

· 论 著 ·

食管鳞癌中 β -catenin 及淋巴细胞结合增强因子 1 的表达及其与近期放疗疗效的关系

黄晓智, 熊伟, 刘洋, 易宣洪

唐山市人民医院放化四科, 河北 唐山 063000

摘要: **目的** 检测 β -catenin 及淋巴细胞结合增强因子(LEF)1 蛋白在食管鳞癌中的表达及食管癌放疗疗效之间的关系,初步探讨上述基因发挥作用的分子通路。**方法** 选择 2010 年 1 月至 2016 年 12 月就诊的 59 例食管鳞癌患者,均为不能接受手术的局部晚期患者,经穿刺或诊断性手术诊断为食管鳞癌,接受根治性放疗。采用免疫组化法检测上述食管癌组织细胞中 β -catenin 及 LEF1 蛋白的表达。应用 χ^2 检验分析 β -catenin 及 LEF1 表达情况与患者近期放疗疗效的关系,应用 Spearman 相关性分析 β -catenin 及 LEF1 表达是否存在相关性。**结果** 在食管鳞癌组织中 β -catenin 蛋白主要表达在胞质及胞核,LEF1 蛋白主要表达在胞核。食管鳞癌组织中 β -catenin 蛋白在胞浆 + 胞核中的阳性表达率在近期放疗有效组和无效组中差异无统计学意义($\chi^2 = 0.83, P = 0.36$); β -catenin 蛋白在胞核中阳性表达率在近期放疗有效组和无效组中表达差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.91, P = 0.03$)。LEF1 蛋白胞核中阳性表达率在近期放疗无效组和有效组差异有统计学意义($\chi^2 = 6.11, P = 0.01$)。 β -catenin 表达与 LEF1 胞核阳性表达呈正相关关系($r_s = 0.81, P < 0.01$)。**结论** 食管癌放射抵抗中可能存在 Wnt 通路上活化, β -catenin 发生核聚集后激活胞核中 LEF1,从而激活下游功能原件,发挥放射抵抗作用,从而影响食管癌的近期疗效。

关键词: β -连环蛋白; 淋巴细胞结合增强因子 1; Wnt 通路; 食管癌; 放射抵抗

中图分类号: R 735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)09-1193-04

Expressions of β -catenin and LEF1 in esophageal squamous cell carcinoma and their relationships with the efficacy of radiotherapy

HUANG Xiao-zhi, XIONG Wei, LIU Yang, YI Xuan-hong

Department of Radiochemistry, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China

Corresponding author: XIONG Wei, E-mail: weini197705@163.com

Abstract: Objective To detect the expressions of β -catenin and lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues to investigate the relationship between their expression and the efficacy of radiotherapy and primarily explore the molecular signaling pathway of above gene functions. **Methods** Fifty-nine patients with locally advanced ESCC confirmed by biopsy and received radical radiotherapy from January 2010 to December 2016 were selected and divided into effective group and ineffective group. The expressions of β -catenin and LEF1 protein in esophageal carcinoma cells were detected by immunohistochemistry. Chi square test was used to analyze the associations of the expressions of β -catenin and LEF1 with the short-term efficacy of radiotherapy. Spearman correlation was used to analyze the relationship between β -catenin and LEF1. **Results** β -catenin was mainly expressed in cytoplasm and nucleus, while LEF1 protein was mainly expressed in nucleus. There was no significant difference in the positive expression rate of β -catenin in cytoplasm and nucleus between effective group and ineffective group ($\chi^2 = 0.83, P = 0.36$), but there was statistical difference in it in nucleus between two groups ($\chi^2 = 4.91, P = 0.03$). There was statistical difference in positive expression rate of LEF1 protein between two groups ($\chi^2 = 6.11, P = 0.01$). There was a positive correlation between β -catenin expression and LEF1 expression ($r_s = 0.81, P < 0.01$). **Conclusion** Activation of Wnt pathway may exist in the radiation resistance of esophageal cancer. β -catenin can activate LEF1 in the nucleus after nuclear aggregation, which can activate downstream components and play a role in radiation resistance, thus affecting the short-term efficacy of radiotherapy in ESCC patients.

Key words: β -catenin; Lymphoid enhancer-binding factor 1; Wnt pathway; Esophageal cancer; Radiation resistance

Fund program: Planned Project of Tangshan Science and Technology Bureau (17130238a)

在“食管癌高发地带”的中国晋冀豫交界地区,食管癌发病率比世界上低发区要高出近 60 倍之多^[1]。随着放射治疗(放疗)技术的发展,目前放疗已经成为食管癌非手术治疗的主要手段之一。临床中经常见到部分食管癌患者临床分期相近,但放疗后疗效存却在明显差异,可能由于其基因突变谱的差异。研究表明放射抵抗性是肿瘤局部复发和放疗失败的重要原因,各种信号转导通路可能在食管癌的放射抵抗形成过程中起到非常重要的作用^[2]。前期分子生物学实验结果提示经典的 Wnt/ β 连环蛋白(β -catenin)信号通路活化,即 β -catenin 及淋巴细胞结合增强因子(LEF)1 高表达,可能与食管癌放射抵抗性相关。基于前期研究背景,本课题搜集 2010 至 2016 年期间在本院接受根治性放疗的食管鳞癌患者病理标本 59 例,对 β -catenin 及 LEF1 的表达水平及表达部位情况进行检测,并分析其与食管鳞癌放疗效果的相关性及两者间表达的相关性,为寻求放射抵抗性相关分子靶标,提高食管鳞癌放疗效果提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2016 年 12 月就诊于唐山市人民医院初诊,经活检病理诊断为食管鳞状细胞癌,无手术指征或有手术禁忌的接受根治性放疗的患者 59 例。收集以上患者放疗前的胃镜活检肿瘤组织的石蜡标本。具体入组条件:(1)初诊于唐山市人民医院的食管癌患者,均于放疗前行电子胃镜活检,活检病理标本均证实为食管鳞状细胞癌;(2)患者均于唐山市人民医院放疗科完成食管癌根治性放疗,治疗前后完善胸部 CT 和食管造影等相关检查;(3)无明确放疗禁忌证,治疗前 KPS 评分 > 70 分,无严重其他系统疾病;(4)患者无手术指征或存在手术禁忌而选择食管癌选择根治性放疗。排除条件:因考虑到化疗药物对疗效观察的影响,放化同期的患者不纳入本实验。入组患者包括男性 39 例,女性 20 例;年龄 25 ~ 84 岁;有淋巴结转移 34 例,无淋巴结转移 25 例;17 例病变长度 < 5 cm,42 例病变长度 \geq 5 cm。参照文献^[3]提出的非手术治疗食管癌临床分期:I 期 + II 期患者 39 例,III 期 + IV 期患者 20 例。

1.2 主要试剂 β -catenin 鼠抗人单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术)。LEF1 兔抗人多克隆抗体(北

京博奥森生物技术)。PV-9000 免疫组织化学二步法检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术)。

1.3 检测方法 采用免疫组化法检测食管癌组织细胞中 β -catenin 及 LEF1 蛋白的表达情况。将组织标本制成 4 μ m 切片,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱苯、水化后,进行免疫组化染色,按试剂说明书操作, β -catenin 一抗浓度均为 1:300,LEF1 一抗浓度均为 1:100。阴性对照以 PBS 取代一抗。经 DAB 染色后,由专业病理科医师进行结果判读。

1.4 免疫组织化学法结果判定标准^[4] 阳性结果判定: β -catenin 定位于食管癌细胞的胞质和胞核中,阳性表达时为棕黄色颗粒;LEF1 定位于食管癌细胞的胞核中,阳性表达时为棕黄色颗粒。每份食管癌病理组织标本均在高倍镜下选择 3 个视野($\times 400$),每个视野计数 200 个肿瘤细胞。由专业病理医师根据细胞染色强度及染色阳性细胞所占的百分比进行结果判读:(1)1 分为阳性表达细胞所占百分比 < 25%,2 分为 25% ~ 50%,3 分为 > 50% ~ 75%,4 分为 > 75%。(2)染色强度:0 分为细胞不着色,1 分为浅棕黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。(3)最后以染色阳性细胞百分比评分乘以染色强度评分所得乘积来判断结果,上述两项评分乘积 0 ~ 2 为阴性表达, \geq 3 分为阳性表达。

1.5 靶区勾画及放疗方法 (1)肿瘤靶区(GTV):靶区范围包括不含气腔的管壁直径 > 1.0 cm 或食管壁厚度 > 0.5 cm;肿大淋巴结,位于纵隔部位的淋巴结阳性标准为短径 \geq 1.0 cm,位于特殊部位的淋巴结如食管旁、气管食管沟等处标准为短径 \geq 0.5 cm,并参考食管钡剂造影。(2)临床靶区(CTV):靶区范围为上述的 GTV 在头脚方向各外扩 2 cm,前后左右方向各自外扩 0.8 cm,如遇解剖屏障适当修正。(3)计划靶区(PTV):靶区范围为上述 CTV 在头脚方向外扩 1 cm,前后左右方向外扩 0.5 cm。放疗方法均采用三维适形放疗,常规分割 2.0 Gy/次,近似剂量 60 ~ 66 Gy/30 ~ 33 次。

1.6 放疗近期疗效评价标准 在患者放疗结束 1 ~ 3 个月由两到三名位经验丰富的放疗科主任医师分别对患者进行近期疗效的评价,评价标准参照 1989 年万钧教授等^[5]所提出的食管癌放疗后近期疗效的评价标准,完全缓解为 CR;部分缓解为 PR;无缓解为 NR。疗效评价意见不一致时通过协商讨论以达成一

致意见。放疗有效组为近期疗效 CR + PR 的患者,放疗无效组为近期疗效 NR 的患者。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 10.0 统计软件包对数据进行处理。采用 χ^2 检验分析 β -catenin 及 LEF1 蛋白与食管癌放疗近期疗效的关系;应用 Spearman 秩相关法分析 β -catenin 及 LEF1 蛋白表达水平的相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 59 例患者放疗近期疗效 CR 13 例,PR 17 例, NR 29 例,总有效率为 50.8% (30/59)。

2.2 在食管鳞癌组织细胞中 β -catenin 的表达情况与近期疗效的关系 β -catenin 蛋白阳性表达呈棕褐色的颗粒,主要位于食管鳞癌细胞的胞质及胞核中,见图 1a。 β -catenin 蛋白胞浆 + 胞核阳性表达率在无效组和有效组中差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.83, P = 0.36$); β -catenin 蛋白胞核阳性表达率在放疗无效组高于有效组 ($\chi^2 = 4.91, P = 0.03$)。见表 1、2。

2.3 在食管鳞癌组织细胞中 LEF1 的表达情况及与近期疗效的关系 LEF1 蛋白表达呈棕褐色颗粒,主要位于食管鳞癌组织细胞的胞核中,见图 1b。食管鳞癌组织中 LEF1 蛋白胞核阳性表达率在放疗无效组高于放疗有效组 ($\chi^2 = 6.11, P = 0.01$)。见表 3。

2.4 在食管鳞癌组织细胞中 β -catenin 与 LEF1 表达的相关性分析 肿瘤细胞中 β -catenin 蛋白与 LEF1 蛋白表达的相关关系采用 Spearman 秩相关分析,结果显示食管鳞癌细胞核中 β -catenin 蛋白的阳性表达与胞核中 LEF1 蛋白的阳性表达存在正相关关系 ($r_s = 0.81, P < 0.01$)。

表 1 放疗近期疗效与 β -catenin 胞浆 + 胞核表达情况的关系 (例)

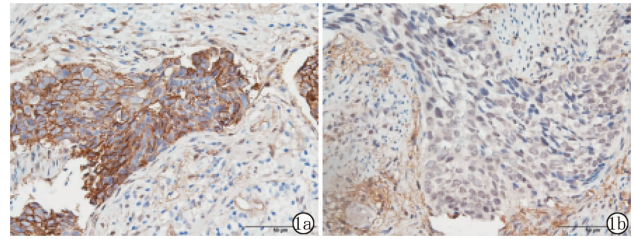
组别	例数	β -catenin 胞浆 + 胞核表达情况		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
有效组	30	17	13	0.83	0.36
无效组	29	13	16		

表 2 放疗近期疗效与 β -catenin 胞核表达情况的关系 (例)

组别	例数	β -catenin 胞核表达情况		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
有效组	30	19	11	4.91	0.03
无效组	29	10	19		

表 3 放疗近期疗效与 LEF1 胞核表达情况的关系 (例)

组别	例数	LEF1 胞核表达情况		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
有效组	30	21	9	6.11	0.01
无效组	29	11	18		



注: 1a: β -catenin 蛋白胞质及胞核阳性表达的食管癌组织; 1b: LEF1 蛋白胞核阳性表达的食管癌组织。

图 1 β -catenin 及 LEF1 在食管癌组织中的表达 (SP, $\times 400$)

3 讨论

随着放疗技术的发展,其已经成为目前食管癌主要治疗手段之一,尤其是对于那些无法接受手术的食管鳞癌患者。然而放疗后肿瘤的局部未控及局部复发仍然是阻碍放疗疗效提高的瓶颈。研究发现,增加放疗剂量不能改善局部控制率与生存期,这表明在食管癌瘤体的内部可能存在着放射抵抗。关于肿瘤细胞放射抵抗分子机制的研究已成为寻求提高放疗疗效的突破口。

在肿瘤发生及进展过程中发挥关键作用的典型 Wnt/ β -catenin 通路,逐渐引起了放疗学者的关注。在该途径中,Wnt 配体可结合卷曲蛋白 (Frz) 受体激活蓬乱蛋白 (DSH), β -catenin 磷酸化将被抑制,导致细胞内 β -catenin 的积累及核易位,随后 β -catenin 将作为转录共激活因子与胞核中的 T 细胞因子 (TCF)/LEF1 复合物,并激活下游靶基因使其过表达,如 Cyclin D1, PLA2G2 和 c-MYC 等。Wnt/ β -catenin 信号通路被激活后, β -catenin 将从细胞质转移到细胞核中,并结合 TCF/LEF1 家族成员,上述过程可将共激活因子 β -catenin 聚集到它们所靶向的基因增强子元件之中。迄今为止已有接近 50% 的人类肿瘤显示与 Wnt/ β -catenin 信号通路的调节异常相关,该通路可能通过影响肿瘤细胞的增殖^[6]、凋亡^[7]、DNA 损伤修复^[8-9]等方面参与肿瘤的放射抵抗性。而且,Wnt 通路已被证实可能通过激活 β -catenin,上调 COX2 而引起结直肠癌的放射抵抗发生^[10-11]。

β -catenin 与 LEF1 作为经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键基因,在人类多种恶性肿瘤中均存在着异常。 β -catenin 基因,全称为钙黏蛋白相关蛋白,为 Wnt/ β -catenin 信号通路途径中的标志性基因之一,对上皮层的构建和维持起着至关重要的作用。有文献报道, β -catenin 与各类型乳腺癌的发生、发展有着密切的相关^[12]。有学者应用免疫组化技术检测到 β -catenin 和 LEF1 蛋白的表达主要集中在结直肠癌、白血病、乳腺癌等恶性肿瘤,但在食管癌中关于上述蛋

白的表达情况的相关报道较少。LEF1 基因, 全称 Wnt/β-catenin 信号通路途径中的标志性基因之一。学者最初发现其表达于前 B 细胞和 T 细胞中, 可与 T 细胞受体 α 结合发挥诱导 T 细胞成熟和分化的作用。LEF1 在许多肿瘤细胞中均存在高表达, 如其可促进肿瘤细胞的侵袭, 与肿瘤的生长、转移相关^[13]。

前期课题组通过分子生物学实验发现相关 Wnt/β-catenin 信号通路可能是参与食管癌放射抗性过程的重要信号传导通路, LEF1 和 CTNNB1 作为该通路中的两个关键性基因发挥重要作用。Wnt/β-catenin 信号通路可能是通过调控细胞周期 G2 期阻滞, 具体地参与了放射抵抗性的形成^[14-15]。上述结果与 Wnt/β-catenin 信号通路通过调控其下游的因子如 cyclin D1、MMP-7、c-myc 等发挥生物学作用的报道相一致^[16]。本课题通过在食管鳞癌组织中检测 β-catenin 及 LEF1 蛋白的表达发现 β-catenin 蛋白主要阳性表达部位为细胞的胞质及胞核, LEF1 蛋白主要表达于细胞的胞核。近期放疗无效组中 β-catenin 和 LEF1 蛋白的胞核阳性表达率高于放疗有效组。同时 β-catenin 与 LEF1 在食管癌中的阳性表达存在正相关关系。综上推测, 食管癌放射抵抗中可能存在 Wnt/β-catenin 信号通路活化, β-catenin 发生核聚集后可激活胞核中的 LEF1, 从而激活其下游的功能原件, 在食管癌中发挥放射抵抗作用, 从而影响放疗的近期疗效。对于 β-catenin 及 LEF1 等 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白的检测及药物研发可能对评估食管癌患者放疗的疗效及针对性的个体化治疗有重要意义。

参考文献

- [1] 宋国慧, 李东方, 孟凡书, 等. 磁县 2003 - 2012 年上消化道癌发病率分析[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(10): 887 - 893.
- [2] 张红, 吴清明. 食管癌放射抗拒的细胞信号通路研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(4): 425 - 427.
- [3] 中国非手术治疗食管癌临床分期专家小组. 非手术治疗食管癌

的临床分期标准(草案)[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2010, 19(3): 179 - 180.

- [4] 李春辉, 潘理会, 佟晓波, 等. Wnt 信号通路的组件蛋白 DKK-1、β-链接素及周期素 D1 蛋白表达与胃癌的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5): 1171 - 1173.
- [5] 万钧, 肖爱勤, 高淑珍, 等. 食管癌放疗后近期疗效评价标准——附 1000 例分析[J]. 中国放射肿瘤学, 1989, 3(4): 3 - 5.
- [6] Wu DP, Li L, Yan W. Knockdown of TC-1 enhances radiosensitivity of non-small cell lung cancer via the Wnt/β-catenin pathway[J]. Biol Open, 2016, 5(4): 492 - 498.
- [7] Wang GY, Li ZW, Zhao Q, et al. Linc RNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for human colorectal cancer by targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1839 - 1845.
- [8] Chang HW, Nam HY, Kim HJ, et al. Effect of β-catenin silencing in overcoming radioresistance of head and neck cancer cells by antagonizing the effects of AMPK on Ku70/Ku80[J]. Head Neck, 2016, 38(S1): E1909 - E1917.
- [9] Jun S, Jung YS, Suh HN, et al. LIG4 mediates Wnt signalling-induced radioresistance[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10994.
- [10] Gassler N, Herr I, Keith M, et al. Wnt-signaling and apoptosis after neoadjuvant short-term radiotherapy for rectal cancer[J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1543 - 1549.
- [11] Gregory Buchanan F, Dubois RN. Connecting COX-2 and Wnt in cancer[J]. Cancer Cell, 2006, 9(1): 6 - 8.
- [12] Lacroix-Triki M, Geyer FC, Lambros MB, et al. β-catenin/Wnt signalling pathway in fibromatosis, metaplastic carcinomas and Phyllodes tumours of the breast[J]. Mod Pathol, 2010, 23(11): 1438 - 1448.
- [13] Huang FI, Chen YL, Chang CN, et al. Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(6): 1142 - 1148.
- [14] 熊伟, 赵静, 黄晓智, 等. 钙黏蛋白相关蛋白及淋巴细胞结合增强因子通过 Wnt 通路调控 G2 期阻滞发挥食管癌放射抵抗作用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(2): 7 - 10.
- [15] 黄晓智, 姚淑晖, 刘洋, 等. 经典 Wnt 通路的异常活化与食管癌放射抵抗的关系[J]. 中国临床研究, 2016, 29(4): 485 - 487.
- [16] 兰翀, 聂小鑫, 史玉林, 等. TC1 和 β-连环蛋白在宫颈癌和癌前病变组织中表达的关系和意义[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(1): 7 - 11.

收稿日期: 2019 - 12 - 11 修回日期: 2020 - 06 - 28 编辑: 王娜娜