

CDK16 在食管鳞癌中的表达及其对肿瘤发生发展的影响

郑皓^{1a}, 景嘉楠^{1a}, 董慧^{1a}, 李铁鹏², 夏鑫^{1b}, 郭燕洁^{1c}, 董子明^{1a}

(1.郑州大学 a.基础医学院;b.公共卫生学院;c.临床医学系,郑州 450001;2.河南省肿瘤医院,郑州 450008)

摘要:目的 研究发现,细胞周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)家族成员与食管鳞癌发病密切相关,但细胞周期素依赖性激酶 16(CDK16)对食管鳞癌发病的影响尚不清楚.本研究旨在探讨 CDK16 在食管鳞癌组织中的表达及生物学意义.方法 应用组织芯片技术结合免疫组织化学技术检测 45 例食管鳞癌组织、45 例癌旁组织中 CDK16 蛋白的表达情况,并使用统计分析软件研究 CDK16 蛋白的表达与食管鳞癌临床病理特征之间的关系.结果 CDK16 在食管鳞癌组织中呈阳性表达,且表达强度与肿瘤分化程度呈负相关.另外,CDK16 在食管鳞癌细胞中的表达位置与肿瘤的分化程度紧密相关.CDK16 的表达与食管鳞癌的分化程度、淋巴结转移及 TNM 临床分期均具有显著的相关性($P < 0.05$),而与患者的年龄、性别以及肿瘤的部位、最大径、病理形态没有显著的相关性($P > 0.05$).结论 CDK16 在食管鳞癌中的高表达与食管鳞癌的发生发展及转移密切相关.检测 CDK16 的表达有助于食管鳞癌的临床诊断和预后评估.

关键词:细胞周期素依赖性激酶 16;组织芯片;免疫组织化学

中图分类号:R363

文献标志码:A

食管癌(Esophageal Cancer, EC)是我国的高发肿瘤,每年食管癌新发病例超过 22 万例,死亡超过 20 万例^[1].食管癌主要有食管鳞癌(Esophageal Squamous Cell Carcinoma, ESCC)和食管腺癌(Esophageal Adenocarcinoma, EAC)2 种.这 2 种食管癌的病因学和病理学特征有很大的不同.西方国家的食管癌以腺癌多发,而我国的食管癌则是以鳞癌为主^[2].

细胞周期紊乱与食管鳞癌的发生发展密切相关.细胞周期包括 G₁, S, G₂ 和 M 期.细胞周期由细胞周期素(Cyclins)、细胞周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)和细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白(cyclin dependent kinase inhibitor, CDKI)共同调节.细胞呈现自主且无节制的增殖,即细胞周期调节失控可以导致肿瘤的发生^[3].

研究发现,细胞周期素依赖性激酶(CDKs)家族成员中的 CDK4, CDK6, CDK7 及 CDK14 和食管鳞癌的发生发展密切相关,通过多个信号通路调控着肿瘤细胞的生长增殖、迁移侵袭、细胞周期以及细胞凋亡等^[4-7].

CDKs 家族中的另一个成员 CDK16 在多种肿瘤中均具有较强的表达,且在肿瘤的发生发展进程中发挥着重要作用,包括皮肤鳞状细胞癌、上皮性卵巢癌、髓母细胞瘤、非小细胞肺癌、黑色素瘤等^[8-12].但 CDK16 在食管癌中的表达情况尚不明晰,且 CDK16 与食管癌的关系目前也未见有相关报道.

组织芯片是将几十例至上百例的病例组织点按照一定的顺序排列且固定于一张切片上.在肿瘤研究中,使用这项技术能够同时检测某种蛋白在几十例至上百例的肿瘤组织样本中的表达情况.另外,所有的组织点均在一张切片上,实验一次性完成且实验条件一致,这样可以极大的降低实验误差,提高实验结果的准确性.

收稿日期:2018-05-03;修回日期:2018-12-10.

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(16A310004);郑州大学青年教师启动基金(1511328002);郑州大学国家级大学生创新创业训练计划项目(201510459071;201610459079).

作者简介:郑皓(1984-),男,河南郑州人,郑州大学讲师,博士,研究方向为食管鳞癌发病的分子机制, E-mail: zhenghao@zzu.edu.cn.

通信作者:董子明, E-mail: dongzm@zzu.edu.cn.

本研究利用组织芯片技术结合免疫组织化学技术研究 CDK16 在食管鳞癌中的表达,并对实验结果进行统计分析,以探究 CDK16 与食管鳞癌发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 芯片

本次研究中所使用的 2 张组织芯片均通过收集郑州大学附属肿瘤医院(河南省肿瘤医院)手术切除的食管鳞癌组织标本和癌旁组织标本制作而成。为了便于研究,分别将这 2 张组织芯片命名为 hESCC-TMA090 和 hESCC-TMA030。所有收集的组织标本均附有详细的临床病理资料。

组织芯片 hESCC-TMA090 上共有 90 个组织标本点,共包括 30 例原发食管鳞状细胞癌,癌/癌旁/远端各 1 点。30 例病例中,男性 23 例,女性 7 例。年龄:44 岁~74 岁, 57.47 ± 8.17 岁。分化程度:高分化 11 例,中分化 10 例,低分化 9 例。淋巴结转移情况:16 例有淋巴结转移,14 例无淋巴结转移。

组织芯片 hESCC-TMA030 上共有 30 个组织标本点,共包括 15 例原发食管鳞状细胞癌。每 1 例包括癌组织和癌旁组织各 1 点。15 例病例中,男性 14 例,女性 1 例。年龄:46 岁~71 岁, 56.93 ± 7.18 岁。分化程度:高分化 3 例,中分化 7 例,低分化 5 例。淋巴结转移情况:8 例有淋巴结转移,7 例无淋巴结转移。

2 张组织芯片中所涉及的所有患者在手术前均未进行过放疗或化疗。所有组织标本点均匀的排布于载玻片上,没有脱片,也没有明显的位移或扭曲。2 张组织芯片均经 HE 染色病理诊断证实,并附有 HE 染色结果。

1.1.2 试剂

兔抗人 CDK16 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。SP-9000 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司,包括封闭用山羊血清、生物素、标记二抗和辣根酶标记链霉卵白素。EnVision™ 试剂盒和 DAB 显色液均购自福州迈新生物技术公司,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化

在切片脱蜡水化后,使用 3% H_2O_2 封闭内源性的过氧化物酶 10 min。然后在 pH6.0~6.2 的 0.1% 枸橼酸缓冲液中进行微波修复 20 min。山羊血清封闭 15 min 后,滴加一抗,并放置于 4 °C 低温环境中过夜。第 2 天待切片恢复室温后,依次加入生物素化的二抗和辣根酶标记的链霉卵白素,分别放置于 37 °C 烤箱内孵育 30 min。然后使用 DAB 显色及苏木素复染,并进行梯度酒精脱水以及二甲苯透明,最后用中性树胶封片。

1.2.2 结果判定

由经验丰富的病理学专家于显微镜下阅片,并确定免疫组化结果。CDK16 蛋白的阳性染色以细胞浆或细胞核出现黄色或棕褐色为准。随机任选 10 个视野(400×),每个视野中约 100 个肿瘤细胞。结果判定采用半定量计分方法,即根据染色强度以及染色细胞所占比例这两者的乘积来判定。其中,染色强度以多数细胞的着色深浅来判定:不着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;染色细胞所占比例:阳性细胞 0~5% 为 0 分,阳性细胞占 5%~25% 为 1 分,阳性细胞占 25%~50% 为 2 分,阳性细胞占 50%~75% 为 3 分,阳性细胞 75%~1 为 4 分。2 项评分相乘即得到最终的分数:0 分为阴性,大于 0 分则为阳性,其中 1~3 分为弱阳性(+),4~8 分为中性(++),9~12 分为强阳性(+++)。

1.3 统计学分析

使用 SPSS22.0 统计分析软件进行数据统计分析。食管鳞癌的癌组织、癌旁组织中 CDK16 表达的差异以及 CDK16 的表达与食管鳞癌各项临床病理参数间关系的分析采用 Pearson 卡方检验或 Fisher's 确切概率法检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织芯片 HE 染色及 IHC 染色的有效性

组织芯片 hESCC-TMA090 上共有 90 个组织标本点,经 HE 染色后,残缺点数为 1,有效信息量为

98.9%;经免疫组化染色后,残缺点数为 2,有效信息量为 97.8%,见图 1.组织芯片 hESCC-TMA030 上共有 30 个组织标本点,经 HE 染色后,残缺点数为 0,有效信息量为 100%;经免疫组化染色后,残缺点数为 0,有效信息量为 100%,见图 1.

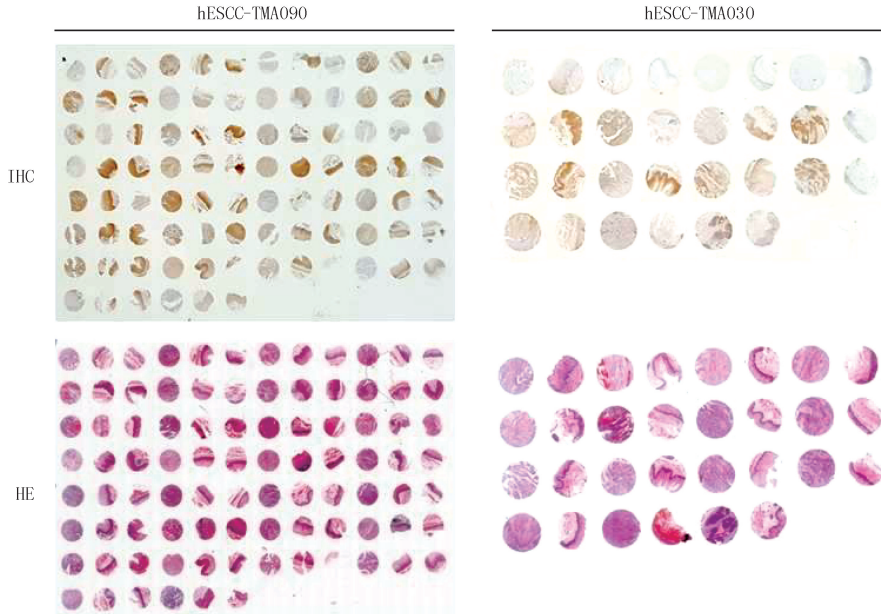


图 1 2 张组织芯片的免疫组化 (IHC) 及苏木精-伊红 (HE) 染色结果

Fig.1 Immunohistochemistry (IHC) and hematoxylin-eosin (HE) staining results of two tissue microarrays

2.2 CDK16 在食管鳞癌中的表达

本次研究中,45 例食管鳞癌病例,统计分析结果表明,CDK16 蛋白在食管鳞癌的癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 80%、28.9%,癌组织中 CDK16 的阳性表达率显著高于癌旁组织($P < 0.05$),见表 1.

CDK16 在高分化食管鳞癌组织中呈弱阳性

表达;在中分化食管鳞癌组织中呈现中阳性表达;而在低分化食管鳞癌组织中则为强阳性表达,见图 2.

2.3 CDK16 在食管鳞癌细胞中的定位

在食管鳞癌的癌旁组织中,CDK16 整体呈现阴性表达,但是其中可见零星几个细胞中的细胞核为阳性染色,见图 3A;在食管鳞癌的高分化癌组织中,CDK16 在细胞质和细胞核中均有表达,但细胞核中的表达强度远远高于细胞质中的表达强度,见图 3B;在食管鳞癌的中分化癌组织中,CDK16 在细胞质和细胞核中均有表达,且表达水平基本一致,见图 3C;在食管鳞癌的低分化癌组织中,CDK16 在细胞质和细胞核中均有表达,但在细胞质中的表达要远远强于在细胞核中的表达,见图 3D.

CDK16 在食管鳞癌的癌组织中呈现质核联合表达,但在不同分化程度的肿瘤细胞中的主要表达部位不同.根据 CDK16 的主要表达部位,可以将本研究中的 45 例食管鳞癌分为胞核表达组及胞质表达组.其中,CDK16 胞核表达 19 例,胞质表达 26 例.统计分析结果表明,CDK16 的主要表达部位与食管鳞癌的分化程度具有显著的相关性($P < 0.05$),见表 2.

2.4 CDK16 表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

根据 CDK16 的表达强弱,可以将本研究中的这 45 例食管鳞癌分为高表达组及低表达组.其中,CDK16 高表达 32 例,低表达 13 例.统计分析结果表明,CDK16 的表达与食管鳞癌的分化程度、淋巴结转移及 TNM 临床分期均有显著的相关性($P < 0.05$),但与患者的年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤最大径及病理形态都没有明显的相关性($P > 0.05$),见表 3.

表 1 CDK16 在食管鳞癌中的表达 (45 例)

Tab.1 Expression of CDK16 in ESCC (45 cases)

CDK16 表达	癌组织	癌旁组织	χ^2	P
阴性	9	32	23.69	< 0.001
阳性	36	13		

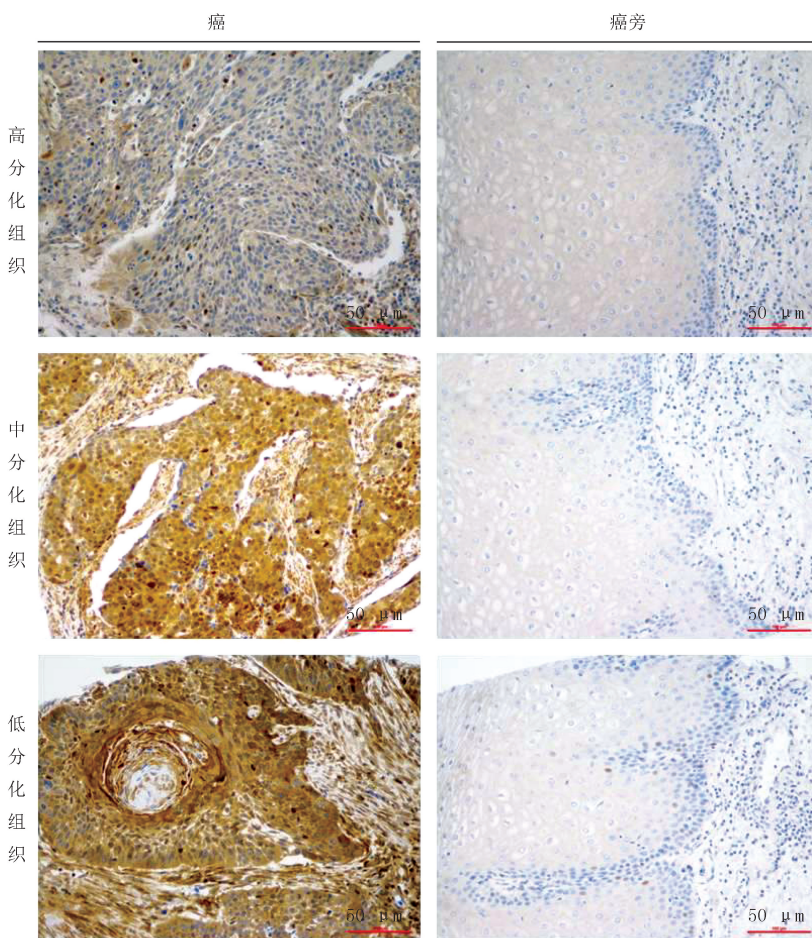


图 2 CDK16 在不同分化程度食管鳞癌中的表达 (原始放大倍数 200×)

Fig.2 Expression of CDK16 in ESCC of different degrees of differentiation(original magnification 200×)

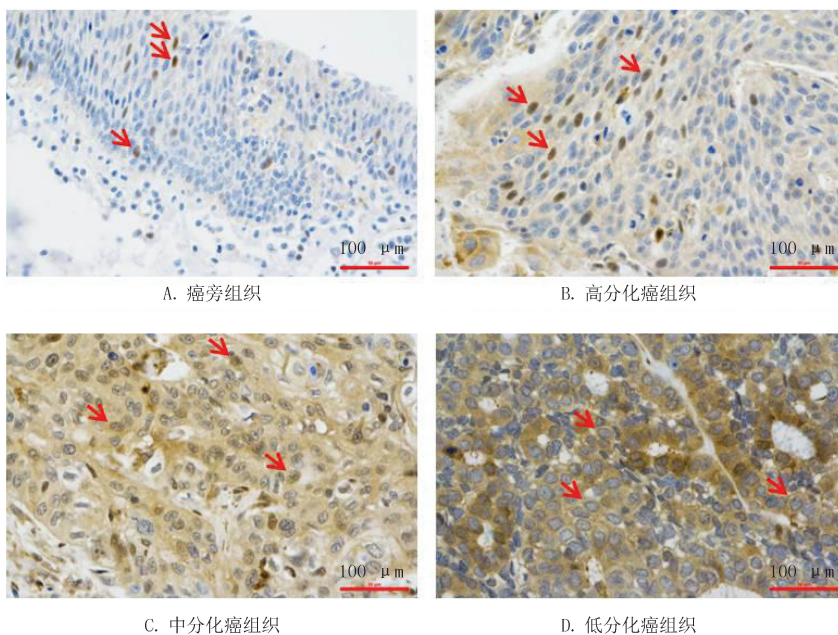


图 3 CDK16 在食管鳞癌细胞中的定位 (原始放大倍数 400×)

Fig.3 Localization of CDK16 in cells of ESCC(original magnification 400×)

表 2 CDK16 在食管鳞癌细胞中的主要表达部位与肿瘤分化程度的关系

Tab.2 The relationship between the major expression location of CDK16 in ESCC and the degree of tumor differentiation

临床病理参数	例数(共 45 例)	CDK16 的表达部位例数		χ^2	P
		胞核(共 19 例)	胞质(共 26 例)		
分化程度	高分化	14	10	9.38	0.009
	中分化	17	7		
	低分化	14	2		

表 3 45 例食管鳞癌组织中 CDK16 的表达与不同临床病理参数的关系

Tab.3 The relationship of the expression of CDK16 in 45 cases of esophageal squamous cell carcinoma and different clinicopathologic parameters

临床病理参数	例数(共 45 例)	CDK16 的表达例数		χ^2	P
		低(共 13 例)	高(共 32 例)		
性别	男	37	11	0.07 ^b	1.000
	女	8	2		
年龄	<60 岁	28	7	0.16 ^b	0.511
	≥60 岁	17	6		
肿瘤部位	食管上段	8	2	1.39 ^b	0.515
	食管中段	22	5		
	食管下段	15	6		
肿瘤最大径	<5 cm	31	9	0.00 ^b	1.000
	≥5 cm	14	4		
病理形态	髓质型	25	7	1.22 ^b	0.546
	蕈伞型	13	5		
	溃疡型	7	1		
分化程度	高分化	14	9	11.69 ^b	0.002 *
	中分化	17	3		
	低分化	14	1		
淋巴结转移	阴性	21	10	6.72 ^a	0.019 *
	阳性	24	3		
TNM 分期	I 期	13	8	10.19 ^b	0.011 *
	II 期	13	3		
	III 期	10	2		
	IV 期	9	0		

方法:^aPearson 卡方检验;^bFisher's 确切概率法检验

3 讨 论

细胞周期素依赖性激酶 16 (cyclin-dependent kinase 16, CDK16), 也被称为 PCTAIRE1 或 PCTK1, 属于 CDC2/CDKX 激酶家族相关的一个分支即 PCTAIRE 家族的一员^[13]. CDK16 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在精子发生及神经发育的过程中发挥着重要作用. 另外, CDK16 能够通过诱导成肌细胞迁移, 从而促进骨骼肌的发育^[14-16].

研究表明, CDK16 在多种肿瘤中都具有较高的表达, 且通过不同信号通路调控肿瘤细胞的生长增殖、迁

移侵袭、细胞周期及细胞凋亡等^[17-20]。但是 CDK16 在食管癌中的表达情况尚未见报道。本课题组一直重点关注蛋白激酶对消化系统肿瘤的影响,尤其是食管癌、胃癌等,所以本文对 CDK16 与食管癌之间的关系进行研究。

通过本研究发现 CDK16 在食管鳞癌中具有较强的表达,且表达强度与肿瘤分化程度呈负相关。统计分析结果表明,CDK16 的表达与肿瘤的分化程度、淋巴结转移及临床分期具有显著的相关性($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤最大径及肿瘤的病理形态均没有显著相关性($P > 0.05$)。其中,肿瘤的分化程度可反映肿瘤的恶性程度,而淋巴结转移及临床分期可反映肿瘤的转移及预后等。所以,这些结果提示 CDK16 可能影响着食管鳞癌的发生发展。

另外,本次研究还发现了一个有趣的现象:CDK16 在肿瘤细胞中的表达部位随着肿瘤细胞分化程度的降低,即随着肿瘤恶性程度的升高,会呈现出一种从胞核到胞质的改变。当然,该实验结果更多反映出的是大致的变化趋势。虽然在研究中也进行了相关的数据统计分析,但在这些统计分析结果中,CDK16 在胞核或胞质中的表达情况主要基于研究人员镜下阅片的经验,而并非出自仪器设备的精密分析。需要注意的是,CDK16 在食管鳞癌的癌细胞中,无论是高分化还是低分化肿瘤细胞中均呈质核联合表达,并不是“非质即核”。本次结果提示,CDK16 在食管鳞癌细胞中主要表达部位的改变,或许与肿瘤的恶性转变之间具有一定的关系。但对于 CDK16 在肿瘤细胞中,尤其是在食管鳞癌细胞中的表达定位,仍需要进行更深入研究。

本次研究,主要存在着实验方法单一、样本例数较少、病理资料不全(缺少生存期数据)等不足之处。本次研究所得出的实验结果尚需要更进一步的研究来加以证实。接下来,本课题组将重点研究 CDK16 对食管鳞癌的各项生物学特性的影响,包括生长增殖、迁移侵袭、细胞周期及细胞凋亡等。

本文初步揭示了 CDK16 可能为食管鳞癌发病的一个危险因子,CDK16 与食管鳞癌发生发展间具有一定的关系。检测 CDK16 的表达对食管鳞癌的临床诊断及预后评估都有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [2] Alsop B R, Sharma P. Esophageal Cancer[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2016, 45(3): 399-412.
- [3] Wiman K G, Zhivotovsky B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases[J]. J Intern Med, 2017, 281(5): 483-495.
- [4] Nikitakis N G, Drachenberg C B, Papadimitriou J C. MDM2 and CDK4 expression in carcinosarcoma of the esophagus: comparison with squamous cell carcinoma and review of the literature[J]. Exp Mol Pathol, 2002, 73(3): 198-208.
- [5] Baba Y, Watanabe M, Murata A, et al. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(5): 1114-1124.
- [6] Zhang J, Yang X, Wang Y, et al. Low expression of cyclinH and cyclin-dependent kinase 7 can decrease the proliferation of human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(7): 2028-2037.
- [7] Miyagaki H, Yamasaki M, Miyata H, et al. Overexpression of PFTK1 predicts resistance to chemotherapy in patients with oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2012, 106(5): 947-954.
- [8] Yanagi T, Hata H, Mizuno E, et al. PCTAIRE1/CDK16/PCTK1 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and regulates p27 stability and cell cycle[J]. J Dermatol Sci, 2017, 86(2): 149-157.
- [9] Zhou Q, Yu Y N. Upregulated CDK16 Expression in Serous Epithelial Ovarian Cancer Cells[J]. Med Sci Monit, 2015, 21(1): 3409-3414.
- [10] Paulina C, Zaira L, Fabiana S, et al. RNA interference screening identifies a novel role for PCTK1/CDK16 in medulloblastoma with c-Myc amplification[J]. Oncotarget, 2015, 6(1): 116-129.
- [11] Wang H, Liu H, Min S, et al. CDK16 overexpressed in non-small cell lung cancer and regulates cancer cell growth and apoptosis via a p27-dependent mechanism[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 399-405.
- [12] Yanagi T, Reed J C, Matsuzawa S. PCTAIRE1 regulates p27 stability, apoptosis and tumor growth in malignant melanoma[J]. Oncoscience, 2014, 1(10): 624-633.
- [13] Meyerson M, Enders G H, Wu C L, et al. A family of human cdc2-related protein kinases[J]. EMBO J, 1992, 11(8): 2909-2917.
- [14] Zi Z, Zhang Z, Li Q, et al. CCNYL1, but Not CCNY, Cooperates with CDK16 to Regulate Spermatogenesis in Mouse[J]. PLoS Genet, 2015, 11(8): 1-22.
- [15] Mikolcevic P, Sigl R, Rauch V, et al. Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(4): 868-879.

- [16] Shimizu K,Uematsu A,Imai Y,et al.Pctaire1/Cdk16 promotes skeletal myogenesis by inducing myoblast migration and fusion[J].FEBS Lett,2014,588(17):3030-3037.
- [17] Yanagi T,Shi R X,Aza-Blanc P,et al.PCTAIRE1-knockdown sensitizes cancer cells to TNF family cytokines[J].PLoS One,2015,10(3):1-19.
- [18] Yanagi T,Krajewska M,Matsuzawa S,et al.PCTAIRE1 phosphorylates p27 and regulates mitosis in cancer cells[J].Cancer Res,2014,74(20):5795-5807.
- [19] Xie J,Li Y,Jiang K,et al.CDK16 Phosphorylates and Degrades p53 to Promote Radioresistance and Predicts Prognosis in Lung Cancer [J].Theranostics,2018,8(3):650-662.
- [20] Wang Y,Qin X,Guo T,et al.Up-regulation of CDK16 by multiple mechanisms in hepatocellular carcinoma promotes tumor progression [J].J Exp Clin Cancer Res,2017,36(1):97.

Expression of CDK16 in esophageal squamous cell carcinoma and its effect for the tumorigenesis and development of tumor

Zheng Hao^{1a},Jing Jianan^{1a},Dong Hui^{1a},Li Tiepeng²,Xia Xin^{1b},Guo Yanjie^{1c},Dong Ziming^{1a}

(1a.School of Basic Medical Sciences;b.College of Public Health;c.Department of Clinical Medicine, Zhengzhou University,Zhengzhou,450001; 2.Henan Cancer Hospital,Zhengzhou 450008,China)

Abstract:Aims Studies found that members of cyclin dependent kinase (CDKs) family were closely related to esophageal squamous cell carcinoma,but cyclin dependent kinase 16 (CDK16) on incidence of esophageal squamous cell carcinoma was not clear.The aim of this study is to investigate the expression and biological significance of CDK16 in esophageal squamous cell carcinoma.**Methods** The expression of CDK16 was detected in tumor tissue microarrays of 45 cases of esophageal squamous cell carcinoma tissues,45 cases of paraneoplastic tissues by immunohistochemical method.The relationship between the expression of CDK16 and the clinicopathological features of esophageal squamous cell carcinoma was analysed by using mathematical statistical analysis software.**Results** The expression of CDK16 was positive in esophageal squamous cell carcinoma,and the expression intensity was negatively correlated with the degree of tumor differentiation.In addition,the location of CDK16 in esophageal squamous cell carcinoma cells is closely related to the degree of tumor differentiation.The expression of CDK16 was significantly correlated with the degree of tumor differentiation,lymph node metastasis and TNM clinical stage of ESCC ($P < 0.05$),but not with age,sex,tumor location,maximum diameter and pathological morphology ($P > 0.05$).**Conclusion** The high expression of CDK16 in esophageal squamous cell carcinoma is closely related to the occurrence and development of esophageal squamous cell carcinoma.Detection of CDK16 expression is helpful to the clinical diagnosis and prognosis assessment of esophageal squamous cell carcinoma.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma;cyclin dependent kinase 16;tissue microarray;immunohistochemistry

[责任编辑 杨浦]