

EB 病毒 LMP1 与 E-cadherin、ICAM-1 在鼻咽癌组织中的表达及其相关性

欧小波, 陈小毅

Relationship of EB Virus Latent Membrane Protein 1 and E-cadherin, ICAM-1 in Nasopharyngeal Carcinoma

OU Xiao-bo, CHEN Xiao-yi

Department of Pathology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Corresponding Author: CHEN Xiaoyi, E-mail: xychen@gdmc.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) on expression of E-cadherin and ICAM-1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and their relative role and metastasis mechanism in NPC. **Methods** The expression of LMP1, E-cadherin and ICAM-1 protein in thirty-one cases of chronic nasopharyngitis, thirty-two cases of NPC and twenty-four cases of lymph nodes with NPC metastases was detected by SP immunohistochemistry. **Results** The expressions rates of LMP1 and ICAM-1 in NPC and lymph nodes with NPC metastases were obviously higher than those in chronic nasopharyngitis, while those of E-cadherin in NPC and lymph nodes with NPC metastases were obviously lower than in chronic nasopharyngitis. Spearman correlation analysis showed a significant negative correlation between the expression of LMP1 and E-cadherin in both NPC and lymph nodes with NPC metastases and a significant positive correlation between the expression of LMP1 and ICAM-1. **Conclusion** It is suggested that in NPC and lymph nodes with NPC metastases, LMP1 may affect the cell adhesion and accelerate the invasion and metastasis of NPC by inhibiting the expression of E-cadherin and increasing the expression of ICAM-1.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; LMP1; E-cadherin; ICAM-1; Cell adhesion; Tumor metastasis

摘要:目的 研究 EB 病毒潜伏膜蛋白 1(LMP1)对鼻咽癌细胞黏附分子 E-cadherin 和 ICAM-1 表达的影响,探讨 LMP1 在鼻咽癌转移中的作用及其相关的机制。方法 应用免疫组织化学(SP法)分别检测 LMP1、E-cadherin 和 ICAM-1 蛋白在 31 例鼻咽粘膜慢性炎、32 例鼻咽癌和 24 例鼻咽癌颈部淋巴结转移灶中的表达。结果 LMP1 和 ICAM-1 蛋白在鼻咽癌和鼻咽癌淋巴结转移灶中的阳性表达率显著高于在鼻咽粘膜慢性炎组织中的阳性表达率,E-cadherin 蛋白在鼻咽癌和鼻咽癌淋巴结转移灶中的阳性表达率则显著低于在鼻咽粘膜慢性炎组织中的阳性表达率。Spearman 相关分析显示,在鼻咽癌组织和鼻咽癌淋巴结转移灶中,LMP1 与 E-cadherin 的表达呈负相关,而与 ICAM-1 的表达呈正相关。结论 在鼻咽癌和鼻咽癌颈部淋巴结转移灶中 LMP1 可能通过抑制 E-cadherin 的表达和促进 ICAM-1 的表达进而影响肿瘤细胞的黏附性,促进鼻咽癌的侵袭和转移。

关键词: 鼻咽癌; LMP1; E-cadherin; ICAM-1; 细胞黏附; 肿瘤转移

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)07-0499-03

0 引言

鼻咽癌以低分化、高转移为特征,转移发生得早,预后差。在恶性肿瘤侵袭和转移过程中细胞黏附扮演着重要的角色,由相应的黏附分子(CAMs)来介导。其中 E 钙黏蛋白(E-cadherin)就是研究得

比较多的同质黏附分子,其表达下降使肿瘤细胞的同质黏附能力减弱,浸润转移能力增强^[1]。而细胞间黏附分子 1(ICAM-1)则以介导异质黏附成为人们关注的热点,ICAM-1 在一些恶性肿瘤中过度表达,与淋巴结转移相关^[2]。EB 病毒潜伏膜蛋白 1(LMP1)在鼻咽癌侵袭和转移中起着重要的作用,但确切的机制尚未明了。有研究发现,LMP1 可抑制 E-cadherin 表达、促进 ICAM-1 表达^[3],而黏附分子异常表达对肿瘤转移有着重大影响,于是,我们推测在鼻咽癌中可能也存在着这样的机制。

收稿日期:2007-07-10;修回日期:2007-12-14

作者单位:524023 广东湛江,广东医学院病理学教研室

通讯作者:陈小毅,E-mail:xychen@gdmc.edu.cn

作者简介:欧小波(1980-),女,硕士,住院医师,主要从事肿瘤病理学研究

1 资料和方法

1.1 资料

收集广东医学院附属医院和高州市人民医院病理科 2002~2005 年石蜡标本。其中鼻咽粘膜慢性炎症标本 31 例,鼻咽癌标本 32 例(病理诊断为鼻咽非角化型鳞状细胞癌),鼻咽癌颈部淋巴结转移灶标本 24 例(病理诊断为淋巴结转移癌,临床证实为鼻咽癌转移)。男性患者 55 例,女性患者 32 例,中位年龄 45 岁。所有病例临床和病理资料完整,诊断前未经任何抗癌治疗。

1.2 试剂

单克隆抗体 CS1-4 购自 DA KO 公司,单克隆抗体 E-cadherin、ICAM-1 和 SP 试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3 方法

采用免疫组化 SP 法,用已知的阳性标本作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。全部标本均经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片。石蜡切片常规脱蜡,梯度水化,高压修复抗原,3% 过氧化氢孵育 15 min 以去除内源性过氧化酶,滴加正常山羊血清封闭 20 min,滴加 1:100 稀释的 LMP1、E-cadherin 和 ICAM-1 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,滴加 1:100 生物素标记的二抗,室温孵育 15 min,滴加 1:100 辣根过氧化物酶标记的卵白素,室温孵育 15 min,DAB 显色,苏木素复染细胞核,脱水、透明、中性树脂封片。

1.4 阳性结果判断

每一批免疫组化均设有已知的阳性对照和用 PBS 代替一抗的空白对照。LMP1、E-cadherin 和 ICAM-1 均以细胞膜或细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性信号。采用双盲法对免疫组化结果进行评估:在光学显微镜下观察,每张切片选取 5 个具有代表性的高倍视野(不少于 1 000 个细胞)进行计数,再取 5

个视野的平均值为判定结果。具体方法为根据棕黄色阳性信号的强度和面积判断结果:(1)对每张切片阳性信号的强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别打 0、1、2、3 分;(2)对阳性信号的面积按无着色、着色 < 1/3、1/3~2/3、> 2/3 分别打 0、1、2、3 分。然后根据两项得分之和判断其结果:0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),5 分以上为强阳性(+++)。

1.5 统计学方法

研究资料采用统计软件 SPSS 14.0 做 R \times C 卡方检验和 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 LMP1、E-cadherin 和 ICAM-1 在鼻咽黏膜慢性炎症、鼻咽癌及鼻咽癌颈淋巴结转移灶中的表达情况

LMP1、E-cadherin 和 ICAM-1 的阳性信号均定位于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色细颗粒状弥漫分布,细胞核呈阴性,见图 1~4。

LMP1 在鼻咽黏膜慢性炎症标本上皮中呈阴性或弱阳性表达,在鼻咽癌和鼻咽癌颈部淋巴结转移灶标本中的阳性表达率升高,差异有统计学意义;而 E-cadherin 在鼻咽黏膜慢性炎症标本上皮中呈强阳性表达,阳性表达率为 100%,在鼻咽癌和鼻咽癌颈部淋巴结转移灶标本中的阳性表达率降低,差异有统计学意义;ICAM-1 在鼻咽黏膜慢性炎症标本上皮中呈阴性或弱阳性表达,在鼻咽癌和鼻咽癌颈部淋巴结转移灶标本中的阳性表达率比鼻咽黏膜慢性炎症组高,差异有统计学意义,见表 1。

2.2 鼻咽癌及鼻咽癌颈淋巴结转移灶中 LMP1 和 E-cadherin、ICAM-1 表达之间的相互关系

鼻咽癌及鼻咽癌颈淋巴结转移灶中 LMP1 和 E-cadherin、ICAM-1 表达的相关性,见表 2、3。

经 Spearman 等级相关分析得出:在鼻咽癌组

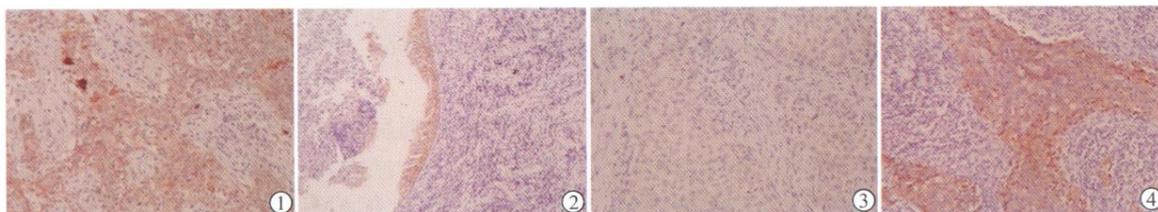


图 1 LMP1 在鼻咽癌组织中的阳性表达(SP \times 100)

图 2 E-cadherin 在慢性鼻咽炎粘膜上皮中的强阳性表达(SP \times 100)

图 3 E-cadherin 在鼻咽癌淋巴结转移灶中的阴性表达(SP \times 100)

图 4 ICAM-1 在鼻咽癌淋巴结转移灶中的强阳性表达(SP \times 100)

Fig 1 Expression of LMP1 in NPC(SP \times 100)

Fig 2 High expression of E-cadherin in chronic nasopharyngitis(SP \times 100)

Fig 3 Negative expression of E-cadherin in Lymph node metastases with NPC(SP \times 100)

Fig 4 High expression of ICAM-1 in Lymph node metastases with NPC(SP \times 100)

表 1 鼻咽部不同病变组织 LMP1、E-cadherin 和 ICAM-1 的阳性表达情况

Tab 1 Expression of LMP1、E-cadherin and ICAM-1 in three nasopharyngeal diseases

组别	n	LMP1 [*]		E-cadherin ^{**}		ICAM-1 ^{***}	
		阳性例数	阳性率 (%)	阳性例数	阳性率 (%)	阳性例数	阳性率 (%)
慢性鼻咽炎	31	7	22.6	31	100	8	25.8
鼻咽癌	32	20	62.5	15	48.9	21	65.6
鼻咽癌颈淋巴结转移灶	24	18	75.0	7	29.2	18	75.0

*: $\chi^2 = 17.240, P < 0.01$; **: $\chi^2 = 32.702, P < 0.01$; ***: $\chi^2 = 15.923, P < 0.01$

表 2 鼻咽癌中 LMP1 与 E-cadherin、ICAM-1 表达之间的相互关系

Tab 2 Correlation between the expression of E-cadherin, ICAM-1 and LMP1 in NPC

LMP1	E-cadherin [*]				ICAM-1 ^{**}			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
-	3	4	3	2	5	3	4	0
+	5	1	0	0	3	2	0	1
++	3	2	0	0	2	0	2	1
+++	6	1	2	0	1	2	4	2

Spearman 相关分析, *: $r = -0.353, P < 0.05$; **: $r = 0.378, P < 0.05$

表 3 鼻咽癌颈淋巴结转移灶中 LMP1 与 E-cadherin、ICAM-1 相互关系

Tab 3 Correlation between the expression of E-cadherin, ICAM-1 and LMP1 in NPC with lymph node metastasis

LMP1	E-cadherin [*]				ICAM-1 ^{**}			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
-	2	3	1	0	5	1	0	0
+	2	1	0	0	0	3	0	0
++	0	0	0	0	0	0	0	0
+++	13	2	0	0	1	4	1	9

Spearman 相关分析, *: $r = -0.502, P < 0.05$; **: $r = 0.735, P < 0.01$

组织中, LMP1 和 E-cadherin 的表达呈负相关, 相关系数为 $r = -0.353, P < 0.05$; LMP1 和 ICAM-1 的表达呈正相关, 相关系数为 $r = 0.378, P < 0.05$ 。

在鼻咽癌颈淋巴结转移灶中, LMP1 和 E-cadherin 的表达呈负相关, $r = -0.502, P < 0.05$; LMP1 和 ICAM-1 的表达呈正相关, $r = 0.735, P < 0.01$ 。

3 讨论

恶性肿瘤侵袭和转移是肿瘤细胞与宿主细胞间相互作用的连续过程, 细胞黏附性的改变贯穿始终。首先, 肿瘤细胞彼此间的同质黏附能力降低了, 彼此

容易分离开来, 才得以从原发灶脱离; 其次, 肿瘤细胞与间质细胞及基质间的异质黏附能力增强也有利于肿瘤的浸润和转移; 最后, 肿瘤细胞黏附停留于转移部位。同质黏附和异质黏附可由相应的粘附分子来介导, 黏附分子包括整合素家族、免疫球蛋白超家族、钙黏着蛋白家族、选择素家族和其他黏附分子共五类。

E-cadherin 属于 I 型钙黏着蛋白家族, 其表达下调而导致的细胞与细胞间黏附性降低是促进恶性肿瘤发生转移的重要因素^[4], 可作为胃癌、肠癌和乳腺小叶癌等肿瘤转移标志^[5]。莫武宁等^[6]发现 E-cadherin 在鼻咽癌的表达体现颈淋巴结转移组显著低于无颈淋巴结转移组的特点。本实验发现 E-cadherin 在鼻咽癌及鼻咽癌颈部淋巴结转移灶中的表达均比慢性鼻咽炎组低, 且在颈部淋巴结转移灶中的表达明显低于鼻咽癌组 ($P < 0.01$)。此结果提示 E-cadherin 表达下降在鼻咽癌的侵袭转移过程中起着关键的作用。

ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族, 是调节异质黏附的重要因素。恶性黑色素瘤、胃癌、结肠癌、肾癌细胞表面 ICAM-1 表达增高, 与肿瘤转移和预后相关^[7,8]。肿瘤细胞通过高表达的 ICAM-1 增强与淋巴细胞及细胞外基质间的异质黏附得以脱离原发灶并凭借黏附的淋巴细胞黏附到靶器官脉管上然后穿出管壁形成转移灶。本实验发现 ICAM-1 在鼻咽癌及鼻咽癌颈淋巴结转移灶中的表达均明显高于慢性鼻咽炎 ($P < 0.01$), 另外在颈淋巴结转移灶中的表达高于鼻咽癌。此结果提示 ICAM-1 过表达增强鼻咽癌细胞的异质黏附能力, 促进肿瘤的侵袭和转移。

EBV 是一种致瘤病毒, 绝大部分的鼻咽癌病例可检测到 EBV, 60% ~ 90% 的鼻咽癌组织有 EBV 编码的 LMP1 的表达, LMP1 可促进恶性肿瘤细胞浸润和转移^[9]。罗非君等^[10]发现在鼻咽癌中随着癌细胞恶性度增加 LMP1 的表达也增加, LMP1 通过 NF- κ B 和 AP-1 起效应。本实验结果显示 LMP1 在鼻咽癌的表达高于慢性鼻咽炎 ($P < 0.01$), 而在鼻咽癌颈部淋巴结转移灶又明显高于鼻咽癌及慢性鼻咽炎 ($P < 0.01$)。这一结果提示 LMP1 可能参与了鼻咽癌的恶性演进过程, 在侵袭和转移中起重要作用。

有研究发现 LMP1 通过诱导 E-cadherin 启动子甲基化而下调 E-cadherin 表达, 通过 NF- κ B 通路介导 ICAM-1 表达从而增强肿瘤细胞的侵袭性^[3,11]。本实验发现在鼻咽癌和颈部淋巴结转移灶中 LMP1 与 E-cadherin 的表达均呈负相关, 而

(下转第 507 页)

pathway[J]. *Oncogene*, 2002, 24(49): 7524-7532.

[27] Carraway KG, Ramsauer VP, Haq B, et al. Cell signaling through membrane mucins[J]. *Bioessays*, 2003, 25(1): 66-71.

[28] Weed DT, Gomez-Fernandez C, Bonfante E, et al. MUC4 (sialomucin complex) expression in salivary gland tumors and squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 124(2): 127-141.

[29] Weed DT, Gomez-Fernandez C, Yasin M, et al. MUC4 and ErbB2 expression in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: correlation with clinical outcome[J]. *Laryngoscope*, 2004, 114(S101): 1-32.

[30] Cullen KJ, Newkirk KA, Schumaker LM, et al. Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8097-8102.

[31] Rogers S, Harington KJ, Rhys-Evans P, et al. Biological significance of c-ErbB family oncogenes in head and neck cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2005, 24(1): 47-69.

[编辑:贺文;校对:安凤]

(上接第 501 页)

LMP1 与 ICAM-1 的表达均呈正相关,提示在鼻咽癌和颈部淋巴结转移灶中 LMP1 可能对 E-cadherin 的表达起抑制作用,对 ICAM-1 的表达起促进作用,于是肿瘤细胞同质黏附减弱、异质黏附增强、转移能力增强。由此可见,LMP1 与 E-cadherin、ICAM-1 三者协同参与了鼻咽癌的侵袭和转移经过。

综上所述,LMP1 可能通过抑制 E-cadherin 的表达和促进 ICAM-1 的表达来抑制鼻咽癌细胞的同质黏附能力、增强其异质黏附能力,进而促进鼻咽癌的侵袭和转移。LMP1 在恶性肿瘤的侵袭和转移中作用重大,有可能成为评估预后的指标,但具体的作用机制还有待进行深入研究。

参考文献:

[1] Lo AK, Huang DP, Lo KW, et al. Phenotypic alterations induced by the Hong Kong prevalent Epstein-Barr virus-encoded LMP1 variant (2117-LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells[J]. *Int J Cancer*, 2004, 109(6): 919-925.

[2] Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck[J]. *Laryngoscope*, 2003, 113(11): 1955-1960.

[3] Mehl AM, Floettmann E, Jones M, et al. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 regulation by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies pathways that cooperate with nuclear factor kappa B to activate transcription[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 984-992.

[4] Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, et al. High through put tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non small cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(10): 2417-2428.

[5] Garcia del Muro X, Torregrosa A, Munoz J, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(3): 357-362.

[6] 莫武宁, 黄光武, 邝国乾, 等. E-cadherin 和 p16 基因蛋白在鼻咽癌中的表达及意义[J]. *癌症*, 2000, 19(1): 37-39.

[7] Velikova G, Banks RE, Gearing A, et al. Circulating soluble adhesion molecules E-cadherin, E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 1997, 76(11): 1398-1404.

[8] Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, et al. Over-expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 1998, 79(1): 76-81.

[9] 王承兴, 邓锡云, 李晓艳, 等. EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中通过 NF- κ B、AP-1 促进 MMP9 表达[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(1): 9-13.

[10] 罗非君, 胡智, 曾亮, 等. EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 参与鼻咽癌恶性演性的转录调控实验研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(4): 567-571.

[11] Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, et al. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 10084-10089.

[编辑:贺文;校对:周永红]