

· 临床研究 ·

淋巴增强因子 1 的表达与食管鳞癌放疗敏感性的关系

黄晓智, 刘洋, 易宣洪, 熊伟

唐山市人民医院放化四科, 河北 唐山 063000

摘要: **目的** 研究淋巴增强因子 1 (LEF1) 的表达与食管鳞癌放疗敏感性的关系并进行机制探讨。**方法** 选择 2010 年至 2016 年期间在唐山市人民医院进行放射治疗的食管鳞癌患者 59 例, 均为不能接受手术, 经穿刺诊断为局部晚期食管鳞癌的患者, 均接受根治性放疗。采用免疫组织化学法检测上述食管癌病理组织中 LEF1 蛋白的表达。分析 LEF1 表达情况与患者放疗疗效及患者年龄、有无淋巴结转移、临床分期等临床病理特征之间的关系。**结果** 所有患者放射治疗均顺利完成, 无明显不良反应。59 例食管癌患者放疗有效为 (CR 13 例、PR 17 例) 30 例, 放疗无效为 (NR) 29 例。放疗有效组 30 例核表达阳性 9 例, 阳性表达率 30.0%, 无效组核表达阳性 18 例, 阳性表达率 62.1%, 相对于有效组, LEF1 蛋白核表达水平在无效组中高表达, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 6.110, P = 0.013$)。相对于无淋巴结转移组, LEF1 蛋白表达水平在有淋巴结转移组肿瘤组织中高表达, 两组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.489, P = 0.034$); III ~ IV 期病例肿瘤组织中的 LEF1 表达高于 I ~ II 期病例, 两组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.879, P = 0.015$); LEF1 在不同年龄、性别、不同长度的肿瘤组织中的表达无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** 食管癌组织中 LEF1 表达程度可能是预测食管鳞癌放射抗性分子指标。LEF1 与食管鳞癌的淋巴结转移及临床分期相关, 可能参与食管鳞癌侵袭、转移的病理过程。

关键词: 淋巴增强因子 1; 食管鳞癌; 放疗; 淋巴结转移; 临床分期

中图分类号: R 735.1 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2020)06-0799-04

Relationship between expression of lymphoid enhancer factor-1 and radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma

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

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

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

Abstract: Objective To study the relationship between the expression of lymphoid enhancer factor-1 (LEF1) and the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its mechanism. **Methods** Fifty-nine ESCC patients who received radical radiotherapy instead of operation because of locally advanced ESCC confirmed by needle puncture from 2010 to 2016 were selected. The expression level of LEF1 protein in esophageal cancer tissue was detected by immunohistochemistry. The associations of LEF1 expression with the therapeutic effect of radiotherapy, age, lymph node metastasis, clinical stage and other clinicopathological characteristics was analyzed. **Results** The radiotherapy was successfully completed in all patients without obvious adverse reactions. There were 13 cases of complete remission (CR), 17 cases of partial remission (PR) and 29 cases of non-remission (NR). The nuclear expressions of LEF1 were positive in 9 of 30 patients with effective radiotherapy (CR and PR group, 30.0%) and in 18 of 29 patients with ineffective radiotherapy (NR group, 62.1%). There was a statistical difference between two groups ($\chi^2 = 6.110, P = 0.013$). LEF1 expression levels were significantly higher in the patients with lymph node metastasis than those of the patients without lymph node metastasis ($\chi^2 = 4.489, P = 0.034$) and also in the patients with stage III-IV ESCC than those of the patients with stage I - II ESCC ($\chi^2 = 5.879, P = 0.015$). LEF1 expression levels were significantly higher in the patients with lymph node metastasis than those in the patients without lymph node metastasis ($\chi^2 = 4.489, P = 0.034$) and also in the patients with stage III-IV ESCC than those in the patients with stage I - II ESCC ($\chi^2 = 5.879, P = 0.015$). There were no statistical differences in LEF1 expression levels of the patients with different ages, genders and tumor size ($P > 0.05$). **Conclusion** LEF1 expression level may be a molecular marker for predicting radiation

resistance of esophageal squamous cell carcinoma. LEF1 is related to lymph node metastasis and clinical stages of ESCC and may be involved in the pathological process of invasion and metastasis of ESCC.

Key words: Lymphoid enhancer factor-1; Esophageal squamous cell carcinoma; Radiotherapy; Lymph node metastasis; Clinical stage

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

放射治疗是临床治疗食管癌的常见方式之一,约 55% 的食管癌患者在治疗期间需要开展放射治疗。在临床治疗阶段,部分病例类型甚至即便是临床分期相同的情况,在接受放射治疗后,预期疗效和实际疗效也可能存有不同,差异性较为明显。这种个体间放疗反应差异与某些基因突变相关^[1]。有报道称 Wnt/ β -catenin 通路活化在放疗抵抗中发挥重要作用^[2]。淋巴增强因子 1 (LEF1) 作为 WNT 通路的主要蛋白,是 Wnt/ β -catenin 通路活化的标志。近年来研究表明,LEF1 在多种肿瘤中异常表达,与肿瘤的发生发展密切相关^[3-5]。本研究选取 2010 至 2016 年期间在本院接受根治性放射治疗的初治食管癌患者 59 例为研究对象,探讨病理组织中 LEF1 的表达情况与食管鳞癌放射治疗敏感性、淋巴结转移、临床分期等病理特性的关系,以期寻找一种能够预测食管癌放疗疗效及肿瘤恶性进程的可靠指标,指导临床合理治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年至 2016 年期间在唐山市人民医院进行放射治疗的食管鳞癌患者 59 例,男 40 例,女 19 例;年龄 ≤ 60 岁 24 例, > 60 岁 35 例;病变长度 < 5 cm 41 例, ≥ 5 cm 18 例;35 例有淋巴转移,24 例无淋巴转移;临床分期 I ~ II 期 23 例, III ~ IV 期 36 例。

1.2 纳入标准与排除标准 所有患者均经内镜活检病理证实为食管鳞状细胞癌;在唐山市人民医院接受首程治疗,不能或拒绝手术要求根治放疗;有全面影像学检查资料,确定病变分期为 I ~ IV 期;不合并第二原发肿瘤及放疗禁忌证(出血、穿孔、严重心肺功能障碍),卡氏评分 ≥ 70 分。排除存在肺部、肝部、肾部等功能障碍者。

1.3 主要试剂 本研究主要试剂为 LEF1 兔抗人多克隆抗体,生产企业为北京博奥森生物技术有限公司。试剂盒主要对应 PV-9000 免疫组织和 DAB 显色,生产企业均为中杉金桥公司。

1.4 免疫组化及结果判读 (1) 免疫组化:标本均经 4% 中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋。切片厚 0.4 μm ,常规 HE 染色,光镜下行细胞形态学观察。

免疫组化染色采用 En Vision 二步法检测 LEF1 表达情况,LEF1 抗体按(1:100)稀释。石蜡标本脱蜡、水化组织切片;预处理组织切片,酶修复或热修复;蒸馏水漂洗,置于 TBS 中;滴加 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,孵育 10 min;蒸馏水漂洗,置于 TBS,10 min;一抗孵育 10 或 30 min,TBS 漂洗 10 min;En Vision TM 孵育 10 或 30 min,TBS 漂洗 10 min;色源底物溶液 DAB 或 AEC 孵育,光镜控制显色;蒸馏水漂洗,复染及封片。(2) 结果判读:LEF1 为棕黄色颗粒,定位于胞核中。每例选择 2 个高倍视野($\times 400$),每个视野计数 200 个细胞。根据染色强度和染色阳性细胞所占百分比进行结果判断:阳性细胞所占百分比 $< 25\%$ 为 1 分, $25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $> 50\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分;染色强度不着色为 0 分,1 分为浅棕黄色,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;以染色阳性细胞百分比评分与染色强度评分相乘判断结果,上述两项评分乘积 0 ~ 2 为阴性表达,否则为阳性表达^[6]。

1.5 靶区勾画及放疗方法 肿瘤靶区(GTV):食管壁厚度 > 0.5 cm 或不含气腔的管壁直径 > 1.0 cm,及肿大淋巴结,纵隔淋巴结阳性标准为短径 ≥ 1.0 cm,特殊部位如食管旁、气管食管沟等淋巴结标准为短径 ≥ 0.5 cm,并参考食管钡剂造影;临床靶区(CTV):GTV 头脚方向各外扩 2 cm,前后左右方向各扩 0.8 cm,解剖屏障适当修正;计划靶区(PTV):CTV 头脚方向外扩 1 cm,前后左右扩 0.5 cm。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 近期疗效 按照 1989 年我国学者万钧所研究提出的食管癌放射治疗相关的近期疗效标准^[7],由两位以上经验丰富的放疗科主任医师在放射治疗结束 1 ~ 3 月后分别进行独立评价近期疗效,如评价不一致时则共同协商讨论。CR(完全缓解):病变达到完全消失,食管的边缘光滑,钡剂通过顺畅,管腔无或稍显狭窄,食管黏膜基本恢复正常或增粗,但食管管壁可稍显强直;PR(部分缓解):肿瘤大部分消失,无食管腔外溃疡,无明显的扭曲或无明显成角,钡剂通过尚顺畅,但管壁边缘欠光滑,或边缘虽然光滑但食管管腔有明显狭窄,有小龛影或小的充盈缺损;NR

(无缓解):无显著好转或残留,存在显著狭窄现象加重,或出现充盈缺损。在试验中,将近期疗效为完全缓解、部分缓解的患者视之为有效组,将无缓解的患者视之为无效组。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 11.0 软件进行数据处理。 χ^2 检验分析 LEF1 表达情况与患者放疗疗效及患者年龄、有无淋巴结转移、临床分期等临床病理特征之间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

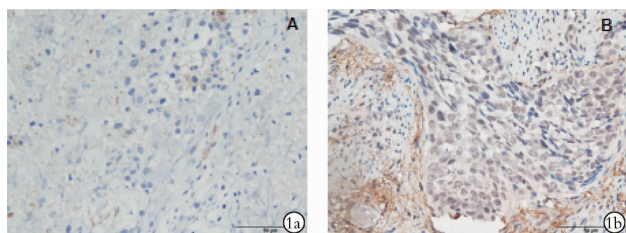
2.1 临床疗效 所有患者放射治疗均顺利完成,无明显不良反应。59 例食管癌患者放疗有效为(CR 13 例,PR 17 例)30 例,放疗无效为(NR)29 例。

2.2 食管鳞癌组织中 LEF1 蛋白表达与放疗疗效的关系 LEF1 蛋白表达可见呈棕褐色颗粒,在食管鳞癌组织中主要位于细胞胞核中,根据其核表达水平的差异,分为阳性和阴性(图 1)。放疗有效组 30 例核表达阳性 9 例,阳性表达率 30.0%,无效组核表达阳性 18 例,阳性表达率 62.1%,相对于有效组,LEF1 蛋白核水平在无效组中高表达,差异具有统计学意义($\chi^2 = 6.110, P = 0.013$)

2.3 食管鳞癌组织中 LEF1 表达与各临床病理特征相关性 相对于无淋巴结转移组,LEF1 蛋白表达水平在有淋巴结转移组肿瘤组织中高表达,两组差异有统计学意义($\chi^2 = 4.489, P = 0.034$); III ~ IV 期病例肿瘤组织中的 LEF1 表达高于 I ~ II 期病例,两组差异有统计学意义($\chi^2 = 5.879, P = 0.015$); LEF1 在不同年龄、性别、不同长度的肿瘤组织中的表达无显著差异($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

LEF1 最初发现其表达于前 B 细胞和 T 细胞,与 T 细胞受体 alpha 结合发挥诱导 T 细胞成熟和分化作用。LEF1 蛋白能够在多项组织中形成调节效应,若出现表达异常或功效异常,会造成组织发育异常,如其可促进乳腺癌细胞的侵袭,与细胞的生长,增殖和



注:1a:LEF1 蛋白阴性表达的食管癌组织;1b:LEF1 蛋白阳性表达的食管癌组织。

图 1 LEF1 在食管癌组织中的表达(SP, $\times 400$)

表 1 食管鳞癌组织中 LEF1 表达与淋巴结转移的关系 (例)

项目	例数	LEF1 核表达		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
年龄					
≤60 岁	24	10	14	2.576	0.109
>60 岁	35	22	13		
性别				0.124	0.725
男	40	23	17		
女	19	10	9		
病变长度				2.458	0.117
<5 cm	41	25	16		
≥5 cm	18	7	11		
有无淋巴转移				4.489	0.034
有	35	15	20		
无	24	17	7		
临床分期				5.879	0.015
I ~ II 期	23	17	6		
III ~ IV 期	36	15	21		

侵袭有关^[8]。LEF1 是 Wnt/ β -catenin 通路上的关键基因之一,是具有双向调节功能的转录因子。LEF1 主要参与 Wnt/ β -catenin 下游相关分子信号转导,它一方面能够与 β -catenin 结合,形成 β -catenin/LEF 复合物,从而促进 Wnt 信号通路下游靶基因 c-myc、Cyclin D1 等的表达,另一方面它能够募集 Groucho 家族的协同抑制因子,抑制转录执行,具有 Wnt 信号通路的负向调控作用^[9-10]。

常规情形下,LEF1 蛋白在众多动物胚胎细胞中能够实现高表达,但在个体出生之后,表达量会严重下滑。研究报道显示,LEF1 在多种肿瘤中高表达^[11-12],在这些肿瘤中,Wnt 信号具有亢进性和失控性特征,能够以 β -catenin 的方式进入于细胞核中,并和 LEF/TCF 结合,使得基因转录,并作为恶性肿瘤主要特征^[13-14]。Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活将导致细胞的恶性转变和人类多种肿瘤的发生^[15-16]。据报道,这条信号通路可能与乳腺癌、肺癌和前列腺癌的转移密切相关。本研究结果显示,在食管鳞癌中有淋巴结转移组患者病理组织中 LEF 表达高于无淋巴结转移组。临床病理分期为 III ~ IV 期组的患者病理组织中 LEF1 的表达高于 I ~ II 期组,上述结果与文献结果报道相符。

Wnt 通路目前被学者认为是一种肿瘤干细胞通路^[17-18]。Cojoc 等^[19]人观察到被放射后的结直肠癌细胞系中显示了 Wnt/ β -catenin 信号通路中 TCF/LEF 因子的活性增加。Wnt/ β -catenin 通路的抑制剂通过降低醛脱氢酶(ALDH),使前列腺癌细胞得到放射增敏效果。靶向 Wnt/ β -catenin 途径的下游标志物 WISP1 可使食管鳞癌细胞放射治疗敏感性得到增加。Zhang 等^[20]表明 WISP1 促进了其自身对放射反应的表达,建立一个正反馈通路并增加放射抵抗。因此,

通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路可以增加肿瘤细胞的放射敏感性。本研究结果显示,LEF1 蛋白表达水平在放疗疗效差的食管鳞癌患者组织中偏高,结果与文献报导相符。

总体而言,食管癌细胞对于放射抵抗的作用,由众多基因在多信号传导过程中形成。LEF1 可能通过 Wnt/ β -catenin 通路在其中发挥放射抵抗作用。同时 LEF1 可能参与到食管鳞癌浸润和转移等恶性进程中。据此推测 LEF1 有可能作为评估肿瘤的放疗抵抗性的指标之一,检测其瘤体中表达水平对评估恶性进程及预后,并有针对性的进行个体化治疗有重要意义。

参考文献

- [1] Chang L, Graham P, Hao JL, et al. Proteomics discovery of radioreistant cancer biomarkers for radiotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(2):289-297.
- [2] Bastos LG, de Marcondes PG, de-Freitas-Junior JC, et al. Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and activate Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(12):2175-2187.
- [3] Wang WJ, Yao Y, Jiang LL, et al. Increased LEF1 expression and decreased Notch2 expression are strong predictors of poor outcomes in colorectal cancer patients [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5):395-405.
- [4] Li Y, Wang L, Zhang M, et al. LEF1 in androgen-independent prostate cancer: regulation of androgen receptor expression, prostate cancer growth, and invasion [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8):3332-3338.
- [5] Tapia JC, Torres VA, Rodriguez DA, et al. Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(41):15079-15084.
- [6] 王妍,杨玉清. β 链蛋白和淋巴增强因子-1 在人脑胶质瘤中的表达及意义[J]. *中国药物与临床*, 2016, 16(8):1146-1148.
- [7] 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):205-207.
- [8] 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.
- [9] Zhang F, Zhang L, Zhang B, et al. Anxa2 plays a critical role in enhanced invasiveness of the multidrug resistant human breast cancer cells [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(11):5041-5047.
- [10] Liang JQ, Li X, Li YR, et al. LEF1 targeting EMT in prostate cancer invasion is mediated by miR-181a [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(3):1124-1132.
- [11] Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(4):1379-1389.
- [12] Guo X, Zhang R, Liu J, et al. Characterization of LEF1 high expression and novel mutations in adult acute lymphoblastic leukemia [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0125429.
- [13] Cortesi L, Barchetti A, De Matteis E, et al. Identification of protein clusters predictive of response to chemotherapy in breast cancer patients [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(11):4916-4933.
- [14] Gutierrez A Jr, Tschumper RC, Wu XS, et al. LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the pre-leukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis [J]. *Blood*, 2010, 116(16):2975-2983.
- [15] Olivares-Navarrete R, Hyzy S, Wieland M, et al. The roles of Wnt signaling modulators Dickkopf-1 (Dkk1) and Dickkopf-2 (Dkk2) and cell maturation state in osteogenesis on microstructured titanium surfaces [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(8):2015-2024.
- [16] Welsh IC, Thomsen M, Gludish DW, et al. Integration of left-right Pitx2 transcription and Wnt signaling drives asymmetric gut morphogenesis via Daam2 [J]. *Dev Cell*, 2013, 26(6):629-644.
- [17] Takebe N, Miele L, Harris PJ, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(8):445-464.
- [18] 李杉,尤琪,张广美,等. Wnt 通路配体家族与卵巢癌的关系 [J]. *中国临床研究*, 2018, 31(2):274-275, 279.
- [19] Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, et al. Aldehyde dehydrogenase is regulated by β -catenin/TCF and promotes radioresistance in prostate cancer progenitor cells [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(7):1482-1494.
- [20] Zhang H, Luo H, Hu Z, et al. Targeting WISPI to sensitize esophageal squamous cell carcinoma to irradiation [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8):6218-6234.

收稿日期:2019-12-11 编辑:王娜娜