

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170725.003

网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170725.0906.006.html

# LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 在鼻咽癌中的表达及其与肿瘤恶性程度的相关性

许 斌<sup>1</sup>, 蔡 莹<sup>2</sup>, 宋启斌<sup>1</sup> ✉

(湖北省武汉大学人民医院 1.肿瘤一科, 2.肿瘤四科, 湖北 武汉 430060)

**[摘要]** **目的:** 鼻咽癌中 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 的表达及其与肿瘤恶性程度的相关性。 **方法:** 选择在本院经纤维鼻咽镜下活组织证实为鼻咽癌以及轻度慢性鼻炎黏膜炎症的组织, 抽提组织中的 RNA 后采用荧光定量 PCR 试剂盒检测 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 以及上皮间质转化基因、细胞周期基因的表达量。 **结果:** 鼻咽癌病灶中 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶且临床分期越晚, 鼻咽癌病灶中 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 的 mRNA 表达量越高; 鼻咽癌病灶中 E-cadherin 的 mRNA 表达量显著低于鼻炎黏膜炎症病灶且与 LMP2A、Gli1 呈负相关, N-cadherin、Vimentin、ZEB2 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶且与 LMP2A、Gli1 呈正相关; 鼻咽癌病灶中 CyclinD1、CyclinE、PCNA 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶且与 AnnexinA2、Rad52 呈正相关。 **结论:** 鼻咽癌中 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 的高表达能够促进癌细胞的上皮间质转化及细胞周期的进程。

**[关键词]** 鼻咽癌; LMP2A; AnnexinA2; Rad52; Gli1; 细胞周期

**[中图分类号]** R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2017)14-1945-04

## LMP2A, AnnexinA2, Rad52 and Gli1 expression in nasopharyngeal carcinoma and their correlation with tumor malignancy

XU Bin<sup>1</sup>, CAI Ying<sup>2</sup>, SONG Qi-bin<sup>1</sup> ✉

(1. Oncology Department No. 1, Renmin Hospital of Wuhan University in Hubei Province, Wuhan City, Hubei Province, 430060; 2. Oncology Department No. 4, Renmin Hospital of Wuhan University in Hubei Province, Wuhan City, Hubei Province, 430060)

**[Foundation Project]:** It is supported by Surface Project of National Natural Science Foundation of China (81372407).

**[Author]:** XU Bin (1987-), Male, M.D., Attending Physician, Tel: 18963940661, E-mail: xubin\_oncology@163.com.

**[Correspondence to]:** SONG Qi-bin (1962-), Male, M.D., Chief Physician, Tel: 027-88041911-82281, E-mail: qibinsong@163.com.

Received: 2017-07-10 Revised: 2017-07-18

JHMC, 2017; 23(14); 1945-1948

**View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.**

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the LMP2A, AnnexinA2, Rad52 and Gli1 expression in nasopharyngeal carcinoma and their correlation with tumor malignancy. **Methods:** Nasopharyngeal cancer tissue confirmed by fiberoptic nasopharyngoscopic biopsy and mild chronic rhinitis mucosa inflammation tissue in Renmin Hospital of Wuhan University between May 2014 and February 2017 were selected to extract the RNA, and then fluorescence quantitative PCR kits were used to determine the ex-

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81372407)

**[作者简介]** 许斌(1987-),男,江苏常州人,博士,主治医师,电话: 18963940661, E-mail: xubin\_oncology@163.com。

**[通讯作者]** 宋启斌(1962-),男,湖北武汉人,博士,主任医师,电话: 027-88041911-82281, E-mail: qibinsong@163.com。

**[收稿日期]** 2017-07-10 **[修回日期]** 2017-07-18 **网络出版时间:** 2017-07-25 09:06:31

pression of LMP2A, AnnexinA2, Rad52, Gli1, epithelial-mesenchymal transition genes and cell cycle genes. **Results:** LMP2A, AnnexinA2, Rad52 and Gli1 mRNA expression in nasopharyngeal cancer lesions were significantly higher than those in rhinitis mucosa inflammation lesions, and the later the clinical stage was, the higher the LMP2A, AnnexinA2, Rad52 and Gli1 mRNA expression in nasopharyngeal cancer lesions would be; E-cadherin mRNA expression in nasopharyngeal cancer lesions was significantly lower than that in rhinitis mucosa inflammation lesions and negatively correlated with LMP2A and Gli1 while N-cadherin, Vimentin and ZEB2 mRNA expression were significantly higher than those in rhinitis mucosa inflammation lesions and positively correlated with LMP2A and Gli1; CyclinD1, CyclinE and PCNA mRNA expression in nasopharyngeal cancer lesions were significantly higher than those in rhinitis mucosa inflammation lesions and positively correlated with AnnexinA2 and Rad52. **Conclusions:** The high expression of LMP2A, AnnexinA2, Rad52 and Gli1 in nasopharyngeal carcinoma can promote epithelial-mesenchymal transition and cell cycle process in cancer cells.

[KEY WORDS] Nasopharyngeal carcinoma; LMP2A; AnnexinA2; Rad52; Gli1; Cell cycle

鼻咽癌是我国常见的头颈部恶性肿瘤之一,南方是高发地区。目前,放疗是治疗鼻咽癌的首选方式,放射线能够有效杀伤癌细胞并使疾病的5年局部控制率达到80%~90%。尽管如此,仍有部分鼻咽癌患者的预后较差,局部复发、浸润及远处转移是影响预后的重要因素<sup>[1,2]</sup>。在肿瘤复发、浸润及转移的过程中,癌细胞的增殖、侵袭是与之密切相关的生物学行为,但目前关于鼻咽癌细胞增殖、侵袭的调控机制尚未明确。潜伏膜蛋白2A(latent membrane protein 2A,LMP2A)和胶质瘤相关癌基因同源蛋白1(glioma-associated oncogene homologue 1,Gli1)是参与细胞上皮间质转化(EMT)调控的重要蛋白,能够通过诱导EMT过程来促进细胞侵袭<sup>[3,4]</sup>;AnnexinA2、Rad52是参与细胞周期进程调控的重要蛋白,能够通过加速细胞周期来促进细胞增殖<sup>[5,6]</sup>。在下列研究中,我们具体分析了鼻咽癌中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1的表达及其与肿瘤恶性程度的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2014年5月~2017年2月期间在武汉大学人民医院纤维鼻咽镜下活组织检查诊断为鼻咽癌的患者以及诊断为轻度慢性鼻炎黏膜炎症的患者,留取相应的组织样本。鼻咽癌患者共78例,包括男性53例、女性25例,年龄41~64岁;轻度慢性鼻炎黏膜炎症患者共45例,包括男性28例、女性17例,年龄38~62岁。鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶组织样本来源的一般资料比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 1.2 组织样本采集方法

纤维鼻咽镜下活组织检查时,留取适量鼻咽癌病灶组织和鼻炎黏膜炎症病灶组织,生理盐水清洗数次后用滤纸吸尽水分,放入冻存管并在液氮中短暂冷冻20分钟,取出后放置

在-70摄氏度冰箱保存。

### 1.3 基因表达检测方法

取不同来源的组织样本适量,加入Takara公司的RNAiso裂解液适量,萃取得到组织中的RNA,而后采用Promega公司的反转录试剂盒将RNA反转录合成为cDNA。设计LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、ZEB2、CyclinD1、CyclinE、PCNA的引物并对cDNA样本进行荧光定量PCR扩增,根据扩增曲线计算相应基因的mRNA表达量。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS22.0软件录入数据并进行分析,两组间数据进行 $t$ 检验、四组间数据进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1表达量的差异

鼻咽癌病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1的mRNA表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶。鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1表达量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

组织来源	<i>n</i>	LMP2A	AnnexinA2	Rad52	Gli1
鼻咽癌	78	2.19±0.33	2.45±0.31	1.94±0.22	2.86±0.39
鼻炎黏膜炎症	45	1.06±0.13	1.01±0.12	0.95±0.14	1.03±0.16
<i>t</i>		10.948	13.285	10.221	15.585
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 2.2 不同肿瘤临床分期鼻咽癌病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1表达量的差异

II期、III期、IV期鼻咽癌病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1的mRNA表达量显著高于I期,III期、IV期鼻咽癌病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1的mRNA表达量显著高于II期,IV期鼻咽癌病灶中LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1的mRNA表达量显著高于III期。不同肿

瘤临床分期鼻咽癌病灶中 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 表达量两两比较的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 不同肿瘤临床分期鼻咽癌病灶中 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

临床分期	n	LMP2A	AnnexinA2	Rad52	Gli1
I 期	13	1.42±0.18	1.63±0.20	1.39±0.17	1.72±0.18
II 期	26	1.89±0.22 <sup>①</sup>	2.03±0.27 <sup>①</sup>	1.77±0.22 <sup>①</sup>	2.41±0.31 <sup>①</sup>
III 期	21	2.31±0.35 <sup>①②</sup>	2.76±0.33 <sup>①②</sup>	2.31±0.34 <sup>①②</sup>	3.15±0.41 <sup>①②</sup>
IV 期	18	2.87±0.42 <sup>①②③</sup>	3.51±0.41 <sup>①②③</sup>	2.80±0.45 <sup>①②③</sup>	3.88±0.52 <sup>①②③</sup>

注:与 I 期鼻咽癌病灶比较,①  $P < 0.05$ ;与 II 期鼻咽癌病灶比较,②  $P < 0.05$ ;与 III 期鼻咽癌病灶比较,③  $P < 0.05$ 。

### 2.3 鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中 EMT 基因的表达量及其与 LMP2A、Gli1 的相关性

鼻咽癌病灶中 E-cadherin 的 mRNA 表达量显著低于鼻炎黏膜炎症病灶, N-cadherin、Vimentin、ZEB2 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶。鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、ZEB2 表达量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Pearson 检验显示: LMP2A、Gli1 的 mRNA 表达量与 E-cadherin 呈负相关,与 N-cadherin、Vimentin、ZEB2 呈正相关。见表 3。

表 3 鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中 EMT 基因的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

组织来源	n	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	ZEB2
鼻咽癌	78	0.41±0.06	2.65±0.35	3.15±0.51	2.04±0.31
鼻炎黏膜炎症	45	1.05±0.13	1.02±0.14	0.97±0.12	1.08±0.11
t		13.272	16.029	14.587	9.287
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 2.4 鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中细胞周期基因的表达量及其与 AnnexinA2、Rad52 的相关性

鼻咽癌病灶中 CyclinD1、CyclinE、PCNA 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶。鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中 CyclinD1、CyclinE、PCNA 表达量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Pearson 检验显示: AnnexinA2、Rad52 的 mRNA 表达量与 CyclinD1、CyclinE、PCNA 呈正相关。见表 4。

表 4 鼻咽癌病灶和鼻炎黏膜炎症病灶中细胞周期基因的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

组织来源	n	CyclinD1	CyclinE	PCNA
鼻咽癌	78	1.98±0.24	2.96±0.42	2.21±0.32
鼻炎黏膜炎症	45	1.03±0.16	1.01±0.15	0.98±0.14
t		9.875	18.572	13.215
P		<0.05	<0.05	<0.05

## 3 讨论

侵袭性生长是造成鼻咽癌病情进展、预后不佳的重要病理因素。LMP2A 是 EB 病毒潜伏期基因表达的产物,其化学本质是一类磷酸化膜蛋白,胞内片段上 74 位和 85 位的酪氨酸残基能够形成 ITAM 基序并且能够识别含有 SH2 结构域的多种酪氨酸激酶,进而调节下游基因的表达并影响细胞的侵袭、迁移过程<sup>[7]</sup>。Gli1 是调节 Hedgehog 信号通路的核

转录因子, Hedgehog 与膜受体 Smo 及 Ptch 结合后,能够促进 Gli1 发生活化并与相应的靶基因结合,进而调节基因表达并影响细胞的侵袭、迁移过程<sup>[8]</sup>。近年来关于 LMP2A、Gli1 功能的研究认为,细胞的上皮间质转化(EMT)过程受到 LMP2A、Gli1 的调控。我们通过分析鼻咽癌病灶内上述两种与 EMT 密切相关的基因表达量可知:鼻咽癌病灶中 LMP2A、Gli1 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶且临床分期越高,鼻咽癌病灶中 LMP2A、Gli1 的 mRNA 表达量越高。这就说明 LMP2A、Gli1 的高表达与鼻咽癌的发生及恶性程度的增加密切相关,调节 EMT 过程是 LMP2A、Gli1 参与鼻咽癌病理进程的可能途径。

EMT 是组织中上皮表型逐步被间质表型取代的过程,该过程能够增强细胞的迁移和运动能力,促进细胞脱离原发部位并向周围浸润、向远处转移<sup>[9]</sup>。E-cadherin 是上皮表型的标志分子,能够维持上皮细胞间的黏附性和极性、使细胞锚定在原发部位<sup>[10]</sup>; N-cadherin 和 Vimentin 是间质表型的标志分子,能够降低细胞间的极性并促进细胞的迁移和运动<sup>[11]</sup>; ZEB2 是具有锌指结构的转录因子,对 E-cadherin 的表达具有阻碍作用,进而使得上皮表型减弱<sup>[12]</sup>。我们通过分析鼻咽癌病灶内 EMT 基因的表达量可知:鼻咽癌病灶中 E-cadherin 的 mRNA 表达量显著低于鼻炎黏膜炎症病灶, N-cadherin、Vimentin、ZEB2 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶。这就说明间质细胞表型增强、上皮细胞表型减弱与鼻咽癌的发生密切相关。进一步分析 LMP2A、Gli1 与 EMT 过程的相关性可知: LMP2A、Gli1 的 mRNA 表达量与 E-cadherin 呈负相关,与 N-cadherin、Vimentin、ZEB2 呈正相关。由此证实鼻咽癌病灶中高表达的 LMP2A、Gli1 能够影响 EMT 过程,促进上皮表型向间质表型转化并增强细胞的侵袭能力。

鼻咽癌的病理进程不仅与癌细胞的迁移和侵袭有关,同时还与细胞增殖活力的增强密切相关。AnnexinA2 是一类钙离子依赖的磷脂结合蛋白,主要定位于细胞质和细胞膜,能够通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路来影响多种细胞周期蛋白 cyclin 的表达,促进 cyclin 与 CDK 形成复合物并加速细胞周期的进程、促进细胞的增殖<sup>[13]</sup>。Rad52 是参与 DNA 损伤修复的分子,与 DNA 双链断裂后的修复密切相关; DNA 双链断裂是最严重的 DNA 损伤形式,被 Rad50-Mre11-NBS1 复合物切割为 ssDNA 后能够进一步与 Rad52 聚合,在 Rad52 的作用下进行 DNA 复制

并促进细胞周期的进程<sup>[14]</sup>。我们通过分析鼻咽癌病灶内上述两种与细胞周期密切相关的基因表达量可知:鼻咽癌病灶中 AnnexinA2、Rad52 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶且临床分期越高,鼻咽癌病灶中 AnnexinA2、Rad52 的 mRNA 表达量越高。这就说明 AnnexinA2、Rad52 的高表达与鼻咽癌的发生及恶性程度的增加密切相关,调节细胞周期进程是 AnnexinA2、Rad52 参与鼻咽癌病理进程的可能途径。

细胞周期的调控依赖于 Cyclin、CDK 以及相应的抑制因子 CDKI 间的相互影响和相互作用。CyclinD1、CyclinE 是参与鼻咽癌病灶内细胞周期调控的重要分子。CyclinD1 能够与 CDK4 和 CDK6 形成复合物并促进细胞周期由 G0 期进入 G1 期,CyclinE 能够与 CDK2 形成复合物并促进细胞周期由 G1 期进入 S 期;同时,Cyclin/CDKs 复合物的形成还能引起 Rb 磷酸化、增加 E2F 释放并调节多种靶基因表达,进而促进细胞增殖<sup>[15]</sup>。PCNA 主要参与 DNA 复制过程的调控,同时能够影响细胞周期的进程<sup>[16]</sup>。我们通过分析鼻咽癌病灶内细胞周期基因的表达量可知:鼻咽癌病灶中 CyclinD1、CyclinE、PCNA 的 mRNA 表达量显著高于鼻炎黏膜炎症病灶。这就说明细胞周期加速与鼻咽癌的发生密切相关。进一步分析 AnnexinA2、Rad52 与细胞周期进程的相关性可知:AnnexinA2、Rad52 的 mRNA 表达量与 CyclinD1、CyclinE、PCNA 呈正相关。由此证实鼻咽癌病灶中高表达的 AnnexinA2、Rad52 能够加速细胞周期进程、促进细胞增殖。

鼻咽癌中 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 的表达量显著升高;高表达的 LMP2A、AnnexinA2、Rad52、Gli1 能够促进癌细胞的上皮间质转化及细胞周期的进程。

## 参考文献

- 1 Xue F, Hu C, He X. Long-term Patterns of Regional Failure for Nasopharyngeal Carcinoma following Intensity-Modulated Radiation Therapy[J]. *J Cancer*, 2017, 8(6): 993-999.
- 2 Chen FP, Zhou GQ, Qi ZY, et al. Prognostic value of cervical nodal tumor volume in nasopharyngeal carcinoma: Analysis of 1230 patients with positive cervical nodal metastasis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176995.
- 3 Liang J, Zheng S, Xiao X, et al. Epstein-Barr virus-encoded

LMP2A stimulates migration of nasopharyngeal carcinoma cells via the EGFR/Ca2+ /calpain/ITGβ4 axis [J]. *Biol Open*, 2017, 6(6): 914-922.

- 4 Wang D, Cao Y, Zheng L, et al. Identification of Annexin A2 as a target protein for plant alkaloid matrine[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(36): 5020-5023.
- 5 Kan Y, Batada NN, Hendrickson EA. Human somatic cells deficient for RAD52 are impaired for viral integration and compromised for most aspects of homology-directed repair [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2017, 55: 64-75.
- 6 Yu B, Gu D, Zhang X, et al. GLI1-mediated regulation of side population is responsible for drug resistance in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 27412-27427.
- 7 Cao Q, Zhang D, Mao Y, et al. A human Fab exclusively binding to the extracellular domain of LMP2A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(2): 226-231.
- 8 Lin Z, Li S, Sheng H, et al. Suppression of GLI sensitizes medulloblastoma cells to mitochondria-mediated apoptosis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(12): 2469-2478.
- 9 Liao ZW, Zhao L, Cai MY, et al. P300 promotes migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2): 763-769.
- 10 Zhang RL, Peng LX, Yang JP, et al. IL-8 suppresses E-cadherin expression in nasopharyngeal carcinoma cells by enhancing E-cadherin promoter DNA methylation [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 207-214.
- 11 Sun H, Liu M, Wu X, et al. Overexpression of N-cadherin and β-catenin correlates with poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1725-1730.
- 12 Jiang Q, Zhou Y, Yang H, et al. A directly negative interaction of miR-203 and ZEB2 modulates tumor stemness and chemotherapy resistance in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41): 67288-67301.
- 13 Chen CY, Lin YS, Chen CL, et al. Targeting annexin A2 reduces tumorigenesis and therapeutic resistance of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 26946-26959.
- 14 Lieberman R, Pan J, Zhang Q, et al. Rad52 deficiency decreases development of lung squamous cell carcinomas by enhancing immuno-surveillance [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 34032-34044.
- 15 Xu M, Cheung CC, Chow C, et al. Overexpression of PIN1 Enhances Cancer Growth and Aggressiveness with Cyclin D1 Induction in EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156833.
- 16 Wang J, Mei F, Gao X, et al. Identification of genes involved in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2375-2380.