

STAT3 和 ZEB1 在食管鳞癌中的表达及其与放疗敏感性的关系

邵 艳^{1,2}, 马兆明^{1,2}, 张建国², 杨淑君², 何 侠^{1,3}

(1.南京医科大学第四临床医学院, 江苏 南京 210009; 2.连云港市第二人民医院, 江苏 连云港 222000; 3.江苏省肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

摘要: [目的] 研究 STAT3 和 ZEB1 在食管鳞癌组织中的表达及其与放疗敏感性的关系。[方法] 采用免疫组化法分别检测 100 例食管癌组织中 STAT3 和 ZEB1 的表达情况, 并分析其与放疗敏感性的关系。[结果] STAT3 和 ZEB1 的阳性表达率分别为 66.0%(66/100) 和 64.0%(64/100)。低分化以及临床分期为 T₃+T₄ 的组织 STAT3 表达阳性率分别为 85.7%(30/35)、82.9%(42/51), 均显著高于中、高分化以及临床分期为 T₁+T₂ 组织中的 55.4%(36/65)、49.0%(24/49); 低分化以及临床分期为 T₃+T₄ 的组织 ZEB1 表达阳性率分别为 85.7%(30/35)、76.5%(39/51), 均显著高于中、高分化以及临床分期为 T₁+T₂ 组织中的 52.3%(34/65)、51.0%(25/49), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。放疗有效组的 STAT3、ZEB1 阳性率均显著低于放疗无效组, 差异均有统计学意义 (59.2% vs 87.5%, $P=0.011$; 55.3% vs 91.7%, $P=0.001$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示 T 分期是影响放疗疗效的独立因素 ($P=0.001$)。食管癌组织中 STAT3 与 ZEB1 的表达呈正相关 ($r=0.341$, $P=0.001$)。[结论] STAT3 和 ZEB1 蛋白表达与食管癌放疗的敏感性呈负相关, 二者可能可作为预测食管癌患者的放射敏感性的分子标志物。

关键词: 食管肿瘤; 放疗敏感性; 信号转导和转录酶活因子 3; E 盒结合锌指蛋白 1

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)12-01055-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.12.B002

STAT3 and ZEB1 Expressions in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Their Relationship with Radiosensitivity

SHAO Yan^{1,2}, MA Zhao-ming^{1,2}, ZHANG Jian-guo², et al.

(1.The Fourth Clinical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China; 2.The Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222000, China)

Abstract: [Objective] To study the expressions of signal transduction and transcription activating factor 3(STAT3) and zinc finger E-box-binding protein 1(ZEB1) in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) and their relationship with radiosensitivity. [Methods] The expressions of STAT3 and ZEB1 were observed using the immunohistochemical method in 100 cases of ESCC before radiotherapy, and their relationship with radiosensitivity was analyzed. [Results] The positive rates of STAT3 and ZEB1 were 66%(66/100) and 64%(64/100), respectively. The positive rates of STAT3 in the group of low differentiation and that in clinical stages T₃+T₄ were 85.7%(30/35) and 82.9%(42/51), respectively, significantly higher than those in the group of medium and high differentiation and that in clinical stages T₁+T₂ [55.4%(36/65) and 49.0%(24/49)], respectively (all $P<0.05$). The positive rates of ZEB1 in the group of low differentiation and that in clinical stages T₃+T₄ were 85.7%(30/35) and 76.5%(39/51), respectively, significantly higher than those in the group of medium and high differentiation and that in clinical stages T₁+T₂ [52.3%(34/65) and 51.0%(25/49)], respectively (all $P<0.05$). The positive rates of STAT3 and ZEB1 in the radiation-effective group were significantly lower than those in the radiation-invalid group (59.2% vs 87.5%, $P=0.011$; 55.3% vs 91.7%, $P=0.001$). Multivariate logistic regression analysis showed that T stage was the only independent predictor of radiotherapeutic response in ESCC ($P=0.001$). The expression of STAT3 was significantly positively correlated with that of ZEB1 ($r=0.341$, $P=0.001$). [Conclusion] STAT3 and ZEB1 expressions were negatively correlated with the radiosensitivity of ESCC. STAT3 and ZEB1 may be used as molecular markers to predict the sensitivity of radiotherapy for patients with ESCC.

Subject words: esophageal carcinoma; radiosensitivity; signal transduction and transcription activating factor 3(STAT3); zinc finger E-box-binding protein 1(ZEB1)

信号转导和转录酶活因子(signal transducer and

activator of transcription, STATs) 属于细胞中最大的信号通路之一, 其主要功能包括信号转导以及信号转录的调控, 在细胞的增殖、分化、转移及侵袭中起着至关重要的作用。而 STAT3 作为 STATs 家族的成员之一, 目前已成为临床关注的热点, 且有研究报道

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”项目(WS-047); 专科建设(ZS201203)

通讯作者: 何 侠, 科主任, 主任医师, 教授, 博士生导师, 博士; 江苏省肿瘤医院放疗科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: hexia206@sina.com

收稿日期: 2017-05-10; **修回日期:** 2017-08-01

发现,其在人类多种肿瘤疾病的发生、发展中发挥着重要作用^[1,2]。E 盒结合锌指蛋白 1(zinc-finger E-box-binding homeobox factor-1, ZEB1)是一种锌指蛋白类转录因子,其在多种恶性肿瘤组织中高表达^[3-5]。本研究分析 STAT3 和 ZEB1 在食管癌中的表达及其与放疗敏感性关系,对 STAT3 和 ZEB1 在食管癌患者放疗治疗中的价值进行评估。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2010 年 1 月至 2015 年 12 月在我院行根治性放疗的 100 例食管癌患者胃镜活检组织标本,其中男性 79 例,女性 21 例,年龄 42~82 岁,中位年龄 66 岁;病变部位:食管颈段 11 例,胸上段 22 例,胸中段 45 例,胸下段 22 例;参照非手术治疗食管癌的临床分期标准进行 T 分期^[6],其中 T₁ 期 22 例, T₂ 期 27 例, T₃ 期 34 例, T₄ 期 17 例。纳入标准:(1)所有患者均经临床病理诊断确诊为食管癌;(2)均为初治;(3)临床资料完整;(4)均经放疗治疗;(5)均为鳞癌。本研究所有患者均签署知情同意书,且经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化试剂及方法

主要试剂包括兔抗人 STAT3 单克隆抗体(购自 CST 公司),羊抗人 ZEB1 多克隆抗体(购自 Santa Cruz 公司),免疫组化二抗试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥公司。

所有组织标本均制成 4 μ m 厚切片,使用二甲苯进行脱蜡,同时予以梯度酒精水化,采用高压抗原修复,采用免疫组织化学染色法进行检测。

1.2.2 免疫组化评分标准

STAT3 与 ZEB1 蛋白阳性表达为细胞质中出现棕黄色颗粒。结果判定标准如下:主要是根据染色强度与阳性细胞百分率进行综合评分。随机选取每例切片 10 个高倍镜视野。无阳性细胞为 0 分,阳性细胞占比 $\leq 25\%$ 为 1 分, 25%~50%为 2 分, 50%~75%为 3 分, >75%为 4 分;细胞质无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。最终结果为阳性细胞比例得分+细胞着色得分, ≥ 3 分为阳性, 0~2 分为阴性。

1.2.3 放疗方法

采用瓦里安直线加速器, 6MV-X 线放疗。所有患者均取仰卧位,使用螺旋 CT 进行定位扫描,勾画靶区及周围正常器官。综合 CT 扫描图像与钡餐造影及胃镜检查结果确定肿瘤靶区(GTV),CT 所示的短径 ≥ 1.0 cm 转移性颈部及纵隔肿大淋巴结为 GTVnd,临床靶体积(CTV)包括 GTV、GTVnd 及相应淋巴引流区,并在 GTV 上下方向外扩 3~5cm,或在有淋巴结转移的 CT 层面上下各放 1.5cm, GTV 和 GTVnd 前后左右外扩 0.8cm, CTV 上下及前后左右各外放 0.5 cm 为计划靶体积(PTV)。放疗方法采用三维适形放疗或调强放疗,由物理师根据要求制定治疗方案,要求 95%的 PTV 接受 100%以上的处方剂量。PTV 放疗剂量 60 Gy/30 次, 6 周, 2.0Gy/次, 1 次/d, 5 次/周。双肺 V20 $\leq 25\%$ ~28%,肺平均剂量 ≤ 13 Gy,心脏 V30 $\leq 40\%$ 、V40 $\leq 30\%$,脊髓 ≤ 45 Gy。

1.3 评价指标

放疗结束后 1~3 个月内行食管钡餐造影检查,近期疗效评价采用万钧食管癌放射治疗后即时疗效评价标准^[7]:完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、无效(NR),以 CR+PR 计算有效率。

1.4 统计学处理

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件进行。 χ^2 检验分析计数资料,相关性分析采用 Pearson 检验;采用 Logistic 回归分析进行多因素分析,筛选影响放疗敏感性的因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌组织中 STAT3、ZEB1 表达与临床病理特征的关系

STAT3 阳性表达为细胞质中出现棕黄色颗粒,食管癌组织中 STAT3 的阳性率为 66.0%(66/100)。低分化以及临床分期为 T₃+T₄ 的组织 STAT3 表达阳性率分别为 85.7%(30/35)、82.9%(42/51),均显著高于中、高分化以及临床分期为 T₁+T₂ 组织中的 55.4%(36/65)、49.0%(24/49),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。STAT3 表达与患者年龄、性别及肿瘤部位无关。见 Figure 1, Table 1。

ZEB1 阳性表达为细胞质中出现棕黄色颗粒,食

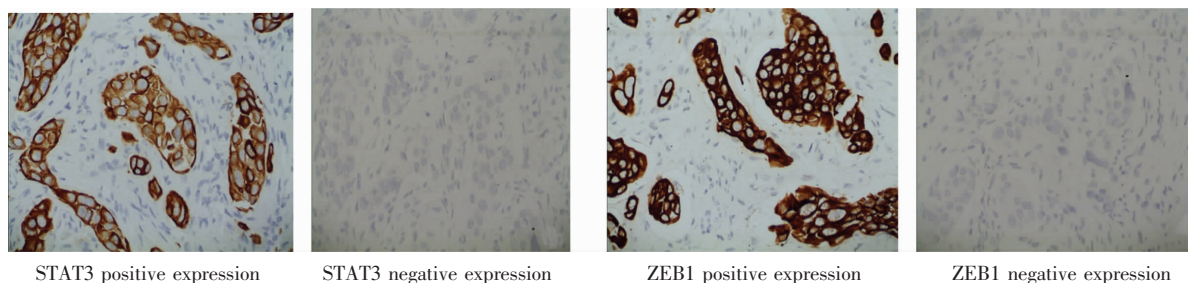


Figure 1 Immunohistochemistry staining of STAT3 and ZEB1 in ESCC tissues($\times 400$)

管癌组织中 ZEB1 的阳性率为 64.0% (64/100)。低分化以及临床分期为 T_3+T_4 的组织 ZEB1 表达阳性率分别为 85.7% (30/35)、76.5% (39/51), 均显著高于中、高分化以及临床分期为 T_1+T_2 组织中的 52.3% (34/65)、51.0% (25/49), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。ZEB1 表达与患者年龄、性别及肿瘤部位无关。见 Figure 1, Table 1。

2.2 放疗有效组与无效组的 STAT3 与 ZEB1 表达情况

100 例食管癌患者均完成了放疗, 放疗结束后, 达 CR 者 41 例 (41%)、PR 者 35 例 (35%)、NR 者 24 例 (24%), 放疗有效率 76%。放疗有效组的 STAT3 与 ZEB1 表达阳性率均显著低于放疗无效组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见 Table 2。

将单因素分析有统计学意义的因素引入 Logistic 回归模型, 结果显示肿瘤 T 分期是影响放疗疗效的独立因素 (Table 3)。

2.3 食管癌组织中 STAT3 与 ZEB1 表达的关系

100 例食管癌组织中 STAT3 和 ZEB1 表达呈正相关 ($r=0.341, P=0.001$)。见 Table 4。

3 讨论

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 初治患者就诊时多数已为中晚期, 放疗是这部分患者的主要治疗手段, 但食管癌单纯放射治疗的 5 年生存率近 30 年来无显著提高, 约为 8%~10% [8]。失

Table 1 Correlation between STAT3, ZEB1 expression and clinicopathologic factors of ESCC

Characteristics	Total	STAT3			ZEB1		
		Positive(%)	χ^2	P	Positive(%)	χ^2	P
Age (years)							
<66	48	33 (68.8)	0.311	0.577	29 (60.4)	0.514	0.473
≥ 66	52	33 (63.5)			35 (67.3)		
Gender							
Male	79	54 (68.4)	0.929	0.335	53 (67.1)	1.558	0.212
Female	21	12 (57.1)			11 (52.4)		
Location							
Cervix	11	8 (72.7)	0.372	0.946	7 (63.6)	2.848	0.416
Upper-thoracic	22	14 (63.6)			16 (72.7)		
Mid-thoracic	45	29 (64.4)			25 (55.6)		
Lower-thoracic	22	15 (68.2)			16 (72.7)		
Differentiation							
High-middle	65	36 (55.4)	9.326	0.002	34 (52.3)	11.020	0.001
Low	35	30 (85.7)			30 (85.7)		
T stage							
T_1+T_2	49	24 (49.0)	12.403	<0.001	25 (51.0)	7.025	0.008
T_3+T_4	51	42 (82.4)			39 (76.5)		

Table 2 The expression of STAT3 and ZEB1 in the two groups

Group	Total	STAT3 positive(%)	ZEB1 positive(%)
CR+PR	76	45 (59.2)	42 (55.3)
NR	24	21 (87.5)	22 (91.7)
χ^2	—	6.505	10.491
P	—	0.011	0.001

Table 3 Multivariate analysis of radiotherapeutic response

Influence factor	β	Wald	OR (95%CI)	P
Differentiation	0.723	1.489	2.061 (0.645~6.583)	0.222
T stage	2.580	10.329	13.203 (2.737~63.696)	0.001
STAT3 expression	0.459	0.731	0.609 (0.151~2.466)	0.487
ZEB1 expression	1.491	0.850	0.225 (0.043~1.191)	0.079

Table 4 Relationship of STAT3 and ZEB1 expression in ESCC

STAT3	ZEB1		r	P
	—	+		
—	20	14	0.341	0.001
+	16	50		

败的主要原因是局部复发或未控,这与部分癌细胞对放射线敏感性差,未完全凋亡有关。因此筛选出与放射敏感性有关的特异性指标用于指导个体化治疗已成为临床研究的热点。

STAT3 是 JAK/STAT 信号途径中的一种关键性转录因子,该通路受细胞因子与生长因子的刺激而活化,并通过调控其下游靶基因来促进细胞异常增殖和恶性转化,参与肿瘤的发生发展。李硕果等^[9]采用免疫组化 SP 法检测 50 例患者食管癌及癌旁组织的 STAT3 的表达,STAT3 在食管癌中的阳性表达率为 70%,显著高于癌旁组织的 18% ($P < 0.05$),且 STAT3 阳性表达与淋巴结转移、浸润深度及 TNM 分期相关,STAT3 阳性组患者的生存率低于 STAT3 阴性组。本研究发现:低分化以及临床分期为 T_3+T_4 的组织 STAT3 表达阳性率显著高于中、高分化以及临床分期为 T_1+T_2 的组织,这与相关研究报道相似^[9,10],说明 STAT3 的表达与食管癌患者的临床病理分级以及分期存在一定相关性,可能参与了食管癌的发生、发展。

ZEB1 是锌指结构转录因子家族的重要一员,是上皮-间充质转化(EMT)的重要调控因子。ZEB1 通过多种途径调控 E-钙黏蛋白及其他相关蛋白的表达,增加多种肿瘤的侵袭和广泛转移的能力。在多种恶性肿瘤的研究中发现,其与恶性肿瘤的侵袭、转移性、分化程度差及预后差相关^[11,12]。Goscinski 等^[11]应用免疫组化方法检测了 ZEB1 在食管癌组织中的表达情况,发现其在食管癌组织中阳性表达率为 64.9%,ZEB1 高表达与食管癌预后差有关。本研究中,低分化以及临床分期为 T_3+T_4 的组织 ZEB1 表达阳性率均显著高于中、高分化以及临床分期为 T_1+T_2 的组织。表明 ZEB1 的表达与食管癌患者的临床病理分级以及分期相关,可能在食管癌的发生、发展过程中发挥着重要作用。

研究发现两者与恶性肿瘤的放化疗敏感性也有密切关系。STAT3 可通过调控下游基因如 CyclinD1、HIF-1 α 等的表达,在放射敏感性方面发挥作用^[13-16],具体机制如下:(1)通过直接调控血管内皮生长因子(VEGF)表达促进血管生成进而产生放疗抗拒。(2)通过活化 HIF-1 α ,进一步促进血管生成产生放疗耐受。(3)直接调控细胞周期蛋白 D1 表达影响放疗敏感性。ZEB1 则可通过 ATM-ZEB1-CHK1

信号轴,介导同源重组 DNA 损伤修复及 DNA 断裂修复影响放疗敏感性^[3,4]。另外放射线可上调细胞内 ZEB1 表达水平,形成治疗诱导的放射抗拒^[3]。研究发现,ZEB1 通过 JAK/STAT3、Wnt 等多种途径抑制 E-钙黏蛋白及其他相关蛋白的表达,参与了肿瘤的上皮-间质转化(EMT)进程^[16]。相关研究提示 STAT3、ZEB1 可能协同参与了恶性肿瘤的发生、发展及恶性肿瘤细胞的放射性抗拒。

本研究 100 例食管癌患者全部接受根治性放疗,治疗结束后评价疗效,放疗有效率(CR+PR)为 76%。通过分别对比 STAT3 和 ZEB1 表达阳性组和阴性组的放疗近期疗效发现 STAT3 和 ZEB1 表达阳性患者对放疗不敏感,疗效均较阴性表达组差。多因素分析显示肿瘤 T 分期是影响放疗疗效的独立因素。食管癌组织中 STAT3 与 ZEB1 表达呈正相关,提示 STAT3、ZEB1 可能协同参与了食管的发展及食管癌放射性抗拒。这提示了我们在临床工作中可通过对食管癌患者组织 STAT3 与 ZEB1 表达水平进行检测,对放疗敏感性以及预后进行评估。

综上所述,STAT3 与 ZEB1 有可能成为食管癌诊断以及治疗的新靶点,为临床食管癌的诊断、治疗及预后提供了新思路,值得对其进行更加深入的研究。

参考文献:

- [1] Siveen KS, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(2): 136-154.
- [2] Timme S, Ihde S, Fichter CD, et al. STAT3 expression, activity and functional consequences of STAT3 inhibition in esophageal squamous cell carcinomas and Barrett's adenocarcinomas[J]. *Oncogene*, 2014, 33(25): 3256-3266.
- [3] Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(4): 481-487.
- [4] Zhang P, Wei Y, Wang L, et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(9): 864-875.
- [5] Bronsert P, Kohler I, Timme S, et al. Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1(ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer[J]. *Surgery*, 2014, 156(1): 97-108.
- [6] The Expert Group of Clinical Staging of Esophageal Car-

- cinoma Non-surgical Methods. Clinical staging criteria (draft) of esophageal carcinoma non-surgical methods[J]. Chinese Journal of Radiation Oncology, 2010, 19 (3): 179–180.[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.]
- [7] Yin WB, Gu XZ. Radiation oncology[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2002. 610–611.[殷蔚伯, 谷铣之. 肿瘤放射治疗学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版, 2002. 610–611.]
- [8] D'Journo XB, Thomas PA. Current management of esophageal cancer[J]. J Thorac Dis, 2014, 6(Suppl 2): S253–S264.
- [9] Li SG, Yao J, Gao SG. Expressions and clinical significance of STAT3 and HIF-1 α in esophageal squamous cell carcinoma[J]. The Journal of Practical Medicine, 2015, (7): 1111–1113.[李硕果, 姚俊, 高社干. STAT3 和 HIF-1 α 在食管癌中的表达及临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2015, (7): 1111–1113.]
- [10] Wang Y, Chen YM, Li JJ. Expression and clinical significance of signal transducers and activators of transcription 3 and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous-cell carcinoma [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2016, 33(3): 788–790.[王琰, 陈豫民, 李娇娇. 信号转导及转录激活因子 3 和血管内皮生长因子在食管鳞状细胞癌组织的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(3): 788–790.]
- [11] Goscinski MA, Xu R, Zhou F, et al. Nuclear, cytoplasmic, and stromal expression of ZEB1 in squamous and small cell carcinoma of the esophagus [J]. APMIS, 2015, 123 (12): 1040–1047.
- [12] Chen Z, Li S, Huang K, et al. The nuclear protein expression levels of SNAI1 and ZEB1 are involved in the progression and lymph node metastasis of cervical cancer via the epithelial-mesenchymal transition pathway [J]. Hum Pathol, 2013, 44(10): 2097–2105.
- [13] Zhao HY, Zhang WM, Chen JF. Effects of X-ray irradiation combined with RNAi against STAT3 on radiosensitivity of human esophageal carcinoma cells [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2011, 31(2): 180–184.[赵环宇, 张维铭, 陈锦飞. X 射线照射联合 RNA 干扰 STAT3 基因对人食管癌细胞放射敏感性的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2011, 31(2): 180–184.]
- [14] Xu DD, Zhou PJ, Wang Y, et al. Reciprocal activation between STAT3 and miR-181b regulates the proliferation of esophageal cancer stem-like cells via the CYLD pathway [J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 40.
- [15] Reddy KR, Guan Y, Qin G, et al. Combined treatment targeting HIF-1 α and Stat3 is a potent strategy for prostate cancer therapy[J]. Prostate, 2011, 71(16): 1796–1809.
- [16] Xiong H, Hong J, Du W, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition[J]. J Biol Chem, 2012, 287(8): 5819–5832.

《肿瘤学杂志》编辑部郑重声明

近段时间,不少作者收到以某编辑名义发来的邮件:“《肿瘤学杂志》征收优秀稿件,可代发代写加急安排,录用后正常查稿”等类似邮件,故向本刊求证。

《肿瘤学杂志》编辑部郑重声明,编辑部从未以某编辑名义发过征收优秀稿件之类的函,请作者和读者不要受骗上当!以防经济损失,也避免因此耽误您的稿件正常发表。本刊坚决贯彻《发表学术论文“五不准”》规定,坚决抵制“第三方”代写、代投、代修改论文!!!

如您发现有这样的邮件,请速联系《肿瘤学杂志》编辑部!编辑部将通过法律途径来解决此类问题,以维护广大读者和作者的权益。

《肿瘤学杂志》编辑部电话:0571-88122280, E-mail: zlxzz04@126.com