

## EZH2 在舌鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

魏子程,程 杰\*,叶金海,江宏兵,吴煜农\*

(南京医科大学口腔医学研究所,南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨 EZH2 蛋白在舌鳞状细胞癌组织中的表达及其与临床病理的关系。方法:应用免疫组织化学染色法检测 EZH2 蛋白在 52 例舌鳞癌组织和 12 例正常舌组织标本中的表达。结合患者临床病理和随访资料,应用 SPSS17.0 软件分析 EZH2 的表达与相关临床病理参数以及患者总生存率之间的关系。结果:EZH2 在舌鳞癌组织中呈高表达,与在正常组织中的表达有显著统计学差异( $P < 0.001$ )。EZH2 蛋白表达与肿瘤病理学分级( $P = 0.033$ )、颈淋巴结转移( $P = 0.036$ )和局部浸润性( $P = 0.012$ )有关,而与患者的性别、年龄、肿瘤大小、临床分期无关( $P > 0.05$ )。Kaplan-Meier 法分析患者的总体生存情况发现 EZH2 高表达组患者的总体生存率明显低于 EZH2 低表达组患者( $P = 0.028$ ,Log-rank 检验)。结论:EZH2 在舌鳞状细胞癌组织中呈高表达,其表达水平与肿瘤病理学分级、颈淋巴结转移、局部浸润性及患者预后有关。

**[关键词]** 舌鳞状细胞癌; EZH2 基因; 免疫组织化学染色; 临床病理

**[中图分类号]** R739.86

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)09-1225-04

## The expression and clinical significance of EZH2 in tongue squamous cell carcinoma

WEI Zi-cheng, CHENG Jie\*, YE Jin-hai, JIANG Hong-bing, WU Yu-nong\*

(Institute of Stomatology, Department of Oral Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatology Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) and its relationship with various clinicopathological parameters. **Methods:** The EZH2 protein expression in 52 cases of TSCC and 12 cases normal tongue samples was examined by immunohistochemistry. Based on these patients' information and their follow-up data, the correlations of the EZH2 level with patients' clinicopathological characteristics and overall survival were further evaluated by statistical analyses using Fisher exact test and Kaplan-Meier method respectively. **Results:** The EZH2 was over-expressed in TSCC, which was statistically different from that in normal tongue ( $P < 0.001$ ). EZH2 over-expression was found to be associated with tumor grades ( $P = 0.033$ ), cervical lymph node metastasis ( $P = 0.036$ ) and the presence of local invasion ( $P = 0.012$ ), but not with gender, age, tumor size and clinical stage ( $P > 0.05$ ). The overall survival rates in patients with EZH2 high expression were significantly lower than those in patients with EZH2 low expression as estimated by Kaplan-Meier method and Log-rank test ( $P = 0.028$ ). **Conclusion:** EZH2 is over-expressed in TSCC and its upregulation is associated with tumor grades, cervical lymph node metastasis, local invasiveness and poor prognosis.

**[Key words]** tongue squamous cell carcinoma; EZH2; immunohistochemistry; clinicopathology

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1225-1228]

舌鳞状细胞癌是最常见的口腔颌面部恶性肿瘤,具有生长快,浸润性强,预后差等特点,5年生存

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81100737);江苏省自然科学基金(BK2011762;BK2010531);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20113234120003);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(2011-137)

\*通讯作者, E-mail: yunong\_wu@163.com; cj992118@yahoo.com.cn

率为 50%~60%。局部侵袭和淋巴转移是导致舌癌患者死亡的主要因素<sup>[1]</sup>。舌癌的发生发展是一个多基因改变、多步骤发展的复杂过程,其中表观遗传学改变是其中的核心环节之一。EZH2(enhancer of zeste homolog 2) 基因是多梳基因家族 (polycomb group genes, PcGs) 的重要成员,主要通过催化组蛋白 H3K27 三甲基化而引起相关基因的沉默,发挥表观遗传学调控作用<sup>[2]</sup>。近年来研究发现, EZH2 作为一

种新的癌基因,在多种恶性肿瘤组织中呈现异常高表达,并与患者的临床病理及预后密切相关<sup>[3]</sup>。然而,EZH2在舌鳞癌发生发展过程中的生物学作用研究较少。本研究旨在检测EZH2在临床舌鳞癌组织中的表达,并探讨其表达情况与患者临床病理参数及预后的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 舌癌标本

选择2000年1月~2007年12月就诊于南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科的52例舌鳞状细胞癌石蜡组织标本,其中男性患者28例,女性患者24例,平均年龄53.5岁(26~74岁)。纳入标准:术前未接受放、化疗的原发舌癌患者,所有患者均采用原发病灶扩大切除术和颈淋巴清扫术(肩胛舌骨上颈淋巴清扫或全颈清扫),原发病灶经术后常规病理均证实为舌鳞状细胞癌。患者的临床分期、病理分级等根据WHO TNM分期标准和病理学分级标准确定。所有患者均接受术后常规随访,资料齐全,平均随访42.3个月(2~101个月,从术后至最后1次随访时间点或患者死亡)。12例正常舌组织标本取自舌部非肿瘤手术,术后经常规病理检查确认为正常舌黏膜。所有标本均经常规处理,置于中性4%福尔马林液中固定12~24 h,逐级脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋。

#### 1.1.2 试剂

兔抗人EZH2单克隆抗体购自美国Cell Signaling公司(EZH2:D2C9 XPTM Rabbit mAb);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;抗小鼠/兔SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组织化学染色

所有石蜡组织标本切片(5 μm)后,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,经3%过氧化氢封闭10 min灭活内源性过氧化物酶后,应用0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液行微波抗原修复(pH 6.0, 15 min),经5%BSA封闭20 min后滴加EZH2一抗(1:50)4℃,过夜。次日分别滴加山羊抗兔二抗,SABC室温20 min,PBS充分洗涤后DAB显色。苏木素复染后,脱水透明,封片镜检。用PBS缓冲液代替一抗做空白阴性对照。

#### 1.2.2 判定标准

免疫组化阳性信号以胞核/胞浆出现棕黄色染

色为阳性细胞。每张染色切片均由两名口腔病理科医师进行双盲评价。染色结果评价采用半定量积分法判断,即基于染色强度和阳性分布细胞比例计分判定<sup>[4]</sup>。染色强度定义为:0:阴性;1:弱阳性;2:阳性;3:强阳性。阳性染色的细胞比例(百分比)通过镜下随机选择10个高倍镜视野的1000个肿瘤细胞,定义为1:<10%;2:11%~50%;3:51%~80%;4:>80%。免疫染色积分按“免疫组化积分=染色强度×阳性比例”公式计算得出,0分为阴性,1~4分为弱阳性,>4分为强阳性。

#### 1.3 统计学分析

应用SPSS17.0进行数据的统计学分析,并采用卡方、Fisher确切概率法对EZH2表达水平与患者的临床病理因素进行相关性分析,同时应用Kaplan-Meier法和Log-rank法分析患者的生存率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EZH2在舌鳞癌组织的表达

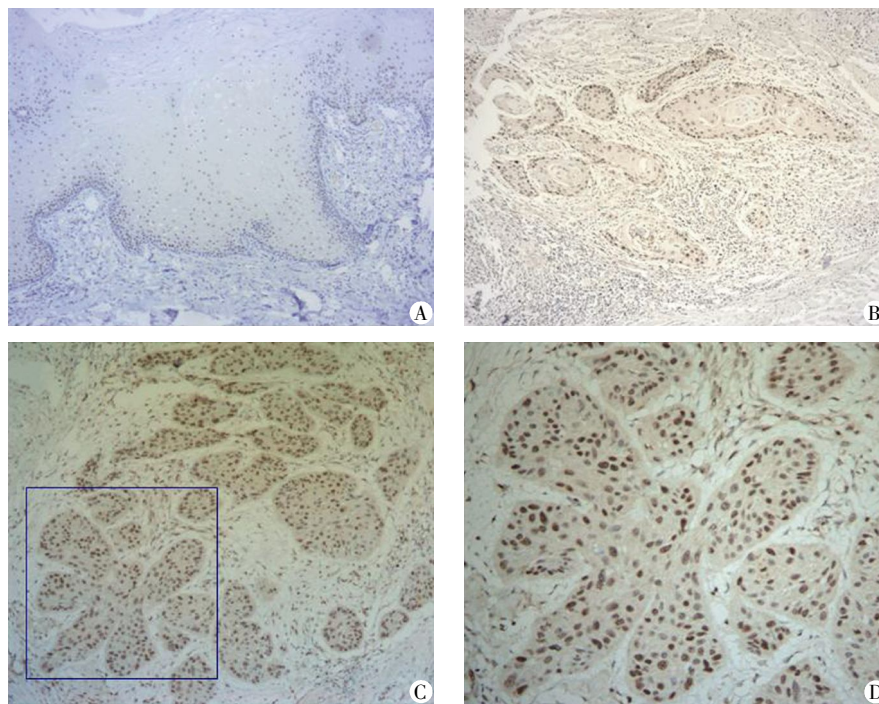
如图1所示,免疫组织化学染色结果显示EZH2蛋白的表达主要位于胞核,部分胞浆中有散在表达;在舌癌组织标本中EZH2主要在鳞癌上皮团块中表达,根据本研究免疫组化染色评价标准,其中有42例(80.7%)呈高表达,10例(19.3%)呈低表达,而在肿瘤周围组织表达很低。在正常黏膜组织中9例(75.0%)EZH2在上皮基层层呈散在弱表达,3例(25.0%)呈阴性,而在正常黏膜组织上皮其他层均未见表达。因此,EZH2在舌癌组织和正常舌黏膜组织的差异表达具有统计学意义( $P < 0.001$ )。

### 2.2 EZH2表达水平与患者临床病理参数的相关性

在所研究的52例舌癌患者中,EZH2蛋白表达与肿瘤病理学分级( $P = 0.033$ )、颈淋巴结转移( $P = 0.036$ )和局部浸润性( $P = 0.012$ )有关,而与患者的性别、年龄、肿瘤大小、临床分期无关( $P > 0.05$ ,表1)。EZH2蛋白在病理学II~III级舌癌标本中强阳性表达率明显高于I级的标本(90.2% vs 65.0%);在具有颈淋巴结转移的患者标本中强阳性率也明显高于无淋巴结转移的患者(92.5% vs 68.0%);在有局部浸润的标本中强阳性率也明显高于无局部浸润的患者(93.3% vs 63.6%)。

### 2.3 EZH2表达与患者总体生存率的关系

结合患者的临床随访资料,应用Kaplan-Meier法对患者的总体生存情况进行分析(图2),发现EZH2高表达组患者的总体生存率明显低于低表达



A: EZH2 在正常舌黏膜组织中呈低表达( $\times 100$ ); B: EZH2 在舌癌组织中呈低表达( $\times 100$ ); C: EZH2 在舌癌组织中呈高表达( $\times 100$ ); D: C 图局部放大( $\times 200$ )。

图 1 EZH2 在正常舌黏膜和舌癌组织中表达

Figure 1 EZH2 expression in normal tongue mucosa and TSCC

表 1 舌癌组织中 EZH2 的表达水平与临床病理参数的关系  
Table 1 Correlation between EZH2 expression and clinicopathological parameters in TSCC (n)

临床病理参数	例数	EZH2		P 值
		低表达	高表达	
性别				
男	28	7	21	0.309
女	24	3	21	
年龄(岁)				
$\leq 60$	35	6	29	0.711
$> 60$	17	4	13	
肿瘤大小				
$T_1 \sim T_2$	36	6	30	0.475
$T_3 \sim T_4$	16	4	12	
病理分级				
I	20	7	13	0.033
II ~ III	32	3	29	
颈淋巴结转移				
无	25	8	17	0.036
有	27	2	25	
局部浸润				
无	22	8	14	0.012
有	30	2	28	
临床分期				
I ~ II	22	5	17	0.725
III ~ IV	30	5	25	

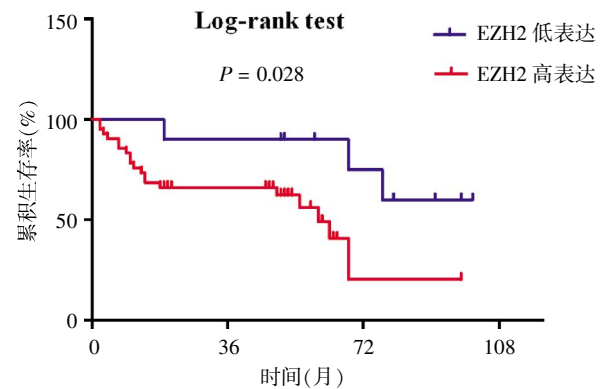


图 2 EZH2 的表达与患者总体生存率的关系(Kaplan-Meier 分析)

Figure 2 The relationship between EZH2 expression and the overall survival in patients with TSCC (Kaplan-Meier method)

组患者( $P = 0.028$ , Log-rank 检验)。

### 3 讨论

表观遗传学改变是肿瘤发生发展过程中的关键环节之一, 其中 PcG 基因家族介导的染色体重塑、基因表达调控和生长调控等在多种恶性肿瘤发生过程中的重要生物学作用逐渐被揭示<sup>[5]</sup>。EZH2 作为 PcG 家族的重要成员, 具有组蛋白甲基化转移酶和

组蛋白去乙酰化酶活性,通过调控组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸(H3K27)的三甲基化来沉默相关基因。目前研究发现:EZH2 是细胞增殖所必需的关键分子,在多种原发恶性肿瘤(前列腺癌、胃癌、乳腺癌和白血病等)中呈高表达<sup>[6-9]</sup>。本研究发现,EZH2 蛋白在舌鳞状细胞癌组织中的阳性表达率明显高于正常舌黏膜组织,提示 EZH2 作为一种癌基因可能是参与舌癌发生发展过程中的重要分子。

EZH2 基因定位于人染色体 7q35,包含 20 个外显子,共编码 613 个氨基酸,蛋白结构中含有 4 个高度保守的区域即 SET 结构域、富含半胱氨酸结构域和 2 个氨基末端结构域。该蛋白主要位于细胞核,参与染色体重塑和转录调控等生物学过程<sup>[10]</sup>。与既往研究一致,本研究发现 EZH2 蛋白主要定位于细胞的胞核内。值得注意的是在正常舌黏膜上皮中 EZH2 蛋白阳性可出现在基底层细胞中,这可能与上皮基底层中存在上皮干细胞或前体细胞以及 EZH2 参与调控干细胞的增殖分化作用有关<sup>[11]</sup>。

既往研究已证实,EZH2 蛋白的高表达与多种恶性肿瘤的临床病理参数有关。Matsukawa 等<sup>[7]</sup>应用免疫组织化学检测了 83 例胃癌组织标本中 EZH2 的表达,发现有 47 例呈高表达,而在正常胃黏膜上皮中呈低表达或不表达,并且 EZH2 的表达水平与肿瘤大小、组织类型、浸润深度和淋巴结转移等显著相关。另外,有研究发现在浸润性膀胱癌中 EZH2 基因的表达水平高于表浅肿瘤,而肿瘤组织中 EZH2 蛋白的表达高于正常膀胱上皮<sup>[12]</sup>。本研究结果证实,与其他实体肿瘤类似,人舌癌组织中 EZH2 蛋白的表达水平与肿瘤分级、颈淋巴结转移和局部浸润性呈显著相关。该结果与近来 Wang 等<sup>[13]</sup>对口腔舌癌标本的研究结论类似,即 EZH2 的过表达与舌鳞状细胞癌的临床病理特点密切相关。

结合组织标本中 EZH2 的表达,通过对患者的生存情况进行分析,我们发现 EZH2 的表达与舌癌患者的总体生存率有关,即:EZH2 高表达患者总体生存率低于低表达患者。Kleer 等<sup>[6]</sup>研究发现 EZH2 的表达不但与乳腺癌肿瘤大小、肿瘤分期、淋巴结转移呈正相关,而且是影响乳腺癌患者生存的重要因素,可以作为治疗预后的判断指标。因此,我们认为 EZH2 在舌癌组织中的表达水平是判断患者总体生存的重要指标之一。

综上所述,本研究发现 EZH2 蛋白是参与舌癌发生发展过程中的重要癌基因,其表达与肿瘤分级、颈淋巴结转移、局部浸润和患者的总体生存率显著相关,

是舌癌的重要分子标记物之一,也提示 EZH2 可能是潜在的抗肿瘤生物治疗靶点。然而 EZH2 在舌癌病变过程中的生物学机制还有待进一步的深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features [J]. *Oral Oncol*, 2010, 46(6): 414-417
- [2] Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3 [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(2): 155-164
- [3] Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(2): 243-247
- [4] Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome [J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(2): 213-224
- [5] Chase A, Cross NC. Aberrations of EZH2 in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2613-2618
- [6] Kleer CG, Cao Q, Varambally S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(20): 11606-116011
- [7] Matsukawa Y, Semba S, Kato H, et al. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(6): 484-491
- [8] Crea F, Hurt EM, Mathews LA, et al. Pharmacologic disruption of polycomb repressive complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 40
- [9] Simon C, Chagraoui J, Kros J, et al. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(7): 651-656
- [10] Margueron R, Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life [J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 343-349
- [11] Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS, et al. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells [J]. *Cell*, 2009, 136(6): 1122-1135
- [12] Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, et al. Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24 Pt 1): 8570-8576
- [13] Wang C, Liu X, Chen Z, et al. Polycomb group protein EZH2-mediated E-cadherin repression promotes metastasis of oral tongue squamous cell carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2011 [Epub ahead of print]

[收稿日期] 2012-05-18