

PARP-1 在舌鳞癌组织中的表达及意义

王立萍,陈树伟,侯景辉,庄士民,宋 明

Expression and Significance of Poly (ADP-ribose) Polymerase 1 in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma

Wang Liping, Chen Shuwei, Hou Jinghui, Zhuang Shimin, Song Ming

Department of Head and Neck Surgery, State Key Laboratory of Oncology of South China, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding Author: Song Ming, E-mail: songming@sysucc.org.cn

Abstract: Objective To detect the expression level and prognostic value of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC), and to analysis the relationship between PARP-1 expression and the clinicopathologic characteristics and prognosis of patients. **Methods** Expression of PARP-1 in 155 paraffin-embedded specimens of OTSCC and 13 paraffin-embedded specimens of adjacent normal tongue mucosa tissues was detected by the immunohistochemical method. The relationship between PARP-1 expression and the clinicopathologic characteristics and prognosis of patients was analyzed. **Results** Expression of PARP-1 was observed in 89.0% (138/155) of 155 OTSCC specimens. Overexpression of PARP-1 was observed in 58.1% (90/155) of the 155 OTSCC Paraffin specimens, while low expression of PARP-1 was 41.9% (65/155). Expression of PARP-1 was not observed in 13 normal tongue specimens. There was a significant difference between the 2 groups ($\chi^2 = 64.815, P = 0.000$). Expression of PARP-1 positively correlated to T stage ($\chi^2 = 10.841, P = 0.002$), N stage ($\chi^2 = 8.962, P = 0.007$) and pathological stage ($\chi^2 = 17.151, P = 0.000$). The overall survival ($P = 0.037$) and disease free survival ($P = 0.026$) were shorter in patients with overexpression of PARP-1. **Conclusion** PARP-1 may play an important role in carcinogenesis and cancer progression of OTSCC. PARP-1 may have a prognostic value in OTSCC.

Key words: Oral tongue squamous cell carcinoma; PARP-1; Recurrence; Prognosis

摘要:目的 检测 PARP-1 在舌鳞癌中的表达水平,分析与舌鳞癌患者临床病理因素及预后的相关性,初步探讨 PARP-1 在舌鳞癌的预后价值。**方法** 采用免疫组织化学法检测 155 例舌鳞癌组织及 13 例邻近正常舌组织的石蜡组织切片中 PARP-1 的表达水平,分析 PARP-1 的表达水平与舌鳞癌患者的临床病理因素及预后的相关性。**结果** 155 例舌鳞癌组织中,PARP-1 阳性表达率为 89.0% (138/155),其中 58.1% (90/155) 呈高表达,41.9% (65/155) 呈低表达;13 例邻近正常舌组织均无 PARP-1 表达,两者比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 64.815, P = 0.000$)。PARP-1 的表达水平与患者的 T 分期 ($\chi^2 = 10.841, P = 0.002$)、N 分期 ($\chi^2 = 8.962, P = 0.007$)、病理分期 ($\chi^2 = 17.151, P = 0.000$) 呈正相关。PARP-1 高表达者总生存时间 ($P = 0.037$) 与无瘤生存时间 ($P = 0.026$) 比低表达者短。**结论** PARP-1 可能是促进舌鳞癌发生发展的癌基因,具有预测舌鳞癌预后的临床价值。

关键词: 舌鳞癌; PARP-1; 复发; 预后

中图分类号:R739.86 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)08-0957-04

0 引言

舌鳞癌是口腔癌中最常见的恶性肿瘤,在头颈

恶性肿瘤中所占的比例有逐年上升的趋势^[1],由于肿瘤局部复发和淋巴结转移,5 年生存率一直没有很大改善^[2-3]。目前舌鳞癌最有效的治疗方法仍然是手术切除,过度的手术切除常常严重影响舌鳞癌患者的口腔功能和术后生活质量。因此,寻找一种与舌鳞癌患者的局部复发、淋巴结转移及预后等临床相关因素密切相关的生物学指标具有重要的临床意义。

收稿日期:2011-12-27;修回日期:2012-02-27

作者单位:510060 广州,华南肿瘤学国家重点实验室 中山大学肿瘤防治中心头颈科

通信作者:宋明,E-mail:songming@sysucc.org.cn

作者简介:王立萍(1986-),女,硕士在读,主要从事舌肿瘤的研究

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 [poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP-1] 是一种广泛存在于真核细胞内的核酶, 其相对分子质量为 116 kD, DNA 损伤可引起 PARP-1 表达增加并将其激活, 激活后的 PARP-1 修复受损 DNA, PARP-1 在 DNA 修复与重组、细胞增殖及维持基因稳定性等方面发挥重要作用^[4-5]。研究发现 PARP-1 在许多恶性肿瘤如恶性淋巴瘤、乳腺癌、肝癌、子宫内膜癌、结肠癌中呈高表达, 其表达水平与患者的病理分期、预后等临床相关因素密切相关^[6-10]。本研究检测 PARP-1 在舌鳞癌中的表达情况, 并分析表达水平与舌鳞癌患者临床病理因素及预后的关系。

1 资料和方法

1.1 病例选择

收集中山大学肿瘤防治中心头颈科 1998 年 1 月—2005 年 12 月收治, 随访时间为 5 年以上的舌鳞癌患者 155 例, 其中男 95 例, 女 60 例, 平均年龄 53.17 岁 (20~85 岁)。155 例患者初治均为手术治疗, 术后均未进行化疗及放疗。患者术后病理分期根据 1992 年 UICC 分期标准, 其中 T1 期 81 例, T2 期 71 例, T3 期 3 例; N0 期 137 例, N1 期 10 例, N2 期 8 例; I 期 75 例, II 期 61 例, III 期 11 例, IV 期 8 例。所有患者治疗时均无远处转移。患者组织学分级根据 WHO 分级标准, 其中高分化鳞癌 124 例, 中分化鳞癌 28 例, 低分化鳞癌 3 例。对所有患者进行随访, 随访至患者死亡时结束, 最短时间 4.4 月, 最长时间 143.9 月, 平均 69.2 月。在随访过程中无病例丢失, 至最后一次随访, 117 例患者存活, 55 例患者复发, 38 例患者死亡, 均死于原发肿瘤复发。

1.2 免疫组织化学染色及结果判断

PARP-1 抗体为博奥森公司产品, SP 试剂盒为迈新公司产品。用 SP 法对标本进行染色。组织切片二甲苯脱蜡, 乙醇再水化, 用 3% 的过氧化氢甲醇溶液孵育, 以阻断内源性过氧化物酶的活性。枸橼酸溶液常规水浴加热。每张切片加入正常非免疫动物血清, 以封闭非特异性结合位点, 除去血清, 每张切片中加入抗 PARP-1 第一抗体, 在 4°C 下过夜孵育, 用 PBS 冲洗。每张切片中加入生物素化的第二抗体, 在室温下孵育 10 min, 用 PBS 冲洗。每张切片中加入过氧化物酶标记的卵白素生物素第三抗体, 在室温下孵育 10 min, 用 PBS 冲洗。二氨基联苯显色, 用自来水冲洗, 苏木精对比染色, 用 PBS 冲洗, 脱水, 中性树胶封片。同时用 PBS 代替第一抗体作阴性对照。

免疫组织化学结果判断: 细胞染色强度评分: 未

染色 0 分, 浅黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分。染色细胞所占视野内总细胞数量百分比评分: 无细胞染色 0 分, 细胞染色数量 <25% 为 1 分, 25%~50% 为 2 分, >50%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。以细胞染色强度和染色细胞所占数量百分比评分之积为最终评分^[11], 分别为 0 分, 1 分, 2 分, 3 分, 4 分, 6 分, 8 分, 9 分, 12 分。根据最终评分将染色结果分为两组: PARP-1 低表达组 (0~4 分) 和高表达组 (6~12 分)。

1.3 统计学方法

运用 SPSS13.0 统计软件包。采用 χ^2 检验、Fisher 精确概率法、关联分析对分类资料进行比较; 采用 Kaplan-Meier 法和 Logrank 检验进行生存分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

免疫染色出现淡黄色、棕黄色、棕褐色颗粒的细胞, 见图 1。免疫组织化学染色结果显示 PARP-1 主要在癌细胞胞核内表达, 见图 1A, 155 例舌鳞癌石蜡组织切片中, PARP-1 表达占 89.0% (138/155), 其中 58.1% (90/155) 呈高表达, 41.9% (65/155) 呈低表达; 13 例邻近正常舌石蜡组织均无 PARP-1 表达, 两者间的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 64.815, P = 0.000$)。

2.2 PARP-1 表达水平与临床病理因素的关系

PARP-1 表达水平与舌鳞癌患者年龄 ($P = 0.548$)、性别 ($P = 0.217$)、病理分级 ($P = 0.743$) 均未显示统计学意义上的相关性, 与舌鳞癌患者的 T 分期 ($P = 0.002$)、N 分期 ($P = 0.007$)、病理分期 ($P = 0.000$) 呈正相关, 见表 1。在 155 例舌鳞癌患者中, PARP-1 高表达者 (17.8%) 淋巴结转移明显高于 PARP-1 低表达者 (3.1%), PARP-1 高表达率随 N 分期 (54.0%, 80.0%, 100%)、病理分期 (42.7%, 68.9%, 72.7%, 100%) 的升高增高, 随 T 分期 (45.7%, 71.8%, 66.7%) 的升高呈增高趋势, 见图 2。

2.3 PARP-1 表达水平与舌鳞癌患者的复发和预后的关系

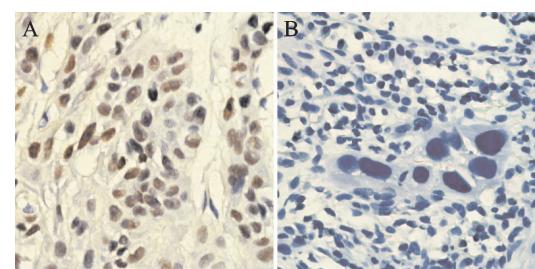
155 例舌鳞癌患者中 55 例患者复发, PARP-1 高表达组中 43.3% (39/90) 患者复发, 明显高于 PARP-1 低表达组 (24.6%, 16/65), 两者间差异有统计学意义 ($P = 0.026$), PARP-1 高表达者和 PARP-1 低表达者的无瘤生存曲线见图 3。患者总的 3 年生存率和 5 年生存率分别为 81.3% 和 75.5%, PARP-1 高表达者

3 年生存率和 5 年生存率分别为 76.4% 和 70.7%，PARP-1 低表达者 3 年生存率和 5 年生存率分别为 87.7% 和 84.6%，PARP-1 高表达者和 PARP-1 低表达者的生存曲线，见图 4，Logrank 检验两者的差异有统计学意义 ($P = 0.037$)。

表 1 155 例舌鳞癌组织中 PARP-1 表达与临床病理因素的关系

Table 1 The relationship of expression of PARP-1 with clinicopathologic factors in 155 tongue specimens

Characteristics	Number	PARP-1		Chi-Square	P	Contingency coefficient
		overexpression	low expression			
Age(years)						
≤53	79	46	33			
>53	76	44	32	0.002	0.548	
Gender						
Male	95	58	37			
Female	60	32	28	0.900	0.217	
T stage						
T1	81	37	44			
T2	71	51	20	10.841	0.002	0.254
T3	3	2	1			
Lymph node metastasis(N)						
N0	137	74	63			
N1	10	8	2	8.962	0.007	0.230
N2	8	8	0			
Pathological stage						
I	75	32	43			
II	61	42	19			
III	11	8	3			
IV	8	8	0	17.151	0.000	0.314
Histology						
I	124	73	51			
II	28	16	12	0.905	0.743	
III	3	1	2			



A: specimens of OTSCC; B: specimens of adjacent normal tongue mucosa tissues

图 1 PARP-1 在舌鳞癌组织和邻近正常舌组织中的表达 (SP $\times 400$)

Figure 1 PARP-1 was expressed in OTSCC and specimens of adjacent normal tongue mucosa (SP $\times 400$)

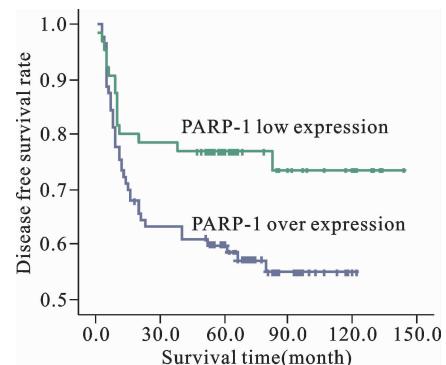


图 3 PARP-1 表达水平与无瘤生存时间

Figure 3 The PARP-1 expression level and disease free survival

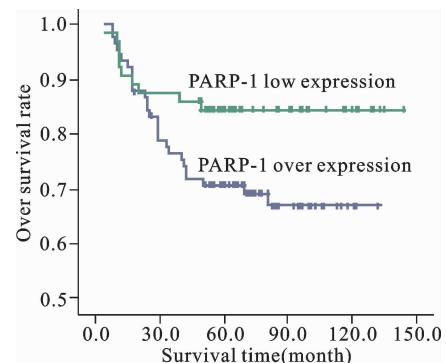
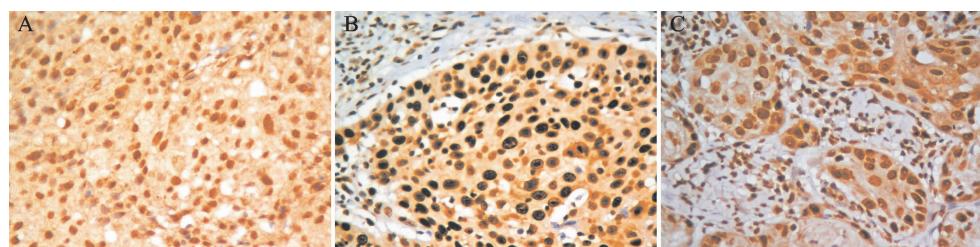


图 4 PARP-1 表达水平与总生存时间

Figure 4 The PARP-1 expression level and overall survival



A: expression of PARP-1 in pathological stage III OTSCC; B: expression of PARP-1 in pathological stage II OTSCC; C: expression of PARP-1 in pathological stage I OTSCC

图 2 PARP-1 在不同病理分级舌鳞癌组织中的表达 (SP $\times 400$)

Figure 2 PARP-1 expression in OTSCC of different pathological classification (SP $\times 400$)

3 讨论

PARP-1 包括 DNA 结合域(DNA-binding domain,DBD)、自身修饰域(the automodification domain,AMD)和 C-端催化域,其中 DBD 含有 2 个锌指结构(F1 和 11)及核定位信号(nuclear localization signal,NLS),AMD 含有自身聚 ADP 核糖基化靶位;C-端催化域含有 NAD 结合位点。肿瘤细胞 DNA 受损断裂时,PARP-1 利用 DBD 内含有的 2 个锌指结构结合在 DNA 损伤处,AMD 及 C-端催化域利用 NAD⁺内 ADP 核糖合成 ADP 核糖聚合体,修复受损 DNA,帮助肿瘤细胞受损 DNA 恢复正常结构,保持肿瘤细胞的增殖活性^[4-5,12-13]。

Nosho 等^[10]研究发现,PARP-1 在 70% (64/91) 的结直肠肿瘤中高表达,在邻近的非肿瘤组织中 PARP-1 的表达则非常低,并且 PARP-1 的表达水平与肿瘤的体积有关。Staibano 等^[6]对恶性黑色素瘤的研究发现,PARP-1 的表达随 T 分期的升高增加。Shimizu 等^[8]通过蛋白印记分析,发现 PARP-1 在肝癌组织中的表达比在癌旁组织中的表达明显增高($P < 0.01$)。Brustman^[14]对浆液性卵巢癌的研究发现,PARP-1 在 76% 的浆液性卵巢癌中高表达,并且 PARP-1 的表达随着浆液性卵巢癌 FIGO 分期的升高增加($P = 0.0075$)。Rajaei-Behbahani 等^[15]对喉癌的研究发现,PARP-1 的表达可增加喉癌的发生风险。本研究结果显示,155 例舌鳞癌石蜡组织切片中,PARP-1 表达占 89.0% (138/155),其中 58.1% (90/155) 呈高表达,41.9% (65/155) 呈低表达;13 例邻近正常舌石蜡组织均无 PARP-1 表达,两者的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 64.815$, $P = 0.000$)。并且 PARP-1 的表达与 T 分期、N 分期、病理分期呈正相关。这提示 PARP-1 的表达情况可能与舌鳞癌的发生与发展相关,检测 PARP-1 表达水平,有助于正确的评估舌鳞癌患者的 T 分期、N 分期、病理分期,为舌鳞癌患者制定更为合理的手术治疗方案,在根治肿瘤的同时最大限度的保留正常组织,提高患者的生活质量。

Staibano 等^[6]对恶性黑色素瘤的研究发现,PARP-1 的表达水平与恶性黑色素瘤患者的复发密切相关,PARP-1 中/高表达的患者与 PARP-1 阴性/低表达的患者相比,无瘤生存时间明显缩短。Brustmann^[14]对浆液性卵巢癌的研究发现,PARP-1 的表达越高,患者的预后越差($P = 0.0196$)。在本研究中 PARP-1 的表达情况与舌鳞癌患者的复发和预后和也显示了同样的相关性,本研究结果显示 PARP-1 高表达舌鳞癌患者的无瘤生存时间比 PARP-1 低表达者短,这表明 PARP-1 高表达者容易复发。PARP-1 高表达舌鳞癌患者的总生存时间比 PARP-1 低表达者短,PARP-1 高表达舌鳞癌患者与 PARP-1 低表达者相比 3 年生存率和 5 年生存率明显降低。这些研究结果提示,PARP-1 高表达舌鳞癌患者的生存率降低,易出现预后不良现象,PARP-1 的表达情况可作

为预测舌鳞癌患者复发及评估舌鳞癌患者预后的一项重要参考指标。通过检测 PARP-1 表达水平,对 PARP-1 高表达舌鳞癌患者应完善相应的治疗措施,采取更加积极彻底治疗方案,如扩大切除范围,术前放化疗或补充术后放疗,并密切随访。

目前已有不少文献表明 PARP-1 表达与许多恶性肿瘤如恶性淋巴瘤、乳腺癌、肝癌、子宫内膜癌、结肠癌的发生发展相关^[6-10]。本文初步探讨了 PARP-1 与舌鳞癌患者的年龄、性别、T 分期、N 分期、病理分期、病理分化、复发及预后的相关性。进一步的确认需要更加深入的研究,如通过 Western blot, qPCR 等方法检测肿瘤细胞中 PARP-1 的表达水平;通过细胞实验及动物实验进一步证明 PARP-1 的表达水平与舌鳞癌发生发展的关系。

参考文献:

- Cooper JS, Porter K, Mallin K, et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck; 10-year update[J]. Head Neck, 2009, 31(6): 748-58.
- Rusthoven K, Ballonoff A, Raben D, et al. Poor prognosis in patients with stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma[J]. Cancer, 2008, 112(2): 345-51.
- Rusthoven KE, Raben D, Song JI, et al. Survival and patterns of relapse in patients with oral tongue cancer[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2010, 68(3): 584-9.
- Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(5): 421-40.
- Woodhouse BC, Dianov GL. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery[J]. DNA Repair (Amst), 2008, 7(7): 1077-86.
- Staibano S, Pepe S, Lo Muzio L, et al. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region[J]. Hum Pathol, 2005, 36(7): 724-31.
- Alli E, Sharma VB, Sunderesakumar P, et al. Defective repair of oxidative dna damage in triple-negative breast cancer confers sensitivity to inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3589-96.
- Shimizu S, Nomura F, Tomonaga T, et al. Expression of poly (ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance[J]. Oncol Rep, 2004, 12(4): 821-5.
- Ghabreau L, Roux JP, Frappart PO, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1, a novel partner of progesterone receptors in endometrial cancer and its precursors[J]. Int J Cancer, 2004, 109(3): 317-21.
- Nosho K, Yamamoto H, Mikami M, et al. Overexpression of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(14): 2374-81.
- Radovits T, Lin LN, Zotkina J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by reactive oxidant hydrogen peroxide in vitro[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 564(1-3): 158-66.
- Noren Hooten N, Kompaniez K, Barnes J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1)[J]. J Biol Chem, 2011, 286(52): 44679-90.
- Nguyen D, Zajac-Kaye M, Rubinstein L, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition enhances p53-dependent and -independent DNA damage responses induced by DNA damaging agent[J]. Cell Cycle, 2011, 10(23): 4074-82.
- Brustmann H. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression in serous ovarian carcinoma: correlation with p53, MIB-1, and outcome[J]. Int J Gynecol Pathol, 2007, 26(2): 147-53.
- Rajaei-Behbahani N, Schmezer P, Ramroth H, et al. Reduced poly (ADP-ribosylation) in lymphocytes of laryngeal cancer patients: results of a case-control study[J]. Int J Cancer, 2002, 98(5): 780-4.

[编辑:周永红;校对:邱颖慧]