

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.09.008

文章编号: 1005-8982 (2020) 09-0043-06

Cdc25C 在食管鳞状细胞癌中的表达 及与预后的关系 *

董倩¹, 叶旭², 廖前进², 周钰娟², 杨锬², 杨敬儒²,
杨松华², 朱笑丛², 曾娜², 师颖瑞²

[1. 南华大学 临床医学系, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省肿瘤医院 (中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院) 放射治疗科, 湖南 长沙 410013]

摘要:目的 探讨食管鳞状细胞癌(以下简称食管鳞癌)组织中细胞分裂周期蛋白 25 同源蛋白 C(Cdc25C)的表达与放疗抵抗间的关系。**方法** 回顾性分析 2011 年 1 月—2016 年 12 月在湖南省肿瘤医院接受根治性放疗的食管鳞癌患者 50 例,采用免疫组织化学法检测放疗前食管鳞癌组织中的 Cdc25C 的表达水平,分析 Cdc25C 表达与放疗后食管鳞癌患者近期疗效及生存预后的关系。**结果** 食管鳞癌 Cdc25C 高表达组患者与低表达组患者的生存率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),高表达组患者生存率低于低表达组患者。Cdc25C 在食管鳞癌中高表达与预后不良相关。**结论** Cdc25C 的高表达可能增强食管癌对放疗的抵抗,Cdc25C 有望作为食管鳞癌放射治疗中潜在判断预后的分子标志物。

关键词: 食管肿瘤; Cdc25C; 放疗抵抗

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Expression and prognosis of Cdc25C in esophageal squamous cell carcinoma*

Qian Dong¹, Xu Ye², Qian-Jin Liao², Yu-Juan Zhou², Pei Yang², Jing-Ru Yang²,
Song-Hua Yang², Xiao-Cong Zhu², Na Zeng², Ying-rui Shi²

[1. Department of Clinical Medicine, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China;

2. Department of Radiotherapy, (Hunan Cancer Hospital, Xiangya Medical College,
Central South University), Changsha, Hunan 410013, China]

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of Cell division cyclin 25 homologous protein C (Cdc25C) and radiotherapy resistance in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Methods** Retrospective analysis was performed on 50 patients with esophageal squamous cell carcinoma who received radical radiotherapy. The expression level of Cdc25C in esophageal carcinoma before radiotherapy was detected by immunohistochemical, and the relationship between Cdc25C expression and short-term efficacy and survival prognosis of patients with esophageal carcinoma after radiotherapy was analyzed. **Result** The survival rate of patients in the high expression group and the low expression group was significantly different, and the survival rate of patients in the high expression group of Cdc25C was lower than those in the low expression group ($P < 0.05$), and the high expression of Cdc25C in esophageal squamous cell carcinoma was correlated with poor prognosis. **Conclusion** The expression level of Cdc25C may be positively correlated with the radiotherapy resistance of esophageal

收稿日期: 2019-12-13

* 基金项目: 湖南省卫生计生委 2016 年度科研计划课题项目 (No: B2016051)

[通信作者] 师颖瑞, E-mail: shiyingrui@hnszlyy.com

squamous cell carcinoma, and Cdc25C is expected to be a potential molecular marker for prognosis in the radiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; Cdc25C; radio resistance

我国是食管癌高发地区,其发病率居恶性肿瘤第 6 位,病死率居第 4 位^[1],对无法手术或拒绝手术的局部晚期食管癌患者,放疗是重要的治疗手段^[2]。然而,因为部分肿瘤对放射线抵抗导致局控率降低,放疗后约 40% ~ 60% 食管癌患者治疗未控或者复发^[3]。原发性及获得性放疗抵抗是影响肿瘤治疗效果和患者生存预后的重要因素,因此,寻找可以预测食管鳞状细胞癌(以下简称食管鳞癌)放疗敏感性的生物标志物有重要意义。本研究应用免疫组织化学法检测食管鳞癌组织中 Cdc25C 的表达情况,并分析 Cdc25C 表达在食管鳞癌预后判断及临床疗效监测中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2011 年 1 月—2016 年 12 月湖南省肿瘤医院确诊的食管鳞癌患者,最终纳入 50 例进行回顾性研究(实验组)。其中,男性 40 例,女性 10 例;年龄 32 ~ 70 岁(中位年龄 61 岁);颈段 6 例,胸上段 18 例,胸中下段 26 例;高分化鳞癌 9 例,中分化鳞癌 19 例,低分化鳞癌 22 例;临床分期采用 2009 年美国癌症联合会(AJCC)第 7 版食管鳞癌的分期标准^[4],Ⅱ期 18 例,Ⅲ期 32 例;根据增强胸部 CT 和其他检查结果,诊断淋巴结转移者 35 例,无淋巴结转移者 15 例。所有患者行根治性放射治疗,放疗方式为三维适形放疗或调强放射治疗,计划肿瘤靶区(PGTV)为 60 ~ 64 Gy/30~33 F。本研究同时选取 20 例食管鳞癌旁正常组织作为对照组。

1.2 主要试剂和方法

兔单克隆抗体抗 Cdc25C[E302]购自美国 Abcam 公司,免疫组织化学染色采用 SP 法,兔/鼠通用型 SP 试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司,食管鳞癌组织及食管鳞癌旁正常组织均由湖南省肿瘤医院病理科提供。免疫组织化学所有操作步骤均按试剂盒说明书进行,一抗的工作浓度为 1 : 300。用 PBS 代替一抗做空白对照。

1.3 免疫组织化学结果判定

表达结果按照染色强度和染色范围综合计分。染色强度分为 4 级:不显色为 0 分;浅黄色为 1 分;棕

黄色为 2 分;棕褐色为 3 分。染色范围(高背景下的阳性细胞所占百分比)分为 4 级:无阳性细胞计为 0 分;阳性细胞 1% ~ 20% 为 1 分;>20% ~ 75% 为 2 分;>75% 为 3 分。两分级相乘,≤ 4 分定义为 Cdc25C 低表达,>4 分定义为 Cdc25C 高表达。

1.4 评价标准

放疗结束后 1 ~ 3 个月复查食管钡餐进行近期疗效评价。近期疗效评价采用万均教授食管癌放疗后疗效评价标准^[5]。完全缓解(complete response, CR)即肿瘤病灶完全消失,食管边缘光滑,钡剂通过顺利,管壁可稍显强直,管腔无明显狭窄或稍显狭窄,黏膜基本恢复正常或增厚;部分缓解(partial response, PR)即病变大部分消失,无明显扭曲或成角畸影,无向腔外溃疡,钡剂通过尚顺利,且边缘欠光滑,有小的充盈缺损或/和小龛影,或边缘虽光滑,但管腔有明显狭窄;无缓解(no response, NR)即放疗结束时,病变看不出明显好转,或充盈缺损及龛影或狭窄加重。

1.5 随访

所有随访信息均来自病例系统及电话随访,随访内容包括食管钡餐以及总生存期(overall survival, OS)。随访时间自治疗结束后 1 个月后开始计算,截止到 2018 年 10 月 31 日。OS 是指从疾病确诊的日期到死亡日期或者随访截止日期的时间,本研究的随访终点为 OS。

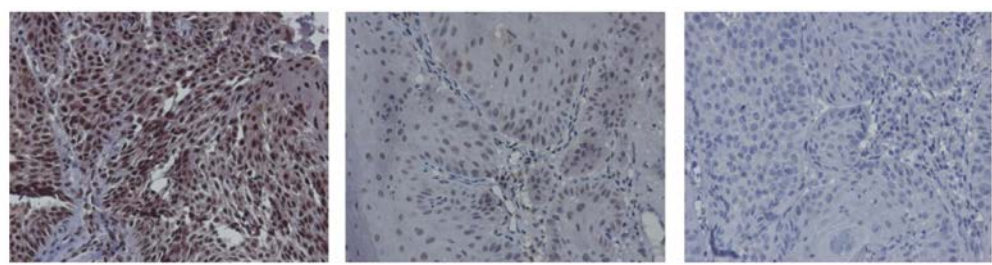
1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计数资料以例(%)表示,比较采用 χ^2 检验;Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,比较用 Log-rank χ^2 检验;影响因素分析用多因素 Cox 风险回归模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cdc25C 在食管鳞癌组织和癌旁正常组织中的表达情况

Cdc25C 阳性染色主要定位在细胞核中,呈黄棕色或棕褐色颗粒,背景不着色。对照组 Cdc25C 表达水平较低,呈现低表达,实验组 Cdc25C 表达水平上调。Cdc25C 在实验组中高表达 58% (29/50),在对照组中低表达 0% (0/20)。见图 1。



Cdc25C 在食管鳞癌组织中的高表达 Cdc25C 在食管鳞癌组织中的低表达 Cdc25C 在食管癌旁组织中的低表达

图 1 Cdc25C 在食管鳞癌及癌旁组织中的表达情况 (SP 法 × 400)

2.2 Cdc25C 表达水平与患者临床特征的关系

Cdc25C 表达水平与食管鳞癌患者的性别、年龄、部位、T 分期及分化程度无关 ($P>0.05$), 但与临床分期及淋巴结转移相关 ($P<0.05$), 淋巴结转移率越高、临床分期越晚, 其在食管鳞癌组织中的表达越强。见表 1。

表 1 食管鳞癌患者 Cdc25C 表达阳性率的比较

因素	<i>n</i>	阳性率 例(%)	χ ² 值	<i>P</i> 值	因素	<i>n</i>	阳性率 例(%)	χ ² 值	<i>P</i> 值
性别					部位				
男	40	23 (57.5)	0.021	0.886	颈段	6	1 (16.7)	4.897	0.086
女	10	6 (60.0)			胸上段	18	12 (66.7)		
年龄					胸中下段	26	16 (61.5)		
≤ 60 岁	23	12 (52.2)	0.593	0.441	T 分期				
>60 岁	27	17 (63.0)			T ₂	18	9 (50.0)	1.895	0.388
临床分期					T ₃	29	19 (65.5)		
Ⅱ 期	18	7 (38.9)	4.217	0.040	T ₄	3	1 (33.3)		
Ⅲ 期	32	22 (68.8)			分化程度				
淋巴结转移					高分化	9	4 (44.4)	1.840	0.399
是	35	24 (68.6)	5.352	0.021	中分化	19	10 (52.6)		
否	15	5 (33.3)			低分化	22	13 (59.1)		

2.3 近期疗效

Cdc25C 高表达组 29 例, 其中 CR 7 例, PR 20 例, NR 2 例; Cdc25C 低表达组 21 例, 其中 CR 14 例, PR 7 例, NR 0 例。将 Cdc25C 表达水平和食管鳞癌患者近期疗效采用 χ^2 检验进行关联性检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=9.557, P=0.008$), Cdc25C 高表达组近期疗效较差。

2.4 生存分析

实验组 1、2 及 3 年总生存率为 82%、56% 和 24%, 中位生存时间是 24.5 个月; Cdc25C 高低表达两组 1、2 及 3 年总生存率分别为 72%、45%、10% 和 90%、67%、48%。Cdc25C 高表达组生存率低于低表达组 ($\chi^2=6.846, P=0.009$)。见图 2。

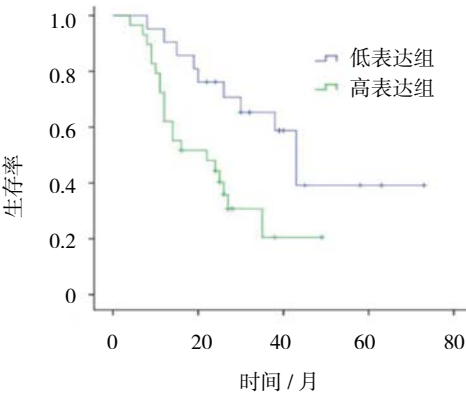


图 2 Cdc25C 高表达组与低表达组的生存曲线

2.5 影响食管鳞癌患者预后的因素

对患者性别、年龄、肿瘤部位、淋巴结是否转移、

临床分期、分化程度、Cdc25C 表达水平进行单因素分析, 结果显示 Cdc25C 高表达、临床分期与食管鳞癌不良预后相关 ($P < 0.05$)。将单因素分析有统计学意义的因素纳入多因素 Cox 风险回归模型, 结果表明

Cdc25C 在食管鳞癌组织中表达水平是食管鳞癌患者预后的独立因素 [$\hat{RR}=0.399$ (95% CI : 0.176, 0.906), $P=0.028$]。见表 2、3。

表 2 食管鳞癌患者单因素预后分析

因素	食管鳞癌 例 (%)	χ^2 值	P 值	因素	食管鳞癌 例 (%)	χ^2 值	P 值
性别				淋巴结转移			
男	40 (80)	2.162	0.141	是	35 (70)	1.844	0.174
女	10 (20)			否	15 (30)		
年龄				临床分期			
≤ 60 岁	23 (46)	0.050	0.946	II 期	18 (36)	5.587	0.018
>60 岁	27 (54)			III 期	32 (64)		
部位				分化程度			
颈段	6 (12)	0.116	0.944	高分化	9 (18)	4.332	0.115
胸上段	18 (36)			中分化	19 (38)		
胸中下段	26 (52)			低分化	22 (44)		
T 分期				Cdc25C			
T ₂	18 (36)	3.996	0.136	高表达组	29 (58)	6.846	0.009
T ₃	29 (58)			低表达组	21 (42)		
T ₄	3 (6)						

表 3 食管鳞癌患者多因素预后分析参数

因素	b	S_b	Wald χ^2	P 值	$\hat{RR}$	95% CI	
						下限	上限
临床分期	0.919	0.419	4.819	0.052	2.319	0.993	5.422
Cdc25C	0.841	0.433	3.770	0.028	0.399	0.176	0.906

3 讨论

食管癌发病率高, 预后差, 严重威胁人类的生命安全。早期食管癌首选手术切除已成为共识, 并且疗效确切, 但对局部晚期食管癌单纯手术切除 5 年生存率仍较低, 而大多数患者就诊时已处中晚期^[6-7], 同步放化疗是非手术局部晚期食管癌标准治疗模式^[8]。在我国, 鳞癌是食管癌的主要病理类型, 约占 90%, 鳞癌对放疗中度敏感, 单纯放疗时 5 年生存率仅 10% ~ 15%^[9-10]。然而, 食管鳞癌细胞存在放射敏感性差异, 增加放射治疗的剂量并不一定能改善 5 年生存率或无病生存^[11], 因此, 放疗之前或者放疗期间准确预测食管癌的放疗敏感性, 采取合理的个体化治疗方案, 寻找可以

预测食管癌放疗疗效的生物标志物显得尤为重要。

近年来, 与食管癌放疗敏感性有关的分子标志物陆续报道, 目前报道较多的有抑癌基因 $P53$ 、细胞周期调控子 (Cdc25C、Cyclin D1)、DNA 损伤修复相关因子、凋亡相关因子 (HDAC1、端粒酶) 等^[12], 其中 Cdc25C 是细胞分裂磷酸化酶 25 家族中的一员, 参与真核细胞有丝分裂周期的调控, 在正常的细胞周期中具有重要作用, 若其表达异常, 将会导致细胞周期紊乱、失常, 从而发生肿瘤^[13]。已有众多研究显示, Cdc25C 是一种肿瘤相关抗原^[14], 在对肝癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌等研究中发现 Cdc25C 的表达较正常组织升高, 提示 Cdc25C 在肿瘤发生、发展过程中起重要作用^[15]。

目前,关于 Cdc25C 影响食管癌细胞放疗敏感性机制可能有多种,但具体机制仍不清楚。放疗主要是电离辐射通过直接作用或间接作用导致细胞 DNA 的损伤,从而引起细胞死亡^[16]。放疗效果不佳主要有两方面的原因:①细胞本身原因或其肿瘤细胞微环境保护从而导致细胞对射线不敏感;②电离辐射后 DNA 损伤修复;后者是主要因素^[17]。在细胞修复的过程中,细胞周期检验点蛋白表达水平的差异在 DNA 损伤修复方面具有举足轻重的作用^[18],肿瘤细胞的高 DNA 损伤修复能力将导致对放射线的抵抗。有文献报道,肿瘤细胞受到辐射损伤后产生的 DNA 双链断裂主要通过激活 ATM-Chk2-Cdc25C 通路修复,此通路可引起 G2/M 期停滞,使肿瘤细胞有足够的时间修复损伤的 DNA^[19]。在正常细胞周期中,Cdc25C 对细胞周期的调控是通过活化 Cyclin B/Cdc2 复合物使细胞由 G2 期进入到 M 期来调控的^[11-12]。在分裂间期 Cdc2 上的 Tyr15 和 Thr14 存在抑制性磷酸化,该磷酸化状态使 Cyclin B/Cdc2 复合物失活,使细胞无法分裂,而 Cdc25C 则可使 Tyr15 和 Thr14 去磷酸化后活化,进而使细胞分裂^[20]。Cdc25C 作为 ATM-Chk2-Cdc25C 信号通路的下游底物,是 G2/M 期检查点的重要效应因子^[21]。在细胞受到辐射损伤后,检查点感受器 ATM 感知 DNA 损伤并活化,继而磷酸化其下游底物 Chk2,被磷酸化后的 Chk2 使 Cdc25C 上丝氨酸第 216 位残基发生抑制性磷酸化^[22-23],从而失去使 Cdc2 去磷酸化后活化的能力,分裂进程因此被抑制,受损的细胞被阻滞在 G2 期而获得足够的时间进行修复,从而增加肿瘤细胞对放射线的抵抗性^[24]。

在前期研究中,构建食管癌放疗抵抗细胞(TE13-R),并发现 Cdc25C 蛋白在 TE13-R 细胞中表达上调,当利用 Cdc25C 干扰质粒转染 TE13-R 细胞后,可抑制 Cdc25C 蛋白的表达,同时癌细胞放疗抵抗消失。其结果提示 Cdc25C 的表达与食管癌的放疗抵抗密切相关,Cdc25C 的高表达可能增强食管癌对放射线的抗拒,Cdc25C 可能是食管癌放疗敏感性相关基因。因此,为进一步明确 Cdc25C 与食管癌放疗抵抗的关系,本文收集临床病例资料,采用免疫组织化学法检测 Cdc25C 在食管鳞癌组织中的表达情况,结果显示 Cdc25C 在食管鳞癌中高表达且与患者预后不良有关。

综上所述,Cdc25C 表达水平可能与食管鳞状细胞癌放疗抵抗相关,Cdc25C 有望作为食管鳞癌放射治

疗中的潜在判断预后的分子标志物,并可能具有预后判断、监测临床疗效的作用。但因本研究病例数较少,仍需开展大规模的临床试验及相关的细胞分子实验加以证实。

参 考 文 献:

- [1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2017,26(1): 1-7.
- [2] LIN Y S, TOTSUKA Y, HE Y T, et al. Epidemiology of esophageal cancer in Japan and China[J]. Epidemiol, 2013, 23(4): 233-242.
- [3] ZHENG R Z, LIU Y H, ZHANG X L, et al. miRNA-200c enhances radiosensitivity of esophageal cancer by cell cycle arrest and targeting P21[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 517-523.
- [4] EDGE S B, BYRD D R, CONPONT C C, et al. AJCC Cancer Staging Manual[M]. Chincago: Springer, 2010: 129-143.
- [5] WAN J, XIAO A Q, GAO S Z, et al. Evaluation criteria for short-term efficacy of radiotherapy for esophageal cancer[J]. Chin J Radiat Oncol, 1989, 3(4): 205-207.
- [6] 冉刚,周丽珍,周超,等. 局部中晚期食管癌术前新辅助放化疗联合食管癌根治术的临床研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2017,26(8): 874-879.
- [7] REEH M, NENTWICH M F, ASANI S, et al. Locally advanced esophageal carcinoma: is there still a role of surgery alone without neoadjuvant treatment[J]. Gastrointest Surg, 2015, 19(4): 587-593.
- [8] 王修身,张羲茜,刘晓,等. 食管癌同步放化疗的疗效及预后因素分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2017,26(4): 400-404.
- [9] 石祥宇,章文成,关勇,等. 食管癌 IMRT 中肿瘤及转移淋巴结大小对预后影响分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2017,26(12): 1389-1393.
- [10] WELSH J, SETTLE S H, AMINI A, et al. Failure patterns in patients with esophageal cancer treated with definitive chemoradiation[J]. Cancer, 2012, 118(10): 2630-2640.
- [11] PAL I, DEY K, CHAURASIA M, et al. Cooperative effect of BI-69A11 and celecoxib enhances radiosensitization by modulating DNA damage repair in colon carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(5): 63-89.
- [12] WONG C, LAW S. Predictive factors in the evaluation of treatment response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with advanced esophageal squamous cell cancer[J]. Thorac Dis, 2017, 9 (8): S773-S780.
- [13] WANG J, CHANG L H, LAI X P, et al. Tetrandrine enhances radiosensitivity through the Cdc25C/CD-K1/Cyclin B1 pathway in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cell Cycle, 2017, 17(6): 671-680.
- [14] CHOU Y W, ZHANG L, MUNIYAN S, et al. Androgens upregulate Cdc25C protein by inhibiting its proteasomal and lysosomal degradation pathways[J]. PLoS One, 2013, 8: e61934.
- [15] PRASAD T, JAYASOORIYA R, GEDARA D, et al. Camptothecin induces G2/M phase arrest through the ATM-Chk2-Cdc25C axis as a result of autophagy-induced cytoprotection: Implications of

- reactive oxygenspecies[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(31): 21744-21757.
- [16] BEISHLIN K, AZIZKHAN-CLIFFORD J. Interplay between the cell cycle and double-strand break response in mammalian cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1170: 41-59.
- [17] BOUTROS R, DOZIER C, DUCOMMUN B. The when and where of Cdc25 phosphatases[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 18: 185-191.
- [18] YANG H, WU L, KE S B, et al. Downregulation of Ubiquitin-conjugating Enzyme UBE2D3 promotes telomere maintenance and radioresistance of Eca-109 Human esophageal carcinoma cells[J]. *Cancer*, 2016, 7(9): 1152-1162.
- [19] YONG K J, MILENIC D E, BAIDOO K E, et al. Sensitization of tumor to 212Pb radioimmunotherapy by gemcitabine involves initial abrogation of G₂ arrest and blocked DNA damage repair by interference with Rad51[J]. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2013, 85: 1119-1126.
- [20] 谭慧心, 董彦宏, 关文辉, 等. 细胞周期调控与肿瘤发生和治疗的的关系研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报, 2015, 31(6): 667-670.
- [21] MORGAN D O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 13: 261-291.
- [22] MCGOWAN C H, RUSSELL P. The DNA damage response: sensing and signaling[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 16: 629-633.
- [23] ANASTASOV N, HOFIG I, VASCONCELLOS I G, et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells[J]. *Radiat Oncol*, 2012, 7: 206.
- [24] MORRIS M C, HEITZ A, MERY J, et al. An essential phosphorylation-site domain of human Cdc25C interacts with both 1433 and cyclins[J]. *J Biol Chem*, 2015, 275: 28849-28857.
- (张西倩 编辑)
- 本文引用格式: 董倩, 叶旭, 廖前进, 等. Cdc25C 在食管鳞状细胞癌中的表达及与预后的关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(9): 43-48.