文章编号:1000-5404(2008)03-0233-04

论著

CDC25A、Smad3在食管鳞癌中的表达及其相互关系

李金梅,王 静,刘江惠,郭建文,左连富 (河北医科大学第四医院肿瘤研究所流式细胞室,石家庄 050011)

摘 要:目的 探讨CDC25A、Smad3在食管鳞癌组织中表达的意义及CDC25A蛋白与Smad3蛋白、细胞增殖指数、细胞凋亡率的关系。方法 采用免疫组织化学S-P法检测CDC25A蛋白在52例食管鳞状细胞癌、24例正常黏膜中的表达。用流式细胞术检测其中30例食管鳞癌、5例正常黏膜的细胞凋亡率、增殖指数及CDC25A蛋白、Smad3蛋白的表达。结果 CDC25A在癌组织中的阳性表达率为50%,明显高于正常黏膜($P<0.05$),CDC25A在高分化和中低分化组、浸润至纤维膜和未浸润至纤维膜组、有淋巴结转移和无淋巴结转移组中的差异显著($P<0.05$)。Smad3蛋白在癌组织中的表达低于正常黏膜($P<0.05$)。Smad3蛋白与CDC25A蛋白的表达呈负相关($r=-0.482$,$P=0.007$)。核膜CDC25A蛋白阳性者的增殖指数高于核膜CDC25A蛋白阴性者($P<0.05$);细胞质CDC25A蛋白表达阳性者的凋亡率低于细胞质CDC25A蛋白表达阴性者,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 Smad3蛋白的下调可能与食管癌中CDC25A蛋白含量升高有关;细胞核中的CDC25A蛋白可能具有促增殖作用;CDC25A蛋白可能参与了食管癌的发生、发展。

关键词:食管鳞状细胞癌;CDC25A;Smad3;免疫组织化学;流式细胞术
中图法分类号:R730.231;R730.261;R735.1 文献标识码:A

Expressions of CDC25A and Smad3 in esophageal squamous cell carcinoma and their relationship

LI Jin-mei, WANG Jing, LIU Jiang-hui, GUO Jian-wen, ZUO Lian-fu (Cytometry Laboratory, Tumor Institute, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of CDC25A and Smad3 in esophageal squamous cell carcinoma and the relationship of CDC25A with Smad3 protein, cell apoptosis, proliferation index (PI). Methods The expression of CDC25A was examined by SP immunohistochemical stain (IHC) in 52 esophageal carcinoma specimens and 24 normal tissues. Moreover, CDC25A protein, Smad3 protein, cell apoptosis, proliferation index (PI) were examined by FCM in 30 esophageal carcinoma specimens and 5 normal tissues. Results The positive expression rate of CDC25A in esophageal carcinoma was 50%, significantly higher than 0% in normal tissues ($P<0.05$). High expression of CDC25A was correlated with invasion, tumor differentiation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma ($P<0.05$). The positive expression of Smad3 protein in esophageal carcinoma was significantly lower than that in normal tissues ($P<0.05$). CDC25A protein expression was negatively associated with Smad3 protein expression ($P<0.05$). The apoptosis rate in the cells with the positive expression of CDC25A protein in cytoplasm was higher than that of negative CDC25A expression, but without statistical significance. PI of the cells with the positive expression of CDC25A protein in nuclear membrane was higher than that of negative expression ($P<0.05$). Conclusion The reduction of Smad3 protein was correlated with the abundance of CDC25A protein. The CDC25A protein in nuclear membrane might contribute to cell proliferation. CDC25A protein may be involved in the carcinogenesis and progression of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; CDC25A; Smad3; immunohistochemistry; flow cytometry

---

基金项目:河北省高等学校强势学科肿瘤学经费项目(2005)
Supported by the Funds for Oncology in Colleges and Universities of Hebei Province(2005)
作者简介:李金梅,女,河北省河间市人,硕士研究生,主要从事食管癌病因及其机制方面的研究。电话:(0312)5976710,E-mail:haitun111999@126.com
通信作者:左连富,电话:(0311)86095337,E-mail:Zuolianfu4909@sina.com
收稿日期:2007-05-18;修回日期:2007-11-10

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,严重威胁人类的健康。研究表明,细胞周期的紊乱与食管癌的发生和发展密切相关。CDC25A 蛋白为双重特异性磷酸酶,能激活细胞周期素依赖性激酶(CDK),推动细胞周期的进行。近年来研究表明,CDC25A 具有癌基因的功能,参与了多种恶性肿瘤的发生、发展。Smad3 是 TGF-β 通路的下游信号传导分子,是一种抑癌基因,TGF-β/Smad3 通路可以促进 SCF-TrCP 介导的 CDC25A 的泛素化,从而促进蛋白酶体通路降解 CDC25A,Smad3 是此过程的限速酶[1],因此依赖 Smad3 的 CDC25A 蛋白降解的失调可能与肿瘤发生发展密切相关,但 Smad3 与 CDC25A 在食管癌中的关系国内外尚少见报道。本研究探讨食管鳞癌中 CDC25A 与 Smad3 表达的意义及其相互关系,旨在为阐明食管癌的发生机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集本院 2005 年 9 – 12 月手术切除后的食管鳞癌组织 52 例(其中男性 25 例,女性 27 例,中位年龄 59 岁),切缘正常黏膜组织 24 例。所有食管癌患者术前未经过任何治疗。所有标本均为术后立即取材,一份固定于 10% 的中性福尔马林液中,石蜡包埋,另一份固定于 70% 的乙醇中,4 ℃保存。按 1990 年 WHO 食管癌的分级标准将 52 例食管鳞状细胞癌分为高分化 21 例,中低分化 31 例;淋巴结转移者 23 例,无淋巴结转移者 29 例;浸润至纤维膜者 34 例,未浸润至纤维膜者 18 例。

1.2 主要试剂

CDC25A(1∶80 稀释,克隆系:DCS-120,鼠抗人,单克隆抗体,Santa Cruz 公司产品),Smad3(1∶50,克隆系:EP568Y,兔抗人,单克隆抗体,Epitomics 公司产品),第二抗体为 FITC 标记的山羊抗兔和山羊抗鼠 IgG(Jackson Immunoresearch Laboratiries Inc. 工作液浓度 1∶100,lot58630),通用型 S-P 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)。

1.3 免疫组织化学

标本 4 μm 厚连续切片,采用 S-P 方法,3,3 ′-二氨基联苯胺(DAB)染色。操作步骤参照试剂盒说明书进行。

1.4 流式细胞凋亡检测

碘化丙啶(propidiumiodide,PI)一步插入性 DNA 定量荧光染色法:PBS 洗涤样品,调整每份样品的细胞数为 1×10^6 ml^{-1}。每份样品中加入 DNA 染液(每升中含 PI 50 mg/L,RNA 酶 10 mg/L,Triton-X100 1.0%)1.0 ml,4 ℃冰箱中染色 30 min,以 500 目筛网过滤,使样品成为合格的单细胞悬液,即可上机检测。

1.5 免疫荧光标记

1.5.1 单细胞悬液的制备 将 70% 乙醇固定的标本置于 120 目不锈钢网上,用眼科剪刀将组织剪碎,搓组织块,并用生理盐水冲洗,直至将组织搓完,将混悬液用 300 目网过滤除团块,收集细胞悬液,以 1 000 r/min 离心沉淀 4 min,得到单细胞悬液。调整其细胞数至 1×10^6 ml^{-1},制备成合格单细胞悬液。

1.5.2 免疫荧光标记 加入 CDC25A 与 Smad3 抗体稀释液(1∶50)100 μl,室温孵育 30 min,PBS 10 ml 洗涤,1 000 r/min,离心 3 min,弃上清,加羊抗兔或鼠 FITC-IgG 工作液 100 μl,步骤同 1.5.1,经 500 目铜网过滤后上流式细胞仪检测。设 PBS 代替一抗和二抗作为阴性对照,以及只加一抗或二抗的阳性对照和同型对照。

1.6 流式细胞仪检测方法

流式细胞检测方法采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 Epics-XLⅡ型流式细胞仪,激发光源为 15 mW 氩离子激光器,激发波长为 488 nm,检测前以 flow-check™ Fluorpheres(10 μm)荧光微球(REF 6605359 Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835)作为标准样品调整仪器,*CV* 值在 2% 以内。

1.7 资料分析

1.7.1 免疫组织化学结果判断 CDC25A 染色阳性为细胞核膜和/或细胞质出现棕黄色颗粒,参照文献[2],在病变处选取 10 个高倍镜视野(×400),每个视野计数 100 个细胞数,按阳性细胞所占的百分比分为:(-)无标记阳性细胞或阳性细胞数≤50% 者;(+)阳性细胞数 >50% 者。由 2 位有经验的病理医师在未知患者任何临床资料的情况下,采用双盲法进行阳性细胞计数。

1.7.2 细胞增殖周期的计算方法 应用 DNA 组方图各时相分布的百分比,以增殖指数(proliferation index, PI)表示细胞的增殖活性。

$$PI = (S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)$$

1.7.3 细胞凋亡率的计算方法[3] 以二倍体峰(G_0/G_1)前出现亚 G_1 峰表示凋亡细胞峰位,根据亚 G_1 峰的分布组方图计算细胞凋亡率。

1.7.4 蛋白表达定量分析 以荧光指数(FI)表示蛋白的相对含量,FI =(样品蛋白平均荧光强度 – 阳性对照样品平均荧光强度)/正常对照样品平均荧光强度。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计软件行 t 检验、精确概率法和 Spearman 等级相关分析。

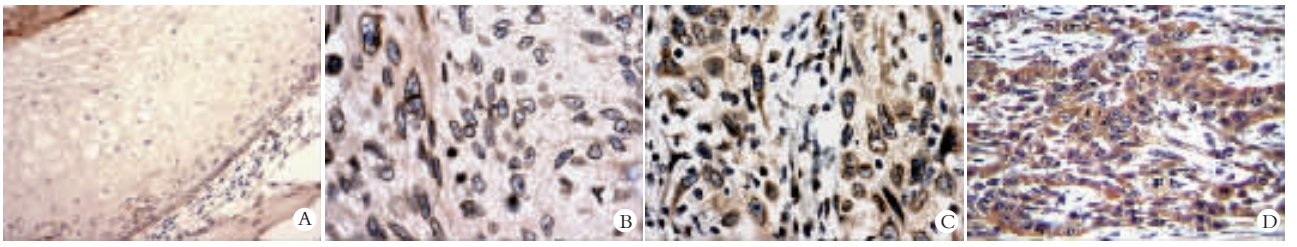
2 结果

2.1 CDC25A 蛋白在食管鳞癌组织和正常黏膜中的表达情况

CDC25A 的阳性产物主要定位于细胞核膜和/或细胞质,正常黏膜只是在基底细胞层呈微弱表达(图 1A),而在癌组织中呈高表达 9 例以细胞核膜着色为主(图 1B),5 例以细胞质着色为主(图 1D),12 例细胞核、细胞质均有着色(图 1C),食管鳞癌组织中 CDC25A 蛋白阳性率高于正常黏膜($P<0.05$,表 1)。流式细胞术结果显示:CDC25A 蛋白含量(FI 值)在癌组织中的含量(1.15 ± 0.09)高于正常黏膜(1.00 ± 0.06)($P<0.05$)。

表 1 CDC25A 蛋白在食管鳞癌和正常黏膜中的表达情况

组织	例数	CDC25A		P
		+	-	
鳞癌组织	52	26	26	0.000
正常黏膜	24	0	24	



A：CDC25A 蛋白在正常黏膜中呈阴性表达（×200）；B：CDC25A 蛋白在细胞核膜呈阳性表达（×400）；C：CDC25A 蛋白在细胞核和细胞质均呈阳性表达（×400）；D：CDC25A 蛋白在细胞质呈阳性表达（×400）

图 1　食管鳞癌组织中 CDC25A 免疫组织化学染色结果　（S-P）

2.2　CDC25A 蛋白表达与临床病理特征的关系

免疫组织化学结果显示 52 例食管鳞癌组织 CDC25A 蛋白表达阳性率为 50%，中、低分化组的 CDC25A 表达阳性率高于高分化组，浸润至纤维膜组的 CDC25A 阳性率高于未浸至纤维膜组，有淋巴结转移组的 CDC25A 阳性率高于无淋巴结转移组（$P<0.05$，表 2）。流式细胞术结果显示：浸润至纤维膜的食管癌组织 CDC25A 蛋白 FI 值（1.18 ± 0.08）高于未浸润至纤维膜者（1.10 ± 0.09）（$t=-2.46$，$P=0.020$）；有淋巴结转移的食管癌组织 CDC25A 蛋白 FI 值（1.22 ± 0.05）高于无淋巴结转移者（1.11 ± 0.08）（$t=-4.04$，$P=0.000$）；CDC25A 蛋白的表达与性别、年龄、细胞的分化程度无显著性差异（$P>0.05$）。

表 2　食管鳞癌组织中 CDC25A 蛋白表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	例数	CDC25A		χ^2	P
		+	-		
性别					
男	36	18	18	0.000	0.618
女	16	8	8		
年龄					
≤59	26	10	16	2.769	0.096
>59	26	16	10		
分化程度					
高分化	21	5	16	9.665	0.002
中/低分化	31	21	10		
淋巴结转移					
有	23	16	7	6.315	0.012
无	29	10	19		
纤维膜浸润					
有	34	22	12	8.497	0.004
无	18	4	14		

2.3　Smad3 蛋白在食管鳞癌组织和正常黏膜中的表达及其与 CDC25A 蛋白表达的关系

流式细胞术检测 Smad3 蛋白含量，结果显示：癌组织中 smad 3 蛋白含量（FI 值）（0.92 ± 0.06）低于正常黏膜（1.00 ± 0.07）（$P<0.05$）。但 Smad3 蛋白含量与各项临床参数均无显著性差异（$P>0.05$）。

Spearman 等级相关分析显示 Smad3 蛋白与 CDC25A 蛋白含量的 FI 值呈明显负相关（$r=-0.482$，$P=0.007$）。

2.4　CDC25A 蛋白与细胞凋亡率的关系

CDC25A 蛋白含量 FI 值与细胞凋亡率无显著性差异（$P>0.05$），选取 30 例流式检测标本分为细胞质 CDC25A 阳性表达和细胞质 CDC25A 阴性表达两组，结果显示，细胞质 CDC25A 阴性组的细胞凋亡率（8.53 ± 4.32）高于细胞质 CDC25A 阳性表达组（6.62 ± 2.01），但差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.5　CDC25A 蛋白与细胞增殖指数的关系

核膜 CDC25A 蛋白阳性表达者的增殖指数（30.71 ± 12.04）高于核膜 CDC25A 蛋白表达阴性者（21.78 ± 8.22）（$P<0.05$）。

3　讨论

近年来研究表明 CDC25A 蛋白具有癌基因的功能[4]，在多种恶性肿瘤中高表达，并与肿瘤的恶性程度和预后差有关[5,6]。本研究结果显示，CDC25A 蛋白在癌组织中（50%）的表达明显高于正常黏膜（0%），提示 CDC25A 蛋白的高表达可能与食管鳞癌的发生有关。对于 CDC25A 蛋白表达，中、低分化组高于高分化组，浸润至纤维膜组高于未浸润至纤维膜组，有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组。这与文献[6]报道一致，提示 CDC25A 可能参与调节食管癌的恶性表型，并促进食管癌的浸润和转移。另外 Nishioka 等[6]还报道 CDC25A 阴性患者的 5 年生存率明显高于 CDC25A 阳性患者，且是评估食管鳞癌预后的独立因素。综合这些结果表明，CDC25A 有可能成为提示食管癌发生和预后的新生物学标志，同时也为食管癌的治疗提供了一个新的靶点。

CDC25A 的致癌作用机制目前并不清楚。目前有 2 种观点：①促增殖：Xu 等[5]研究发现 CDC25A 在细胞核中表达并和 PCNA 在肝癌组织中的表达呈显著正相关，推测过表达的 CDC25A 蛋白会使细胞快速由 G_1 期进入 S 期，从而导致细胞 DNA 的合成增加，进而癌细胞获得高增殖活性引起疾病的发生。②抗凋亡：CDC25A 可以在细胞质中直接激活 AKT 生存途径而阻止细胞凋亡[7,8]。因此核蛋白的表达可能更多的起到促增殖作用，而细胞质的表达可能与凋亡关系密切。本实验检测了其中 30 例流式检测标本食管鳞状细胞癌的 CDC25A 含量、细胞凋亡率、细胞增殖指数，结果显示核膜 CDC25A 表达阳性组的细胞增殖指数高于核膜表达阴性组，细胞质 CDC25A 表达阳性组凋亡率高于细胞质表达阴性组，但差别无显著性，可能与研究例数过少有关。此结果提示 CDC25A 蛋白的定位可能与功能密切相关，核内蛋白可能具有促增殖作用，细胞

质蛋白的作用仍需进一步研究[9]。

目前多种研究表明：Smad3 为一种抑癌基因，在一些恶性肿瘤中表达下调。Zhu 等[10] 通过动物实验发现，Smad3 基因敲除小鼠易发结肠癌。因此推测依赖 Smad3 的 CDC25A 蛋白调节的紊乱可能与肿瘤的发生、发展密切相关。本实验结果显示，Smad3 蛋白在癌组织中的表达明显低于正常黏膜，且其与 CDC25A 的表达呈负相关，提示 Smad3 蛋白的下调导致 CDC25A 蛋白降解减少，可能是其在食管鳞癌中含量升高的机制之一。

参考文献：

[1] Ray D, Terao Y, Nimbalkar D, *et al*. Transforming growth factor beta facilitates beta-TrCP-mediated degradation of Cdc25A in a Smad3-dependent manner[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(8): 3338 – 3347.

[2] Ito Y, Yoshida H, Uruno T, *et al*. Expression of cdc25A and cdc25B phosphatase in breast carcinoma[J]. Breast Cancer, 2004, 11(3): 295 – 300.

[3] 刘江惠，郭建文，王 静. 等. 流式细胞术 PI 染色法检测胃蛋白酶消化时间对细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(22): 2196 – 2197.

[4] Galaktionov K, Lee A K, Eckstein J, *et al*. CDC25 phosphatases as potential human oncogenes[J]. Science, 1995, 269(5230): 1575 – 1577.

[5] Xu X, Yamamoto H, Sakon M, *et al*. Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(5): 1764 – 1772.

[6] Nishioka K, Doki Y, Shiozaki H, *et al*. Clinical significance of CDC25A and CDC25B expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus[J]. Br J Cancer, 2001, 85(3): 412 – 421.

[7] Fuhrmann G, Leisser C, Rosenberger G, *et al*. Cdc25A phosphatase suppresses apoptosis induced by serum deprivation[J]. Oncogene, 2001, 20(33): 4542 – 4553.

[8] Leisser C, Rosenberger G, Maier S, *et al*. Subcellular localisation of Cdc25A determines cell fate[J]. Cell Death Differ, 2003, 11(1): 80 – 89.

[9] 曹学全，张 红，娄 欣，等. 食管鳞癌组织中 Syndecan – 1 蛋白及 mRNA 表达[J]. 郑州大学学报：医学版, 2007, 42(1): 1 – 4.

[10] Zhu Y, Richardson J A, Parada L F, *et al*. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer[J]. Cell, 1998, 94(6): 703 – 714.

（编辑 郭建秀）

（上接 225 页）

2 结果

2.1 两组早产儿 RDS 发生率

预防组应用 PS 后 6 ~ 24 h，有 15 例出现 RDS，发生率为 37.5%（15/40），其中 Ⅲ 级 2 例，4 例给予 CPAP 治疗，8 例需要机械通气。对照组 26 例出现 RDS，发生率为 65.0%（26/40），其中 Ⅲ 级 9 例，Ⅳ 级 4 例，6 例给予 CPAP 治疗，16 例需要机械通气治疗。对照组 RDS 发生率、需机械通气例数及 Ⅲ 级以上 RDS 发病例数均高于预防组，两组比较有显著性差异（$P<0.01$）。

2.2 预防性用药前后血气指标的变化

用药后 6 h 预防组 $p(O_2)$ 较用药前增高，$p(CO_2)$ 较用药前降低（$P<0.01$），pH 值无显著性差异（$P>0.05$）。

表 1 PS 用药前后血气分析结果（$\bar{x}\pm s$）

时间	$p(O_2)$（mmHg）	$p(CO_2)$（kPa）	pH 值
用药前	56.0 ± 5.2	46.9 ± 5.6	7.27 ± 0.07
用药后 6 h	64.0 ± 6.4	41.8 ± 5.0	7.29 ± 0.06
P 值	< 0.01	< 0.05	> 0.05

2.3 两组早产儿氧疗时间、机械通气时间比较

预防组 40 例早产儿氧疗时间和机械通气时间较短，分别为 11（2 ~ 21）d 和 4.5（3 ~ 11）d 对照组分别为 15（4 ~ 30）d 和 9（3 ~ 18）d，两组比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

2.4 主要并发症与转归

在预防组早产儿中，出现动脉导管开放 7 例，脑室内出血 3 例，肺出血 1 例，呼吸暂停 14 例，早产儿视网膜病 1 例，无气漏及远期并发症支气管肺发育不良（BPD）等发生。对照组早产儿出现动脉导管开放 12 例、肺出血 5 例和脑室内出血 5 例，气胸 4 例，呼吸暂停 16 例，支气管肺发育不良 4 例，早产儿视网膜病 3 例。两组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。病死率因例数较少，故两组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3 讨论

PS 的缺乏是新生儿死于 NRDS 的主要原因。PS 缺乏时肺泡表面张力大，可出现严重的低氧血症以及呼吸性酸中毒[1]。30 周内出生的早产儿肺内 PS 总量不到足月儿的 10%。因此，在早产儿出生后，尚未发生 NRDS 以前，提倡预防性应用外源性 PS，替代内源性 PS 的不足，而如果确诊 NRDS 后再行 PS 治疗性用药，则由于已经产生的肺水肿渗出液中蛋白质多，拮抗 PS，从而影响治疗性用药疗效。

本研究表明，预防性应用 PS 能很快改善血气，明显降低重症 NRDS 的发生率，减少上机概率，缩短机械通气时间、氧疗时间。这与其他多中心随机对照临床研究结论一致[2]。PS 使用后的常见并发症主要有：动脉导管开放、脑室内出血、肺出血等。但本研究中两组未见显著差异。临床上注意规范给药操作，维持内环境稳定，纠正酸中毒、高碳酸血症及稳定血压，及时调整给氧浓度和辅助呼吸的条件，可以很大程度减少此类并发症的发生。

对于预防性应用 PS 的指征，目前尚无统一标准。由于我国采用的围产期是从怀孕 28 周开始，大部分胎龄 < 28 周的早产儿其父母因各种原因会放弃治疗，故选择胎龄 < 30 周，有发生 NRDS 高危因素的早产儿预防性使用 PS 较切合国情。

关键词：早产儿 肺表面活性物质 预防性应用
中图法分类号：R722.120.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 金汉珍，黄德珉，官希吉. 实用新生儿学[M]. 第 3 版，北京：人民卫生出版社，2003：421 – 427.

[2] Suresh G K, Soll R F. Exogenous surfactant therapy in newborn infants[J]. Ann Acad Med Singapore, 2003, 32(3): 335 – 345.

（编辑 汪勤俭）