

Pokemon、P14ARF 蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义*

张健 王磊 赵智宏 王巨 刘鑫远 禹亮[△]

(哈尔滨医科大学第一临床医学院胸外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中 Pokemon 和 P14ARF 表达的关系及其对 ESCC 临床病理特征和预后的判定价值。方法 应用 SP 免疫组织化学方法检测 Pokemon 和 P14ARF 二种蛋白在 96 例 ESCC 组织及 20 例癌旁正常组织中的表达,分析它们与 ESCC 病理学特征的关系,以及 Pokemon 和 P14ARF 的相关性,并结合随访资料观察上述蛋白表达对 ESCC 长期预后的影响。结果 癌旁正常组织中未见 Pokemon 蛋白表达,P14ARF 蛋白阳性表达率为 90.0%。在 ESCC 组织中 Pokemon 和 P14ARF 阳性表达率分别为 75.0% 和 30.2%。Pokemon 表达与 P14ARF 表达呈负相关($r = -0.458, P = 0.000$)。Pokemon 和 P14ARF 的表达与 TNM 分期和淋巴结转移相关($P < 0.05$)。Pokemon 表达阳性组的 5 年生存率分别为 20.8%,显著低于阴性组($P = 0.004$)。P14ARF 表达阳性组的 5 年生存率为 41.4%,显著高于阴性组($P = 0.011$)。结论 Pokemon 蛋白的高表达和 P14ARF 蛋白低表达可能与 ESCC 的发生、发展关系密切,它们对于 ESCC 预后评估有一定的临床意义。

关键词 鳞癌 食管肿瘤 Pokemon P14ARF 预后

中图分类号 R735.1, R655.4 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)21-4050-04

Expression and Clinical Significance of Pokemon and P14ARF in Esophageal Squamous Cell Cancer*

ZHANG Jian, WANG Lei, ZHAO Zhi-hong, WANG Ju, LIU Xin-yuan, YU Liang[△]

(Department of Thoracic Surgery, First Clinic College, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlation of the expression of Pokemon and P14ARF in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues, and their values for determining the clinicopathological characteristics and prognosis of ESCC. **Methods:** Immuno histochemical SP staining was used to detect the expressions of pokemon and P14ARF proteins in 96 ESCC tumor tissues and 20 adjacent normal tissues. Their relationship with the pathological characteristics of ESCC was analyzed. The correlation of abnormal expressions of pokemon and P14ARF was analyzed. The effects of the expressions of the two proteins on the long-term prognosis of ESCC patients were observed based on the follow-up data. **Results:** In normal tissues there was no Pokemon expression but the positive rate of P14ARF expression was 90.0%. In ESCC tissues, the positive rate of Pokemon and P14ARF protein were 75% and 30.2%, respectively. The expression of Pokemon had negative correlation with expression of P14ARF ($r = -0.458, P = 0.000$). The expression of Pokemon and P14ARF were associated with TNM staging and lymph node metastasis ($P < 0.05$). In Pokemon positive patients, the five-year survival rate was 20.8%, which was significantly lower than that in Pokemon negative patients ($P = 0.004$). In contrast, the five-year survival rate was 41.4% in patients with positive expression of P14ARF, which was significantly higher than that in patients with negative expression of P14ARF ($P = 0.011$). **Conclusion:** The over expression of Pokemon and the less expression of P14ARF maybe play important roles in the development of ESCC. Pokemon and P14ARF have a certain clinical significance for evaluating the prognosis of ESCC patients.

Key words: Squamous cell carcinoma; Esophageal neoplasm; Pokemon; P14ARF; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R735.1, R655.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)21-4050-04

转录抑制因子 Pokemon 是一种原癌基因,与肿瘤发生密切相关。作为原癌基因, Pokemon 特殊的是有促进其他癌基因的作用,因此可以认为它是肿瘤的总开关。Pokemon 在人类肿瘤中的表达可以预示肿瘤的生物行为学和临床结果。该基因在肝癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、乳腺癌及恶性胶质细胞瘤等多种肿瘤组织中表达明显增高^[1-4]。P14ARF 基因是近年来引起重视的一个抑癌基因,在肿瘤的发生、细胞周期和细胞凋亡方面具

有非常重要的作用。原癌基因 Pokemon 通过特异抑制 P14ARF 转录等多种途径来调控细胞周期、诱导肿瘤发生^[5,6]。Pokemon、P14ARF 在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中的表达情况尚不清楚,与临床病理特征与患者预后的关系还未见报道,因此我们用免疫组化方法检测 Pokemon、P14ARF 蛋白在 ESCC 中的表达,探讨其临床意义及对预后的影响。

* 基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题(2010-039) 哈尔滨医科大学第一医院科研基金(2009L05)

作者简介:张健(1978),男,主治医师、医学硕士,主要研究方向:胸部肿瘤的发生机制及治疗。

电话:13845096619, E-mail: doczhang2003@163.com

[△]通讯作者:禹亮,主任医师,教授,硕士导师,电话:0451-85555210, E-mail: hydwkyl@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-03-06 接受日期:2012-03-31)

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集哈尔滨医科大学附属一院胸外科 2004 年 1 月~2005 年 6 月手术切除并经病理证实的原发性 ESCC 石蜡标本,挑选术前均未进行放疗或化疗等任何治疗,且有完整随访记录和 TNM 分期的病例 96 例。96 例患者中,男 56 例,女 40 例,年龄 36~75 岁,中位年龄 58 岁;高分化癌 (G1) 24 例,中分化癌 (G2) 46 例,低分化癌 (G3) 26 例,有淋巴结转移 31 例,无淋巴结转移 65 例。根据国际抗癌联盟 (UICC) 食管癌 TNM 分期标准,0 期 6 例,I 期 35 例,II 期 31 例,III 期 24 例。另取同期我院病理科 20 例癌旁正常组织 (距肿块 5 cm 以上) 作对照。随访截止日至 2010 年 8 月,随访方式采用门诊复查、电话相结合,中位随访期 38.5 (23~60) 个月。

1.2 方法

采用免疫组织化学方法 (SP 二步法) 检测上述 ESCC 组织、癌旁正常组织中 Pokemon、P14ARF 蛋白的表达。兔抗人 Pokemon、P14ARF 多克隆抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司,抗体工作浓度分别为 1:100 和 1:200。即用型二步法免疫组化 SP 试剂盒 (货号 PV-9000)、浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,采用 SP 二步法,按试剂盒说明书操作,DAB 显色,冲洗、复染、脱水、透明、封片,显微镜观察。采用已知阳性切片做阳性对照,用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.3 结果判定

免疫组化染色阳性反应为淡黄至棕褐色颗粒,Pokemon、P14ARF 表达定位于细胞核。两人双盲观察切片,采用二级计分法^[7],由阳性着色细胞所占百分数与细胞着色强度结合起来计算。阳性细胞计数 $\leq 5\%$ 计 0 分,6%~25% 计 1 分,26%~50% 计 2 分,51%~75% 计 3 分,>75% 计 4 分。细胞着色强度:不着色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分。两者计分相乘大于 1 为阳性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行分析。正常食管粘膜和 ESCC 组织中 2 种蛋白阳性表达率的比较应用配对 χ^2 检验,不同临床病理特征的 ESCC 组织中 2 种蛋白阳性表达率的比较应用 χ^2 检验。以列联系数评估 ESCC 组织中 2 种蛋白表达的关系。预后的单因素分析采 Kaplan-Meier 方法,显著性检验采用 log-rank 检验, $P<0.05$ 视为有统计学意义。

2 结果

2.1 正常食管粘膜和 ESCC 组织中 Pokemon 和 P14ARF 的表达

癌旁正常组织中未见 Pokemon 蛋白表达,P14ARF 蛋白阳性表达率分别为 90.0%。在 ESCC 组织中 Pokemon、P14ARF 阳性表达率分别为 75%、30.2%。ESCC 组织 Pokemon、P14ARF 表达与癌旁正常组织相比,差异有统计学意义 ($P=0.000$), (见图 1)。

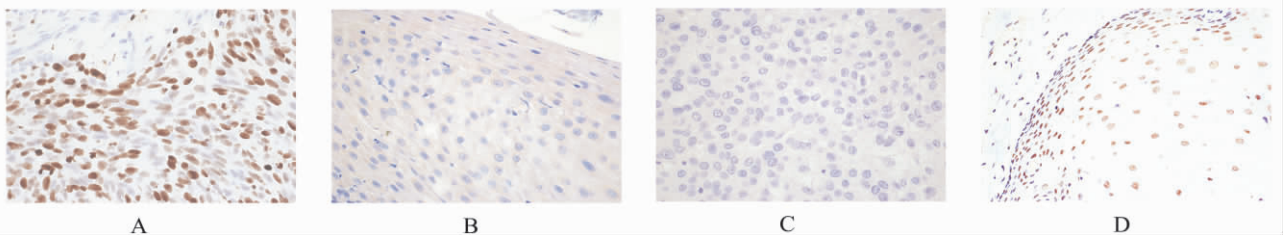


图 1 A,B 分别为 ESCC 及正常食管粘膜组织中 Pokemon 蛋白的表达,C,D 分别为 ESCC 及正常食管粘膜组织中 P14ARF 蛋白的表达 (HE 染色, $\times 400$)

Fig.1 Immunohistochemical assays of Pokemon and P14ARF. A-B: Pokemon, C-D: P14ARF, A-C: In ESCC, B-D: In esophageal mucosa. (HE staining, $\times 400$)

2.2 ESCC 组织中 Pokemon 和 P14ARF 蛋白表达与临床病理特征的关系 (见表 1)

Pokemon 和 P14ARF 蛋白表达呈负相关 ($\chi^2=17.935$, $r=-0.458$, $P=0.000$), (见表 2)。

2.3 ESCC 组织中 Pokemon 和 P14ARF 蛋白表达关联性分析

表 1 Pokemon、P14ARF 蛋白表达与 ESCC 临床病理特征的关系

Table 1 Relationships between the expressions of Pokemon, P14ARF and clinicopathological characteristics in ESCC patients

临床病理特征 Clinical parameters	n	Pokemon 阳性例数 (%) Positive expression	χ^2	P	P14ARF 阳性例数 (%) Positive expression	χ^2	P
性别 (Sex)							
男 (Male)	56	41 (73.2)	0.057	0.811	19 (33.9)	0.510	0.475
女 (Female)	40	31 (77.5)			10 (25.0)		
年龄 (Age)							
<60	52	38 (73.1)	0.056	0.813	18 (34.6)	0.639	0.424
≥ 60	44	34 (77.3)			11 (25.0)		

分化程度 (Differentiation)							
高分化(Well)	24	14 (58.3)	4.433	0.109	8 (33.3)	0.724	0.696
中分化 (Moderate)	46	37 (80.4)			12 (26.1)		
低分化(Poor)	26	21 (80.8)			9 (34.6)		
TNM 分期 (TNMstage)							
O~I (O~I stage)	41	25 (61.0)	6.258	0.012	20 (48.8)	10.221	0.001
II~III (II~III stage)	55	47 (85.5)			9 (16.4)		
淋巴结转移 (Lympho node metastasis)							
有(Yes)	31	29 (93.5)	7.003	0.008	4 (12.9)	5.348	0.021
无(No)	65	43 (66.2)			25 (38.5)		

表 2 Pokemon、P14ARF 蛋白表达的关联性

Table 2 The correlation between the expressions of Pokemon and P14ARF

Pokemon	P14ARF	
	+	-
+	13	59
-	16	8

2.4 Pokemon 和 P14ARF 蛋白表达与生存的关系

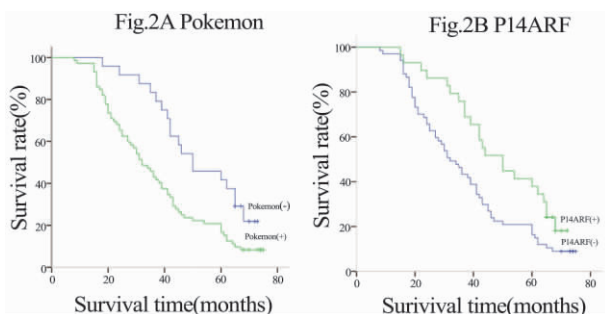


图 2 Pokemon 和 P14ARF 蛋白表达不同状态的肺癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig.2 Kaplan-Meier curves of the ESCC patients with positively and negatively expressive Pokemon and P14ARF.

Pokemon 阳性表达组中位生存期为 32 个月, 低于阴性表达组的 50 个月, Pokemon 阳性表达组 5 年生存率 20.8 %, 显著低于阴性表达组的 45.8 % (图 2A), log-rank 检验 $P=0.003$ 。P14ARF 阳性表达组中位生存期为 32 个月, 低于阳性表达组的 50 个月, P14ARF 阳性表达组 5 年生存率 20.9 %, 显著低于阳性表达组的 41.4 % (图 2B), log-rank 检验 $P=0.012$ 。

3 讨论

食管癌是胸部常见恶性肿瘤, 我国是食管癌高发地区, 也是死亡率最高的国家。食管癌的发生、发展与基因改变关系密切, 癌基因的激活与抑癌基因的失活是癌变的主要机制。对食

管癌组织中癌基因和抑癌基因的检测, 可揭示食管癌发生、发展过程中的基因改变情况, 并筛选有临床价值的基因作为早期诊断、预后评估指标。

人类 Pokemon (亦称为 LRF、FBI-1、OCZF、TIP) 蛋白是由 ZBTB7 基因编码的具有 584 个氨基酸的蛋白质^[8,9], 位于细胞核, 具有 N 端的 BTB/POZ 域和 C 端的 4 个 Krü ppe 锌指结构^[10,11]。BTB 域结构蛋白与许多关键的细胞过程比如细胞分化、肿瘤形成、细胞凋亡、离子通道活性和转录密切相关^[12], 作为转录因子的 Pokemon 可通过同源或异源复合体直接抑制抑癌基因而发挥癌基因的作用。本研究结果表明, Pokemon 在 ESCC 组织中高表达, 而在癌旁正常组织中低表达, Pokemon 的表达与 ESCC 的 TNM 分期和淋巴结转移有关, 与性别、年龄、分化程度无关。说明 P14ARF 与 ESCC 的发生、浸润及转移密切相关。

P14ARF 定位于 INK4a/ARF 基因位点, 该位点位于人类染色体 9p21 上, 可编码 p16INK4a 和 P14ARF 2 种蛋白^[13]。P14ARF 对于细胞周期起负性调控作用, 可依赖或不依赖 p53 发挥抑癌作用^[14,15]。P14ARF 作为抑癌基因基因阻滞 MDM2 诱导的 p53 的降解而使 p53 稳定和积累^[16,17], 阻滞细胞周期在 G1-S 期和 G2-M 期^[18,19]。Pokemon 特异性地抑制抑癌基因 ARF 的转录。Maeda 等^[20]利用 ARF 荧光指示剂和免疫沉淀实验证明 Pokemon 是 P14ARF 的特异阻遏物, Pokemon 可通过 P14ARF-MDM2-p53 途径发挥作用^[21]。该研究结果表明, P14ARF 在 ESCC 组织中低表达, 而在癌旁正常组织中高表达, P14ARF 的表达与 ESCC 的 TNM 分期和淋巴结转移有关, 与性别、年龄、分化程度无关。说明 Pokemon 与 ESCC 的发生、浸

润及转移密切相关。Pokemon 阳性表达组与阴性表达组中, P14ARF 表达具有统计学差异 ($P=0.000$), 两者呈负相关 ($r=-0.458$), 说明在 ESCC 中 Pokemon 亦通过阻遏 P14ARF 而发挥致癌作用。

本研究观察到 Pokemon 阳性表达组 5 年生存率 (20.8%) 显著低于阴性组 (45.8%), 阳性组生存曲线明显低于阴性组, 说明 Pokemon 阳性表达组生存期短, 预后差。P14ARF 阳性表达组 5 年生存率 (41.4%) 显著高于阴性组 (20.9%), 阳性组生存曲线明显高于阴性组, 说明 Pokemon 阴性表达组生存期短, 预后差。Pokemon 及 P14ARF 表达与 TNM 分期和淋巴结转移有关, 对于 ESCC 而言, TNM 分期和淋巴结转移是预测患者生存期最有力和广泛接受的参数, 本课题组认为联合检测 Pokemon 和 P14ARF 对判断预后更有意义。

综上所述, Pokemon 和 P14ARF 对 ESCC 均有一定临床意义, 尤其是 Pokemon 在肿瘤细胞转化过程中发挥关键作用并与肿瘤的发生密切相关, 有望在 ESCC 预后评估和将来的基因治疗中发生发挥重要作用。

参考文献 (References)

- [1] Aggarwal A, Hunter WJ 3rd, Aggarwal H, et al. Expression of leukemia / lymphoma-related factor (LRF/POKEMON) in human breast carcinoma and other cancers[J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89(2):140-148
- [2] Zhao ZH, Wang SF, Yu L, et al. Overexpression of Pokemon in non-small cell lung cancer and foreshadowing tumor biological behavior as well as clinical results[J]. *Lung Cancer*, 2008, 62(1):113-119
- [3] 王波, 田德安, 张全乐, 等. 人肝癌组织中原癌基因 Pokemon 的表达及其临床意义[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2010, 19(2):151-153
Wang Bo, Tian De-an, Zhang Quan-le, et al. Expression of Pokemon and its clinical significance in human hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 19(2):151-153
- [4] 曹国春, 王会, 黄亚玲, 等. Pokemon 在人贲门癌中的表达及其意义[J]. *南京大学学报(自然科学)*, 2010, 46(1):108-113
Cao Guo-chun, Wang Hui, Huang Ya-ling, et al. Expression of Pokemon in human esophagogastric junctional cancer [J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2010, 46(1):108-113
- [5] Maeda T, Hobbs RM, Pandolfi PP. The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8575-8578
- [6] Jeon BN, Yoo JY, Choi WI, et al. Proto-oncogene FBI-1 (Pokemon/ZBTB7A) represses transcription of the tumor suppressor Rb gene via binding competition with Sp1 and recruitment of co-repressors [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48):33199-33210
- [7] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9):1808-1812
- [8] Pessler F, Pendergrast PS, Hernandez N. Purification and characterization of FBI-1, a cellular factor that binds to the human immunodeficiency virus type 1 inducer of short transcripts [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(7):3786-3798
- [9] Morrison DJ, Pendergrast PS, Stavropoulos P, et al. FBI-1, a factor that binds to the HIV-1 inducer of short transcripts (IST), is a POZ domain protein[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(5):1251-1262
- [10] Costoya JA. Functional analysis of the role of POK transcriptional repressors[J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2007, 6(1):8-18
- [11] Yang Y, Zhou X, Zhu X, et al. Cloning and functional analysis of 5'-upstream region of the Pokemon gene [J]. *FEBS J*, 2008, 275(8): 1860-1873
- [12] Stogios PJ, Chen L, Privé GG. Crystal structure of the BTB domain from the LRF/ZBTB7 transcriptional regulator [J]. *Protein Sci*, 2007, 16(2):336-342
- [13] Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, et al. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, 115(10):2239-2247
- [14] Abida WM, Gu W. P53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2):352-357
- [15] Balaburski GM, Hontz RD, Murphy ME. P53 and ARF: unexpected players in autophagy[J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(6):363-369
- [16] Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, et al. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(20):2658-2669
- [17] Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53[J]. *Cell*, 2009, 137(3):413-431
- [18] Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways [J]. *Cell*, 1998, 92(16): 725-734
- [19] Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14 (ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2[J]. *EMBO J*, 1998, 17(17):5001-5014
- [20] Maeda T, Hobbs RM, Merghou BT, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression[J]. *Nature*, 2005, 433(7023): 278-285
- [21] Agrawal A, Yang J, Murphy RF, et al. Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: an overview in breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2006, 81(2):115-122