

### 【临床研究】

流行病学研究表明,食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是我国常见恶性肿瘤之一,居恶性肿瘤死因第4位<sup>[1-2]</sup>。研究表明,食管癌变是由多基因遗传及环境因素共同作用所致<sup>[3-4]</sup>。全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)技术研究显示,PLCE1 基因多态性rs2274223 位点是 ESCC 易感位点<sup>[5]</sup>。PLCE1 基因

编码磷脂酶蛋白,该蛋白在磷脂酰肌醇信号转导通路等细胞内信号转导中发挥关键作用,影响细胞生长、分化、凋亡及血管生成等生命活动<sup>[6-7]</sup>。研究发现,中国不同地区 ESCC 组织中 PLCE1 蛋白阳性表达显著高于正常食管鳞状上皮,表明 PLCE1 蛋白可能促进 ESCC 癌变的发生、发展<sup>[8-10]</sup>。但 PLCE1 蛋白表达能否预测食管癌患者预后,目前研究甚少。本研究利用免疫组织化学分析技术检测 ESCC 组织中 PLCE1 蛋白表达,分析 PLEC1 表达与其临床病理资料及生存期的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集河南省食管癌重点开放实验室资料库 1997 年 3 月至 2011 年 12 月手术切除的 ESCC 患者 85 例组织标本,其中,男 59 例,平均年龄(58.4±8.5)岁;女 26 例,平均年龄(63.5±6.4)岁。85 例正常对照组织均取自 85 例手术切除标本对应蜡块。所有手术患者均来自 ESCC 高发区。所有患者术前未接受任何放射治疗、化学治疗,均经组织病理学确诊为 ESCC。

1.2 主要试剂 一抗和二抗分别为兔抗人 PLCE1 多克隆抗体、体积分数 2% 小牛冻干血清蛋白(美国 Sigma 公司)和羊抗兔抗体(美国 Vector 公司);卵白素-生物素-辣根过氧化氢酶复合物(avidin biotin complex,ABC)试剂盒(美国 Vector 公司);二氨基联苯胺底物试剂盒(中杉金桥公司)。

1.3 免疫组织化学检测方法 采用本实验室已建立的方法进行免疫组织化学染色<sup>[8,11]</sup>。空白对照由磷酸盐缓冲液代替一抗,阳性对照由已知阳性染色组织设立。

1.4 阳性分级标准 采用本实验室已建立的 ABC 法<sup>[8]</sup>进行 PLCE1 蛋白定性和定量的综合评定。定性:根据免疫阳性细胞染色程度(A)设定,没有染色的为 0 分;细胞质内或核膜见淡黄色颗粒,明显高于背景者为 1 分;有较多棕黄色颗粒者为 2 分;有大量深棕黄色颗粒者为 3 分。定量:每例免疫组织化学切片高倍镜下(×40)计数至少 5 个随机视野,取免疫阳性细胞数(B)平均值,阳性细胞数比例<5%者为 0 分;阳性细胞数比例 5%~25%者为 1 分;阳性细胞数比例 25%~75%者为 2 分;阳性细胞数比例>75%者为 3 分。A+B 得 0~1 分者为阴性(-),得 2~3 分者为弱阳性(+),得 4 分以上者为强阳性(+++)。

1.5 随访和问卷调查 收集食管癌资料库中 85 例患者一般资料,进行入户问卷调查和电话随访,核对并记录患者一般资料(年龄、性别、家族史、治疗医院等)。最终进入本研究分析的患者均经入户调查和随访。随访时间截至 2016 年 12 月。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析,Cox 回归分析临床病理特征及 PLCE1 表达对生存期的影响, $\chi^2$  检验比较各临床病理特征对健在/死亡的影响有无差别,并比较 ESCC 组织中 PLCE1 的表达对临床病理特征的影响。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 临床资料 85 例患者中,因地址或联系方式变更而失访 5 例,随访率为 94.1% (80/85)。

80 例 ESCC 患者中,男 57 例(71.25%),发病年龄 55~64 岁比例最高(46.25%,37/80),发病部位以中段为主(75.00%,60/80);大体类型以髓质型居多(55.00%,44/80);有肿瘤阳性家族史者占 31.25%(25/80);分化程度以 G2 为主(77.50%,62/80),浸润程度以 T3 为主(73.75%,59/80);淋巴结转移 34 例(42.50%);无远处转移病例;治疗方式以手术为主(87.50%,70/80);见表 1。

表 1 80 例 ESCC 患者临床病理特征

Tab.1      Cincinal pathological features of 80 ESCC patients							
项目		例数(%)		项目		例数(%)	
性别				分化程度			
男		57(71.25)		G1		3(3.75)	
女		23(28.75)		G2		62(77.50)	
年龄				G3		15(18.75)	
35 ~44 岁		3(3.75)		浸润程度			
45 ~54 岁		16(20.00)		T1		8(10.00)	
55 ~64 岁		37(46.25)		T2		13(16.25)	
65 ~75 岁		24(30.00)		T3		59(73.75)	
肿瘤部位				淋巴结转移			
上段		15(18.75)		无		46(57.50)	
中段		60(75.00)		有		34(42.50)	
下段		5(6.25)		远处转移			
大体类型				无		80(100.00)	
髓质型		44(55.00)		有		0(0.00)	
溃疡型		15(18.75)		治疗类型			
覃伞型		10(12.50)		手术		70(87.50)	
缩窄型		9(11.25)		手术 + 放射、化学治疗		10(12.50)	
腔内型		2(2.50)					
家族史							
阳性		25(31.25)					
阴性		55(68.75)					

2.2 PLCE1 蛋白表达与 ESCC 临床病理的关系

ESCC 组织中 PLCE1 蛋白免疫阳性表达主要定位于细胞质中,仅少量存在于细胞膜,未发现细胞核表达(图 1)。ESCC 组织中 PLCE1 蛋白阳性表达 62 例,阳性表达率为 77. 5%;ESCC 对应正常组织中 PLCE1 蛋白阳性表达 30 例,阳性表达率为 37. 5%,ESCC 对应正常组织中 PLCE1 蛋白阳性表达率低于 ESCC 组织中 PLCE1 蛋白阳性表达率,差异有统计学意义( $\chi^2 = 26. 19, P < 0. 001$ )。PLCE1 阳性表达与 ESCC 分化程度、浸润深度、淋巴结转移及家族史无显著性相关( $P > 0. 05$ );见表 2。

表 2 PLCE1 表达与食管癌临床病理的关系

Tab.2 Relationship between PLCE1 expression and the clinicopathologic feature with ESCC

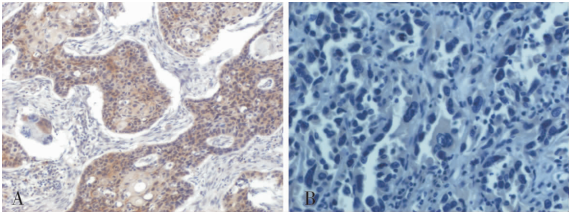
PLCE1 蛋白表达	n	分化程度			浸润程度			淋巴结转移		家族史	
		G1	G2	G3	T1	T2	T3	N0	N1	阳性	阴性
阳性	62	2	48	12	8	8	46	37	25	20	42
阴性	18	1	14	3	0	5	13	9	9	5	13
$\chi^2$		0. 256			4. 229			0. 535		0. 130	
P		0. 880			0. 121			0. 465		0. 718	

2.3 ESCC 患者单因素生存分析 Kaplan-Meier 法单因素生存分析结果表明,淋巴结转移与 ESCC 患者生存率显著相关,有淋巴结转移患者的生存率显著低于无淋巴结转移患者( $P < 0. 05$ )。分化程度、

表 3 ESCC 患者临床病理特征及 PLCE1 表达的单因素生存分析

Tab.3 Clinicopathological features and single factor survival analysis of PLCE1 expression in ESCC patients

因素	总例数	死亡例数	中位生存期/d	标准误	Long-rank	<i>P</i>
分化程度						
G1	3	2	2 533.000	1 624.012	0.847	0.655
G2	62	43	1 457.000	315.945		
G3	15	12	1 117.000	155.219		
浸润程度						
T1	8	6	1 131.000	453.963	0.385	0.825
T2	13	8	2 396.000	1 193.047		
T3	59	43	1 330.000	277.030		
家族史						
阳性	25	19	936.000	127.398	1.253	0.263
阴性	55	38	1 597.000	496.803		
肿瘤部位						
下段	5	4	756.000	586.063	2.054	0.358
中段	60	43	1 261.000	234.961		
上段	15	10	1 701.000	90.169		
治疗方式						
单纯手术	70	48	1 481.000	316.885	3.374	0.066
手术+放射、化学治疗	10	9	523.000	562.885		
PLCE1 蛋白表达						
阳性	62	42	1 481.000	468.503	1.699	0.192
阴性	18	13	819.000	128.340		
PLCE1 蛋白表达量						
高表达	29	21	1 330.000	326.506	0.138	0.710
低表达	51	36	1 457.000	287.833		
淋巴结转移						
有	34	28	756.000	167.640	8.106	0.004
无	46	29	2 083.000	576.498		



A;ESCC 组织;B;ESCC 癌旁正常组织。  
图 1 ESCC 组织和癌旁正常组织中 PLCE1 蛋白表达(免疫组织化学染色,×100)  
Fig.1 Expression of the PLCE1 protein in ESCC tissue and normal tissue adjacent tumor ( immunohistochemical staining, ×100)

浸润程度、家族史、肿瘤部位、治疗方式、PLCE1 蛋白表达(阳性/阴性)、PLCE1 蛋白表达量(高表达/低表达)与 ESCC 患者生存率无显著相关性( $P > 0. 05$ );见表 3。

**2.4 ESCC 患者多因素生存分析** Cox 回归分析结果显示:淋巴结转移可影响 ESCC 患者的生存期[相对危险度 1.763,95%可信区间(confidence interval,CI):下限为 1.008,上限为 3.084, $P < 0.05$ ]。淋巴结转移 34 例,患者生存期为 822.50 d (371.25 ~ 2 360.50 d);无淋巴结转移 46 例,患者生存期为 2 183.00 d (911.25 ~ 3 205.25 d)。

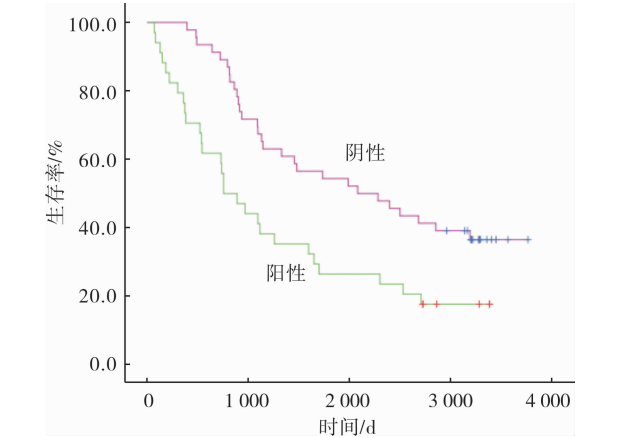


图 2 ESCC 淋巴结转移与患者生存期的关系  
Fig.2 Relationship between ESCC lymph node metastasis and survival

表 4 ESCC 患者临床病理特征及 PLCE1 表达的多因素生存分析

Tab.4 Multi-factor survival analysis of the clinical pathological features with ESCC patients and PLCE1 expression

因素	<i>B</i>	<i>Wald</i>	相对危险度	95% CI		<i>P</i>
				下限	上限	
肿瘤部位	-0.345	1.303	0.708	0.392	1.280	0.254
分化程度	0.148	0.238	1.160	0.639	2.106	0.626
浸润程度	0.114	0.278	1.121	0.733	1.715	0.598
治疗方式	0.651	2.563	1.917	0.864	4.250	0.109
家族史	0.343	1.331	1.409	0.787	2.522	0.249
蛋白表达	-0.348	0.967	0.706	0.353	1.413	0.325
淋巴结转移	0.567	3.951	1.763	1.008	3.084	0.047 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

PLCE1 基因定位于 10q23.32-24.1,全长 334.3 kb,其蛋白分子量为 258 000,包含 2 302 个氨基酸。PLCE1 基因细胞信号转导研究发现,上游信号 Ras、Rho 家族 GTP 酶和 G 蛋白可对其进行双向调节,下游信号除激活蛋白激酶 C 和钙离子流动外,还可作为 Ras 超家族 GTP 酶的鸟苷酸交换因子(GMP exchange factor,GEF),参与调节细胞生长与分化、基因表达及肿瘤发生发展的生物学过程<sup>[6-7,12]</sup>。

多项大规模 GWAS 分析表明,PLCE1 基因多态性 rs2274223 位点可显著增加中国人群 ESCC 及胃贲门癌的患病风险,且与性别、年龄、体质量指数及

PLCE1 蛋白表达阳性 62 例,患者生存期为 1 539.00 d(781.50 ~ 3 176.00 d);蛋白表达阴性 18 例,患者生存期为 877.50 d (618.25 ~ 2 758.25 d)。未发现家族史、肿瘤部位、分化程度、浸润程度、治疗方式、PLCE 蛋白表达与食管癌患者生存期有显著的相关性( $P > 0.05$ );见图 2 和图 3 及表 4。

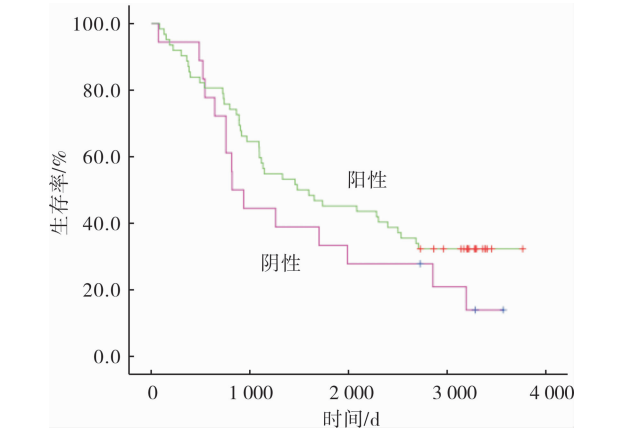


图 3 ESCC 组织中 PLCE1 蛋白表达(阳性/阴性)与患者生存期的关系  
Fig.3 Relationship between PLCE1 protein expression in ESCC tissues (positive/negative) and survival

饮酒、吸烟等因素无关,但是 rs2274223 位点与南非人群 ESCC 无明显关联,也不是高加索人群的食管腺癌及胃癌发病的易感位点<sup>[7,13]</sup>。定量分析表明,食管癌细胞系和食管永生化细胞系中 PLCE C2 区域 A : G 等位基因失衡与其恶性度有关,食管癌高发区非癌人群资料显示,G 等位基因与中重度食管炎有关,提示 PLCE 基因,特别是 5780G 等位基因,通过上调 PLCE1 mRNA 及蛋白和酶活性,增加食管上皮细胞炎症,可能在食管癌变中发挥关键作用<sup>[14]</sup>。国内还有研究表明,食管癌细胞 OE33 和 CP-C 细胞中 PLCE1 mRNA 和蛋白表达水平明显高于正常细胞 HEK293,还发现 PLCE1 通过促进 p53 启动子区甲基化抑制 p53 的表达,从而抑制食管癌细胞凋亡<sup>[15]</sup>。上述研究表明,PLCE1 基因可能有助于促进 ESCC 食管癌变的发生、发展。

有研究显示,rs2274223 G 基因型在 ESCC 组织和食管癌细胞系中 PLCE1 mRNA 和蛋白表达显著增加<sup>[11]</sup>。而来自我国东部地区 ESCC 患者的一项研究表明,GrS2274223CrS11187870 单体型可能增加 ESCC 患者的风险,其比值比(odds ratio,OR)值为 1.22 (95% CI:下限为 1.04,上限为 1.42)<sup>[13]</sup>。该研究还提示,ESCC 组织中 PLCE1 mRNA 表达显著低于配对正常组织,免疫组织化学分析显示正常组织中 PLCE1 rs2274223 GG 基因型染色分值低于 AG 基因型。来自山西太原 ESCC 患者的研究显示,PLCE1 mRNA 表

达在癌组织中显著降低(仅探针 205112), PLCE1 蛋白表达无显著变化,且并未发现 rs2274223 及 PLCE1 其他单核苷酸多态性与 mRNA 表达之间的关系<sup>[16]</sup>。但生存曲线提示肿瘤-正常配对组织差异倍数(mRNA 和蛋白)的增加可能延迟胃贲门腺癌和 ESCC 的生存期,提示包括胃贲门腺癌和 ESCC 在内的上消化道肿瘤存在 PLCE1 mRNA 的表达异常,这种异常变化可能与肿瘤预后有关<sup>[16]</sup>。来自印度 ESCC 患者 PLCE1 基因的研究显示,2005~2011 年期间 117 例放射治疗患者部分接受化学治疗,最长随访时间 70 个月,结果显示,PLCE1 单核苷酸多态性与肿瘤部位、淋巴结转移等临床病理资料无关,PLCE1rs2274223 (H1927R) 和 rs3765524 (T17771) 基因多态性对 PLCE1 蛋白结构的影响甚微<sup>[17]</sup>;生存分析显示,PLCE1 rs7922612 CT+TT 基因型预后差(总生存期 $\leq 8.7$  个月,相对危险度=2.09,95% CI:下限为 1.13,上限为 3.85)<sup>[17]</sup>。新近对河南汉族 ESCC 人群中 PLCE1 单体型分析显示,GrS10882379 Crs3765524 Ars829232 和 GrS10882379 Trs3765524 Ars829232 均可能增加 ESCC 风险,其对应 OR 分别为 1.40(95% CI:下限为 1.13,上限为 1.73)和 1.66(95% CI:下限为 1.18,上限为 2.34),而 Ars10882379 Crs3765524 Grs829232 单体型可能降低 ESCC 风险(OR=0.74,95% CI:下限为 0.61,上限为 0.91)<sup>[18]</sup>。这些研究结果的差异提示,PLCE1 基因作为 ESCC 易感基因在食管癌变机制中遗传因素及环境因素的不同作用。

本研究结果显示,ESCC 组织中 PLCE1 蛋白以细胞质表达为主,未发现细胞核表达,且 PLCE1 蛋白在 ESCC 和正常组织中表达有显著差异,与以往研究一致<sup>[8]</sup>。同时,本研究还发现 PLCE1 阳性表达与 ESCC 分化程度、浸润深度、淋巴结转移及家族史无显著性相关。PLCE1 阳性表达与 ESCC 患者生存期无显著相关,提示 PLCE1 蛋白参与 ESCC 癌变,但不能预测食管癌患者的预后。目前,有关 PLCE1 基因的研究多集中在单核苷酸多态性研究,且样本来自不同地区人群,尚未发现有关 PLCE1 基因突变的报道<sup>[19]</sup>。不同地区人群中 PLCE1 基因单核苷酸多态性表现的差异,与研究人群遗传背景、不同地区的环境因素以及二者相互作用有关。因此,进一步研究 PLCE1 基因在细胞中定位及功能的差异、环境因素与 PLCE1 单核苷酸多态性的相互作用等多种问题,可了解 PLCE1 基因在 ESCC 癌变机制更多的基因组信息。

## 参考文献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAAD P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 鲍启德, 张长江, 刘敏, 等. 食管癌临床症状类型及其年龄和性别分布特征[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(7): 570-573, 578.
- [3] CHEUNG W Y, LIU G. Genetic variations in esophageal cancer risk and prognosis[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2009, 38(1): 75-80.
- [4] 王立东, 宋昕, 赵学科, 等. 食管癌环境和遗传危险因素交互作用的分子基础和精准预防[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(12): 515-520.
- [5] WANG L D, ZHOU F Y, LI X M, et al. Genome-wide association study of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese subjects identifies susceptibility loci at PLCE1 and C20orf54[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 759-763.
- [6] BUNNEY T D, KATAN M. Phosphoinositide signalling in cancer: Beyond PI3K and PTEN[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 342-352.
- [7] CUI X B, PENG H, LI S, et al. Prognostic value of PLCE1 expression in upper gastrointestinal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(22): 9661-9666.
- [8] 赵学科, 周福有, 张连群, 等. 食管癌变过程中 PLCE1 蛋白的表达[J]. 河南大学学报(医学版), 2012, 31(3): 203-205.
- [9] 朱佳龙, 尹来波, 侯量, 等. PLCE1 蛋白在新疆哈萨克族食管鳞癌中的表达及意义[J]. 农垦医学, 2012, 34(1): 5-8.
- [10] 张晓娟, 石劲松, 张玲染, 等. 食管鳞状细胞癌组织中 PLCE1 和 RFT2 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(12): 1348-1351.
- [11] WANG L D, HONG J Y, QIU S L, et al. Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(8): 1783-1787.
- [12] SONG C, HU C D, MASAGO M, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLC epsilon, through membrane targeting by Ras[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2752-2757.
- [13] HU H, YANG J, SUN Y, et al. Putatively functional PLCE1 variants and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma (ESCC): a case-control study in eastern Chinese populations[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(7): 2403-2410.
- [14] WANG L D, BI X, SONG X, et al. A sequence variant in the phospholipase C epsilon C2 domain is associated with esophageal carcinoma and esophagitis[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(Suppl 1): E80-E86.
- [15] 李昀, 张军航, 安军, 等. PLCE1 调控 p53 诱导食管癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(1): 82-86.
- [16] LI W Q, HU N, BURTON V H, et al. PLCE1 mRNA and protein expression and survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma and gastric adenocarcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(8): 1579-1588.
- [17] UMAR M, UPADHYAY R, KUMAR S, et al. Role of novel and GWAS originated PLCE1 genetic variants in susceptibility and prognosis of esophageal cancer patients in northern Indian population[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11667-11676.
- [18] QU Y, ZHANG S, CUI L, et al. Two novel polymorphisms in PLCE1 are associated with the susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma in Chinese population[J]. *Dis Esophagus*, 2017, 30(1): 1-7.
- [19] LIN Y, TOTSUKA Y, SHAN B, et al. Esophageal cancer in high-risk areas of China: research progress and challenges[J]. *Ann Epidemiol*, 2017, 27(3): 215-221.

(本文编辑:杨博 英文编辑:杨博)