

# 喉癌相关基因的研究进展

王蓓蕾<sup>1</sup> 徐立红<sup>1</sup> 袁 晖<sup>2</sup> 林志宏<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058; <sup>2</sup>浙江大学医学院附属第二医院耳鼻咽喉科, 杭州 310009)

**摘要** 喉癌是头颈部常见恶性肿瘤之一, 以喉鳞状细胞癌为多。喉癌的发生和发展是一个多基因参与、多阶段、多层面的复杂过程。目前研究发现, 喉癌与*EGFR*、*COX-2*、*Survivin*、*VEGF*、*STAT3*、*p16*、*p53*和*Cyclin D1*等基因相关。通过对这些基因的深入研究, 基因治疗将为喉癌的临床治疗和预防提供新途径, 对人类战胜喉癌有着极其重要的意义。

**关键词** 喉癌; 基因治疗; 预防

## Research Advances of Gene Related to Laryngeal Carcinoma

Wang Beilei<sup>1</sup>, Xu Lihong<sup>1</sup>, Yuan Hui<sup>2</sup>, Lin Zhihong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

<sup>2</sup>Department of Otolaryngology, Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

**Abstract** Laryngeal carcinoma is one of the most common malignant neoplasms of the head and neck. The major pathological type of laryngeal cancers is squamous cell carcinoma. The occurrence and development of laryngeal cancer is more than one gene involved, multi-stage and multi-level complex process. Recent studies show that laryngeal carcinoma is related with *EGFR*, *COX-2*, *Survivin*, *VEGF*, *STAT3*, *p16*, *p53* and *Cyclin D1*. Through in-depth study of these genes, gene therapy provides new ways for laryngeal cancer clinical treatment and prevention, and has an extremely important significance to overcome the human larynx.

**Key words** laryngeal carcinoma; gene treatment; prevention

喉癌(laryngeal carcinoma)是头颈部常见的原发于上皮的恶性肿瘤, 占全身恶性肿瘤的5.7%~7.6%, 其主要病理类型为喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)。近几年来, 喉癌的发病率呈现明显增高的趋势, 以东北、华北和华东地区发病率最高。喉癌的病因复杂, 其主要病因有吸烟、酗酒、人类乳头瘤病毒感染、咽喉反流及胃食管反流等<sup>[1]</sup>。目前, 主要治疗手段为手术和放射治疗, 还涉及抗肿瘤药物治疗和基因治疗等综合措施。虽然早期喉癌治疗效果较好, 但晚期喉癌疗效和预后仍不尽人意,

因而有必要探讨有效的检测指标和新的预后指标, 有助于确定合理的治疗方案。

随着分子生物学及其技术的飞速发展, 人们对喉癌发生、发展及其生物学行为的研究也已进入了基因水平。关于喉癌相关基因的研究也逐渐成为热点。研究发现, 有多种基因与喉癌的发生、发展、转移及预后有关, 如*Ccbe1*、*EGFR*、*COX-2*、*Survivin*、*VEGF*、*STAT3*、*PDCD5*、*c-myc*、*p16*、*p53*、*EMP-1*、*Cyclin D1*和*Jab1*等基因。由于目前对于喉癌相关基因的研究较为广泛, 喉癌相关基因

收稿日期: 2013-11-19 接受日期: 2014-06-03

浙江省自然科学基金(批准号: LY13H130001)、浙江省科技厅项目(批准号: 2013C33208)和浙江省中医药管理局项目(批准号: 2012ZAO85)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-87783777, E-mail: sun6406@163.com

Received: November 19, 2013 Accepted: June 3, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY13H130001), the Program of Science Technology Department (Grant No. 2013C33208) and the Program of Traditional Chinese Medicine Administration of Zhejiang Province (Grant No. 2012ZAO85)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-87783777, E-mail: sun6406@163.com

网络出版时间: 2014-08-26 14:49 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0380.html>

也较多,因此本文将对其中研究较为深入的相关基因(*EGFR*、*COX-2*、*Survivin*、*VEGF*、*STAT3*、*p16*、*p53*、*Cyclin D1*)进行逐一介绍,并对目前喉癌相关基因的研究进展作一综述。

## 1 *EGFR*基因

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)是原癌基因的表达产物,是一种相对分子质量为17 000的跨膜糖蛋白,在细胞衍生、血管生成、肿瘤细胞转移和凋亡抑制等过程中起重要作用。其作用途径为通过*EGFR*酪氨酸磷酸化并启动一系列胞内信号级联反应,最终激活相关核蛋白,促进细胞从G<sub>1</sub>期进入S期,从而参与肿瘤的发生和发展。大量研究显示,*EGFR*在乳腺癌、头颈癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌中均过度表达,与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。

目前,*EGFR*基因在喉癌中作用的研究也受到了广泛的关注。大量研究发现,*EGFR*蛋白在喉癌组织中高表达<sup>[2]</sup>。还有研究者利用免疫组化技术测定其在喉鳞状细胞癌原发灶和相应的淋巴结转移灶上的表达,结果显示,*EGFR*基因扩增对喉癌的转移起着关键作用<sup>[3]</sup>。

以上研究都表明,*EGFR*过表达与喉癌的发生发展关系密切,但是引起喉癌组织*EGFR*过表达的机制目前还不明确。李海洲等<sup>[4]</sup>应用差异PCR技术研究发现,在29例*EGFR* mRNA过表达的喉癌组织样本中有13例存在扩增,说明*EGFR*基因在DNA水平上的扩增是导致其过表达的原因之一,提示*EGFR*作为肿瘤标志物具有重要意义。该研究也为临床治疗提供了重要提示,可以结合RT-PCR和差异PCR方法检测术后标本组织中mRNA表达情况和扩增水平,以此作为喉癌预后的分子指标。

表皮生长因子受体在喉癌中的过度表达可引起信号传导通路异常活化,促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移及血管生成,并可抑制肿瘤细胞凋亡,是喉癌生物治疗的研究热点。根据国外最新的研究,Lionello等<sup>[5]</sup>认为,*EGFR*-mTOR信号通路与喉肿瘤血管的生成有关。他们利用免疫组化的方法发现,*EGFR*和mTOR的表达呈正相关。当前,为特异性靶点而设计的分子靶向药物的开发,使肿瘤治疗进入了一个全新的时代。因此,利用*EGFR*抑制剂和mTOR抑制剂联合靶向治疗喉癌,可能成为喉癌治疗的新方向。

然而,目前作为一种有前景的抗肿瘤药物,*EGFR*酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors)耐药性的产生也是一个难以解决的临床问题。

随着分子克隆技术的进步,以病毒为表达载体,通过RNA干扰技术特异性下调*EGFR*表达的基因治疗策略也为喉癌的治疗开辟了新领域。

## 2 *COX-2*基因

环氧合酶是分解花生四烯酸、催化前列腺素合成的关键限速酶。*COX-2*是环氧合酶的一种亚型。*COX-2*基因被称为“快反应基因”,静息时不表达,当受到细胞因子、生长因子和促癌剂等刺激时可迅速合成<sup>[6]</sup>。*COX-2*除参与炎症反应外,还与肿瘤的发生具有密切关系<sup>[7]</sup>。*COX-2*的作用机制主要是通过促进肿瘤细胞增殖和抑制肿瘤细胞凋亡,促进血管生成,增加肿瘤细胞侵袭和迁移能力而实现的。

在关于喉癌的研究中,有研究者采用RT-PCR技术发现,*COX-2* mRNA在头颈部鳞状细胞癌中显著表达<sup>[8]</sup>。Cho等<sup>[9]</sup>和Chen等<sup>[10]</sup>采用免疫组化的方法发现,喉癌患者的*COX-2*阳性表达率明显高于癌旁正常组织的阳性表达率。梁灼萍等<sup>[11]</sup>的研究也得出相同的结论,并进一步研究发现,*COX-2*的表达与喉癌临床分期有关。另外,Cheng等<sup>[12]</sup>研究发现,*COX-2*的表达量与微血管密度(microvessel density, MVD)的表达呈正相关,提示*COX-2*在喉癌血管形成中也起重要作用。为更好地研究*COX-2*基因的功能,姚小宝等<sup>[13]</sup>利用反义核酸技术,制备了*COX-2*基因表达持续下调的喉癌细胞模型,分别采用RT-PCR及Western blot分析转染细胞*COX-2* mRNA及蛋白表达水平;采用MTT比色实验、Boyden侵袭小室法和裸鼠成瘤实验分别检测转染细胞的体外增殖速度、体外侵袭力和体内成瘤性。他们的研究结果表明,反义核酸技术抑制*COX-2*表达可以逆转喉癌细胞的恶性表型。

以上的研究都说明,*COX-2*与喉癌的发生发展具有密切联系。因此,以*COX-2*为靶点,探索开发特异性*COX-2*抑制剂已然成为喉癌治疗的主要方向。目前认为,*COX-2*抑制剂是通过降低周期蛋白(cyclinA和cyclinB1)和周期素依赖性激酶-1(cyclin dependent kinase-1, CDK-1)的表达,同时增加了细胞周期抑制蛋白p21 waf1和p27 kip1的表达,使肿瘤细

胞阻滞在G<sub>1</sub>期<sup>[14]</sup>。随着对COX-2及其抑制剂研究的深入, 其抑制剂用于肿瘤的防治已经取得了一定进展。赛来昔布(celecoxib, 商品名“西乐葆”)作为一种高选择性的COX-2抑制剂, 已有研究发现其对鼻咽癌、胃癌等细胞具有抑制作用<sup>[15]</sup>。

同时, 将赛来昔布应用于喉癌细胞系的研究也越来越多。研究发现, 赛来昔布能够抑制喉癌细胞株Hep-2生长, 下调COX-2表达, 阻滞细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期转化, 降低肿瘤细胞的增殖能力及诱导细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。该研究为赛来昔布应用于喉癌的临床治疗提供了一定的理论依据, 而且它与传统的非甾体类抗炎药(non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)相比, 副作用较小。因此, 它可能成为喉癌靶向治疗的新方向, 为临床喉癌的防治提供更多的方法。

### 3 Survivin基因

凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IAP)家族成员在肿瘤发生、发展过程中具有重要作用。Survivin则是近年来发现的IAP家族的新成员, 具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的作用, 在多种常见的恶性肿瘤均可表达。大量研究证明, 凋亡抑制因子Survivin在肿瘤组织中能够抑制正常细胞凋亡, 使细胞发生异常增殖, 从而导致肿瘤的发生发展, 并对肿瘤患者的预后产生重要影响。

在梁灼萍等<sup>[11]</sup>和白云飞等<sup>[18]</sup>的研究中, Survivin在喉癌组织中的表达明显高于癌旁组织, 与Guo等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。还有研究结果显示, 组织分化程度越低, Survivin基因表达的阳性率越高; 有淋巴结转移者的Survivin基因表达的阳性率高于无淋巴结转移者<sup>[20]</sup>。

另外, Li等<sup>[21]</sup>采用免疫组化技术发现, Survivin在LSCC组织中高表达, 且与临床分期和淋巴结转移显著相关。同时, 利用RT-PCR和蛋白质免疫印记技术研究发现, 在缺氧条件下, 低氧诱导因子HIF-1 $\alpha$ 和Survivin在LSCC细胞中表达均上调, 且HIF-1 $\alpha$ 的下调会导致Survivin表达量减少。因此, 低氧诱导因子HIF-1 $\alpha$ 是Survivin基因重要的调节因子。所以, 可以考虑将Survivin基因作为喉癌发展和转移的参考指标。

国外关于Survivin基因在喉癌预后方面的研究也越来越多, 如Vaught等<sup>[22]</sup>利用ELISA法检测血清中的Survivin表达水平。结果显示, 血清中Survivin

表达水平与喉鳞状细胞癌分期有关, 晚期喉癌血清中Survivin表达水平高于早期喉癌。Li等<sup>[23]</sup>采用TUNEL法检测喉癌组织中的凋亡指数, 结果发现, 在Survivin高表达量的喉癌组织中, 细胞凋亡减少而细胞增殖增加。

RNA干扰技术(RNA interference, RNAi)具有高度的特异性和有效性, 是目前靶向封闭目的基因的最佳选择, 也是基因治疗较为理想的工具。靶向Survivin基因的RNA干扰技术在喉癌的基因治疗中具有一定价值。叶栋等<sup>[24]</sup>通过细胞转染, 将Survivin基因的siRNA导入喉癌Hep-2细胞, 研究结果发现, Survivin-siRNA能够显著抑制细胞增殖, 并能诱导细胞凋亡。提示靶向Survivin的siRNA技术在理论上可以应用于喉癌的临床治疗中。

### 4 VEGF基因

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知作用最强的一种促血管生长因子。它是肿瘤血管形成过程中的正性调控因子, 能够促进血管内皮细胞分裂和增殖, 诱导新生血管形成, 增加血管通透性, 促进淋巴内皮细胞生长。大多数肿瘤细胞本身、肿瘤浸润的巨噬细胞和肥大细胞均分泌高水平的VEGF。目前已有研究证实, VEGF在乳腺癌、肾癌、肺癌、胃肠道原发腺瘤等肿瘤中普遍表达<sup>[25]</sup>。

关于喉癌的研究, Liu等<sup>[26]</sup>研究发现, 随着肿瘤分化程度的降低、临床分期的由早变晚和淋巴结转移的出现, VEGF的表达水平呈现增高趋势。也有研究者采用免疫组织化学SABC法检测黏膜VEGF及微血管密度(MVD)的表达情况, 结果显示, VEGF及MVD均在喉癌组中高表达, 且VEGF表达水平与癌组织中MVD的表达呈明显正相关<sup>[27]</sup>。Wang等<sup>[28]</sup>利用ELISA法得出血清中VEGF的含量也能反映喉癌发展水平的结论。更有研究者利用反义核酸技术有效地阻断VEGF在mRNA水平的合成, 从而减少VEGF蛋白在体内合成, 有效减少了喉肿瘤血管的生成, 达到控制肿瘤细胞生长的目的<sup>[29]</sup>。以上都提示, VEGF是喉癌发生和发展过程中重要的标记分子。

VEGF-C是目前发现的VEGF家族中一种特异性淋巴管生成因子, 研究发现, 它可以引起淋巴管选择性增生, 增加淋巴管的通透性, 为癌细胞中淋巴的扩散提供条件<sup>[30]</sup>。然而, 目前国内外关于VEGF-C

和其受体VEGFR-3在喉癌中表达的研究还很少。有研究者利用逆转录聚合酶链式反应技术检测喉癌组织和正常组织中*VEGF*、*VEGF-C*基因的表达情况,发现*VEGF*、*VEGF-C*均在喉癌组织中高表达<sup>[31]</sup>。Wang等<sup>[32]</sup>利用RT-PCR和免疫组化技术发现,*VEGF-C*和*VEGFR-3*在淋巴结转移组中的表达高于转移组,提示其在喉癌的转移中具有一定的作用。

应用二次杂交瘤技术研制抗人喉癌/抗血管内皮因子双功能克隆抗体,这种双功能抗体不仅可抑制喉癌细胞释放血管形成因子,而且抗VEGF单克隆抗体可以直接抑制VEGF的作用,有效运用于喉癌抗血管生成治疗。因此,以抗喉癌血管生成为靶点的免疫治疗具有广阔的应用前景<sup>[33]</sup>。

## 5 *STAT3*基因

信号转导及转录活化因子(signal transducers and activators of transcriptions, STATs)是细胞质内具有信号转导和转录因子双重功效的DNA结合蛋白。它通过与酪氨酸磷酸化信号通道偶联,发挥信号转导和转录调控的作用。*STAT3*属于*STAT*家族成员中的一员。根据近几年的研究发现,*STAT3*在多种肿瘤组织与细胞系中异常激活,因此也被公认为是一种癌基因<sup>[34]</sup>。

*STAT3*信号通路在肿瘤的发生、发展中起重要作用。因此,关于*STAT3*在喉癌中的作用受到了众多学者的关注。钟刚等<sup>[35]</sup>采用免疫组化和RT-PCR检测*STAT3*蛋白及其mRNA在喉癌组织中的表达情况。研究结果显示,*STAT3*在大多数喉癌组织中高表达,认为*STAT3*的表达可能与喉癌的发生、发展密切相关。另外有研究发现,*STAT3*和P-*STAT3*均在喉癌组织中表达过度,两者分别定位于胞浆和核内,并且与临床分期和淋巴结转移有关<sup>[36]</sup>。

关于*STAT3*和*Cyclin D1*在喉癌中表达关系的研究中,Liang等<sup>[37]</sup>应用免疫组化的方法,得出活化的*STAT3*可能通过促进靶基因*Cyclin D1*转录而发挥其促进癌变作用的结论。所以,*STAT3*和*Cyclin D1*的表达水平可以反映LSCC的恶化程度。相似的结论也在Wang等<sup>[38]</sup>的研究中得出。另外,Xu等<sup>[39]</sup>在对喉癌中*STAT3*与*VEGF*相互关系的研究中发现,*STAT3*在*VEGF*基因启动子区域有结合位点,持续激活*STAT3*就能诱导*VEGF*表达,从而导致肿瘤新生血管形成。因此,*STAT3*与*VEGF*在喉鳞癌中的高表达可

能提示这两者与喉鳞癌的发生、发展及预后密切相关。

近年来,以各种技术阻断*STAT3*信号传导通路对肿瘤作用的研究逐渐增多。Zhang等<sup>[40]</sup>利用JAK-2蛋白酪氨酸激酶抑制剂AG490抑制该信号通路。结果显示,在喉癌细胞中AG490可下调*STAT3*、P-*STAT3*和Survivin的表达水平,从而抑制细胞增殖,诱导其凋亡。对于*STAT3*调控喉癌细胞周期的机制的研究中,利用*STAT3*反义寡核苷酸阻断*STAT3*信号传导通路,改变了*Cyclin D1*、*Cyclin E*及*p21*基因的表达,抑制了G<sub>1</sub>/S期的转化,最终导致喉癌细胞的异常增殖<sup>[41]</sup>。因此,深入研究*STAT3*信号通路 with 细胞周期调控的作用机制,有可能为设计新的联合治疗方案提供理论和实验基础。另外,RNA干扰也是有效的阻断手段之一,而且由于阻断*STAT3*通路对正常细胞影响不明显,因此RNA干扰阻断*STAT3*通路可作为一种较为安全、高效的基因治疗方法<sup>[42]</sup>。

## 6 *p16*基因

*p16*基因又称多重肿瘤抑制基因,是人们发现的第一个直接作用于细胞周期、抑制细胞分裂的抑癌基因<sup>[43]</sup>。它通过抑制CDK4和CDK6从而影响众多的癌基因的转录,最终抑制细胞增殖。该基因编码的p16蛋白是细胞周期的一种负性调节因子。当*p16*基因缺失或突变而失活时,p16蛋白表达缺失,则可引起细胞过度增殖而导致癌变。

大量研究显示,*p16*基因的失活在人恶性肿瘤中普遍存在。关于喉癌,李俊义等<sup>[44]</sup>采用免疫组织化学方法检测50例喉癌组织中p16的表达情况。结果显示,p16蛋白在喉鳞癌组织中的阳性表达率明显低于正常喉黏膜组织,并且随着临床分期的进展及组织学分化程度的降低,p16蛋白表达进一步降低,提示p16蛋白表达缺失可能导致了喉癌细胞的增殖活性增强,分化受阻。Fu等<sup>[45]</sup>同样采用免疫组化的方法研究了喉癌中p16的低表达和*Cyclin D1*的高表达与淋巴结转移的关系。研究发现,随着淋巴结转移,p16表达下调,而*Cyclin D1*表达上调。这些研究表明,p16蛋白表达失调在喉癌中是普遍现象,p16蛋白和基因调节的关系在喉癌的发生发展中起重要作用。

将*p16*作为基因治疗靶点,已成为攻克喉癌的新方向。由于*p16*基因失活、p16蛋白的低表达或缺失在喉癌的增殖和去分化中起重要作用,因此增加

肿瘤细胞p16表达即可以阻止喉癌细胞的进一步增殖。p16启动子的甲基化又是p16失活的重要机制<sup>[46]</sup>。有研究利用去甲基化药物5-杂氮胞苷处理喉癌细胞株,使启动子区CpG岛甲基化表达失活的p16基因重新表达p16蛋白<sup>[47]</sup>;还有利用携带p16基因的复制缺陷型腺病毒转染人喉癌细胞株,可有效地介导p16基因的表达<sup>[48]</sup>。上述研究结果表明,p16可作为喉癌基因治疗的靶基因之一。在临床上,p16基因的表达检测也可以作为喉癌诊断及预后评估的重要指标。

## 7 p53基因

p53基因是与人类肿瘤关系最为密切的抑癌基因之一,在大多数的肿瘤中均可以检测到p53缺失或突变。p53的主要功能是抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和分化。p53基因突变产物是p53蛋白,是一种肿瘤促进因子。在关于头颈部肿瘤的研究中,p53受到广泛关注,因此它也是目前研究最广泛和最早用于基因治疗的基因之一。

在对p53的大量研究中,Luo等<sup>[49]</sup>采用免疫组化SP法检测出p53蛋白在喉癌组织中过表达,提示该基因在喉癌恶化的早期阶段起重要作用。另有研究者利用聚合酶链反应-单链构象多态性(polymerase chain reaction-single strain conformation polymorphism, PCR-SSCP)银染技术结合DNA直接测序,检测发现在喉癌新鲜组织中,p53基因的第5至8号外显子上存在基因突变<sup>[50]</sup>。结果提示,p53基因突变与喉鳞癌恶性程度及淋巴结转移密切相关。

在关于p53和VEGF在喉癌中的表达及其相关性的研究中,王金渊等<sup>[51]</sup>采用免疫组化方法检测了40例喉癌患者手术切除标本p53、VEGF的表达情况。结果提示,p53的表达与VEGF表达密切相关,共同促进肿瘤微血管的形成。这与前期研究发现野生型p53可下调VEGF、抑制肿瘤血管形成,而突变型p53可上调VEGF的结果一致<sup>[52-53]</sup>。

目前国内外肿瘤研究领域,重组人p53腺病毒制品(rAd/p53)治疗肿瘤的研究最为深入。rAd/p53是一种有活性的基因工程重组腺病毒颗粒,可以有效地将p53基因转入肿瘤细胞内<sup>[54]</sup>。为探索p53基因在喉癌基因治疗方面的可能性,国内外研究者均以重组腺病毒为载体,除了单一转导野生型p53基因进入喉癌细胞系Hep-2外,还有研究者同时导入肿瘤免疫相关基因B7-1<sup>[55]</sup>。在利用p53直接抑制癌细

胞增殖的同时,还通过B7-1的作用来增强机体自身的抗肿瘤免疫反应,进而杀死残余或转移的癌细胞。这也提示了应用基因治疗喉癌的策略中,导入单一基因往往很难达到治疗效果,复合基因治疗才更为合理。

由此可见,p53基因在喉癌的基因治疗中应联合应用多种基因治疗策略,通过向患者体内导入多种目的基因,从多个环节控制肿瘤的发生和发展,最终达到治疗目的。

## 8 Cyclin D1基因

细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)作为细胞周期的正向调控因素,控制细胞周期的进程,对细胞周期中的G<sub>1</sub>/S期的调控尤为重要。许多研究证明,多数恶性肿瘤都是细胞周期性疾病,因此认为Cyclin D1基因是与肿瘤有最直接关系的癌基因。

关于喉癌的研究,Zhang等<sup>[56]</sup>利用免疫组化染色技术(immunohistochemical staining, IHS)研究Cyclin D1基因在喉癌组织中的表达情况。结果显示,Cyclin D1蛋白在喉癌组织中过表达,并与肿瘤分期有关,提示Cyclin D1可作为喉癌预后的生物标记。

目前有许多研究显示,端粒酶的激活广泛存在于喉鳞状细胞癌中。关于喉癌中Cyclin D1蛋白的过表达与端粒酶活性的关系,Yu等<sup>[57]</sup>分别采用端粒重复序列扩增法和免疫组化的方法来检测端粒酶活性和Cyclin D1蛋白的表达量。结果提示,Cyclin D1蛋白的过表达是激活端粒酶的重要机制。Chrysovergis等<sup>[58]</sup>利用免疫组化、组织微阵列技术和原位杂交显色分析技术研究了Cyclin D1和EGFR蛋白表达水平与端粒酶催化亚基表达的关系,结果显示,无论从蛋白水平还是DNA分子水平分析,Cyclin D1、EGFR和端粒酶的表达都与LSCC的表型有关。

细胞周期调控因子相互调控机制在喉癌演进过程中起重要作用。p53是细胞周期调控关键的负性调控因子,Cyclin D1是正性调控因子,都是G<sub>1</sub>/S期转换中重要的调控点。因此,在基因治疗策略中,可联合靶向复合基因,从两方面来抑制喉癌细胞的过度增殖,达到更好的治疗效果。

综上所述,喉癌的癌变机制及肿瘤演进过程是多种基因共同参与、相互影响的结果。随着关于喉癌的各项研究进入基因水平,通过改变或修饰相关基因及其表达产物的方式治疗喉癌已经成为喉癌生

物治疗中的研究热点。目前关于喉癌的许多基因的具体作用机制还需要进一步研究, 因此基因治疗还不能作为单一的治疗手段, 但与传统的治疗方法相结合, 还是能够显著提高治疗的成功率。相信随着研究的继续深入, 以喉癌相关基因为突破口的基因治疗是喉癌治疗中最根本、最有前途的方法之一。

### 参考文献 (References)

- 1 黄志刚. 喉癌基础研究现状和展望. 中国耳鼻咽喉头颈外科 (Huang Zhigang. The status and prospects of the basic research in larynx carcinoma. Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery) 2010; 14(2): 57.
- 2 张世文, 何晓光, 李晓江, 王苑伶. 表皮生长因子受体在喉癌组织不同部位中的表达及与分化的关系. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志 (Zhang Shiwen, He Xiaoguang, Li Xiaojang, Wang Yuanling. Expression of EGFR about different region tissues and its relationship with histological differentiation in laryngeal carcinoma. J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg) 2012; 26(3): 123-8.
- 3 Wei Q, Sheng L, Shui Y, Hu Q, Nordgren H, Carlsson J. EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases. Ann Surg Oncol 2008; 15(4): 1193-201.
- 4 李海洲, 李巍, 米玉录, 王旭红. 喉癌中EGFR基因扩增、表达及临床意义. 解剖科学进展 (Li Haizhou, Li Wei, Mi Yulu, Wang Xuhong. EGFR gene amplification, overexpression and its clinical implications in laryngeal squamous cell carcinoma. Progress of Anatomical Sciences) 2008; 14(3): 302-4.
- 5 Lionello M, Lovato A, Staffieri A, Blandamura S, Turato C, Giacomelli L, et al. The EGFR-mTOR pathway and laryngeal cancer angiogenesis. Eur Arch Otorhinolaryngol 2014; 271(4): 757-64.
- 6 Marco E. Turini, Raymond N. DuBois. Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. Annu Rev Med 2002; 53: 35-57.
- 7 王东林, 王艳芬, 施公胜, 黄华. 胶质瘤中hTERT、maspin和bFGF表达的相关性及意义. 癌症 (Wang Donglin, Wang Yanfen, Shi Gongsheng, Huang Hua. Correlation of hTERT expression to maspin and bFGF expression and their significance in glioma. Chinese Journal of Cancer) 2007; 26(6): 601-6.
- 8 Celenk F, Bayramoglu I, Yilmaz A, Menevse A, Bayazit Y. Expression of cyclooxygenase-2, 12-lipoxygenase, and inducible nitric oxide synthase in head and neck squamous cell carcinoma. J Craniofac Surg 2013; 24(4): 1114-7.
- 9 Ko CD, Kim JS, Ko BG, Son BH, Kang HJ, Yoon HS, et al. The meaning of the c-kit proto-oncogene product in malignant transformation in human mammary epithelium. Clin Exp Metastasis 2003; 20(7): 593-7.
- 10 Chen YF, Luo RZ, Li Y, Cui BK, Song M, Yang AK, et al. High expression levels of COX-2 and P300 are associated with unfavorable survival in laryngeal squamous cell carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 2013; 270(3): 1009-17.
- 11 梁灼萍, 余铃, 陈祖尧, 刘文军, 黎万荣, 覃纲. COX-2和Survivin在喉癌组织中的表达及临床意义. 中国耳鼻咽喉头颈外科杂志 (Liang Zhuoping, Yu Ling, Chen Zuyao, Liu Wenjun, Li Wanrong, Tan Gang. Expression and clinical significance of COX-2 and Survivin in laryngeal carcinoma. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery) 2009; 15(1): 6-11.
- 12 Cheng W, Zhou W. Clinical significance and relationship between HIF-1alpha, COX-2, VEGF and micro-vessel density expression in laryngeal carcinoma. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 2010; 24(18): 820-2.
- 13 姚小宝, 王晓侠, 张少强, 闫利英, 朱宏亮. COX-2反义核酸对喉癌恶性生物学行为的抑制作用. 西安交通大学学报 (Yao Xiaobao, Wang Xiaoxia, Zhang Shaoqiang, Yan Liying, Zhu Hongliang. Inhibition of malignant phenotypes of human laryngeal cancer cell by anti sense nucleic acid of cyclooxygenase-2. Journal of Xi'an Jiaotong University) 2009; 30(2): 234-6.
- 14 Cheng J, Imanishi H, Amuro Y, Hada T. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. Int J Cancer 2002; 99(5): 755-61.
- 15 William WN Jr, Heymach JV, Kim ES, Lippman SM. Molecular targets for cancer chemoprevention. Nat Rev Drug Discov 2009; 8(3): 213-25.
- 16 余盛富, 张功秀, 李谨. 塞来昔布对喉癌Hep-2细胞COX-2和Caspase-3表达的影响. 湖北医药学院学报 (Yu Shengfu, Zhang Gongxiu, Li Jin. Effects of celecoxib on COX-2 expression and Caspase-3 activity in laryngocarcinoma Hep-2 cells. Journal of Hubei University of Medicine) 2011; 30(1): 19-22.
- 17 王巍毅, 李仕晟, 杨新明, 肖旭平. 靶向阻断COX-2信号通路对喉癌细胞生长的影响. 中国耳鼻咽喉头颈外科杂志 (Wang Weiyi, Li Shisheng, Yang Xinming, Xiao Xuping. Effects of target blocking COX-2 on the growth of laryngeal cancer. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery) 2010; 16(6): 419-23.
- 18 白云飞, 覃洁, 彭诗东. 喉癌组织中Survivin和VEGF的表达及其临床意义. 中国耳鼻咽喉头颈外科杂志 (Bai Yunfei, Tan Jie, Peng Shidong. Expression of Survivin and VEGF in laryngeal carcinoma and clinical significance. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery) 2012; 18(1): 5-8.
- 19 Guo Q, Li Y. Analysis on expression of survivin and PTEN in vocal cords polyps, papilloma of larynx and laryngeal squamous cell carcinoma. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 2012; 26(15): 704-7.
- 20 刘学军, 陈波蓓, 黄加云, 黄赛瑜, 高金建, 金建新. 凋亡抑制基因Survivin和p63基因在喉癌组织中的表达及意义. 上海医学 (Liu Xuejun, Chen Bobei, Huang Jiayun, Huang Saiyu, Gao Jinjian, Jin Jianxin. Expression and significance of Survivin and p63 in laryngeal carcinoma. Shanghai Medical Journal) 2010; 33(11): 1048-9.
- 21 Li DW, Zhou L, Jin B, Xie J, Dong P. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1alpha and survivin in laryngeal carcinoma tissue and cells. Otolaryngol Head Neck Surg 2013; 148(1): 75-81.
- 22 Vaught C, Weinberger P, Seybt TP, Bollag R, Jackson L. Prognostic implications of Survivin expression in squamous cell carcinoma of the larynx. Laryngoscope 2010; 120(4): 188.
- 23 Li DW, Gao S, Shen B, Dong P. Effect of apoptotic and proliferative indices, P-glycoprotein and survivin expression on prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. Med Oncol 2011; 28(1): 333-40.
- 24 叶栋, 沈志森, 蒋振, 郭俊明, 肖丙秀. 靶向survivin基因siRNA对喉癌细胞增殖、凋亡的影响. 现代实用医学 (Ye Dong, Shen Zhisen, Jiang Zhen, Guo Junming, Xiao Bingxiu.

- Investigation of siRNA targeted to survivin in suppressing proliferation and inducing apoptosis in laryngeal carcinoma. *Modern Practical Medicine* 2009; 21(11): 1165-8.
- 25 Koh YJ, Kim HZ, Hwang SI, Lee JE, Oh N, Jung K, *et al.* Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF -A and angiopoietins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage. *Cancer Cell* 2010; 18(2): 171-84.
- 26 Liu Y, Qiu Y, Zhang X, Tian Y, Huang D, Zhou X, *et al.* The expression and correlation of HMGB1 and VEGF protein in laryngeal squamous cell carcinoma. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2011; 25(6): 265-9.
- 27 任光辉, 董朝, 耿中利, 李鸿涛, 马斌林. 血管内皮生长因子在喉癌中的表达及其与血管生成和转移的相关性. *中国老年学杂志*(Ren Guanghui, Dong Chao, Geng Zhongli, Li Hongtao, Ma Binlin. Expression of VEGF in laryngeal carcinoma and its relationship with angiogenesis and metastasis. *Chinese Journal of Gerontology* 2012; 32(21): 4641-2.
- 28 Wang Y, Zhao H, Chen J, Liu L, Zhang P, Che J, *et al.* Relationship and expression of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in serum preoperative and postoperative patients with laryngeal squamous cell cancer. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010; 24(24): 1112-5.
- 29 邓志宏, 金明, 黄维国, 邱建华, 刘顺利, 王锦玲. 反义血管内皮生长因子基因转染治疗喉癌的实验研究. *中华耳鼻咽喉科杂志*(Deng Zhihong, Jin Min, Huang Weiguo, Qiu Jianhua, Liu Shunli, Wang Jinling. Human antisense-vascular endothelial growth factor gene therapy for laryngeal tumor by cationic liposome-mediated transfection. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology* 2004; 39(1): 8-12.
- 30 Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, *et al.* FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 1992; 53(20): 5738-43.
- 31 杨艳, 葛荣明. VEGF和VEGF-C在喉癌中的表达及临床意义. *临床耳鼻咽喉科杂志*(Yang Yan, Ge Rongming. Expression of VEGF and VEGF-C in laryngeal carcinoma and their clinical significance. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology* 2002; 16(12): 650-2.
- 32 Wang Z, Chen Y, Li X, Xu L, Ma W, Chang L, *et al.* Expression of VEGF-C/VEGFR-3 in human laryngeal squamous cell carcinomas and its significance for lymphatic metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(1): 27-31.
- 33 陈鸥, 孙立群, 盛力, 金春顺, 赵明, 韩岚. 抗人喉癌/抗VEGF双功能抗体制备及应用研究. *中国免疫学杂志*(Chen Ou, Sun Liqun, Sheng Li, Jin Chunshun, Zhao Ming, Han Lan. The preparation and application study of anti-human laryngeal carcinoma and anti-VEGF bifunctional antibody. *Chinese Journal of Immunology* 2006; 22(3): 241-3.
- 34 Itoh M, Murata T, Suzuki T, Shindoh M, Nakajima K, Imai K, *et al.* Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells. *Oncogene* 2006; 25(8): 1195-204.
- 35 钟刚, 张松, 孔维佳, 刘英鹏, 孙宇. STAT3蛋白在喉癌组织中的表达及意义. *肿瘤防治研究*(Zhong Gang, Zhang Song, Kong Weijia, Liu Yingpeng, Sun Yu. Expression of STAT3 Protein in human laryngeal carcinoma and its significance. *Cancer Research on Prevention and Treatment*) 2008; 35(2): 104-6.
- 36 Wang J, Li X, Chen Y, Lu X. Expression of STAT3 and P-STAT3 in laryngeal carcinoma and its clinical significance. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2007; 21(3): 113-5.
- 37 Liang H, Liu B, Ji W. To investigate the overexpression of Stat3 and Cyclin D1 in laryngeal neoplasm by immunohistochemistry. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2009; 23(21): 982-4.
- 38 Wang L, Duan X, Tang X, Shao Y, Zhao R, Qian X, *et al.* Clinical significance of Stat3 and Cyclin D1 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2011; 25(21): 966-9.
- 39 Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, *et al.* Targeting Stat3 blocks both HIF 1 and VEGF expression induced by multiple pathways. *Oncogene* 2005; 24(36): 5552-60.
- 40 Zhang H, Zhang D, Luan X. Inhibition of the signal transducers and activators of transcription (STAT)3 signalling pathway by AG490 in laryngeal carcinoma cells. *J Int Med Res* 2010; 38(5): 1673-81.
- 41 王俊阁, 李晓明, 路秀英, 皮丽宏. Stat3信号传导通路对喉癌细胞G<sub>1</sub>-S期的调控. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*(Wang Junge, Li Xiaoming, Lu Xiuying, Pi Lihong. The regulation of Stat3 signal transduction pathway to G<sub>1</sub> to S phase of laryngocarcinoma cell. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*) 2008; 22(15): 699-702.
- 42 王海茹, 李晓明, 李春林, 路秀英. RNA干扰沉默STAT3基因增强人喉癌细胞放射敏感性的实验. *中国耳鼻咽喉头颈外科*(Wang Hairu, Li Xiaoming, Li Chunlin, Lu Xiuying. Enhancing radiosensitivity of RNA interference targeting silence STAT3 gene on human laryngeal carcinoma cells. *Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*) 2009; 16(11): 623-7.
- 43 付志婕, 潘新良. p16基因和蛋白与喉癌关系的研究进展. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*(Fu Zhijie, Pan Xinliang. Research advances of the relationship between p16 gene and protein with larynx carcinoma. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*) 2007; 21(12): 573-4.
- 44 李俊义, 徐华林, 徐峰. p16、COX-2在喉癌组织中的表达及相关性研究. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*(Li Junyi, Xu Hualin, Xu Feng. Expression of p16 and cyclooxygenase-2 in larynx carcinoma tissues and their correlation. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology of Integrated Traditional and Western Medicine*) 2011; 19(2): 72-4.
- 45 Fu ZJ, Ma ZY, Wang QR, Lei DP, Wang R, Liu CX, *et al.* Overexpression of Cyclin D1 and underexpression of p16 correlate with lymph node metastases in laryngeal squamous cell carcinoma in Chinese patients. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25(8): 887-92.
- 46 Bai S, Gao H, Liang H, Fei S, Zhang X, Sun K. The study of p16 gene mutation and methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2000; 35(4): 292-4.
- 47 Suh SI, Pyun HY, Cho JW, Baek WK, Park JB, Kwon T. 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2000; 160(1): 81-8.
- 48 刘世喜, 唐嗣泉, 梁传余. p16基因治疗喉鳞状细胞癌的实验研究. *中华耳鼻咽喉科杂志*(Liu Shixi, Tang Siqun, Liang Chuanyu. Adenovirus p16(INK4A) gene therapy for laryngeal squamous cell carcinoma. *Chinese Journal of Otorhinolaryngol-*

- ogy) 2003; 38(1): 35-8.
- 49 Luo K, Wang Z, Wang N, Zhang X, Yang J. Effect of expression of p53 in squamous cell carcinoma of larynx and mucosa adjacent to tumor on the biological behavior. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2005; 19(9): 405-8.
- 50 张晓晴, 王力红, 刘世喜, 欧阳雪松, 梁传余. p53基因突变与喉癌生物学行为的关系. *中华医学遗传学杂志(Zhang Xiaoqing, Wang Lihong, Liu Shixi, OuYang Xuesong, Liang Chuanyu. The relationship of p53 gene mutation to cell differentiation and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. Chinese Journal of Medical Genetics)* 2002; 19(2): 61-3.
- 51 王金渊, 王斌全. 喉癌中p53和VEGF的表达及其相关性. *中华临床医学研究杂志(Wang Jinyuan, Wang Binqun. Expression of p53 and VEGF in larynx carcinoma and their correlation. Chinese Journal of Clinical Practical Medicine)* 2005; 11(19): 2743-4.
- 52 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Turley H, O'Byrne K, Scott PA, *et al.* Vascular endothelial growth factor, with-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(12): 3017-24.
- 53 Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, Fujiwara T, Liu W, Bucana CD, *et al.* Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cance Res* 1998; 58(6): 2288-92.
- 54 敖敏, 何刚, 乔晓明, 梁传余. 重组人p53腺病毒基因药物抑制喉癌细胞生长的实验研究. *华西医学(Ao Min, He Gang, Qiao Xiaoming, Liang Chuanyu. Adenovirus-mediated p53 gene therapy of human laryngeal cancer. West China Medical Journal)* 2007; 22(3): 579-80.
- 55 邱兆华, 潘鲁浙, 劳妙芬, 吴祖泽. 重组腺病毒介导人野生型p53和B7-1基因诱导喉癌细胞凋亡并增强其免疫原性. *生物技术通讯(Qiu Zhaohua, Pan Lu-zhe, Lao Miaofen, Wu Zuze. Adenovirus-mediated co-transfer of human wild-type p53 and B7-1 genes induces apoptosis and enhances immunogenicity in laryngocarcinoma cells. Letters in Biotechnology)* 2002; 13(1): 1-5.
- 56 Zhang YY, Xu ZN, Wang JX, Wei DM, Pan XL. G<sub>1</sub>/S-specific Cyclin-D1 might be a prognostic biomarker for patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(5): 2133-7.
- 57 Yu Z, Wang W. The expressions of telomerase activity and cyclinD1 protein in laryngeal squamous cell carcinoma. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2002; 16(6): 286-8.
- 58 Chrysovergis A, Gorgoulis VG, Giotakis I, Tsiambas E, Karameris A, Kittas C, *et al.* Simultaneous over activation of EGFR, telomerase (hTERT), and cyclin D1 correlates with advanced disease in larynxsquamous cell carcinoma: A tissue microarray analysis. *Med Oncol* 2011; 28(3): 871-7.