

放疗前宫颈癌组织 IER5 表达与中子刀疗效的相关性*

王永才, 宋 伟, 张 鹏, 周凤佳, 朱广渊, 张 爽

(解放军 202 医院 放疗科, 吉林 沈阳 110003)

[摘 要] **目的:** 探讨放疗前宫颈癌组织早期快速反应基因 5 (IER5) 表达与中子刀疗效的相关性。**方法:** 收集放疗前累积接受 7.5 Gy、15 Gy、22.5 Gy 及 30 Gy 照射剂量治疗的宫颈癌组织标本各 25 例, 分别采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 及免疫组化法检测 IER5 mRNA 及蛋白表达水平, 比较 4 个照射剂量组高 IER5 蛋白表达及低 IER5 蛋白表达宫颈癌患者的临床获益率, Spearman 法分析放疗前 IER5 蛋白表达与中子刀疗效的相关性。**结果:** 不同照射剂量治疗的宫颈癌组织 IER5 mRNA 及 IER5 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 照射剂量越高, IER5 mRNA 和 IER5 蛋白的相对表达量也越高, 两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在累积接受 7.5 Gy、15 Gy、22.5 Gy、30 Gy 照射剂量的宫颈癌患者中, 高 IER5 蛋白表达者临床获益率高于低 IER5 蛋白表达者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 放疗前 IER5 蛋白表达与中子刀疗效呈显著正相关 ($r = 0.546, P < 0.05$)。**结论:** 随累积照射剂量增加会增加宫颈癌患者的临床获益率, 其机制可能与照射提高宫颈组织中 IER5 mRNA 和蛋白表达量有关, 放疗前宫颈癌组织中 IER5 蛋白与中子刀疗效呈显著的正相关。

[关键词] 宫颈癌组织; 早期快速反应基因 5; 中子刀; 相关性分析; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)11-1344-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.11.022

The Correlation Between the Expression of IER5 and the Efficacy of Neutron Knife in the Treatment of Cervical Cancer before Radiotherapy

WANG Yongcai, SONG Wei, ZHANG Peng, ZHOU Fengjia, ZHU Guangyuan, ZHANG Shuang
(Radiotherapy Department, The 202 Hospital of PLA, Shenyang 110003, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between the expression of rapid response gene 5 (IER5) and the efficacy (CR + PR + SD) of the neutron knife in the treatment of cervical cancer before radiotherapy. **Methods:** 25 cases with cervical cancer were collected and received radiation with 7.5 Gy, 15 Gy, 22.5 Gy and 30Gy doses respectively, and the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the relative expression of IER5 and mRNA, the the optical density (OD) of IER5 protein was detected by immunohistochemistry. The relative expression levels of IER5, mRNA and IER5 proteins were compared among the cases with different radiotherapy doses. According to the expression of IER5 protein, the patients were divided into the high expression group and low expression group, and the clinical benefit rates (CR + PR + SD) were compared after irradiation with different doses. **Results:** The relative expression levels of IER5, mRNA and IER5 protein in different irradiation doses were statistically different ($P < 0.05$), and the higher the radiation dose, the higher the relative expression of IER5, mRNA and IER5 proteins. The relative expression of IER5, mRNA and IER5 protein in both samples were statistically significant ($P < 0.05$). Among the patients who received 7.5 Gy, 15 Gy, 22.5 Gy and 30 Gy irradiation doses, the clinical benefit rates of high IER5 protein expression were 70.00%, 66.67%, 64.29% and 78.95% respectively, much higher than those with low IER5 protein expression by 33.33%, 30.37%, 45.45%, and 50.00%, with sig-

*[基金项目] 解放军 202 医院课题基金 (2017080)
网络出版时间: 2018-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181115.2127.019.html>

nificant differences ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the expression of IER5 protein and the efficacy of neutron knife before radiotherapy ($r = 0.546$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The higher the cumulative radiation dose, the higher the relative expression of IER5 mRNA and protein in cervical cancer tissues. The expression of IER5 protein was positively correlated with the efficacy of neutron knife before radiotherapy, playing a guidance role in the selection of clinical radiotherapy protocols and the prediction of prognosis.

[**Key words**] cervical cancer tissue; immediate early response gene 5; neutron knife; correlation; polymerase chain reaction

2016 年的数据统计显示,全球每年约有 50 万宫颈癌新发病例,其中发展中国家新发病例高达 80%,我国占全世界的 28.8%^[1]。目前宫颈癌患者主要的治疗方式有手术、放疗及化疗,其中超过 80% 的病例均需要接受放疗,而机体对放疗的敏感性在很大程度上决定了治疗的效果及复发情况^[1]。早期快速反应基因 5 (IER5) 是一种早期慢反应基因,受外界刺激后 IER5 表达会发生明显改变^[2],辐射条件下宫颈癌患者 IER5 基因和蛋白表达上调与患者的预后存在一定关系^[3]。为了进一步探讨放疗前宫颈癌组织 IER5 表达与中子刀疗效的相关性,本研究随机选取 25 例宫颈癌患者,观察放疗前及累积接受不同照射剂量后宫颈癌组织中 IER5 表达水平改变,旨在为宫颈癌患者的治疗提供思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2015 年 9 月~2016 年 12 月收治的宫颈癌患者 25 例,纳入标准:经病理检查确诊为宫颈鳞癌患者,未接受过宫颈癌根治术或宫颈保持完整者,卡氏 (KPS) 评分 ≥ 90 分,能耐受中子刀治疗者;排除合并第二原发恶性肿瘤者,治疗前行放化疗者,微小病灶且肿瘤组织标本不够检测者,严重并发症影响放疗者,患有严重精神病者,临床资料不全影响判断者及不具备随访条件者。25 例患者 31~58 岁,平均 (42.4 ± 5.3) 岁;临床分期 II 期 16 例、III 期 9 例。所有受试者均采用铟 252 后装治疗,采用宫腔施源器及双侧穹隆球治疗,每次给予 7.5 Gy、每周治疗 1 次,治疗 5 次,总剂量根据患者具体病灶及分期选择,并参照《现代肿瘤学》^[4] 制定。该研究取得医院伦理委员为批准,获得患者或家属知情同意参加本研究。

1.2 方法

1.2.1 分组 根据放疗累积接受照射剂量分为 7.5 Gy 组、15 Gy 组、22.5 Gy 组及 30 Gy 组,根据 IER5 蛋白表达水平将 4 个照射剂量组再分为高表达组和低表达组。

1.2.2 标本采集 每名入组患者在中子刀治疗剂量达到 7.5 Gy、15 Gy、22.5 Gy 及 30 Gy 后活检钳取宫颈病灶处 $3 \sim 4 \text{ mm}^3$ 大小组织,离体后立即放置于液氮 (-196°C) 中,5 d 内转至冰柜 (-80°C) 储存备用。

1.2.3 IER5 mRNA 水平 采用 RNA 提取试剂盒 (购自深圳晶美生物科技公司) 提取组织样本中的 RNA,按照参考文献 [5] 提取 RNA 并鉴定纯度及浓度;采用 HIFI-MMLV cDNA 试剂盒 (购自深圳晶美生物科技公司) 进行反转录,反应体系 $20 \mu\text{L}$,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 引物由北京康为世纪生物科技公司设计并合成,PCR 循环条件为 95°C 预变性 5 min, 95°C 条件下变性 15 s, 60°C 条件下延伸 60 s,共 40 个循环。参考文献 [5] 计算 IER5 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 IER5 蛋白水平 按照文献 [6] 检测 IER5 蛋白水平,将组织样本常规脱水、渗透、包埋、切片、贴片、脱蜡、水化及修复抗原,加入过氧化物酶封闭 10 min, PBS 缓冲液冲洗;加入脱脂奶封闭蛋白非特异性结合位点 10 min, PBS 缓冲液冲洗;加入一抗工作液 (鼠抗人单克隆 IER5 抗体,美国 Bio-Rad 公司) 60 min, PBS 冲洗;加入二抗工作液 (羊抗鼠抗体,购自美国 Bio-Rad 公司) 10 min, PBS 冲洗;加入显色工作液,苏木素复染,常规脱水透明及中性树脂封片,晾干后在光学显微镜 (日本 Olympus 公司) 下观察。细胞浆被染成棕黄色或棕褐色的细胞为 IER5 蛋白表达阳性细胞,随机选取 5 个高倍视野,将阳性细胞率 $\geq 70\%$ 者记为 IER5 蛋白高表达。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对染色结果进行分析,得出光密度值 (OD),以 OD 对

IER5 蛋白相对表达情况进行定量分析。

1.3 观察指标

比较 4 个照射剂量组宫颈癌组织中 IER5 mRNA 及蛋白表达水平,比较 4 个照射剂量组高 IER5 蛋白表达和低 IER5 蛋白表达宫颈癌患者的临床获益率,分析放疗前 IER5 蛋白表达与中子刀疗效的相关性。临床获益率 = [完全缓解 (CR) + 部分缓解 (PR) + 稳定 (SD)] / 总例数 × 100% ,CR 为所有目标病灶消失、且至少维持 4 周,PR 为所有目标病灶缩小 ≥ 50%、且至少维持 4 周,SD 为目标病灶有所减小、但是未达到 PR 标准者。

1.4 统计学分析

数据用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据比较采用方差分析,两两比较采用 t 检验;计数资料用百分比 (%) 表示,数据比较采用 χ^2 检验;采用 *Spearman* 法分析 IER5 蛋白表达与中子刀疗效相关性,用相关系数 r 表示。 $P < 0.05$ 可认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IER5 mRNA 和 IER5 蛋白表达

不同照射剂量宫颈癌组织 IER5 mRNA 和

IER5 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),照射剂量越高,IER5 mRNA 和 IER5 蛋白的相对表达量也越高,且每 2 个样本间 IER5 mRNA 和 IER5 蛋白相对表达水平比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);见表 1。免疫组织化学染色结果显示,照射剂量越高,宫颈癌组织中 IER5 蛋白阳性表达的细胞比例也呈现逐渐升高的趋势。见图 1。

表 1 不同照射剂量宫颈癌组织 IER5 mRNA 和 IER5 蛋白的相对表达量比较

Tab.1 Comparison of relative expressions of IER5 mRNA and IER5 proteins in cervical cancer tissues with different doses of radiation

组别	<i>n</i>	IER5 mRNA	IER5 蛋白
放疗前组	25	0.63 ± 0.06	0.21 ± 0.04
7.5 Gy 组	25	0.74 ± 0.09 ⁽¹⁾	0.25 ± 0.07 ⁽¹⁾
15 Gy 组	25	0.82 ± 0.12 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.29 ± 0.09 ⁽¹⁾⁽²⁾
22.5 Gy 组	25	0.93 ± 0.14 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	0.31 ± 0.08 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
30 Gy 组	25	1.87 ± 0.25 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	0.36 ± 0.11 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
<i>F</i>		14.697	15.839
<i>P</i>		0.000	0.000

注: ⁽¹⁾与放疗前组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 7.5 Gyz 组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与 15 Gy 组比较, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾与 22.5 Gy 比较, $P < 0.05$

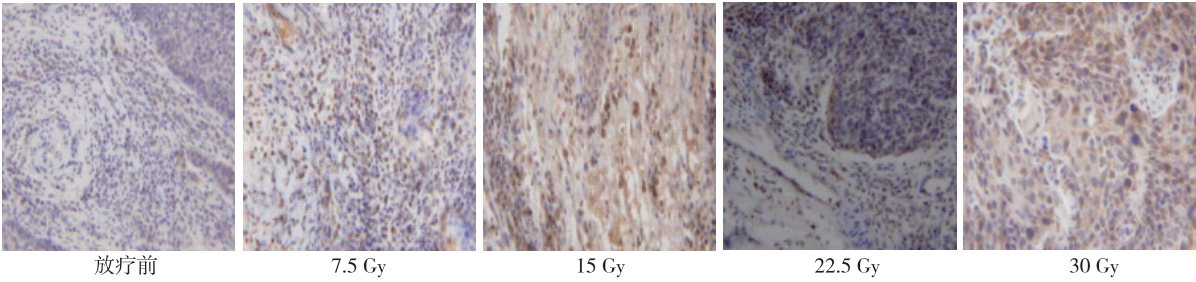


图 1 不同照射剂量宫颈癌组织 IER5 蛋白表达 (免疫组织化学染色, × 40)

Fig.1 Expression of IER5 protein in cervical cancer tissues with different doses of radiation

2.2 不同 IER5 蛋白表达水平的不同照射剂量宫颈癌患者的临床获益率

在累积接受 7.5 Gy、15 Gy、22.5 Gy、30 Gy 照射剂量的宫颈癌患者中,宫颈癌组织标本中高 IER5 蛋白表达患者的临床获益率分别高于低 IER5 蛋白表达者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 放疗前 IER5 蛋白表达与中子刀疗效的相关性

放疗前共有 8 例 IER5 蛋白高表达,17 例 IER5 蛋白低表达,在 8 例 IER5 蛋白高表达患者中,累积

表 2 不同 IER5 蛋白表达水平的不同照射剂量宫颈癌患者的临床获益率比较

Tab.2 Comparison of clinical benefit rates of cervical cancer patients with different levels of IER5 protein expression

组别	宫颈癌患者临床获益率(<i>n</i> ,%)		χ^2	<i>P</i>
	IER5 蛋白高表达	IER5 蛋白低表达		
7.5 Gy 组	70.00(7/10)	33.33(5/15)	5.743	0.012
15 Gy 组	66.67(8/12)	30.77(4/13)	5.546	0.010
22.5 Gy 组	64.29(9/14)	45.45(5/11)	2.976	0.048
30 Gy 组	78.95(15/19)	33.33(2/6)	3.627	0.031

30 Gy 照射剂量治疗患者的临床获益率为 87.50% (7/8); 在 17 例 IER5 蛋白低表达患者中, 累积 30 Gy 照射剂量治疗患者的临床获益率为 58.82% (10/17)。经 *Spearman* 相关性分析显示, 放疗前 IER5 蛋白表达与中子刀疗效呈显著正相关性($r = 0.546, P < 0.05$)。

3 讨论

宫颈癌的发病机制尚未完全阐述清楚, 该病发生的高危因素多种多样, 常见的高危型人乳头瘤病毒感染、多个性伴侣、初产年龄较小、初次性生活 < 16 岁、多孕多产、滴虫或沙眼衣原体感染、营养不良等均可诱发宫颈癌^[7-8]。国外研究表明, 该病发生的病理基础是细胞增殖和凋亡失去平衡, 调控作用紊乱, 导致宫颈癌细胞迅速增殖, 侵袭周围正常结构, 发生浸润或转移, 对机体的健康状态造成严重的损害^[9]。世界卫生组织主张对 II b 期及以上临床分期的宫颈癌均实施放疗, 实际上任何临床分期的宫颈癌患者均符合放疗指征, 但是个体对放疗的敏感性与获取的疗效和预后效果存在着紧密的关联^[10-11]。中子刀主要是利用同位素中子源 ²⁵²Cf 发射的中子射线杀伤肿瘤乏氧细胞, 治愈率较高, 照射后几乎没有致死损伤修复, 并且无痛, 安全性高, 相较于常规 X 射线和 γ 射线照射具有更高的安全性, 能够近距离照射病灶组织, 最大程度杀灭癌细胞, 减轻对正常组织的损伤, 优势明显。而探讨宫颈癌患者放疗敏感性的调控机制及其与疗效的相关性能够指导临床治疗, 从而有助于改善预后效果。

目前人们对 IER5 基因的认识并不深入, 于新平等^[12]认为该基因很可能对细胞周期有调节作用, 尤其是调控有丝分裂周期, 并且对细胞凋亡也有理想的促进作用; 国内刘洋等^[13]研究表明, 在机体受到辐射后 IER5 基因的表达水平上调, 可诱导宫颈癌细胞在体外实验中显现出细胞周期 G2/M 和 S 期阻滞, 抑制细胞分裂和生长, 促进细胞凋亡, 最终达到控制肿瘤的目的。本研究通过对比不同高 LET 中子照射剂量亚组间 IER5 mRNA 和 IER5 蛋白的相对表达量可知, 宫颈癌患者累积照射剂量越大, IER5 射的剂量有相关性。此推测在国外 Ishikawa Y 等^[14]的 X 射线照射和伽玛射线的照射研究中被证实, 在该研究中发现照射剂量越大的宫颈癌患者 IER5 蛋白的相对表达量越高, 且 OD 值也逐渐高由 (0.23 ± 0.04) 升高至 (0.34 ± 0.10),

照射剂量与 IER5 蛋白 OD 值存在明显的正相关($r = 0.673, P < 0.05$), 证实该基因和蛋白表达的确与宫颈癌患者化疗敏感性密切相关。但是 IER5 的表达与宫颈癌中子刀疗效的研究尚鲜有报道。

此外, 本研究还发现, 在累积接受 7.5Gy、15Gy、22.5Gy、30Gy 照射剂量的患者中, 高 IER5 蛋白表达者临床获益率分别为 70.00%、66.67%、64.29%、78.95%, 均远高于低 IER5 蛋白表达者的 33.33%、30.37%、45.45% 和 50.00%, 且放疗前高 IER5 蛋白表达者放疗结束后临床获益率高达 87.50%, 低 IER5 蛋白表达者临床获益率仅为 58.82%, 证实高 IER5 蛋白表达能够提高宫颈癌放射治疗的临床疗效, 且放疗前 IER5 蛋白表达与宫颈癌患者中子刀疗效有明显的正向相关性。关于放疗前 IER5 蛋白表达与宫颈癌患者中子刀疗效的相关性研究尚鲜有报道, 但是高 IER5 蛋白表达的宫颈癌患者接受放疗后临床效果明显优于低 IER5 蛋白表达的宫颈癌患者, 该结论已经在国内另一项研究中得到证实^[15]。据此可以推测, 在宫颈癌放疗前可以检测 IER5 蛋白表达情况, 并以此预测治疗效果。

综上所述, 宫颈癌组织中 IER5 mRNA 和蛋白相对表达量与累积照射剂量可能有明显的正相关性, 可将 IER5 基因和蛋白表达情况作为宫颈癌患者放疗敏感性的评估指标, 指导射剂量, 对临床放疗方案的选择和预后成效的预测均有良好的指导价值, 值得进一步挖掘、探讨。

4 参考文献

[1] 刘慧强. 我国宫颈癌流行病学特征和高危因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(6):1258-1260.

[2] 刘洋, 吴玉梅, 田明, 等. 宫颈癌组织 IER5 与放射敏感性及其临床意义研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2016, 25(12):1345-1349.

[3] 吉晨, 吴玉梅, 李秀楠, 等. 宫颈癌细胞辐射敏感性与 IER5 基因的关系[J]. 肿瘤学杂志, 2017, 23(4):305-311.

[4] 孙丽慧. 现代肿瘤学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2011:132-133.

[5] KAWABATA S, LSHITA Y, LSHIKAWA Y, et al. Immediate-early response 5 (IER5) interacts with protein phosphatase 2A and regulates the phosphorylation of ribosomal protein S6 kinase and heat shock factor 1[J]. FEBS Lett, 2015, 589(23):3679-3685.

(下转第 1352 页)