

CHK1 和 CHK2 在食管癌组织中的表达

王玉祥,祝淑钗,王鑫,封巍,李娟,沈文斌

Expression of CHK1 and CHK2 Protein in Tissue of Esophageal Carcinoma

WANG Yu-xiang, ZHU Shu-chai, WANG Xin, FENG Wei, LI Juan, SHEN Wen-bin

Department of Radiation Oncology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding Author: ZHU Shu-chai

Abstract: Objective To observed expression of CHK1 and CHK2 in tissues of esophageal carcinoma and its precucor and analyzed its relationship with prognosis of esophageal carcinoma after radiotherapy.

Methods Protein expression of CHK1 and CHK2 in tissue of 33 cases of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and 12 cases of dysplasia were detected with western blotting and prognostic related factors in ESCC patients were analyzed after radiotherapy.

Results Expression of CHK1 and CHK2 protein were not significant difference between tissues of ESCC and its relevant precursor with semi-quantity analysis respectively. After radiotherapy, 1-year survival rate and median were 61.44% and 11.5 months respectively in 33 cases of ESCC. Age, tumor length in X-ray and CT, T stage, N stage, clinical stage and clinical response were correlated with prognosis of ESCC after radiotherapy with One-way survival analysis; but only clinical stage is the independent prognostic factor with Cox multivariate analysis. Expression of CHK1 and CHK2 protein is not related with prognosis of ESCC after radiotherapy.

Conclusion Protein expression of CHK1 and CHK2 was probably not act as prognosis index of ESCC after radiotherapy, clinical stage is the most important prognostic factor of ESCC after radiotherapy.

Key words: Esophageal carcinoma; Checkpoint kinase; Radiotherapy; Prognosis

摘要:目的 观察 CHK1 和 CHK2 在食管癌和癌旁不典型增生组织中的表达及其与食管癌单纯放疗疗效的关系。方法 采用 Western Blotting 方法检测 33 例胃镜活检标本诊断为食管鳞癌以及 12 例癌旁不典型增生组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达,分析单纯放疗的疗效及预后相关因素。结果 33 例食管癌组织和 12 例癌旁不典型增生组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达量均无明显差别 ($P > 0.05$)。33 例食管癌病人单纯放疗后 1 年生存率为 61.44%,中位生存期 11.5 个月;单因素分析显示年龄、食管造影 X 线病变长度、CT 扫描显示病变长度、临床 T 分期、N 分期、近期疗效以及临床分期均与食管癌放疗预后有关 ($P < 0.05$);COX 多因素分析仅临床分期为独立预后因素;而食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 表达对预后无明显影响 ($P > 0.05$)。结论 CHK1 和 CHK2 不能作为判断食管癌放疗预后的指标,而临床分期则是影响食管癌单纯放疗疗效的主要因素。

关键词: 食管癌;细胞周期检测点激酶;放疗;预后

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)03-0171-04

0 引言

细胞周期检测点激酶 1 和 2 (CHK1 和 CHK2) 是生物进化过程中非常保守的蛋白激酶,在 DNA 损伤引起的细胞周期检测点调节中有着非常重要的作用。CHK1 和 CHK2 在多种人正常和肿瘤组织中均有表达,并可能与某些肿瘤的发生发展有关^[1]。食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 表达情况如何,尚未

见报道。为此应用 Western Blotting 方法检测食管癌组织及癌旁组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达,分析其对单纯放疗疗效的影响,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例入组条件

收集 2003 年 11 月~2004 年 7 月在河北医科大学第四医院放疗科诊治的食管癌初诊患者 33 例;内窥镜下在病灶及不碘染区多点取材,病灶及不碘染区处分别诊断为鳞癌和不典型增生者入组;放疗前行胸部 CT 扫描和食管钡餐造影 X 片以及腹部超声波检查,疗前及疗中常规行血液学检查;疗前 KPS 评分均 70 分,无严重心脑血管疾

收稿日期:2005-05-24;修回日期:2005-09-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470524)

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院放疗三病区

通讯作者:祝淑钗

作者简介:王玉祥(1969-),男,博士,副主任医师,主要从事食管癌基础与临床研究

病和放疗禁忌症；所有患者均接受单纯根治性放疗，疗前、疗中和疗后未行辅助性治疗。

1.2 一般资料

33 例食管癌中，男 22 例、女 11 例，男女为 2:1；中位年龄 60 岁（37~82 岁）。病变部位：颈段 2 例、胸上段 8 例、胸中段 18 例、胸下段 5 例。食管造影 X 线片显示病变长度：3.0cm 者 5 例、3.1~5.0cm 者 9 例、5.1~8.0cm 者 12 例、>8cm 者 7 例；X 线病理分型：髓质型 29 例、溃疡型和缩窄型各 2 例。CT 扫描显示病变长度：3.0cm 者 4 例、3.1~5cm 者 8 例、5.1~8cm 者 12 例、>8cm 者 9 例。按照祝淑钗^[2]提出的非手术治疗食管癌分期标准，T 分期：T1 3 例、T2a 12 例、T2b 13 例、T3a 2 例、T3b 2 例、T4 1 例；N 分期：N0 13 例、N1 9 例、N2 11 例；M 分期：M0 31 例、M1 2 例；临床分期：I 期 2 例、a 期 7 例、b 期 7 例、II 期 7 例、a 期 7 例、b 期 5 例、III 期 5 例。

1.3 放疗

常规放疗组于模拟机下定位，以食管病变中心为射野中心，给予一前野加两后斜野避开脊髓照射。适形放疗组先行热塑体模固定体位，标记三维激光灯参考点以保证治疗重复性。以 CT 扫描模拟定位，层厚 3cm，应用三维适形放射治疗计划系统（CMS 公司）进行扫描图像的数字化传输、三维重建，勾画肉眼可见的病灶靶区（包括原发肿瘤和转移淋巴结 GTV），一般上下两端外扩 3.0cm，前后左右外扩 1.5cm 作为临床靶区（CTV），通常给予 3 个共面或非共面照射野，计算靶区周围重要脏器剂量分布，确认治疗计划给予肿瘤最高致死剂量的同时确保周围正常组织受照不超过耐受剂量。常规分割照射 2Gy/d，5 次/周，肿瘤总剂量 50~70Gy，中位剂量 60Gy。

1.4 食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达的检测

收集 33 例食管癌标本和 12 例癌旁不染色标本分别提取组织蛋白（组织蛋白裂解液由河北医科大学法医教研室提供），考马斯亮蓝法（南京建成生物工程研究所）蛋白定量后，12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，湿法电转印至 PVDF 膜上，依次经 5% 脱脂奶粉封闭、一抗 CHK1 和 CHK2（美国 Santa Cruz 公司，按 1:300 稀释）4 过夜、辣根过氧化物酶（HRP）标记 IgG（1:2000 稀释）37℃ 孵育 1h，DAB（北京中杉生物技术公司）显色。扫描后用凝胶分析软件分析，以光密度值代表蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计分析软件对结果进行统计分析。计量资料采用 *t* 检验，生存分析采用 Kaplan-

Meier 方法，单因素分析采用 Log-rank 检验，多因素分析采用 COX 比例风险回归模型。

2 结果

2.1 食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达

Western Blotting 检测发现，33 例食管癌组织和 12 例癌旁不典型增生组织中，CHK1 和 CHK2 蛋白均有表达见图 1、2；用凝胶成像仪进行蛋白半定量分析，33 例食管癌组织与 12 例癌旁不典型增生组织中的 CHK1 和 CHK2 蛋白表达量无明显差异（ $P>0.05$ ），见表 1。

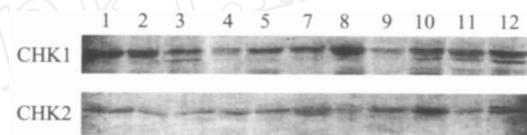


图 1 Western Blotting 检测食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达

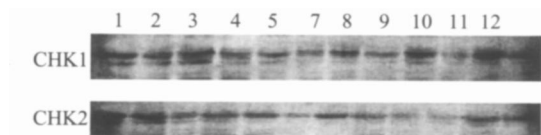


图 2 Western Blotting 检测食管癌旁不典型增生组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达

表 1 Western Blotting 半定量法分析食管癌及癌旁不典型增生组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达

组织来源	例数	CHK1	CHK2
食管癌组织	33	42.27 ±14.29	55.86 ±14.08
食管癌旁不典型增生	12	37.07 ±10.49	57.91 ±20.56
		$P>0.05$	$P>0.05$

2.2 食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达与单纯放疗疗效的关系

2.2.1 食管癌单纯放疗后生存率

33 例食管癌患者随访至 2005 年 3 月 1 日，随访率 100%，生存期从放疗开始日期计算，中位随访期 9 个月（范围 3~15 个月）。33 例单纯放疗后 1 年生存率 61.44%，中位生存时间 11.5 个月（范围 3~15 个月）。放疗后 CR21 例、PR12 例，总有效率（CR+RP）为 100%。

2.2.2 食管癌预后相关因素分析

单因素分析显示年龄、食管造影 X 线长度、CT 扫描显示病变长度、临床 T 分期、N 分期、临床分期以及近期疗效均与食管癌单纯放疗预后有关（ $P<0.05$ ）；COX 多因素分析仅 TNM 临床分期为独立预后因素，见图 3、表 2。而患者性别、病变部位、放疗方法（常规/适形）、放疗总剂量、以及肿瘤组织中 CHK1 和 CHK2 表达量等均与预后无明显关系（ $P>0.05$ ）。

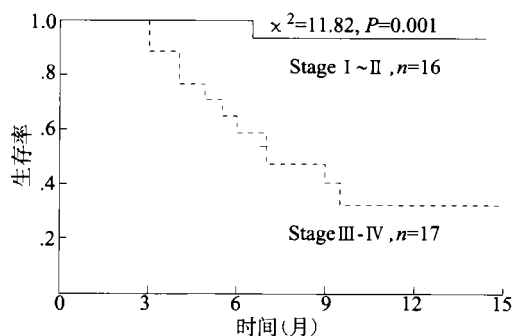


图 3 食管癌单纯放疗后不同临床分期的生存曲线

表 2 食管癌单纯放疗后预后相关单因素及多因素分析

项目	例数	1 年生存率 (%)	中位生存期 (月)	Log-rank 检验 ²	<i>P</i>	COX 检验 ³	<i>P</i>
性别							
男	22	55.56	11.1				
女	11	72.73	11.9	0.47	0.50	0.51	
年龄 (岁)							
< 60	13	33.65	8.9				
60	20	80.00	13.2	6.12	0.01	0.28	
原发肿瘤部位							
颈胸上段	10	45.00	10.2				
胸中下段	23	68.23	12.0	0.85	0.36	0.14	
T 分期							
T1-2	28	69.02	12.4				
T3-4	5	20.00	5.0	8.76	0.00	0.26	
N 分期							
N0	13	92.31	13.9				
N1	9	66.67	11.2				
N2	11	24.24	7.0	11.23	0.00	0.86	
临床分期							
~ 期	16	93.75	14.0				
~ 期	17	32.37	7.0	11.82	0.00	0.01	
X 线长度 (cm)							
≤ 5	14	85.71	13.3				
> 5	19	39.7	9.8	4.56	0.03	0.14	
CT 长度 (cm)							
≤ 6	17	88.24	13.6				
> 6	16	31.25	7.0	8.29	0.00	0.09	
CHK1 表达量 (平均 OD 值)							
≤ 42	18	47.62	9.0				
> 42	15	78.00	13.2	3.61	0.58	0.17	
CHK2 表达量 (平均 OD 值)							
≤ 52	15	60.00	10.4				
> 52	18	64.17	12.0	0.32	0.57	0.44	
治疗方法							
常规	21	58.93	11.5				
适形	12	66.67	11.3	0.01	0.92	0.20	
近期疗效							
CR	21	80.95	13.0				
PR	12	16.67	7.0	7.58	0.01	0.12	

2.2.3 食管癌不同预后因素间的相关性

对影响食管癌预后因素进行相关性检验,发现肿瘤 X 线造影长度、CT 长度和胃镜长度之间以及与它们与 T 和临床分期之间有正相关性, *P* 值均 < 0.05, 见表 3; 而 CHK1 和 CHK2 蛋白表达与肿瘤

X 线造影、CT 和胃镜所显示病变长度、肿瘤临床 T 分期、N 分期、临床分期以及近期疗效之间均无相关性, *P* 值均 > 0.05。

表 3 影像学检查与临床分期的相关性分析

相关比较项目	相关系数	<i>P</i>
T 分期与 X 线长度	0.607	0.000
T 分期与 CT 长度	0.719	0.000
T 分期与胃镜长度	0.677	0.003
临床分期与 X 线长度	0.487	0.004
临床分期与 CT 长度	0.598	0.000
X 线长度与 CT 长度	0.847	0.000
CT 长度与浸润深度	0.378	0.030
CT 长度与肿瘤最大直径	0.691	0.000

3 讨论

CHK1 和 CHK2 是非常重要的细胞周期检测点调节蛋白,在人类多种肿瘤组织中均有表达^[1]。本研究结果显示 33 例食管癌组织和 12 例癌旁不典型增生组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白均有表达。CHK1 和 CHK2 作为效应激酶,其蛋白的稳定表达有利于维护 DNA 损伤修复和细胞周期检测点调节,以保证细胞基因组的完整和稳定^[1]。

CHK1 和 CHK2 与肿瘤的发生发展是否有关系,以往研究报道结果不完全一致。Tort 等^[3]报道,淋巴瘤组织中 CHK1 表达与肿瘤增殖活性没有明显的关系;Tort 等^[4]还报道,在所有类型淋巴瘤和反应性增生组织中 CHK2 mRNA 和蛋白表达水平相似,而且 CHK2 表达与淋巴瘤的增殖活性无关,提示淋巴瘤的发生发展与 CHK1 和 CHK2 关系不大。但 Shigeishi 等^[5]报道提示 CHK1 和 CHK2 在 p53 突变胃癌的细胞周期检测点功能中发挥重要作用。Bartkova 等^[6]报道 CHK2 在原位癌和非侵袭性精原干细胞肿瘤中表达较高,而在侵袭性精原干细胞肿瘤和奇胎瘤中弱表达或无表达。

食管癌是我国常见肿瘤,食管上皮不典型增生被认为是重要的癌前病变。本研究发现,食管癌组织与癌旁不典型增生组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白表达均无明显差异,提示 CHK1 和 CHK2 可能与食管癌发生发展无明显关系,但由于病例数较少,还需进一步研究证实。本研究分析了 33 例食管癌单纯放疗后疗效及预后相关因素,结果发现仅临床分期为最主要的预后因素,临床分期越早,放疗预后越好;患者年龄、食管造影 X 线病变长度、CT 扫描显示病变长度、临床 T 分期、N 分期和近期疗效与预后也有关系,这与文献报道结果基本一致^[7]。

本研究发现食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 蛋

白表达量高低与食管癌单纯放疗预后无关,提示 CHK1 和 CHK2 不能作为判断食管癌放疗疗效的预后指标。CHK1 和 CHK2 蛋白表达高低还与食管造影 X 线和 CT 检查所显示的病变长度、T 分期、N 分期、临床分期以及近期疗效等均无明显相关性,提示 CHK1 和 CHK2 表达尚不能成为判断食管癌预后的指标。本研究结果还显示,X 线食管造影和 CT 检查显示病变长度的一致性很高,而且二者均与 T 分期和临床分期正相关,病变长度越长,T 分期和临床分期越晚;另外,CT 显示病变长度与浸润深度也成正相关,病变越长浸润深度越深,这与文献报道结果一致^[8]。另外,在 33 例食管癌组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白均有表达;而 Bartkova 等^[9]采用免疫组化分析发现,进展期(T2~T4)膀胱癌 CHK2 表达降低者为 10.3%(6/58 例),这可能与免疫组化法检测灵敏度较低有关。

本研究显示,食管癌和癌旁组织中 CHK1 和 CHK2 蛋白均有表达,虽然 CHK1 和 CHK2 表达可能与食管癌发生、发展和放疗疗效无明显关系,但其主要 DNA 损伤发生后,通过调节细胞周期检测点而影响 DNA 损伤修复,影响放疗和化疗药物的敏感性;因此有必要对食管癌细胞中 CHK1 和 CHK2 激酶对照射后细胞周期的调控作用行进一步的研究。

参考文献:

[1] Bartek J, Lukas J. CHK1 and CHK2 kinases in checkpoint control and cancer[J]. Cancer Cell, 2003, 3(5): 421-429.
 [2] 祝淑钗, 李任, 李娟, 等. 非手术治疗胸段食管癌临床分期与预后关系的初步探讨[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2003, 13

(3): 189-192.
 [3] Tort F, Hernandez S, Bea S, et al. Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms[J]. Leukemia, 2005, 19(1): 112-117.
 [4] Tort F, Hernandez S, Bea S, et al. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas [J]. Blood, 2002, 100(13): 4602-4608.
 [5] Shigeishi H, Yokozaki H, Oue N, et al. Increased expression of CHK2 in human gastric carcinomas harboring p53 mutations[J]. Int J Cancer, 2002, 99(1): 58-62.
 [6] Bartkova J, Falck J, Rajpert-De Meyts E, et al. CHK2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ cell tumours[J]. Oncogene, 2001, 20(41): 5897-5902.
 [7] Zhao KL, Shi XH, Jiang GL, et al. Late-course accelerated hyperfractionated radiotherapy for localized esophageal carcinoma[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60(1): 123-129.
 [8] Zhang P, Wang J, Gao W, et al. CHK2 kinase expression is down-regulated due to promoter methylation in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cancer, 2004, 3(1): 14-21.
 [9] Matsuoka S, Nakagawa T, Masuda A, et al. Reduced expression and impaired kinase activity of a CHK2 mutant identified in human lung cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5362-5365.
 [10] Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, et al. Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients[J]. Hum Pathol, 2004, 35(1): 165-175.
 [11] 刘明, 李彩英, 彭俊杰, 等. 食管癌病变长度与浸润深度关系的探讨[J]. 中国医学影像技术, 2003, 19(7): 885-886.
 [12] Bartkova J, Guldborg P, Gronbaek K, et al. Aberrations of the CHK2 tumour suppressor in advanced urinary bladder cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(52): 8545-8551.

[编辑:刘红武]

· 简讯 ·

关于举办肺癌的多领域研究新进展学习班的通知

由中国抗癌协会肺癌专业委员会、湖北省抗癌协会肺癌专业委员会主办,湖北省肿瘤医院、《肿瘤防治研究》杂志、贵州益佰药业有限公司协办的肺癌的多领域研究新进展学习班,将于 2006 年 8 月 18~20 日在武汉举办。

本学习班为国家级继续教育项目,编号:2006-09-03-003(国),参加者授予 类学分 10 分。学习班将邀请殷蔚伯教授、吴一龙教授、蒋国梁教授、秦叔逵教授、于丁教授、邬蒙教授、张力教授、Joseph Y. Ting, Ph. D 等国内外肺癌领域的著名专家进行授课。

注意事项:

1. 请欲参加学习班的代表接到通知后于 2006 年 8 月 4 日前将注册费寄到组委会秘书处。
2. 学分证工本费、学习班交通、食宿费用自理。

注册时间	费用(学生在读)
2006. 8. 4 前	700(500)
现场	900(600)

3. 注册及联系方式

地 址:武汉市湖北省肿瘤医院内科,430079 联系人:胡胜
 电 话:027-87670057 13971324718 E-mail: ehusmn@163.com
 网上注册和其他信息: <http://www.hbch.com.cn>

