

• 基础实验研究论著 •

ATM 蛋白在早期食管鳞癌组织中的表达及意义*

樊卫¹, 韩笑², 祁金友¹

(淮安市楚州医院: 1. 检验科; 2. 病理科, 江苏淮安 223200)

摘要:目的 研究共济失调毛细血管扩张征突变(ATM)蛋白在早期食管鳞癌癌变组织及其癌旁正常组织中的表达差异, 初步探讨其在早期食管鳞癌诊断中的意义。方法 采用免疫组织化学 SP 法, 检测 ATM 蛋白在早期食管鳞癌癌变组织及其癌旁正常组织中的表达, 采用统计学方法分析其表达差异。结果 ATM 蛋白在早期食管鳞癌癌变组织及其癌旁正常组织中的阳性表达率分别是 65%、95%, 差异有统计学意义($P=0.044$)。结论 ATM 蛋白在食管鳞癌癌变组织中的表达下降, 检测食管鳞癌癌变组织的 ATM 蛋白表达可能成为早期诊断食管鳞癌的方法。

关键词:食管鳞癌; ATM 蛋白; 早期诊断; 免疫组织化学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)18-2430-03

The expression and clinical significance of ATM protein in early esophageal squamous carcinoma*

Fan Wei¹, Han Xiao², Qi Jinyou¹

(1, Department of Clinical Laboratory; 2, Department of Pathology, Chuzhou Hospital of Huai'an City, Huai'an, Jiangsu 223200, China)

Abstract: Objective To study expression differences of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein in early esophageal squamous cell carcinoma tissues and adjacent normal tissues in order to explore its diagnostic significance for early esophageal squamous cell carcinoma. Methods ATM protein expression was detected in early esophageal squamous cell carcinoma tissues and adjacent normal tissues by immunohistochemical SP method and the differential expression was calculated by using statistical methods. Results The positive positive expression rate of ATM protein in the early esophageal squamous cell carcinoma tissue and adjacent normal tissue were 65% and 95% respectively, which were statistically different ($P=0.044$). Conclusion The ATM protein expression in esophageal squamous cell carcinoma tissue declined. The detection of ATM protein in esophageal squamous cell carcinoma tissue could become a reliable method for early diagnose of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; ATM protein; early diagnosis; immunohistochemistry

食管癌是全世界常见的十大恶性肿瘤之一, 是发展中国家最常见的一种消化道恶性肿瘤^[1]。全世界每年有 30 多万人死于食管癌。我国每年新增的食管癌患者数量居世界首位, 每年约有 25 万新诊断的食管癌患者, 占全世界新诊断病例的一半。至 2013 年 3 月, 淮安报告恶性肿瘤患者共 2 601 例, 以食管癌的发病率最高, 男性和女性食管癌发病率分别为每 10 万人 108.61 例和每 10 万人 162.63 例。同时, 每 10 万男性中有 79.74 例食管癌病死者, 每 10 万女性中有 58.08 例食管癌病死者(数据为淮安地区疾病预防控制中心提供)。早期食管癌患者经手术切除治疗 5 年生存率可达 90% 以上, 而中晚期患者仅为 6%~15%^[2-4]。因此, 如何使用分子生物学手段提高早期食管癌的诊断率已经成为目前临床及基础研究的主要方向。淮安是食管癌较为高发的地区, 如果能够找出早期诊断食管癌的方法, 对本地区防治食管癌来说意义重大。以往的研究表明, 共济失调毛细血管扩张征突变(ATM)蛋白在 DNA 双链断裂修复过程中起到关键作用^[5], 与肿瘤的发生及患者的治疗和预后有关^[6-7]。但其在早期食管鳞癌中的作用尚不清楚。本研究旨在对 ATM 蛋白在早期食管鳞癌中的表达进行初步分析, 以期找出一种有助于早期食管鳞癌诊断的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 8 月至 2014 年 1 月于本院行食管鳞癌手术切除患者的蜡块标本 80 例, 其中早期食管鳞癌

患者的癌组织标本 20 例, 相应患者的癌旁正常组织 20 例作为对照; 食管鳞癌淋巴结阴性进展型食管鳞癌 20 例, 相应病例的癌旁正常组织 20 例作为正常组织对照。所有患者在标本收集前均未进行化疗或放疗。

1.2 方法 ATM 蛋白检测采用免疫组织化学法。阴性对照: 采用 PBS 缓冲液代替一抗, 其余实验条件和步骤都与样品操作相同; 阳性对照: 采用上海生工公司提供的已知阳性切片, 实验步骤严格按照说明书进行。

1.3 结果判断 ATM 蛋白主要表达于细胞核, 部分表达于细胞质, 呈棕黄色颗粒, 根据着色程度分别记为 0、1、2、3 分。阳性细胞小于 10% 记 0 分, 10%~25% 记 1 分, >25%~50% 记 2 分, >50% 记 3 分。综合判定取着色强度和阳性细胞百分数分值之积: 0 分为阴性, 记为“-”; ≥1 分为阳性, 其中 1、2 分记为“+”, 3、4 分记为“++”, 6、9 分记为“+++”。临床分期按国际抗癌联盟(UICC) TNM 分期标准。结果判定由本院 2 位病理科医师在相同条件下对结果做出判断。

1.4 统计学处理 利用软件 SPSS17.0 对统计结果进行处理, 早期食管鳞癌组织和癌旁正常组织的 ATM 蛋白表达阳性率的比较采用配对设计资料的 χ^2 检验, 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATM 蛋白在不同类别标本中的表达情况 ATM 蛋白

* 基金项目: 江苏省淮安市科技支撑项目(HAS2012017)。作者简介: 樊卫, 女, 主管技师, 主要从事食管癌分子诊断学的研究。

在大多数早期食管鳞癌组织(除分类为食管上段和浸润深度为固有层/原位癌的癌组织)中表达的阳性率低于癌旁正常组织($P < 0.05$)。不同分化程度的癌组织, I 级与 III 级比较, II 级与 III 级比较, ATM 蛋白表达阳性率的差异均有统计学意义($P < 0.05$);位于食管上、下段的癌组织间比较, ATM 蛋白表达阳性率的差异有统计学意义($P < 0.05$);2 种不同浸润深度的癌组织间比较, ATM 蛋白表达阳性率的差异有统计学意义($P < 0.05$);用其余几种方法进行标本分类后,不同标本间比

较, ATM 蛋白表达阳性率的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 ATM 蛋白在早期食管鳞癌组织和淋巴结阴性进展型食管癌组织中的表达差异 早期食管鳞癌中 ATM 蛋白表达阳性率为 65%,与其在癌旁正常组织中的表达阳性率(95%)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。ATM 蛋白在两种组织中的表达情况,见附图 1、2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

表 1 ATM 蛋白在不同标本中的表达情况

项目	n	癌组织中 ATM 蛋白的表达(n)				癌组织中 ATM 蛋白阳性[n(%)]	正常组织中 ATM 蛋白阳性(n)				正常组织中 ATM 蛋白阳性[n(%)]	
		-	+	++	+++		-	+	++	+++		
性别	男	15	6	5	2	2	9(60.0)	1	6	5	3	14(93.3)
	女	5	1	0	4	0	4(80.0)	0	1	2	2	5(100.0)
年龄	≤60 岁	7	2	2	1	2	5(71.4)	1	1	4	1	6(85.7)
	>60 岁	13	5	3	5	0	8(61.5)	0	6	3	4	13(100.0)
肿瘤类型	糜烂型	15	6	3	5	1	9(60.0)	1	6	3	5	14(93.3)
	斑块型	5	1	2	1	1	4(80.0)	0	1	4	0	5(100.0)
分化程度	I 级	3	1	0	2	0	2(66.7)	0	1	1	1	3(100.0)
	II 级	16	5	5	4	2	11(68.8)	1	6	5	4	15(93.8)
	III 级	1	1	0	0	0	0(0)	0	0	1	0	1(100.0)
肿块位置	食管上段	2	0	1	1	0	2(100.0)	0	1	1	0	2(100.0)
	食管中段	14	5	4	4	1	9(64.3)	1	5	4	4	13(92.9)
	食管下段	4	2	0	1	1	2(50.0)	0	1	2	1	4(100.0)
浸润深度	黏膜下层/肌层	16	7	5	3	1	9(56.3)	1	7	5	3	15(93.8)
	固有层/原位癌	4	0	0	3	1	4(100.0)	0	0	2	2	4(100.0)

表 2 ATM 蛋白在早期食管鳞癌中的表达及阳性率统计表

食管鳞癌的类型	n	ATM 蛋白的表达情况(n)				阳性率(%)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
早期食管鳞癌癌旁正常组织	20	1	7	7	5	95.0	5.625	0.044
早期食管鳞癌癌变组织	20	7	5	6	2	65.0		
食管鳞癌癌旁正常组织*	40	2	18	13	7	95.0	12.624	0.001
食管鳞癌癌变组织 [△]	40	15	15	8	2	62.5		

*:淋巴结阴性进展型食管鳞癌癌旁正常组织和早期食管鳞癌癌旁正常组织;[△]:早期食管鳞癌癌变组织和淋巴结阴性进展型食管癌组织。

3 讨 论

食管癌的发生、发展是一个复杂过程,在分子水平上包括许多癌基因和抑癌基因及其蛋白质的改变^[7]。ATM 蛋白属于一种自动磷酸化蛋白激酶,在 DNA 损伤修复、细胞周期阻滞和细胞凋亡过程中发挥着关键的调控作用。ATM 蛋白的核心作用是对电离辐射或紫外线造成的 DNA 双链断裂损伤起反应,通过激活与 DNA 修复相关的 BRCA1 和 RAD51 从而调控 DNA 损伤的修复。当 ATM 基因发生突变、失活和功能受损后,细胞缺乏功能正常的 ATM 蛋白,不能正常修复受损的 DNA,受损的 DNA 很容易随细胞分裂而传入子细胞,最终易导致细胞癌变。学者研究发现,许多肿瘤的发生和治疗过程涉及了 ATM 蛋白表达或活性的改变,并且 ATM 蛋白的表达或活性的改变影响了肿瘤的治疗及预后,提示 ATM 基因或许能成为肿瘤治疗过程中一个新的潜在作用靶点^[8-10]。

本研究通过对 20 例早期食管鳞癌癌变组织和癌旁正常组织的 ATM 蛋白检测,发现癌变组织的 ATM 蛋白表达普遍比癌旁正常组织低,正常组织中 ATM 蛋白的表达可能对组织可能起着一定的保护作用。国内有部分学者对 ATM 蛋白在肺癌和宫颈癌等组织中的表达也做了研究^[11-12],得到 ATM 蛋白在这些癌变组织中的表达降低,但乔劲鹏^[13]研究了 ATM 蛋白在食管癌中的表达,得出了不同的结论。这可能是由于实验条件和标本状态等的不同。

综上所述,与旁正常组织阳性表达率的比较,ATM 蛋白在食管鳞癌癌变组织中的表达偏低,即 ATM 基因在癌变组织中受损,正常表达蛋白功能部分受损。笔者认为,检测 ATM 蛋白在组织中的表达率可能成为早期诊断食管癌的一种新方法。

情况下,MP 高发于年龄较大的儿童^[6],在婴幼儿中也有一定的发病比例;FluB 也是儿童 ARI 的常见病原体之一,仅次于 MP,远高于文献^[12]报道的 0.8%。各年龄组间感染情况也有明显差异,其中 3~<6 岁组的检出率最高,为 47.84%;RSV 检出率在 3~<6 岁年龄组最高,明显低于文献^[4]报道的 35%。不同的是,其他文献报道中 RSV 的检出率是最高的,而本研究中排第二位。ADV、COX、PIV 和 FluA 病原体检出率在 3~<6 岁组中较高,CPn 检出率在 6~12 岁组中明显高于其他年龄组。

本研究中,两种病原体混合感染模式以 MP+FluB 和 MP+RSV 多见,而 Peng 等^[13]报道 FluA+FluB 是主要的混合感染;3 种病原体混合感染模式以 MP+FluB+RSV 和 MP+FluB+PIV 较多;4 种病原体混合感染模式以 MP+FluB+RSV+PIV 多见,这可能是由于一种病原体(如 MP)感染后造成气道黏膜细胞损害,使其他病原体更容易入侵,也可能与患儿体质差免疫功能低下,病程长、住院时间长和其他患儿接触,交叉感染机会增加有关。因此,儿童在住院期间应该有相应的隔离措施,避免院内感染。另外,很重要的一点就是混合感染的检出率很大程度上与使用的检测方法和待检测病原体的种类的多少有关。

本研究分析了本院近三年拟诊为 ARI 患儿的呼吸道病原体检测结果,增加了对本地区儿童 ARI 的病原体流行趋势的认识,为 ARI 患儿经验性用药提供了参考依据。

参考文献

- [1] Liu L, Johnson HL, Cousens S, et al. Global, regional, and National causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000 [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9832): 2151-2161.
- [2] Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, et al. Viral pneumonia [J]. *Lancet*, 2011, 377 (9773): 1264-1275.
- [3] Kumar S, Wang L, Fan J, et al. Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse tran-

scription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detec [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46 (9): 3063-3072.

- [4] Bezerra PG, Britto MC, Correia JB, et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (4): 18928.
- [5] Do AH, van Doorn HR, Nghiem MN, et al. Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004 - 2008 [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3): 2004-2008.
- [6] Kim CK, Choi J, Callaway Z, et al. Clinical and epidemiological comparison of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in Seoul, Korea, 2003-2008 [J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25 (3): 342-347.
- [7] Mardy S, Ly S, Heng S, et al. Influenza activity in Cambodia during 2006-2008 [J]. *BMC Infect Dis*, 2009, 9 (1): 168.
- [8] Fabbiani M, Terrosi C, Martorelli B, et al. Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy [J]. *J Med Virol*, 2009, 81 (4): 750-756.
- [9] Yeolekar LR, Damle RG, Kamat AN, et al. Respiratory viruses in acute respiratory tract infections in Western India [J]. *Indian J Pediatr*, 2008, 75 (4): 341-345.
- [10] Chan PK, Mok HY, Lee TC, et al. Seasonal influenza activity in Hong Kong and its association with meteorological variations [J]. *J Med Virol*, 2009, 81 (10): 1797-1806.
- [11] Liu CL, Wang GQ, Zhang B, et al. Mycoplasma pneumoniae pneumonia in hospitalized children diagnosed at acute stage by paired sera [J]. *Chin Med J*, 2010, 123 (23): 3444-3450.
- [12] Shibli F, Chazan B, Nitzan O, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in northern Israel [J]. *Isr Med Assoc J*, 2010, 12 (8): 477-482.
- [13] Peng D, Zhao D, Liu J, et al. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections [J]. *Virol J*, 2009, 6 (1): 155.

(收稿日期:2014-02-28)

(上接第 2431 页)

参考文献

- [1] Vodicka P, Stetina R, Polakova V, et al. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28 (3): 657-664.
- [2] 胡建莉,陈萍,刘伟,等.食管鳞癌中 VEGF₁₆₅(b)、HIF-1 α 的表达及临床意义 [J]. *肿瘤防治研究*, 2010, 37 (1): 9-11.
- [3] Wang LD, Zheng S, Zheng ZY, et al. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia; in special reference to China [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (6): 1156-1164.
- [4] Moreto M. Diagnosis of esophagogastric tumors [J]. *Endoscopy*, 2001, 33 (1): 1-7.
- [5] Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (3): 155-168.
- [6] 刘小群. ATM 与肿瘤的关系研究进展 [J]. *中国癌症杂志*, 2011, 12 (12): 973-977.
- [7] Grabsch H, Dattani M, Barker L, et al. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 (5): 1494-1500.

[8] Truman JP, Gueven N, Lavin M, et al. Down-regulation of ATM protein sensitizes human prostate cancer cells to radiation-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (24): 23262-23272.

- [9] Otterbein LE, Hedblom A, Harris C, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide modulate DNA repair through ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (35): 14491-14496.
- [10] Cosentino C, Grieco D, Costanzo V. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair [J]. *EMBO J*, 2011, 30 (3): 546-555.
- [11] 张梅光,王晓凌,徐世杰,等.肺癌患者射线诱发的淋巴细胞遗传损伤及 ATM 蛋白表达的研究 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2007, 22 (5): 416-419.
- [12] 王秋,折虹. ATM 蛋白在宫颈癌中的表达及临床意义 [J]. *宁夏医学杂志*, 2010, 32 (3): 220-222.
- [13] 乔劲鹏. ATM 蛋白在食管鳞癌中的表达意义及其抑制剂 KU-55933 在 ECA-109 细胞中的放射增敏作用 [D]. 蚌埠:蚌埠医学院, 2012.

(收稿日期:2014-01-28)