

CIITA 表达与喉鳞状细胞癌(LSCC)患者预后的关系

薛乙¹ 汤迪¹ 翟长文² 袁存存² 衡宇¹ 周梁¹ 陶磊^{1△} 路丽明³

(¹复旦大学附属耳鼻喉科医院耳鼻喉科, ²病理科 上海 200031; ³上海交通大学医学院免疫研究所 上海 200025)

【摘要】 目的 探讨 MHC-Ⅱ 类反式激活蛋白(class Ⅱ trans-activator, CIITA)的表达水平与喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)患者预后的关系。方法 收集 2013 年 9 月至 2015 年 6 月于复旦大学附属耳鼻喉科医院行手术治疗的喉癌患者的病例资料及组织标本。根据纳入标准最终入组 67 例,采用免疫组化方法检测 LSCC 组织标本中 CIITA 的表达情况。采用 χ^2 检验、Kaplan-Meier、Log-rank 检验、Cox 比例风险模型多因素回归方法对 CIITA 的表达水平与 LSCC 患者的临床特征、术后总生存期(overall survival, OS)之间的关系进行分析。利用 GEPIA 分析 CIITA 的表达与头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)预后的关系。结果 CIITA 的表达与 LSCC 的病理分级、临床分期、年龄、性别等临床特征无明显相关性;Kaplan-Meier 分析显示在 LSCC 患者中 CIITA 高表达较低表达的预后好($P<0.05$);GEPIA 分析显示 HNSCC 患者中 CIITA 高表达较低表达的预后好($P<0.05$);Cox 多因素回归分析显示饮酒、CIITA 的表达、淋巴结转移是 LSCC 术后生存时间的独立影响因素。结论 CIITA 表达与 LSCC 患者术后 OS 的关系密切,可作为预测 LSCC 患者预后的辅助指标之一。

【关键词】 Ⅱ 类反式激活蛋白(CIITA); 喉鳞状细胞癌(LSCC); 预后

【中图分类号】 R767 **【文献标识码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2020.02.009

Relationship between CIITA expression and prognosis of patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC)

XUE Yi¹, TANG Di¹, ZHAI Chang-wen², YUAN Cun-cun², HENG Yu¹,
ZHOU Liang¹, TAO Lei^{1△}, LU Li-ming³

(¹Department of Otolaryngology, ²Department of Pathology, Eye Ear Nose and Throat Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China; ³Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the expression level of MHC class Ⅱ trans-activator (CIITA) and the prognosis of patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). **Methods** We collected case data and tissue specimens of patients with laryngeal cancer underwent surgery in hospital from Sep.2013 to Jun.2015. According to the inclusion criteria, 67 patients were enrolled in the study. The expression of CIITA in LSCC tissue samples was detected by immunohistochemistry. The relationship between the expression level of CIITA and the clinical features of LSCC patients and overall survival (OS) after surgery were analyzed by χ^2 test, Kaplan-Meier, Log-rank test and Cox proportional

国家自然科学基金(81772878, 30801283, 30972691); 上海市科委青年科技启明星项目(09QA1401000, 10QA1405900, 14411961900); 上海市卫生系统优秀青年人才培养计划(XYQ2011055, XYQ2011015); 上海市科委生物医药处西医类引导重点项目(14411961900); 国家重点研发计划项目(2017YFA0104500)

[△]Corresponding author E-mail: doctortaolei@163.com

网络首发时间: 2020-01-02 18:19:04 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/31.1885.r.20191231.0834.030.html>

hazard model. The relationship between the expression level of CⅡTA and the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients by GEPIA. **Results** The expression of CⅡTA was not associated with clinical features such as pathological grade, clinical stage, age and gender of LSCC ($P > 0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that among LSCC patients, CⅡTA high expression has a better prognosis than CⅡTA low expression ($P < 0.05$). GEPIA analysis showed that CⅡTA high expression in patients with HNSCC had a better prognosis than CⅡTA low expression ($P < 0.05$). Cox multivariate regression analysis showed that alcohol consumption and CⅡTA high expression and lymph node metastasis were independent factors influencing postoperative survival time of patients with LSCC. **Conclusion** CⅡTA expression is closely related to postoperative OS in patients with LSCC. It can be used as an auxiliary index to predict the prognosis of patients with LSCC.

【Key words】 class Ⅱ trans-activator (CⅡTA); laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC); prognosis

*This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81772878, 30801283, 30972691), Shanghai Science and Technology Development Funds (09QA1401000, 10QA1405900, 14411961900), Training Program of the Excellent Young Talents of Shanghai Municipal Health System (XYQ2011055, XYQ2011015), Key Project of Western Medicine Guidance of Biomedical Division of Shanghai Science and Technology Commission (14411961900) and the National Key Research and Development Program (2017YFA0104500).

喉癌是头颈部肿瘤中最常见的类型^[1]。喉癌中最常见的病理类型是喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC),约占96%^[2]。喉癌的主要病因是吸烟、饮酒、老年和男性^[3-4]。目前LSCC的治疗方法主要有手术、放疗和化疗等,尽管诊疗手段不断提高,但在过去40年LSCC术后5年的生存率并无明显改善^[5]。因此迫切需要探索新的治疗方法或预测LSCC术后与预后相关的生物学指标,为治愈或延缓进展提供新的策略。

MHC-Ⅱ类反式激活蛋白(class Ⅱ trans-activator, CⅡTA)属于NOD样受体家族成员,是参与机体炎症反应的主要成分^[6]。炎症是参与肿瘤形成的重要因素之一^[7]。CⅡTA是调节MHC-Ⅱ分子调控的主控开关,也是IFN- γ 激活MHC-Ⅰ和MHC-Ⅱ分子转录的关键基因^[8]。CⅡTA所调控的MHC-Ⅰ/Ⅱ分子的表达水平与头颈部肿瘤免疫逃逸机制有密切的关系,表明CⅡTA在肿瘤免疫调节中的重要性^[9]。MHC-Ⅱ分子高表达的肿瘤通常预后较好,如非小细胞性肺癌^[10]、肝鳞状细胞癌^[11]等,而CⅡTA表达与肿瘤预后关系的研究较少,然而最近研究发现CⅡTA高表达的肿瘤与较好的预后相关^[11-12],这引起了我们对CⅡTA表达水平与LSCC预后关系进行探索性研究。

关于CⅡTA表达与LSCC患者预后关系的研究国内外尚未见报道。本研究结合CⅡTA在LSCC组织的表达水平与LSCC患者临床特征进行相关性

分析,并对CⅡTA表达水平与LSCC患者的预后进行初步研究,以期对LSCC的诊疗或预后评估提供新的思路。

资料和方法

临床资料 本研究经复旦大学附属眼耳鼻喉科医院医学伦理委员会审核批准(编号KJ200801),所有患者均签署知情同意书。收集我院2013年9月至2015年6月收治的80例喉癌患者术后的肿瘤组织样本并制作成组织芯片。入组标准:(1)首次行肿瘤根治性手术,且术前未接受过放疗、化疗;(2)确诊为喉鳞状细胞癌(术后病理);(3)随访和临床病例资料完整。排除标准:(1)喉非鳞状细胞癌(神经内分泌癌,腺癌,梭形细胞癌等);(2)伴有其他肿瘤病史;(3)伴有全身系统性疾病病史(系统性红斑狼疮,类风湿关节炎等)。根据上述标准,排除非鳞状细胞癌4例,伴有其他肿瘤1例,失访5例,术前放疗患者3例,最终纳入67例。喉癌的TNM临床分期参考第8版美国癌症协会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)制定的标准。吸烟和饮酒人群的界定为:吸烟 ≥ 20 支/天(持续时间 ≥ 1 年);饮酒 ≥ 200 mL/d(持续时间 ≥ 1 年)。目前已经戒烟/戒酒的人群(曾经吸烟/饮酒),统计为有吸烟史/饮酒史。随访终止时间为2018年10月16日,随访终止或患者死亡为观察终止时间,总生存期(overall

survival, OS)为LSCC术后到观察终止时间。

免疫组化 免疫组化主要试剂:一抗,兔抗人多克隆CIIITA抗体(美国Novus公司,NBP2-59072);二抗,HRP山羊抗兔(中国Beyotime公司,A0208);山羊血清(英国Abcam公司,ab7481)。参考CIIITA免疫组织化步骤,完成实验。首先,二甲苯浸泡脱蜡,梯度酒精(100%、95%、70%、50%)脱水各5 min;封闭内源性过氧化物酶(3% H_2O_2 , 15 min),PBS漂洗3遍(5 min/遍);抗原修复,抗原修复液(dd H_2O :柠檬酸钠缓冲液=100:1),微波炉(高火10 min,解冻2 min,中火7 min),待恢复至室温取出;加入一抗(1:300山羊血清稀释;对照组加入PBS);4℃过夜;16 h后取出;依次用PBST、PBS漂洗(均为3遍,5 min/遍);加入二抗(1:50山羊血清稀释);PBS漂洗3次(每次5 min),DAB显色5 min左右,显微镜检查染色情况,苏木素复染,进行后续处理,封片。

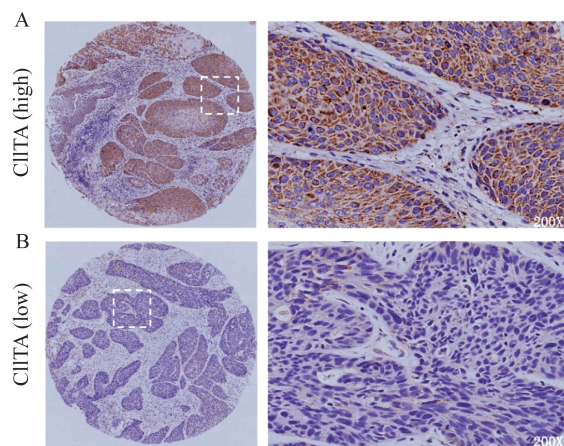
免疫组化结果分析 光学显微镜下观察位点染色情况,选取3个不同的视野,按照染色程度与面积计算染色的强弱,每次评分均由2位病理科医师双盲独立完成,且由第3位病理科医师复评以确保结果的准确性。染色强度评分:0(-),1(+),2(++),3(+++)。染色面积评分:0(0),1(1%~25%),2(26%~50%),3(51%~75%),4(76%~100%)。根据染色面积乘以染色强度的结果分为:CIIITA低表达组(0~6分);CIIITA高表达组(7~12分)。LSCC的肿瘤/间质细胞表达,均可认为CIIITA表达阳性。

GEPIA GEPIA是一种新开发的网络服务器,基于癌症基因数据库(TCGA)和基因组织表达数据库(GTEX),且有肿瘤(9 736个)和正常样本(8 587个)的RNA测序表达数据。GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)可提供多种功能^[13],如肿瘤患者生存分析、类似基因的检测以及某种基因在肿瘤或正常组织表达的差异性分析等。利用GEPIA分析CIIITA的表达与头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)患者预后的关系。

统计学分析 采用SPSS 23.0软件对数据进行统计学分析。用 χ^2 检验分析CIIITA的表达水平与LSCC患者临床特征的关系。用Kaplan-Meier法分析LSCC患者术后5年的OS,Log-rank检验计算P值。对CIIITA表达情况、淋巴结转移等因素进行Cox比例风险模型多因素回归分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

LSCC癌组织中CIIITA表达水平与患者临床特征的关系 本次研究共纳入67例患者(男性66例,女性1例),年龄38~84岁,平均61岁。根据免疫组化结果,分为CIIITA高表达组(图1A)和低表达组(图1B)。对CIIITA的表达与患者年龄、性别、吸烟、饮酒、临床分期、喉癌分型、肿瘤大小等临床特征的关系进行统计分析,结果显示CIIITA的表达水平与LSCC患者临床特征的差异均无统计学意义($P>0.05$,表1)。



A: High expression of CIIITA in LSCC; B: Low expression of CIIITA in LSCC.

图1 LSCC肿瘤组织中CIIITA的免疫组化结果

Fig 1 IHC results of CIIITA in LSCC tumor tissues

COX回归多因素分析结果 本研究将CIIITA的表达、淋巴结转移、饮酒等临床指标纳入COX多因素回归模型,结果显示饮酒、CIIITA的表达水平、肿瘤的淋巴结转移与LSCC患者术后生存时间密切相关(表2)。饮酒、CIIITA的表达及淋巴结转移均为LSCC术后OS的独立影响因素。

LSCC癌组织中CIIITA表达水平与预后的关系 67例LSCC患者,死亡33例,生存34例。CIIITA高表达组41例,平均生存时间(49.3 ± 2.6)个月,5年生存率为41.5%(24/41);CIIITA低表达组26例,平均生存时间(35.3 ± 3.9)个月,5年生存率为38.5%(10/26)。Kaplan-Meier法分析LSCC患者术后5年的OS结果显示,CIIITA高表达比CIIITA低表达的患者预后好(图2A, $P<0.05$)。

TCGA数据库CIIITA表达与HNSCC预后的关系 运用TCGA数据库对CIIITA的表达与HNSCC

表1 CⅡTA的表达水平与LSCC患者临床特征的关系
Tab 1 The relationship between CⅡTA expression level and clinicopathologic characteristics in LSCC patients

Characteristics	Case No.	CⅡTA (n)		P
		High	Low	
Age				
<60 y	17	10	7	0.816
≥60 y	50	31	19	
Gender				
Female	1	0	1	0.817
Male	66	41	25	
Smoking				
No	26	18	8	0.282
Yes	41	23	18	
Alcohol consumption				
No	42	26	16	0.877
Yes	25	15	10	
Stage of LSCC				
I+II	14	11	3	0.233
III+IV	53	30	23	
Typing of LSCC				
Glottic type	28	15	13	0.427
Supraglottic type	33	21	12	
Subglottic type	6	5	1	
Tumor size				
<3 cm	26	19	7	0.112
≥3 cm	41	22	19	
Histological grade				
Well	16	11	5	0.501
Moderate	40	22	18	
Poor	11	8	3	
Lymph node				
N0	34	24	10	0.109
N1+N2	33	17	16	

表2 多变量Cox比例回归生存分析
Tab 2 Multivariate Cox proportional regression survival analysis

Characteristics	Multivariate analysis HR(95%CI)	P
Alcohol consumption	2.827 (1.043-7.663)	0.041
CⅡTA (high/low)	0.405 (0.180-0.910)	0.029
Lymph node metastasis (yes/no)	3.257 (1.204-8.813)	0.020

的预后进行分析,可结合CⅡTA表达与LSCC预后的关系进行与之对比分析。结果显示,HNSCC患者中CⅡTA高表达组比低表达组预后好(图2B, $P<0.05$)。

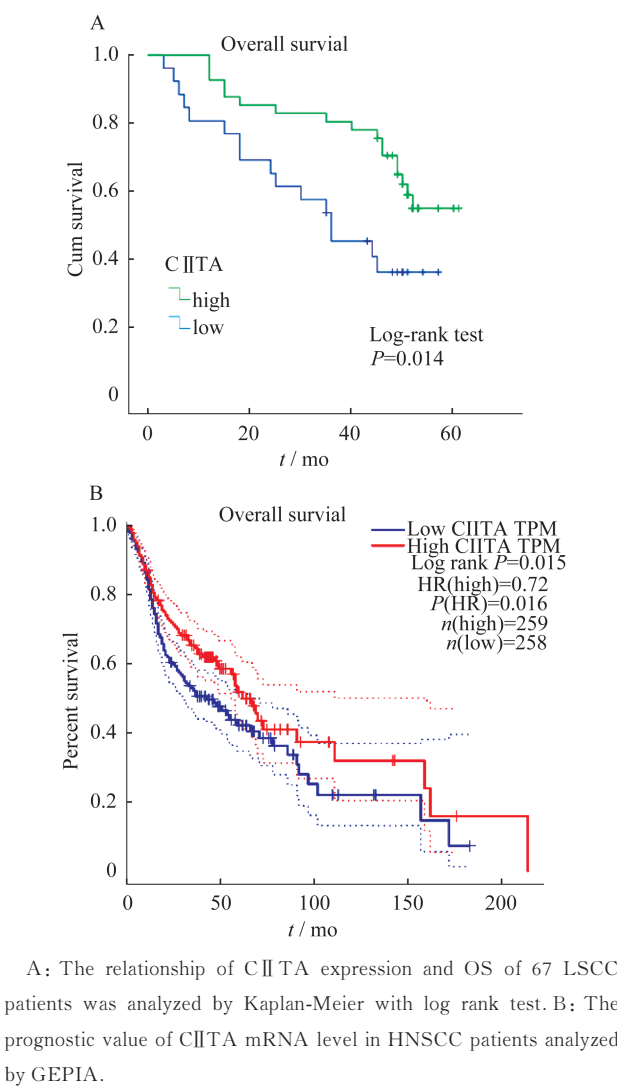


图2 CⅡTA与LSCC/HNSCC预后的关系
Fig 2 Relationship between CⅡTA and prognosis of LSCC/HNSCC

讨 论

随着MHC-I/Ⅱ分子在肿瘤免疫逃逸的作用及机制的研究不断明确,人们逐步认识到CⅡTA在肿瘤免疫的重要性。CⅡTA基因的缺陷会导致裸淋巴细胞综合征^[14],而CⅡTA分子的表达异常与头颈部鳞状细胞癌^[15]、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤^[16]等疾病发生相关。Yazawa等^[17]认为肿瘤细胞表达的MHC-Ⅱ分子可以将抗原肽呈递给辅助性T淋巴细胞,有助于抗肿瘤免疫反应。最近有研究认为CⅡTA在不同肿瘤组织中的表达,其预后也不尽相同^[12,18],这为探索CⅡTA表达与肿瘤的关系提供了一定的

研究基础。我们对CII TA分子表达水平与LSCC患者术后预后的关系进行了初步的研究。

CII TA可在多种肿瘤组织中表达,如三阴性乳腺癌^[12]、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤^[16]、脂肪肉瘤^[19]等。根据IHC结果,我们分析认为CII TA在LSCC的肿瘤细胞以及部分肿瘤间质细胞中均有表达。并将CII TA表达情况分为高表达组(图1A)和低表达组,对CII TA的表达水平与LSCC的临床特征进行统计学分析,结果显示差异无统计学意义,结果可能与研究样本量的多少有关,值得进一步研究。尽管CII TA表达与LSCC临床特征的分析无统计学差异,而Cox比例风险模型多因素回归分析结果显示饮酒、CII TA表达及淋巴结转移是LSCC术后生存时间的独立影响因素($P<0.05$),这表明LSCC的发生可能是一个复杂的多因素结果。

Kaplan-Meier法对LSCC术后5年的生存分析显示,CII TA高表达比低表达的LSCC患者术后预后好,差异有统计学意义($P<0.05$)。Xie等^[11]研究认为,肝鳞状细胞癌肿瘤组织中CII TA高表达经常伴有MHC-II分子的表达,且术后的无进展生存期更长。Forero等^[12]在对三阴性乳腺癌患者术后长达11年的随访后认为,CII TA高表达的三阴性乳腺癌有较好的预后,CII TA表达是三阴性乳腺癌术后无进展生存期的独立预后因素。我们推测CII TA高表达的LSCC患者预后较好可能与MHC-II分子的表达增加相关,其在LSCC肿瘤微环境中增强一系列的免疫应答反应,加强机体对肿瘤细胞的杀伤能力。我们运用GEPIA数据库分析CII TA的mRNA水平对HNSCC患者的预后价值,对研究结果进行辅助性验证,结果显示CII TA高表达组比低表达组预后好,差异有统计学意义($P<0.05$)。

然而,有研究认为CII TA的表达可能是增加肿瘤患者死亡风险的重要因素。Tan等^[18]认为CII TA表达升高能够增加肾透明细胞癌的死亡风险,CII TA的过表达诱导肿瘤细胞表达MHC-II分子参与免疫反应,加剧机体的免疫炎症反应而导致癌症进展加快。CII TA表达水平与肿瘤预后的关系不同,这可能与CII TA分子所处的肿瘤微环境不同密切相关,以至于CII TA在不同肿瘤类型发挥的作用可能不同,仍待进一步的研究和探讨。本研究仍有许多局限性:纳入的临床病例样本量不够大;纳入的女性

LSCC病例数相对较少;随访时间不够长。

总之,CII TA作为调控MHC-II分子表达的关键基因,在参与肿瘤免疫调控中发挥重要作用。本研究结果显示CII TA高表达的LSCC患者比低表达者预后好(OS)。本研究结果提示CII TA表达水平可能对LSCC患者术后诊疗及预后的预测有一定的参考意义。

参 考 文 献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1):7-30.
- [2] ALMADORI G, BUSSU F, CADONI G, et al. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: Towards an integrated clinicobiological approach [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(5):683-693.
- [3] ZHANG SS, XIA QM, ZHENG RS, et al. Laryngeal cancer incidence and mortality in China, 2010[J]. *J Cancer Res Ther*, 2015, 11(Suppl 2):C143-C148.
- [4] DE STEFANI E, CORREA P, OREGGIA F, et al. Risk factors for laryngeal cancer[J]. *Cancer*, 1987, 60(12):3087-3091.
- [5] STEUER CE, EL-DEIRYM, PARKS JR, et al. An update on larynx.cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):31-50.
- [6] AWAD F, ASSRAWI E, LOUVRIER C, et al. Inflammation biology, molecular pathology and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 187:133-149.
- [7] ZITVOGEL L, KEPP O, GALLUZZI L, et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses[J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(4):343-351.
- [8] DEVAIAH BN, SINGER DS. CII TA and its dual roles in MHC gene transcription[J]. *Front Immunol*, 2013, 4(476):1-6.
- [9] ECONOMOPOULOU P, AGELAKI S, PERISANIDIS C, et al. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Annals Oncol*, 2016, 27(9):1675-1685.
- [10] HE Y, ROZEBOOM L, RIVARD CJ, et al. MHC class II expression in lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2017, 112:75-80.
- [11] XIE XW, MEI MH, LIAO WJ, et al. Expression of CII TA-related MHCII molecules in tumors linked to prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(3):681-688.

- risk: a dose-response meta analysis of prospective cohort studies[J].*Oncotarget*,2018,9(19):15090-15100.
- [18] WANG RS, HU XY, GU WJ, *et al.* Tooth loss and risk of head and neck cancer: a meta-analysis[J].*PLoS One*, 2013, 8(8):e71122.
- [19] AKIFUSA S, SOH I, ANSAI T, *et al.* Relationship of number of remaining teeth to health-related quality of life in community-dwelling elderly [J]. *Gerodontology*, 2005, 22(2):91-97.
- [20] SATO F, OZE I, KAWAKITA D, *et al.* Inverse association between toothbrushing and upper aerodigestive tract cancer risk in a Japanese population[J].*Head Neck-J Sci Spec*, 2011, 33(11):1628-1637.
- [21] 蒯荷芽.放疗后牙周组织改变的短期观察研究[J].*中国医学创新*, 2016, 13(9):124-126.
- [22] 荣艳梅.化疗性口腔溃疡的护理方法[J].*临床医学研究与实践*, 2016, 1(14):171-173.
- [23] KENGNE TALLA P, GAGNON MP, DRAMAIX M, *et al.* Barriers to dental visits in Belgium: a secondary analysis of the 2004 National Health Interview Survey[J].*J Public Health Dent*, 2013, 73(1):32-40.
- [24] LIU J, ZHANG SS, ZHENG SG, *et al.* Oral health status and oral health care model in China[J].*Chin J Dent Res*, 2016, 19(4):207-215.
- [25] HU DY, HONG X, LI X. Oral health in China--trends and challenges[J].*Int J Oral Sci*, 2011, 3(1):7-12.
- [26] DOUGLASS CW, BERLIN J, TENNSTEDT S. The validity of self-reported oral health status in the elderly[J].*J Public Health Dent*, 1991, 51(4):220-222.
- (收稿日期:2019-04-26; 编辑:张秀峰)

(上接第 196 页)

- [12] FORERO A, LI Y, CHEN D, *et al.* Expression of the MHC Class II pathway in triple-negative breast cancer tumor cells is associated with a good prognosis and infiltrating lymphocytes[J].*Cancer Immunol Res*, 2016, 4(5):390-399.
- [13] TANG Z, LI C, KANG B, *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (W1) : W98-W102.
- [14] HANNA S, ETZIONI A. MHC class I and II deficiencies [J].*J Allergy Clin Immunol*, 2014, 134(2):269-275.
- [15] VORA AR, RODGERS S, PARKER AJ, *et al.* An immunohistochemical study of altered immunomodulatory molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma[J].*Br J Cancer*, 1997, 76(7):836-844.
- [16] MOTTOK A, WOOLCOCK B, CHAN FC, *et al.* Genomic alterations in CII TA are frequent in primary mediastinal large B cell lymphoma and are associated with diminished MHC class II Eexpression [J]. *Cell Reports*, 2015, 13(7):1418-1431.
- [17] YAZAWA T, ITO T, KAMMA H, *et al.* Complicated Mechanisms of Class II transactivator transcription deficiency in small cell lung cancer and neuroblastoma[J].*Am J Pathol*, 2002, 161(1):291-300.
- [18] TAN W, HILDEBRANDT MA, PU X, *et al.* Role of inflammatory related gene expression in clear cell renal cell carcinoma development and clinical outcomes[J].*J Urol*, 2011, 186(5):2071-2077.
- [19] MATHER Q, PRIEGO J, WARD K, *et al.* A novel protein expression. signature differentiates benign lipomas from well-differentiated liposarcomas[J].*Mol Clin Oncol*, 2017, 7(3):315-321.
- (收稿日期:2019-03-24; 编辑:王蔚)