

食管鳞癌放疗前后外周血 survivin 检测的临床意义

袁 昕,殷旭东,薛金俊,汪 瑞,张正荣,夏广鑫

(扬州市第一人民医院肿瘤科,江苏 扬州 225009)

[摘要] 目的:研究食管鳞癌(esophagus squamous cell carcinoma, ESCC)患者放疗前后外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)标记生存素(survivin) mRNA 的表达及其临床意义。方法:收集 72 例 ESCC 患者根治性放疗前后外周血,应用巢式 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达,分析其与临床病理特征、放疗疗效及两年无进展生存期(progression-free survival, PFS)的关系。结果:放疗前后 survivin mRNA 阳性者分别占 54.2%(39/72)与 38.9%(28/72),差异无统计学意义($P = 0.066$),放疗前后 survivin mRNA 阳性均与淋巴结转移相关 (P 值分别为 0.012 和 0.005),放疗后 survivin mRNA 阳性提示放疗疗效不佳 ($P = 0.030$)。生存分析表明放疗前后 survivin mRNA 阳性与 PFS 减少有关 (P 值分别为 0.040 和 < 0.001),Cox 回归模型证实放疗后 survivin mRNA 阳性、KPS 评分和规范化后续化疗是独立预后指标。结论:放疗后外周血 survivin mRNA 阳性有望成为 ESCC 根治性放疗疗效评估和预后判断的有效分子标记。

[关键词] 食管鳞癌;放疗;生存素;预后;分子标记

[中图分类号] R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-231-05

Clinical significances of survivin mRNA detection in peripheral blood of esophageal cancer patients treated with radiotherapy

YUAN Xin, YIN Xu-dong, XUE Jin-jun, WANG Rui, ZHANG Zheng-rong, XIA Guang-xin

(Department of Oncology, Yangzhou No.1 People's Hospital, Yangzhou 225009, China)

[Abstract] **Objective:** To study clinical significances of survivin expression, a marker of circulating tumor cells (CTC), in peripheral blood of esophagus squamous cell carcinoma (ESCC) patients treated with radiotherapy. **Methods:** Survivin mRNA expression was determined using nest RT-PCR in pre- and post-radiotherapy blood of 72 esophageal cancer patients with radiotherapy, and its associations with clinicopathological features, radiotherapy response and 2-year progression-free survival (PFS) were further evaluated. **Results:** The positive expression of survivin mRNA in pre- and post-radiotherapy were 54.2%(39/72) and 38.9%(28/72), respectively, and the difference has not statistical significance ($P = 0.066$). Furthermore, survivin mRNA expression was associated with lymph metastasis both in pre- and post-radiotherapy ($P = 0.012$ and $P = 0.005$, respectively). Survivin expression of post-radiotherapy was associated with poor radiotherapy response ($P = 0.030$). Kaplan-Meier analysis also showed that survivin mRNA expression predicted adverse 2-year PFS both in pre- and post-radiotherapy ($P = 0.023$ and $P < 0.001$). However, Cox proportional hazard models indicated that only post-radiotherapy survivin mRNA expression apart from KPS scores and standard chemotherapy were independent prognostic factors for ESCC. **Conclusion:** Post-radiotherapy survivin mRNA expression may be an useful biomarker related to poor radiotherapy response and adverse prognosis in ESCC patients treated with radiotherapy.

[Key words] esophagus squamous cell carcinoma; radiotherapy; survivin; prognosis; biomarker

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 231-235]

食管癌是我国常见的恶性肿瘤,其中以食管鳞癌(esophagus squamous cell carcinoma, ESCC)为主。放射治疗是 ESCC 治疗的主要手段之一,但多年来其效果尚不理想,5 年生存率仅 10%~15%,失败原因主要是局部未控或复发^[1]。研究表明,肿瘤细胞在侵袭转移的早期阶段就可能进入血液循环,而患者

常无任何临床表现,常规检测手段亦不能发现,即肿瘤微转移(micrometastasis)^[2]。若能及时监测循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs),将对判断肿瘤预后及指导临床治疗具有重要价值^[3]。生存素(survivin)是迄今发现的作用最强的凋亡抑制因子,选择性地表达于胚胎组织和大多数肿瘤组织而在

正常终末分化组织中不表达,故可视为 CTCs 潜在标记^[4]。本研究应用巢式 RT-PCR 技术检测 72 例根治性放疗 ESCC 患者外周血中 survivin mRNA 的表达,并探讨其临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

2008 年 3 月~2009 年 3 月在扬州市第一人民医院行根治性放疗的 ESCC 患者 72 例,其中男 54 例,女 18 例,年龄 46~83 岁,中位年龄 63 岁。原发肿瘤部位:胸上段 15 例,胸中段 46 例,胸下段 11 例。根据放疗前影像学检查结果,依照我国《非手术治疗食管癌的临床分期标准(草案)》^[5]分期:其中 I 期 8 例,II 期 37 例,III 期 27 例。入组条件符合以下标准:经胃镜病理检查确诊;均为初治患者;无放疗禁忌证;无远处转移;KPS 评分 ≥ 70 分;预计生存期 ≥ 3 个月;实验室检查主要指标无异常。所有患者采用 6 MV X 线,2.0 Gy/次,5 次/周,总剂量 60~70 Gy,分 30~35 次完成放疗计划。放疗结束后采用 RECIST 实体瘤疗效标准进行评价,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD),有效率=(CR+PR)/总例数 $\times 100\%$ 。其中 44 例患者接受了至少 4 个周期铂类或氟尿嘧啶类为基础的序贯化疗。治疗结束后每 3 个月行食管造影和(或)胸部 CT

复查,随访截至 2011 年 5 月。

1.2 方法

1.2.1 标本处理及 RNA 提取

经患者知情同意和医院伦理委员会批准,收集放疗前及放疗结束 2 周内外周血 10 ml (EDTA 抗凝),采用淋巴细胞分离液(上海华精生物科技有限公司)分离单核细胞,生理盐水洗涤后置于 -80℃ 冰箱备用。同期收集 20 例食管良性疾病患者外周血及 10 例 ESCC 术后组织标本作为对照。参照 TRIzol (Invitrogen 公司,美国)一步法提取细胞和组织的总 RNA,无 RNA 酶的 DNase 去除混杂的 DNA,紫外分光光度计定量。

1.2.2 巢式 RT-PCR

取 1~2 μg 总 RNA,70℃ 5 min 预变性后,采用日本 TaKaRa 公司逆转录试剂盒进行 cDNA 第 1 链合成。继而取 4 μl cDNA 行第 1 轮 PCR 扩增,取第 1 轮 PCR 产物 0.5 μl 行第 2 轮 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 10 \times PCR buffer 2.5 μl (含 Mg^{2+} ,终浓度 1.5 mmol/L),dNTP mixture 2.5 μl (终浓度 250 $\mu\text{m}/\text{L}$),上下游引物各 2 μl (20 pmol),Taq 酶 0.15 μl (日本 TaKaRa 公司),灭菌去离子水补足至 25 μl 。引物序列及反应条件见表 1。取第 2 轮 PCR 扩增产物 5 μl 行 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照。

表 1 巢式 PCR 引物

Table 1 Primers of nest-PCR

引物	序列(5'→3')	退火温度(℃)	循环数	产物大小(bp)
survivin (外)	正: CTGCCTGGCAGCCCTTTCTCAA	53	40	463
	反: AATAAACCCCTGGAAGTGGTGCA			
survivin (内)	正: CCGCATCTCTACATTCAAGAAC	60	40	279
	反: CTTGGCTCTTTCTCTGTCC			
β -actin	正: CCCTGGACTTCGAGCAAGAGAT	55	35	531
	反: GTTTCTGCGCAAGTTAGG			

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。率的比较采取 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,生存分析采用 Kaplan-Meier 方法(Log-rank 检验),Cox 比例风险模型评估各参数预后意义。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

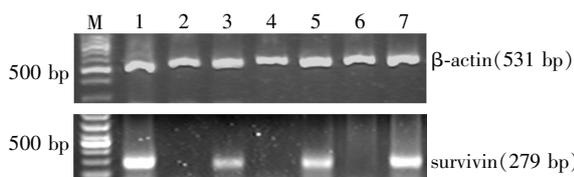
2.1 放疗前后 survivin mRNA 表达

72 例食管癌患者中,放疗前 survivin mRNA 阳性者为 39 例(54.2%),放疗后 survivin mRNA 阳性

者为 28 例(38.9%),整体差异无统计学意义($P = 0.066$)。放疗前 39 例表达阳性者,放疗后其中 14 例转阴(35.9%),25 例持续阳性(64.1%);放疗前 33 例阴性者,3 例转为阳性(9.1%),30 例持续阴性(90.9%)。10 例 ESCC 术后组织标本 survivin mRNA 表达均为阳性(100%),而 20 例食管良性疾病患者外周血 survivin mRNA 仅有 1 例为阳性(5.0%)。典型 PCR 结果如图 1 所示。

2.2 survivin mRNA 表达与临床病理特征的关系

放疗前、后 survivin mRNA 阳性均与淋巴结转移相关(P 值分别为 0.012 和 0.005),而与年龄、性



M: DNA Marker; 1: 阳性对照, 为 ESCC 组织标本; 2: 阴性对照, 为食管良性疾病血标本; 3~7 为 ESCC 放疗前血标本。

图 1 ESCC 的 survivin mRNA 表达

Figure 1 mRNA expression in peripheral blood of ESCC

表 2 ESCC 外周血 survivin mRNA 表达与临床病理特征的关系

Table 2 Association between survivin expression in the peripheral blood of ESCC and clinicopathological features

临床病理参数	n	放疗前 survivin mRNA		放疗后 survivin mRNA	
		阳性[n(%)]	P 值	阳性[n(%)]	P 值
年龄					
< 60 岁	31	16(51.6)		10(32.3)	
≥60 岁	41	23(56.1)	0.705	18(43.9)	0.316
性别					
男	54	30(55.6)		23(42.6)	
女	18	9(50.0)	0.682	6(33.3)	0.488
肿瘤位置					
胸上段	15	7(46.7)		5(33.3)	
胸中段	46	27(58.7)		21(45.7)	
胸下段	11	5(45.5)	0.590	3(27.3)	0.443
病变长度					
≤5 cm	28	14(50.0)		10(35.7)	
> 5 cm	44	25(56.8)	0.571	18(40.9)	0.659
病变直径*					
≤4 cm	54	26(48.1)		19(35.2)	
> 4 cm	18	13(72.2)	0.131	9(50.0)	0.264
淋巴结转移					
N0	30	11(36.7)		6(20.0)	
N1/N2	42	28(66.7)	0.012	22(52.4)	0.005
分期					
I / II	45	21(46.7)		14(31.1)	
III	27	18(66.7)	0.099	14(51.9)	0.107

*: CT 所示食管病变最大层面的食管直径。

效不佳($P = 0.030$)。其中 25 例持续阳性者有效率 56.0% (14/25), 3 例由阴性转阳者有效率为 0; 而 30 例持续阴性者有效率 70.0% (21/30), 14 例由阳性转阴者有效率 85.7% (12/14)($P = 0.024$, 表 3)。

2.4 survivin mRNA 表达与 ESCC 预后的关系

放疗结束后 2 年内进展或复发者为 34 例。生存分析结果如图 2 所示, 放疗前外周血 survivin mRNA 阳性与阴性者中位无进展生存期(progression-free survival, PFS) 分别为 17.8 个月 (95% CI: 15.881~19.811) 与 21.0 个月 (95% CI: 19.367~22.633)($P = 0.023$), 放疗后 survivin mRNA 阳性与阴性者中位 PFS 分别为 15.4 个月(95%CI: 13.021~17.836)与 21.8

个月(95%CI: 20.662~22.838)($P < 0.001$)。其中, 放疗后 3 例由阴性转阳者均出现进展, 14 例由阳性转阴者预后与持续阴性者无显著差异 ($P = 0.357$), 而与持续阳性者相比预后较好 ($P = 0.040$)。Cox 多变量分析进一步表明, 放疗后 survivin mRNA 阳性、KPS 评分和规范化后续化疗是 ESCC 放疗患者病情进展的独立预后因子(表 4)。

2.3 survivin mRNA 表达与放疗疗效的关系

放疗结束后评价, CR 8 例, PR 39 例, SD 20 例, PD 5 例, 放疗前 survivin mRNA 表达与放疗有效率无关, 而放疗后 survivin mRNA 阳性则提示放疗疗

3 讨论

肿瘤细胞由原发灶脱落, 弥散进入外周血, 是导致肿瘤转移和复发的起始步骤, 目前, CTCs 已成为肿瘤早期诊断、预后判断及疗效评估的重要手

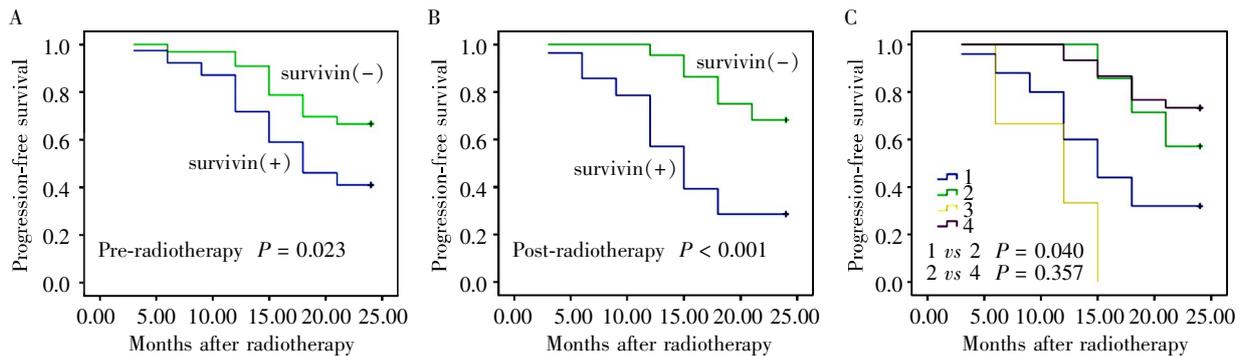
表 3 ESCC 外周血 survivin mRNA 表达与放疗疗效的关系

Table 3 Association between survivin expression in ESCC blood and radiotherapy response

survivin mRNA	n	放疗有效率(CR+PR)		
		n	%	P 值
放疗前				
阳性	39	26	66.7	0.926
阴性	33	21	63.6	
放疗后				
阳性	28	14	43.9	0.030
阴性	44	33	72.0	
放疗前后变化				
持续阳性	25	14	56.0	0.024
阳性转阴	14	12	85.7	
阴性转阳	3	0	0.0	
持续阴性	30	21	70.0	

段^[3,6]。由于受到人体免疫系统的清除,存活的 CTCs 数量极少,对检测方法要求较高。RT-PCR 技术具有高度敏感性,可鉴别 10⁶~10⁷ 个正常细胞中的一个肿瘤细胞,是目前检测微转移最常用的方法^[7]。

survivin 是 1997 年发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员,它主要通过抑制 caspase3、7 而阻断细胞的凋亡过程,并参与细胞有丝分裂,促进细胞增殖和血管形成,还参与放化疗抵抗,与肿瘤发生发展密切相关^[4]。survivin 特异性地高表达于恶性肿瘤组织,因此被认为是检测微转移的有效标记之一,近年来在外周血、尿液、痰液及胸腹水等体液中的诊断价值已得到广泛证实^[8-9]。如 Cao 等^[10]报道,108 例 ESCC 外周血 survivin mRNA 阳性为 47.2%,且 survivin 表达与浸润深度、血管侵犯、淋巴结转移和肿瘤分期有关,对其 48 例术后辅助化疗患者的随访进一步表明,sur-



A: 放疗前; B: 放疗后; C: 放疗前后变化; 1: 放疗前后持续阳性; 2: 阳性转阴; 3: 阴性转阳; 4: 持续阴性。

图 2 Kaplan-Meier 生存曲线分析

Figure 2 Kaplan-Meier survival curves

表 4 72 例 ESCC 患者 2 年无进展生存期的 Cox 比例风险模型分析

Table 4 Cox proportional hazard models of clinicopathological factors for 2-year progression-free survival of 72 patients with ESCC

临床病理参数	风险比 (95%CI)	P 值
年龄: ≥60 岁 vs < 60 岁	1.833(0.710~4.732)	0.208
性别: 男性 vs 女性	0.862(0.296~2.567)	0.785
肿瘤位置: 胸上、中段 vs 胸下段	1.371(0.377~4.985)	0.631
病变长度: > 5 cm vs ≤ 5 cm	1.172(0.436~3.155)	0.752
病变直径: > 4 cm vs ≤ 4 cm	2.188(0.712~6.302)	0.173
淋巴结转移: N0 vs N1、N2	1.751(0.784~3.921)	0.172
分期: III vs I、II	1.372(0.539~3.497)	0.507
放疗前 survivin mRNA: 阳性 vs 阴性	2.265(0.857~5.859)	0.090
放疗后 survivin mRNA: 阳性 vs 阴性	4.081(1.488~11.192)	0.005
放疗后 KPS 评分: ≥90 分 vs < 90 分	0.375(0.142~0.994)	0.046
放疗方式: 常规放疗 vs 三维适形、调强适形	0.846(0.317~2.257)	0.738
序贯化疗: 是 vs 否	0.317(0.118~0.852)	0.021

ivin 表达预示肿瘤复发和生存期缩短,这与 Hoffmann 等^[11]的研究结果一致。Grimminger 等^[12]则证实,食管癌新辅助放疗前外周血 survivin mRNA 高表达与部分缓解(minor-response)有关。钱志英等^[13]应用荧光定量 PCR 法,也发现食管癌患者外周血中 survivin mRNA 表达与良性病变者和正常人相比明显升高,且 survivin 表达水平与总生存期减少和不同化疗方案敏感性有关。这些结果提示 survivin mRNA 检测在 ESCC 中的潜在应用价值。

本研究结果表明,根治性放疗前后 ESCC 外周血 survivin mRNA 阳性者分别占 54.2%(39/72)与 38.9%(28/72),放疗前后 survivin 阳性均与淋巴结转移和 PFS 减少相关,进一步证实以 survivin 为标记的 CTCs 在 ESCC 预后中的价值。survivin 阳性在直径 > 4 cm 和 III 期患者中也占有一定优势,但无统计学意义,可能与样本量较小有关。同时,本研究发现放疗前后 survivin mRNA 变化与放疗疗效有关,其中 14 例由阳性转阴者有效率达 85.7% (12/14),预后与持续阴性者无显著差异,较持续阳性者改善;而 3 例由阴性转阳者有效率为 0,均在 2 年内出现进展。提示放疗后 survivin mRNA 阳性可能是决定肿瘤转归的重要因素,如放疗有效地减少肿瘤负荷,从而停止释放癌细胞入血,则外周 CTCs 可能由于凋亡增加而转阴,预后改善;反之,如放疗未有效控制肿瘤生长,则 CTCs 持续存在甚至由阴性转阳,预后不佳。Cox 多变量分析进一步证实了这一点,放疗后 survivin mRNA 阳性与 KPS 评分、规范化后续化疗一样,是决定病情进展的独立预后因子。此外,我们也注意到,放疗后 survivin mRNA 阳性率整体相比放疗前并无明显下降,说明放疗作为局部治疗手段对于控制 CTCs 的局限性。

总之,外周血 survivin mRNA 阳性对于判断 ESCC 微转移具有重要意义,放疗后 survivin mRNA 阳性可望成为 ESCC 根治性放疗疗效评估和预后判断的有效分子标记,对于这部分患者,有必要采取包括全身化疗在内的综合治疗措施。

[参考文献]

[1] 冯永,于长华,仲琴,等.同步与序贯化放疗在 III 期食管癌治疗中的应用[J].南京医科大学学报(自然科学版),2010,30(2):274-276

[2] Riethdorf S,Wikman H,Pantel K. Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients [J]. *Int J Cancer*,2008,123(9):1991-2006

[3] Armakolas A,Panteleakou Z,Nezos A,et al. Detection of the circulating tumor cells in cancer patients [J]. *Future Oncol*,2010,6(12):1849-1856

[4] Cheung CH,Cheng L,Chang KY,et al. Investigations of survivin:the past,present and future [J]. *Front Biosci*,2011,16:952-961

[5] 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

[6] Liu Z,Jiang M,Zhao J,et al. Circulating tumor cells in perioperative esophageal cancer patients:quantitative assay system and potential clinical utility [J]. *Clin Cancer Res*,2007,13(10):2992-2997

[7] Ring AE,Zabaglo L,Ormerod MG,et al. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer:Comparison of three techniques [J]. *Br J Cancer*,2005,92(5):906-912

[8] Cao W,Yang W,Li H,et al. Using detection of survivin-expressing circulating tumor cells in peripheral blood to predict tumor recurrence following curative resection of gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*,2011,103(2):110-115

[9] Smith SD,Wheeler MA,Plescia J,et al. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer [J]. *JAMA*,2001,285(3):324-328

[10] Cao M,Yie SM,Wu SM,et al. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Clin Exp Metastasis*,2009,26(7):751-758

[11] Hoffmann AC,Vallböhmer D,Grimminger P,et al. Preoperative survivin mRNA detection in peripheral blood is an independent predictor of outcome in esophageal carcinoma [J]. *Pharmacogenomics*,2010,11(3):341-347

[12] Grimminger P,Vallböhmer D,Hoffmann A,et al. Quantitative analysis of survivin RNA expression in blood as a non-invasive predictor of response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer[J]. *J Surg Oncol*,2009,100(6):447-451

[13] 钱志英,何流,何晓松,等.食管癌外周血中 Survivin mRNA 表达对化疗敏感性及预后的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*,2009,14(7):598-601

[收稿日期] 2011-10-22