

CST4 在哈萨克族食管鳞状细胞癌中的表达及意义

伊尔夏提·图尔宏¹, 张海平¹, 卡吾力·居买¹, 李子焱¹, 张力¹, 伊地力斯·阿吾提^{1,2*}

- 新疆医科大学第一附属医院 胸外科, 新疆 乌鲁木齐 830017;
- 新疆医科大学 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

摘要:目的 探究半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S(CST4) 在哈萨克族食管鳞状细胞癌(ESCC) 中的表达情况及临床意义。方法 收集 2010 年至 2020 年于新疆医科大学第一附属医院 49 例接受手术治疗的哈萨克族食管鳞状细胞癌患者的新鲜组织标本及石蜡包埋的组织标本。用 RT-qPCR 及免疫组化法检测食管癌组织与对应癌旁组织中 CST4 的表达。用 χ^2 检验分析 CST4 表达与患者临床病理资料之间的关系。用单因素及多因素分析 CST4 表达与患者术后生存期的关系。结果 CST4 mRNA 在食管癌组织中的表达量明显高于对应癌旁组织($P<0.05$)。CST4 蛋白在食管癌组织中的表达率(53.1%, 26/49)明显高于对应癌旁组织(28.2%, 11/39)($\chi^2=5.506, P<0.05$)。CST4 表达与淋巴结转移($P<0.05$)和 TNM 分期($P<0.01$)有关, CST4 高表达者淋巴结转移率更高, 肿瘤 TNM 分期更晚。单因素生存分析发现, CST4 表达水平($P<0.01$)、肿瘤浸润深度($P<0.05$)和 TNM 分期($P<0.01$)均与患者生存率相关。进一步行多因素生存分析发现, CST4 表达水平($P<0.05$)、肿瘤浸润深度($P<0.05$)是影响哈萨克族食管鳞状细胞癌患者预后的独立危险因素。结论 CST4 基因的表达可能与哈萨克族食管鳞癌的发生、进展及预后有关。CST4 的表达可作为食管鳞癌患者病情及预后评估的指标。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 哈萨克族; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S; RT-qPCR; 免疫组织化学

中图分类号: R735.1 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.09.1412

Expression and significance of CST4 in Kazakh esophageal squamous cell carcinoma

Yierxiati · TUERHONG¹, ZHANG Haiping¹, Kawuli · JUMAI¹, LI Ziyao¹,
ZHANG Liwei¹, Yidilisi · AWUTI^{1,2*}

- Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830017;
- State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention, Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of cystatin S(CST4) in patients with esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) in Kazakhs. **Methods** Totally 49 specimens from Kazakh ESCC patients who received surgical treatment were collected. RT-qPCR and immunohistochemical methods were used to detect CST4 expression in cancer tissues and adjacent tissues. Chi-square(χ^2) test was used to analyze the relationship

收稿日期: 2022-06-29 修回日期: 2022-12-09

基金项目: 国家自然科学基金(81960498); 省部共建国家重点实验室开放课题(SKL-HIDCA-2021-21)

* 通信作者(corresponding author): docedrs@163.com

between CST4 expression and the clinicopathological parameters. Kaplan-Meier method and Cox regression model were used to estimate the correlation between CST4 expression and overall survival. **Results** CST4 mRNA expression in ESCC tissues was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). CST4 protein expression in ESCC tissues (53.1%, 26/49) was higher than that in adjacent tissues (28.2%, 11/39) ($\chi^2 = 5.506$, $P < 0.05$). The expression of CST4 was significantly associated with lymph node metastasis ($P < 0.05$) and TNM stage ($P < 0.01$). Those with high CST4 expression had higher lymph node metastasis rate and later TNM stage. Univariate survival analysis showed that CST4 expression level ($P < 0.01$), invasion depth ($P < 0.05$) and TNM stage ($P < 0.01$) were associated with overall survival. Multivariate survival analysis showed that the CST4 expression ($P < 0.05$) and the invasion depth ($P < 0.05$) were independent prognostic factors for survival of ESCC patients. **Conclusions** CST4 expression is related to the occurrence, progression and prognosis of ESCC so it can be a potential prognostic marker for ESCC in Kazakhs.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; Kazakh; cystatin S; RT-qPCR; immunohistochemistry

食管癌(esophageal cancer, EC)是常见的恶性肿瘤之一,其发病率位列世界第7位,死亡率位列世界第6位^[1]。东亚地区食管癌的发病率及死亡率最高,其中中国每年新发病例数就占全球新发病例数的一半之多,而食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是中国食管癌的主要病理类型^[2]。新疆维吾尔自治区为中国食管癌的高发区,居住在新疆伊犁地区的人群中哈萨克族发病率最高^[3]。食管癌因恶性程度高,中晚期患者治疗效果差,故早期发现对改善预后很关键。

CST4(cystatin S/cystatin 4)是一种存在于多种体液及组织的外分泌型蛋白质,属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族(cystatins, CSTs)成员之一,由141个氨基酸组成,分子量约为15 ku,基因表达位点在20号染色体(20p11.2)^[4]。CST4通过免疫相关机制在哮喘^[5]、干燥综合征^[6]等疾病中发挥作用,近年来发现其在胃肠道肿瘤^[7]、卵巢癌^[8]、乳腺癌^[9]等多种恶性肿瘤中异常表达并与肿瘤的发生、进展及预后有关。这表明CST4参与恶性肿瘤的发生发展的过程,而CST4在食管癌中的表达情况及作用尚不清楚。故本研究通过RT-qPCR及免疫组化法检测哈萨克族食管癌患者CST4的表达情况,分析CST4基因表达与患者临床病理资料及预后之间的关系,探讨CST4在食管癌发生、发展及预后中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象:收集2010年至2020年于新

疆医科大学第一附属医院行根治性手术治疗的哈萨克族食管鳞状细胞癌患者49例,其中47例来自新疆维吾尔自治区,2例来自哈萨克斯坦国家。收集新鲜组织标本及石蜡包埋的组织标本,包括癌组织与距离肿瘤边缘>5 cm的癌旁组织标本。手术均常规进行,术后根据第八版AJCC食管癌分期系统进行病理学诊断,包含肿瘤分化、浸润深度、淋巴结转移以及TNM分期。本研究所使用的标本均经过患者或家属签署知情同意,通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审核批准(审批号:K201911-02)。纳入标准:1)术前及术后病理均确诊为食管鳞状细胞癌;2)切缘未见癌累及;3)有完整的病例档案。排除标准:1)术前行放射治疗和化学治疗(放化疗);2)合并其他恶性肿瘤或有恶性肿瘤个人史;3)腺鳞癌等混合癌。

1.1.2 试剂:兔抗人CST4多克隆抗体(Abcam公司);兔二步法试剂盒PV6001、DAB显色液、二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);Trizol试剂(Ambion公司);EvaGreen Express 2 × qPCR MasterMix-Low Rox、5X All-In-One RT MasterMix反转录试剂盒(Abm公司)。

1.2 方法

1.2.1 RT-qPCR检测CST4 mRNA:将新鲜组织标本采用Trizol法提取总RNA,反转录合成cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增。反应条件:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火60 s,60℃延伸60 s,40循环。CST4基因的引物序列:上游:5'-CT

GCTACTCTGATGGCTACC-3', 下游: 5'-GAAGTGAAGGGCAGCCTGTA-3'。内参基因 *GAPDH* 引物序列: 上游: 5'-TGTTGCCATCAATGACCCCTT-3', 下游: 5'-CTCCACGACGTACTCAGCG-3'。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 CST4 表达量。

1.2.2 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 检测 CST4 蛋白: 切片行常规脱蜡、水化、去除内源性酶、抗原修复、滴加兔抗人 CST4 多克隆抗体, 4 °C 冰箱孵育、加入二抗、DAB 显色、苏木精复染、脱水及封片。显微镜下观察, 每张切片中随机选取 5 个 20 倍放大视野, 每个视野计数 100 个细胞, 由 2 名病理科医生采用双盲法独立阅片赋分。根据着色强度赋分: 细胞无着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 根据着色细胞占比赋分: 无阳性细胞为 0 分, 阳性细胞占比 1%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 76%~100% 为 4 分。2 项之积 ≥ 3 分定为高表达^[8]。

1.3 统计学分析

所获数据均录入 Excel 建立数据库, 采用 SPSS 26.0 软件行统计学分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料采用例数和百分率表示, 组间比较采用 χ^2 ; 采用 Kaplan-Meier 单因素法和 Cox 因素回归法进行生存分析; 将单因素分析中发现统计学差异的指标与临床上认为影响预后的指标纳入到多

因素分析中。

2 结果

2.1 CST4-mRNA 的表达情况

食管鳞癌组织 CST4 表达 (1.63 ± 1.08) 显著高于对应癌旁组织 (1.13 ± 0.56) ($P < 0.05$)。

2.2 CST4 蛋白的表达情况

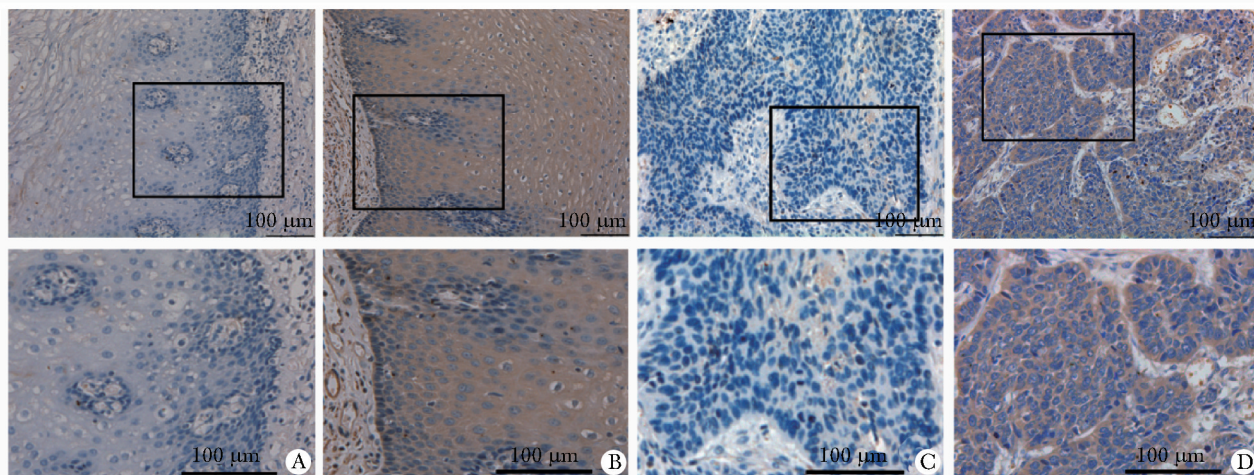
CST4 蛋白主要在细胞质中表达, 表现为棕色或黄色颗粒在细胞质聚集。CST4 蛋白在食管鳞癌组织中的高表达率为 53.1% (26/49), 明显高于对应癌旁组织 28.2% (11/39) ($P < 0.05$) (图 1)。

2.3 CST4 表达与食管癌患者临床病理学特征之间的关系

在食管癌组织中 CST4 高表达与淋巴结 (N) ($P < 0.05$) 及 TNM 分期 ($P < 0.01$) 有关 (表 1)。CST4 表达与患者性别、年龄、食管癌家族史、吸烟史、饮酒史、神经侵犯、脉管侵犯、分化程度及浸润深度未发现相关性。

2.4 CST4 表达与食管癌患者预后之间的关系:

49 例患者中死亡 26 例, 存活/失访 23 例, 中位随访时间为 19 个月。行 Kaplan-Meier 单因素分析发现, 食管癌组织 CST4 表达情况 ($P < 0.01$)、肿瘤浸润深度 ($P < 0.05$)、肿瘤 TNM 分期 ($P < 0.01$) 与患者术后生存率有关。Cox 因素分析发现, CST4 基因表达情况 ($P < 0.05$)、浸润 (T) ($P < 0.05$) 是影



A. low expression in adjacent tissue; B. high expression in adjacent tissue; C. low expression in ESCC; D. high expression in ESCC.

图 1 食管鳞癌组织与癌旁组织中 CST4 蛋白表达情况

Fig 1 Expression of CST4 in esophageal cancer tissue and correlated adjacent tissue

表 1 CST4 蛋白表达水平与患者临床病理参数的关系

Table 1 Correlation between CST4 expression and the clinicopathological characteristics

clinicopathological feature	n	CST4		χ^2	P
		low	high		
tissue				5.506	0.019
ESCC	49	23	26		
adjacent tissue	39	28	11		
N stage				5.121	0.024
N0	35	20	15		
N1+N2+N3	14	3	11		
TNM stage				11.478	0.001
I + II	28	9	19		
III + IV	21	4	17		

响哈萨克族食管鳞状细胞癌患者预后的独立危险因素(表 2,图 2)。

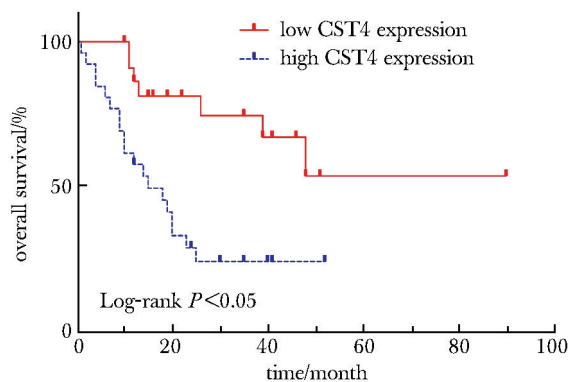


图 2 食管癌(EC)患者术后 CST4 生存曲线

Fig 2 Survival curve of CST4 for EC patients after surgery

表 2 食管癌(EC)患者术后生存期的单因素和多因素分析

Table 2 Univariate and multivariate survival analysis of Kazakh esophageal cancer(EC) patients after surgery

characteristics		n	univariate HR(95% CI)	P	multivariate HR(95% CI)	P
T stage	T1+T2	22				
	T3+T4	27	3.076(1.283-7.377)	0.012	3.046(1.186-7.827)	0.021
TNM stage	I + II	28				
	III + IV	21	3.291(1.479-7.323)	0.004	1.565(0.507-4.827)	0.436
CST4	low	23				
	high	26	3.788(1.567-9.156)	0.003	3.114(1.022-9.490)	0.046

3 讨论

食管癌的发生、发展由多个基因的特征性表达和相关蛋白质功能的变化调控,其具体机制尚未完全阐明。

本研究结果提示,食管癌组织中 CST4 基因的表达在 mRNA 水平和蛋白质水平上均明显高于癌旁组织,这与报道的^[7]在胃肠癌中的研究结果一致,表明 CST4 可能在食管癌发生的过程中发挥促癌作用。

CST4 高表达与较高的区域淋巴结转移率相关,与报道的^[10]在肿瘤骨转移中的研究结果一致,提示 CST4 可能在食管癌中促进癌细胞侵袭与转

移。此结论与报道的^[9]在乳腺癌中的研究结论相反。这可能与组织蛋白酶在不同肿瘤中的促癌与抑癌双重作用有关^[11]。组织蛋白酶的这种特性可能导致其抑制剂 CST4 在不同肿瘤中的表达存在差异性^[12]。

进一步生存分析发现,CST4 高表达与较短的术后生存期有关,结果与报道的^[8]在卵巢癌中的研究结果一致。单因素与多因素生存分析表明 CST4 高表达是导致患者不良预后的独立危险因素。

综上所述,CST4 基因的表达在哈萨克族食管鳞癌发生、发展的过程中可能存在重要意义,CST4 有潜力成为病情及预后评估的指标。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71:209-249.
- [2] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国食管癌发病状况与趋势分析 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38:703-708.
- [3] 居来提·艾尼瓦尔, 李德生, 张力为, 等. 新疆 2005~2008 年伊犁地区食管癌患病情况调查研究 [J]. *新疆医学*, 2011, 41:112-114.
- [4] Dickinson DP, Zhao Y, Thiesse M, *et al.* Direct mapping of seven genes encoding human type 2 cystatins to a single site located at 20p11.2. [J]. *Genomics*, 1994, 24:172-175.
- [5] Singhania A, Wallington JC, Smith CG, *et al.* Multitissue transcriptomics delineates the diversity of airway T cell functions in asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58:261-270.
- [6] Martini D, Gallo A, Vella S, *et al.* Cystatin S-a candidate biomarker for severity of submandibular gland involvement in Sjögren's syndrome [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2017, 56:1031-1038.
- [7] Dou Y, Lv Y, Zhou X, *et al.* Antibody-sandwich ELISA analysis of a novel blood biomarker of CST4 in gastrointestinal cancers [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:1743-1756.
- [8] Wang S, Wang C, Liu O, *et al.* Prognostic value of immune-related cells and genes in the tumor microenvironment of ovarian cancer, especially CST4 [J]. *Life Sci*, 2021, 277:119461. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119461.
- [9] Johnstone CN, Pattison AD, Gorringer KL, *et al.* Functional and genomic characterisation of a xenograft model system for the study of metastasis in triple-negative breast cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11: dmm032250. doi: 10.1242/dmm.032250.
- [10] Blanco MA, LeRoy G, Khan Z, *et al.* Global secretome analysis identifies novel mediators of bone metastasis [J]. *Cell Res*, 2012, 22:1339-1355.
- [11] Vasiljeva O, Turk B. Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion [J]. *Biochimie*, 2008, 90:380-386.
- [12] Strojan P, Aničin A, Svetič B, *et al.* Proteolytic profile of cysteine proteases and inhibitors determines tumor cell phenotype in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Int J Biol Markers*, 2011, 26:247-254.