64 份舌状鳞癌组织,对照组收集 64 份癌旁正常组织。KLF6 和 GPCR124 蛋白水平的检测采用免疫组织化学方法进行。患者出院后均随访 5 年,随访率为 100%。检测 KLF6 和 GPCR124

蛋白^[6]:SP 法,石蜡切片标本厚 2 μm ,烘烤 60 $^{\circ}\text{C}$,脱蜡,浸泡。磷酸盐缓冲液(PBST)冲洗修复抗原切片。滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育,冲洗。一抗(GPCR124 多克隆抗体浓度 1:100)滴加,室温孵育 1 h,冲洗。辣根酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物滴加,室温孵育 30 min。对照组采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗;滴加山羊抗兔二抗,室温孵育 30 min。二氨基联苯胺显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,树胶封片。

1.3 临床病理特征及随访

对所有患者性别、年龄、临床分期、组织分化程度、预后评分、KLF6 和 GPCR124 蛋白表达情况及其预后情况进行记录,比较 KLF6 和 GPCR124 蛋白表达水平在不同患者中的区别。采用双盲法评定 KLF6 和 GPCR124 蛋白:随机选择每张切片 5 个视野,根据染色深浅和视野中阳性细胞比例评分^[7]:0 分为无着色;1 分为浅黄色, $< 25\%$;2 分为棕黄色, $25\% \sim 50\%$;3 分为棕褐色, $> 50\%$ 。免疫反应评分以两者积分相乘:阴性(-)为 0 ~ 1 分,弱阳性(+)为 2 ~ 4 分,中等阳性(++)为 5 ~ 8 分,强阳性(+++)为 9 ~ 12 分。低表达为阴性和弱阳性(-, +),高表达为中等阳性(+)和强阳性(++ , +++)。所有患者治疗结束后均随访 5 年。

1.4 统计学分析

数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)描述,采用 t 检验;计数资料通过率或构成比表示,采用 χ^2 检验;影响舌状鳞癌患者预后的相关因素采用非条件单因素和多因素 logistic 回归模型分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KLF6 和 GPCR124 基因水平在舌状鳞癌组织和癌旁正常组织的比较

KLF6 和 GPCR124 蛋白在舌状鳞癌组织中分别呈低表达和高表达,即舌状鳞癌组织中 KLF6 蛋白阳性率表达低于癌旁正常组织(图 1),而 GPCR124 蛋白高于癌旁正常组织($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 临床病理特征比较

年龄、性别与舌状鳞癌患者其 KLF6 和 GPCR124 蛋白表达无关 ($P > 0.05$), 但临床分期和组织分化程度与舌状鳞癌患者的 KLF6 和 GPCR124 蛋白表达有关 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 64 例舌状鳞癌患者预后情况

随访 5 年, 患者总生存率为 59.38% (38/64)。其中, GPCR124 蛋白高表达和低表达患者的 5 年总生存率分别为 37.50% (6/16) 和 66.67% (32/48), KLF6 蛋白高表达和低表达患者其 5 年总生存率分别为 10.00% (10/10) 和 51.85% (28/54), 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 4.232, P = 0.014; \chi^2 = 9.218, P = 0.002$)。

表 1 KLF6 和 GPCR124 基因水平在舌状鳞癌组织和癌旁正常组织比较

组别	KLF6 蛋白					GPCR124 蛋白				
	-	+	++	+++	高表达率 (%)	-	+	++	+++	高表达率 (%)
对照组 (n=64)	5	9	32	18	78.13	45	10	8	1	14.06
观察组 (n=64)	40	13	9	2	17.19	19	13	30	2	50.00
χ^2 值	-	-	-	-	47.64	-	-	-	-	18.98
P 值	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	-	<0.001

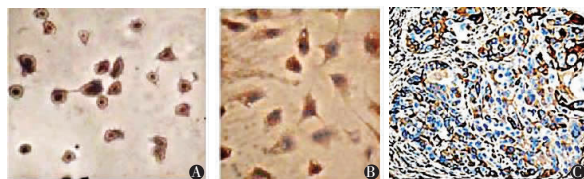


图 1 舌状鳞癌组织中, KLF6 呈强阳性

表 2 临床病理特征比较

临床特征	例数 (n=64)	GPCR124 蛋白		χ^2 值	P 值	KLF6 蛋白		χ^2 值	P 值
		高表达 (n=16)	低表达 (n=48)			高表达 (n=54)	低表达 (n=10)		
年龄 (岁)								2.717	0.099
≥60	28	8	20	0.339	0.561	26	2		
<60	36	8	28			28	8		
性别								1.720	0.190
男	37	9	28	0.021	0.884	33	4	17.322	<0.001
女	27	7	20			20	6		
临床分期									
I ~ II 期	28	12	16	9.722	0.002	38	0		
III ~ IV 期	36	29	7			16	10		
组织分化程度								8.109	0.004
高中分化	38	13	25	18.463	<0.001	28	10		
低分化	26	23	3			26	0		

2.4 单因素分析

不同临床分期、组织分化程度、预后评分、KLF6 和 GPCR124 蛋白表达舌状鳞癌患者 5 年生存率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 单因素分析

临床特征	例数 (n=64)	5 年总生存例数 (n=38)	χ^2 值	P 值
年龄 (岁)			0.498	0.481
≥60	28	18		
<60	36	20		
性别			2.693	0.101
男	22	10		
女	42	28		
临床分期			14.331	<0.001
I 期 ~ II 期	46	34		
III ~ IV 期	18	4		
组织分化程度			3.173	0.075
高中分化	26	12		
低分化	38	26		
预后评分 (分)			5.630	0.018
≥7	28	12		
<7	36	26		
GPCR124 蛋白			4.232	0.014
低表达	16	6		
高表达	48	32		
KLF6 蛋白			9.218	0.002
低表达	54	28		
高表达	10	10		

2.5 多因素分析

舌状鳞癌患者预后的独立危险因素为临床 III ~ IV 期、低分化组织、预后评分超过 7 分以及 KLF6 蛋白低表达和 GPCR124 高表达 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 多因素分析

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	P 值	RR (95% CI)
临床分期 (参照组 = I ~ II 期)	0.658	0.308	6.494	0.011	1.93 (1.06 ~ 3.53)
组织分化程度 (参照组 = 中高分化)	0.724	0.248	6.970	0.008	2.06 (1.15 ~ 3.69)
预后评分 (参照组 < 7 分)	0.618	0.284	4.444	0.035	1.86 (1.06 ~ 3.24)
GPCR124 蛋白 (参照组 = 低表达)	0.602	0.264	7.367	0.007	1.83 (1.09 ~ 3.06)
KLF6 蛋白 (参照组 = 低高表达)	0.562	0.248	5.742	0.017	1.75 (1.08 ~ 2.85)

3 讨论

作为颌面部最常见的恶性肿瘤, 舌状鳞癌在全世界全身恶性肿瘤中位居第六, 尤以东南亚最多见, 而我国舌状鳞癌占据重要比例, 约为 46% [8]。该病具有极高的恶性程度, 早期即可发生淋巴结转移, 虽手术治疗疗效显著, 但预后较差, 肿瘤复发和转移使患者的 5 年生存率仅为 50% 左右。目前尚不清楚该病发展和转移机制, 临床上缺乏相应有效的分子标志物。

浸润转移为恶性肿瘤的重要生物学特征,呈阶梯式过程。随生物学研究的深入,研究者发现肿瘤如舌状鳞癌的病理特征随基因蛋白改变而改变,与舌状鳞癌预后关联性大。本研究结果显示,舌状鳞癌组织中 KLF6 蛋白阳性率表达低于癌旁正常组织,而 GPCR124 蛋白比癌旁正常组织高,且 GPCR124 和 KLF6 蛋白的高表达率和低表达与舌状鳞癌组织分化程度和临床分期呈正相关关系。由此可知,舌状鳞癌患者疾病的发展与 GPCR124 和 KLF6 表达水平联系密切。恶性肿瘤中,KLF6 基因表达意义重大。基因形态学的学者^[9]得出,KLF6 基因蛋白在结直肠癌病例中存在大量缺失,且缺失率与肿瘤大小有着密不可分的关系。也有学者^[10]经免疫组化技术研究肝癌中 KLF6 基因蛋白的表达发现,肝癌组织中的 KLF6 基因蛋白表达较癌旁正常组织高,且随着恶性肿瘤分化程度的增高,其表达相应增加,与本研究结论一致。细胞外信号分子为传递基因蛋白的重要物质,GPCR124 蛋白通过识别多种以上物质,使体内 G 蛋白激活,GTP 变成 GDP,G 蛋白解离,效应分子发挥作用,体内不良反应发生,引发肿瘤的出现。以往研究^[11]发现,GPCR124 过高表达介导血管壁增厚、血管紊乱和血管扩张过度,可造成血管瘤样变。经动物学研究证实,肿瘤形成确与 GPCR124 表达有关,其中细胞内渗透和迁移以及形成小管为重要的发生机制。此外,研究还发现 GPCR124 蛋白 sTEM 对血管芽发育和内皮细胞生长具有重要的促进作用,而血管内皮因子与恶性肿瘤血管生成紧密联系。由此可知,GPCR124 蛋白水平与舌状鳞癌相关,与本研究结论一致。

本研究结果显示,临床Ⅲ~Ⅳ期、低分化组织、预后评分超过7分以及低表达 KLF6 蛋白和高表达 GPCR124 均为影响舌状鳞癌患者预后的独立危险因素。考虑原因为随着肿瘤临床分期的增高,患者的病情程度越重,进展越危险,进而预后效果更差。而随着组织分化程度的降低,患者体内细胞繁殖能力增强,病情恶化程度增加,患者预后效果越差。预后评分也影响患者预后效果,一定程度上预后评分越高,表明患者病情越危重,生存率较低,预后越差。

综上所述,GPCR124 高表达和 KLF6 低表达与患者的肿瘤临床病理特征及预后有关,呈高表达状态的 KLF6 和低表达状态的 GPCR124 联合预后评分超过7分临、床Ⅲ~Ⅳ期和低分化组织影响舌状鳞癌患者预后,GPCR124 与 KLF6 蛋白有可能作为理想的舌状鳞癌的预后标志物。

参考文献

- [1] 胡慧君,李中武,王琼,等. SUZ12 在舌鳞癌中的表达及临床意义[J]. 口腔医学,2018,38(6):499-502,513.
- [2] 王立山,周福亭,韩成冰,等. 早期舌鳞状细胞癌颈淋巴结转移规律、手术方式选择及预后相关因素分析[J]. 中华口腔医学杂志,2018,53(2):73-78.
- [3] 郝瑞,梁艳. 口腔舌鳞状细胞癌患者血清多配体聚糖-1 表达水平及临床意义[J]. 国际肿瘤学杂志,2018,45(4):193-196.
- [4] 方政,陈帅,赵军方,等. 人滋养层细胞表面抗原 2 基因表达对舌鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J]. 中华口腔医学杂志,2018,53(9):640-644.
- [5] 马征,焦光美,单海雷,等. KLF6 基因对 THP-1 细胞诱导分化的巨噬细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(10):1776-1781.
- [6] 徐克,陈庆文,卫颖泽,等. G-蛋白偶联受体 124 与舌鳞癌的相关性研究[J]. 东南大学学报(医学版),2019,38(3):445-450.
- [7] Vallon M, Rohde F, Janssek K, et al. Tumor endothelial marker 5 expression in endothelial cells during capillary morphogenesis is induced by the small GTPase Rac and mediates contact inhibition of cell proliferation[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(3):412-421.
- [8] Lydiatt WM, Patel SG, Osuiivan B, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(2):122-137.
- [9] Parviz K, Mohammad HF, Fariba M, et al. Autologous T cells expressing the oncogenic transcription factor KLF6-SV1 prevent apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells[J]. Plos One, 2018, 13(2):e0192839.
- [10] 邹勇,余昌文. 肿瘤组织和血浆 miR-146a 表达水平与肝内胆管癌患者临床病理特征及预后相关性分析[J]. 河北医学, 2018, 24(3):357-362.
- [11] Matos LL, Dedivitis RA, Kulcsar MAV, et al. External validation of the AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition, in an independent cohort of oral cancer patients[J]. Oral Oncology, 2017, 71:47-53.

(收稿日期:2020-04-12)

学术编辑:杜小波)