

# 口腔鳞状细胞癌中CDK6、E2F-1的表达及临床意义

王 瑞<sup>1</sup>,周兴安<sup>1</sup>,达林泰<sup>2\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学附属医院 口腔科, 内蒙古 呼和浩特 010050;

2. 呼和浩特市口腔医院, 内蒙古 呼和浩特 010020)

**【摘要】目的** 解析口腔鳞状细胞癌中CDK6、E2F-1表达与临床病理参数之间的关系,探讨其临床意义。**方法** 应用免疫组化法检测60例口腔鳞状细胞癌组织中CDK6、E2F-1的表达情况,用 $\chi^2$ 检验分析二者与口腔鳞癌患者临床资料的关联,用Spearman秩相关分析二者表达的相关性。**结果** (1)CDK6在高分化组和中低分化组阳性表达率差异无统计学意义( $P>0.05$ );在临床分期Ⅲ+Ⅳ期组的阳性表达率显著高于Ⅰ+Ⅱ期组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );淋巴结转移阳性组的表达率显著高于淋巴结转移阴性组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。E2F-1的阳性表达在高分化组、中低分化组、临床分期Ⅰ+Ⅱ期组、Ⅲ+Ⅳ期组、淋巴结转移阳性组和阴性组间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。(2)通过Spearman秩相关分析得出CDK6与E2F-1在口腔鳞状细胞癌中的表达无显著相关性( $r_s=0.014$ ,  $P>0.05$ )。**结论** 口腔鳞状细胞癌中CDK6的表达与淋巴结转移及临床分期有关,提示其参与口腔鳞癌的进展,为早期判定淋巴结转移情况及基因靶向治疗的进一步研究提供了新的思路。E2F-1的表达与口腔癌的临床病理参数无显著关联。文献报道中CDK6与E2F-1在RB细胞通路上下游均发挥重要作用,但是在本研究中并未发现二者的显著相关性。

**【关键词】** 口腔鳞状细胞癌;CDK6;E2F-1;淋巴结转移

中图分类号: R765

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2023)03-0270-04

口腔鳞状上皮细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)占比口腔颌面部恶性肿瘤的80%以上,占比口腔恶性肿瘤的90%以上,除了原发于口腔外,也包括由其他组织转移而来和由邻近组织原发灶直接侵袭口腔区域所致的病灶<sup>[1]</sup>,其恶性程度高、局部浸润性强并且淋巴结转移发生较早<sup>[2]</sup>。虽然近年来国内外学者对其发病机制有了一定的研究,在治疗方法上也有了部分改进,但患者的5年生存率仍然维持在50%左右的较低水平<sup>[3]</sup>。治疗方面,中晚期患者术后因严重的面部畸形及功能缺陷导致其生活质量降低,再加上逐年上升的发病率,针对口腔癌的早期诊断和有效治疗有着重大意义。

细胞周期是细胞生命活动的基本过程。细胞周期调控异常,细胞无限分裂、凋亡受阻可导致肿瘤形成<sup>[4]</sup>。近年来,人体肿瘤分子生物学领域有了重大突破,细胞周期调控的多条信号通路被发现,其分子机制逐渐被解析。已知RB通路在细胞周期G1→S期发挥了重要作用<sup>[5]</sup>。本研究中的细胞周期蛋白依赖性激酶6(CDK6)和核转录调节因子

E2F-1均是Rb通路中的组成因子。我们将通过检测OSCC中二者的表达情况,探讨其在口腔鳞状细胞癌中的临床意义,为口腔癌的预防、诊断和治疗提供相关依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集

选取2013年6月至2019年3月在内蒙古医科大学附属医院口腔颌面外科手术治疗的口腔鳞状细胞癌患者60例。纳入标准:全部病例均为首次手术治疗,术前无放疗和化疗史,经临床病理验证已明确诊断,且有完整的病历资料。

详细资料如表1所示,病例中男性41例,女性19例;年龄范围为24~78岁,平均年龄59岁,其中 $\geq 59$ 岁有34例、 $< 59$ 岁有26例;WHO分化度分类:高分化42例,中度分化15例,低分化3例;淋巴结转移阳性23例,淋巴结转移阴性37例;Ⅰ期24例,Ⅱ期15例,Ⅲ期12例,Ⅳ期9例;发生部位分类:舌癌24

收稿日期:2022-11-27;修回日期:2023-05-04

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2019LH08016);内蒙古医科大学附属医院一般科研项目(NYFY YB048)

第一作者:王瑞(1988—),女,硕士,主治医师。研究方向:口腔颌面部肿瘤及牙槽外科。E-mail:jyiguangpan@126.com

\*通信作者:达林泰,男,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师。研究方向:口腔颌面部肿瘤及外伤。E-mail:qishi6658@hotmail.com

例,唇癌16例,牙龈癌13例,颊癌4例,口底癌2例,颊部癌1例。WHO病理组织学分类,组织病理学TNM分类以及临床分期均按照国际抗癌联盟(UICC)标准进行。

### 1.2 免疫组化-SP法

组织标本经甲醛固定、包埋切片、脱蜡脱水后,免疫组化法染色。设定阳性对照组为阳性表达组织切片,设定磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。其余操作按照试剂说明进行,PBS液冲洗,EDTA抗原修复,30%双氧水在室温下孵育15 min,PBS液洗片,滴加CDK6(工作浓度1:100)和E2F-1(工作浓度1:50)抗体,对照组滴加PBS液,37℃恒温箱孵育2 h。PBS液洗片后,滴加第二抗体,室温下孵育30 min。再次进行冲洗,滴加DAB显色剂进行显色,冲洗后苏木素复染(因E2F-1染色为核着色,所以不必复染),流水冲洗返蓝,再次脱水后树脂封片,显微镜下观察并分析结果。

## 2 结果判定

在OSCC组织中,CDK6主要表达在细胞质内(偶见细胞核着色),胞浆呈黄色或棕黄色(见图1);E2F-1可同时表达于细胞核和细胞质内,镜下见细胞质呈黄染,细胞核呈棕黄色深染(见图1)。低倍镜下找到癌组织,高倍镜(400×)下选取5个清晰而典型的视野,计数阳性细胞个数在癌细胞总数中所占的比例,取5个视野的细胞比例平均值作为本片的表达比率,以全部组织标本的表达比率平均值作为分界值,个例的表达比率大于或等于分界值判定为阳性表达,小于分界值判定为阴性表达。

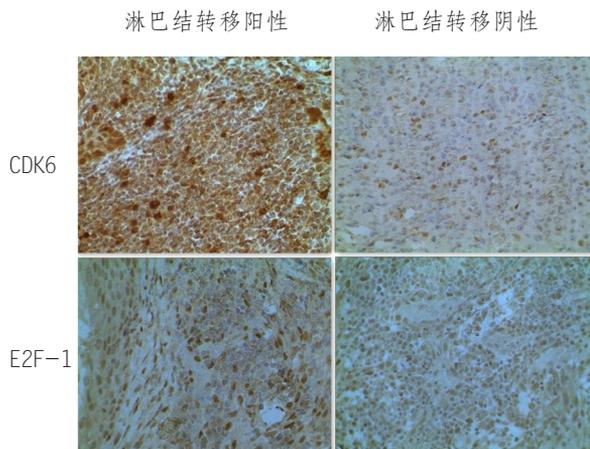


图1 CDK6和E2F-1在有淋巴结转移和无淋巴结转移的高分化口腔鳞状细胞癌组织中的SP染色(×400)

## 3 统计学方法

应用SPSS 20.0统计学软件分析,CDK6、E2F-1与临床分期、病理分型等的关联采用 $\chi^2$ 检验,用Spearman秩相关分析研究二者间有无关联,检验标准为 $\alpha=0.05$ ,当 $P<0.05$ 时差异有统计学意义。

## 4 结果

### 4.1 CDK6、E2F-1在OSCC中的表达与患者临床资料的关系

分析60例OSCC组织中CDK6、E2F-1的表达情况与患者临床资料的相关性发现,CDK6阳性表达率为45%;E2F-1阳性表达率为40%。分别以性别、年龄(平均年龄59岁)、病理学肿瘤分化程度、恶性肿瘤分期以及淋巴结转移情况进行分组。CDK6在高分化组和中低分化组阳性表达率差异无统计学意义( $P>0.05$ );在临床分期Ⅲ+Ⅳ期组的阳性表达率显著高于Ⅰ+Ⅱ期组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );淋巴结转移阳性组的表达率显著高于淋巴结转移阴性组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。E2F-1的阳性表达在高分化组、中低分化组、临床分期Ⅰ+Ⅱ期组、Ⅲ+Ⅳ期组、淋巴结转移阳性组和阴性组间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )(见表1、表2)。

表1 口腔鳞状细胞癌中CDK6的表达及其与患者临床资料的关系

组别	例数	CDK6		
		阳性率(%)	$\chi^2$	P
性别	女	19	10(52.63)	0.241 0.623
	男	41	17(41.46)	
年龄	≥59岁	34	12(35.29)	1.116 0.291
	<59岁	26	15(57.69)	
临床分期	Ⅰ+Ⅱ	39	10(25.64)	5.919 0.015
	Ⅲ+Ⅳ	21	17(80.95)	
分化度	高分化	42	18(42.86)	0.097 0.756
	中—低分化	18	9(50.00)	
淋巴结转移	阳性	23	17(73.91)	4.548 0.033
	阴性	37	10(27.03)	

表2 口腔鳞状细胞癌中E2F-1的表达及其与患者临床资料的关系

组别	例数	E2F-1		
		阳性率(%)	$\chi^2$	P
性别	女	19	8(42.11)	0.022 0.883
	男	41	16(39.02)	
年龄	≥59岁	34	13(38.24)	0.043 0.835
	<59岁	26	11(42.31)	
临床分期	Ⅰ+Ⅱ	39	19(48.72)	1.610 0.205
	Ⅲ+Ⅳ	21	5(23.81)	
分化度	高分化	42	18(42.86)	0.210 0.647
	中—低分化	18	6(33.33)	
淋巴结转移	阳性	23	5(21.74)	2.363 0.124
	阴性	37	19(51.35)	

#### 4.2 口腔鳞状细胞癌中 CDK6 与 E2F-1 表达的相关性

60 例 OSCC 组织中,CDK6 和 E2F-1 表达均为阳性的有 11 例,CDK6 与 E2F-1 均为阴性表达的有 20 例,CDK6 阳性表达而 E2F-1 阴性表达的有 16 例,CDK6 表达为阴性表达而 E2F-1 为阳性表达的有 13 例, Spearman 秩相关分析显示 OSCC 中 CDK6 与 E2F-1 间表达无显著相关性( $r_s=0.014, P>0.05$ )(见表 3)。

表 3 CDK6 与 E2F-1 表达的相关性

		E2F-1		$r_s$	$P$
		阳性	阴性		
CDK6	阳性	11	16	0.014	0.917
	阴性	13	20		

#### 5 讨论

口腔鳞状细胞癌是人体常见的恶性肿瘤,其发病涉及体内一系列遗传物质的改变,主要包括原癌基因的激活、抑癌基因的失活及各种功能性蛋白产物的异常表达等<sup>[6]</sup>,反映到细胞层面,就表现为细胞周期调控的异常<sup>[7]</sup>。RB 信号通路是细胞周期调控的经典途径,CDK6 是其重要组成部分。它在 G1 期与 Cyclin D 结合形成复合物,参与 pRb 磷酸化,从而解除 pRb 对转录调节因子 E2F-1 的抑制效应<sup>[8,9]</sup>,启动 DNA 复制,使细胞周期向前推进。研究报道显示,CDK6 在胃癌、卵巢癌、淋巴瘤等恶性肿瘤中均有异常表达,与多种肿瘤的发生及进展存在密切联系<sup>[10,11]</sup>。在临床治疗方面,CDKs 抑制剂 Palbociclib 或 Ribociclib 与来曲唑联用治疗乳腺癌已被批准为一线治疗方案<sup>[12,13]</sup>;Ribociclib 针对部分肝癌细胞系发挥了良好的抗肿瘤活性<sup>[14]</sup>,它可增强肝癌细胞的辐射敏感性,作为放疗化疗的辅助用药<sup>[15]</sup>,也可通过独立于 CDK4/6 的 PP5/AMPK 轴对肝癌发挥抗肿瘤活性<sup>[16]</sup>。

本研究中,CDK6 在淋巴结转移阳性组的表达率显著增加。这提示我们若将 CDK6 作为 OSCC 淋巴结转移的检测指标之一,可能在疾病病程的判断及治疗等方面有一定的指导意义。临床上已有将 CDKs 抑制剂用于恶性肿瘤治疗的先例,并取得了一定的效果,结合此研究结果,未来或可将 CDK6 作为 OSCC 化疗的新思路及基因治疗的研究目标。

E2F-1 是转录调节因子家族中目前研究较多的一员。它是细胞周期 pRb 通路中的重要调控因

子<sup>[17]</sup>,其转录调节功能除了受 pRb 通路影响外,还受到 p53 依赖的负反馈环<sup>[18]</sup>和 mir-RNAs 信号<sup>[19]</sup>的调控。它具有一定的诱导细胞凋亡的功能,且可发挥促癌和抑癌两种活性。已有研究证实,E2F-1 在肺癌、肝癌、胰腺癌等恶性肿瘤中均有异常表达<sup>[20,21]</sup>;在结肠癌、恶性黑色素瘤中表达显著上调,并与肿瘤分级、分期及远处转移等呈正相关关系<sup>[22]</sup>。

在本研究中,60 例口腔鳞状细胞癌中 E2F-1 的总阳性率为 40%(24/60),而其表达在肿瘤分化度、临床分期及淋巴结转移等方面的分组间差异无统计学意义。分析其可能原因如下:(1)E2F-1 在人体恶性肿瘤中同时发挥促癌和抑癌作用,在口腔鳞状细胞癌中未能发现 E2F-1 表达与临床病理参数之间的相关性,在今后 OSCC 机制研究中应进一步关注 E2F-1。(2)由于本研究样本含量小或者实验所纳入的 OSCC 病例分布不均匀,影响了实验结果。(3)RB 信号通路中尚存在一些影响 E2F-1 表达的其他因子,有待于学者们进一步研究。

#### 参考文献

- [1]Sasahira T, Kurihara SM, Shimojokoku Y, et al. Searching for new molecular targets for oral squamous cell carcinoma with a view to clinical implementation of precision medicine[J]. J Pers Med, 2022, 12(3):413
- [2]McDermott JD, Bowles DW. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinomas: impact on staging and prevention strategies[J]. Curr Treat Options Oncol, 2019, 20(5):43
- [3]Ford PJ, Rich AM. Tobacco use and oral health[J]. Addiction, 2021, 116(12):3531-3540
- [4]武强, 窦长武, 张占普. 转录因子 FoxM1 调控恶性肿瘤病理发展研究论述[J]. 内蒙古医科大学学报, 2022, 44(3):321-324
- [5]Lafitte M, Sirvent A, Roche S. Collagen kinase receptors as potential therapeutic targets in metastatic colon cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10:125
- [6]Matthews HK, Bertoli C, Bruin RAM. Cell cycle control in cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(1):74-78
- [7]郑启炜, 塔拉, 白瑞霞. miR-365 对胃癌 SGC-7901 细胞的作用及其机制[J]. 内蒙古医科大学学报, 2021, 43(1):59-61
- [8]Sun F, Li N, Tong X, et al. Ara-c induces cell cycle G1/S arrest by inducing upregulation of the INK4 family gene or directly inhibiting the formation of the cell cycle-dependent complex CDK4/cyclinD1[J]. Cell Cycle, 2019, 18(18):2293-2306
- [9]董一楠, 张新伟, 魏枫. CDK6 导致肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(19):973-977
- [10]刘玉海, 刘明明, 刘新华, 等. miR-637 调控 CDK6/cyclinD1/Rb 信号通路对人胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(11):1672-1677

- [11]凌晨,刘蜀,王勇,等.CDK6在早期卵巢癌中表达及临床意义[J].南方医科大学学报,2016,36(9):1271-1275
- [12]Finn RS, Crown JP, Lang I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(1): 25-35
- [13]Sonke GS, Hart LL, Campone M, et al. Ribociclib with letrozole vs letrozole alone in elderly patients with hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer in the randomized MONALEESA-2 trial[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 167(3): 659-669
- [14]Reiter FP, Denk G, Ziesch A, et al. Predictors of ribociclib-mediated antitumour effects in native and sorafenib-resistant human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cell Oncol*, 2019, 42(5): 705-715
- [15]Huang CY, Hsieh FS, Wang CY, et al. Palbociclib enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma via inhibiting ataxia telangiectasia-mutated kinase-mediated DNA damage response[J]. *Eur J Cancer*, 2018, 102: 10-22
- [16]Hsieh FS, Chen YL, Hung MH, et al. Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6-independent manner[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(8): 1035-1049
- [17]Kim KY, Wang DH, Campbell M, et al. PRMT4-mediated arginine methylation negatively regulates retinoblastoma tumour suppressor protein and promotes E2F-1 dissociation[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(1): 238-248
- [18]Nidhi S, Cynthia T, Prashant T, et al. Control of the p53-p21CIP1 axis by E2F1, E2F2, and E2F3 is essential for G1/S progression and cellular transformation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36124-36131
- [19]Mary TP, Bradford MS, Timothy FK. miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2009, 28(1): 140-145
- [20]Li N, Li L, Chen Y. The identification of core gene expression signature in hepatocellular carcinoma[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018: 3478305
- [21]Ma L, Tian X, Guo H, et al. Long noncoding RNA H19 derived miR-675 regulates cell proliferation by down-regulating E2F-1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer*, 2018, 9(2): 389-399
- [22]Putzer BM, Steder M, Alla V. Predicting and preventing melanoma invasiveness: advances in clarifying E2F-1 function [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10(11): 1707-1720

(上接第252页)

对蒙医的临床辨证问题开展量化研究是结合现代医学思维推进蒙医理论及提高临床疗效必不可少的手段之一,对蒙医整体诊疗决策的制定有重要参考意义<sup>[14]</sup>。上述研究结果仅基于对CHF蒙医药学相关现代文献资料中的蒙医证型及症状、体征分布特点进行了总结及分析,在一定意义上可为该病证的蒙医证型及症状、体征的规范化研究提供参考。目前,有关CHF蒙医辨证诊断方面的文献报道数量较少,且各临床研究中的病例数量较少,期待未来能够开展更多高水准、多中心的临床研究,以进行经验总结。

#### 参考文献

- [1]Huang L, Cai H, Zhuang J, et al. Fuling sini decoction for patients with chronic heart failure: a protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(51): e13692
- [2]梁秀清.蒙医辨证护理干预在老年慢性心力衰竭护理中的效果分析[J]. *中国实用医药*, 2019, 14(30): 125-127
- [3]宝音图.蒙药达力-16味散治疗老年慢性心力衰竭(CHF)

患者的临床疗效及对患者血液流变学分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(60): 211+254

- [4]刘萨仁,佟玉清,金桃,等.蒙药辅助治疗老年慢性心衰患者的临床疗效[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(7): 208-211
- [5]丁淑艳.分析蒙药对慢性心力衰竭患者心功能及生活质量的影响[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(78): 185+197
- [6]内蒙古自治区卫生厅.蒙医病证诊断疗效标准[M].北京:民族出版社,2007
- [7]斯琴.蒙医诊断学[M].呼和浩特:内蒙古医科大学,2013
- [8]《蒙古学百科全书》编辑委员会.蒙古学百科全书·医学卷[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,2012
- [9]策·苏荣扎布.蒙医内科学[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,2011
- [10]李花,苏日古格,包泽阳,等.心力衰竭蒙医寒证热证模型的建立方法及其评价[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2022, 44(5): 462-465+470
- [11]曹包莫日根,奥·乌力吉,静进.量化标准在蒙医学临床辨证应用的可行性[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(2): 5-7