

SAMHD1 蛋白在食管癌中的表达特点及其临床意义

黄云龙, 张仁泉, 姚 龙, 宁光耀

摘要 目的 探讨食管鳞癌组织中 SAMHD1 蛋白的表达水平及其临床意义。方法 用免疫组化方法检测 204 例食管鳞癌组织 SAMHD1 蛋白表达情况, 分析其与食管鳞癌患者性别、年龄、临床病理特征以及患者生存预后之间的关系。结果 SAMHD1 主要在食管鳞癌细胞的细胞质或细胞核中表达。SAMHD1 的表达在患者的年龄、性别、肿瘤分期(T、N、TNM 分期)及上纵膈淋巴结的转移间差异无统计学意义。但在大尺寸肿瘤中, SAMHD1 低表达更为显著($P=0.013$)。肿瘤分化程度越差, SAMHD1 表达可能越低($P=0.001$)。有腹腔淋巴结转移的食管癌病例中 SAMHD1 的表达更低($P=0.044$)。与高表达 SAMHD1 组相比, 低表达 SAMHD1 组的累积生存率和无疾病进展生存率更低($P<0.05$)。结论 SAMHD1 在食管鳞状细胞癌中呈低表达, 其表达水平越低, 患者的生存预后越差。

关键词 SAMHD1; 食管鳞状细胞癌; 生存预后

中图分类号 R 655.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)06-0952-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.022

食管癌是一种高病死率和预后差的恶性肿瘤^[1], 总体 5 年生存率低于 13%^[2-3], 究其原因, 一方面由于肿瘤侵袭和转移导致复发和预后不良, 另一方面因食管癌临床诊断时常偏晚期。尽管已有广泛报道在食管癌中有多个基因突变^[4-5], 但仍不全面了解其发生发展的分子机制。最近, 一种新的细胞内抗病毒因子, 由真核生物 SAMHD1 基因编码的全称为不育- α -基序结构域(SAM 域)和组氨酸/天冬氨酸残基双联体结构域(HD 域)包涵蛋白 1 的蛋白^[6], 在癌症中的差异表达被越来越多的人所关注。已有研究^[7-11]表明 SAMHD1 在慢性淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、肝癌、肺癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤等癌症中的降低。该研究通过免疫组化的方法检测食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中 SAMHD1 的表达水平, 分析 SAM-

HD1 表达与 ESCC 临床病理参数及患者生存预后之间的关系, 为 ESCC 的诊治及预后评估提供新思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 标本源于安徽医科大学第一附属医院 2009 年 1 月—2013 年 12 月期间收治的 204 名食管鳞状细胞癌患者, 统计其详细的术后临床病理资料且根据 UICC/AJCC 第 8 版食管癌 TNM 分期标准进行严格术后病理分期, 并跟踪随访生存预后情况。所有患者均未接受任何术前放化疗, 并且他们都接受了微创食管癌切除手术。

1.2 试剂 SAMHD1 的小鼠抗人单克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。免疫组化试剂盒(SP-9001)购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.3 免疫组化 使用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP)检测实验标本中 SAMHD1 表达。将样本固定在 4% 中性多聚甲醛中, 常规包埋在石蜡中, 连续切成 4 μm 切片, 并使用 HE 方法常规染色以进一步确认病理诊断。然后进行免疫组织化学染色。将石蜡切片用二甲苯脱蜡, 用梯度乙醇水合, 浸入 3% H_2O_2 溶液, 并在室温下用灭活内源性过氧化物酶温育 10 min。使用 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液($\text{pH} = 6.0$, 95 ~ 100 $^\circ\text{C}$ 20 min)在加热的水浴中修复抗原。在室温冷却后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤样品, 加入小鼠抗人 SAMHD1 单克隆抗体, 然后在 37 $^\circ\text{C}$ 恒温下持续培养 2 h。然后将它们用 PBS 漂洗 3 次(每次 5 min), 加入生物素标记的第二抗体, 在室温下孵育 30 min, 再次用 PBS 洗涤 3 次(每次 5 min)。使用 DAB 作为显色剂, 用蒸馏水冲洗样品, 用苏木精染色, 用乙醇和二甲苯脱水, 用中性胶密封。选择阳性表达 SAMHD1 的多形性胶质母细胞瘤标本作为阳性对照, 用 PBS 替换一抗后获得阴性对照。

1.4 评估标准 SAMHD1 表达在细胞质或细胞核上显示为黄色或棕色染色为阳性, 并且在细胞质或细胞核中为黄色或棕色颗粒。在高倍视野($\times 400$)下观察, 每个切片检查随机 5 个恶性细胞区域, 基于阳性染色细胞的数量和颜色深度, 使用半定量评分

2021-03-19 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目(编号: KJ2019ZD22)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普胸外科, 合肥 230022

作者简介: 黄云龙, 男, 硕士研究生;

张仁泉, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: elvady2012@126.com

确定结果: 阳性细胞百分比 $\leq 5\%$ 为0分, $6\% \sim 25\%$ 为1分, $26\% \sim 50\%$ 为2分, $51\% \sim 75\%$ 为3分, $> 75\%$ 为4分。关注阳性细胞的颜色深度, 基本上没有着色为0点, 浅黄色为1点, 浅棕色为2点, 深棕色为3点。在将2个得分相乘后得到分数进行判别: 0~2分为阴性结果, 3~4分为弱阳性, 5~8分为中度阳性, 9~12分为强阳性; 将阴性和弱阳性定义为低表达, 中等阳性和强阳性定义为高表达。见图1。

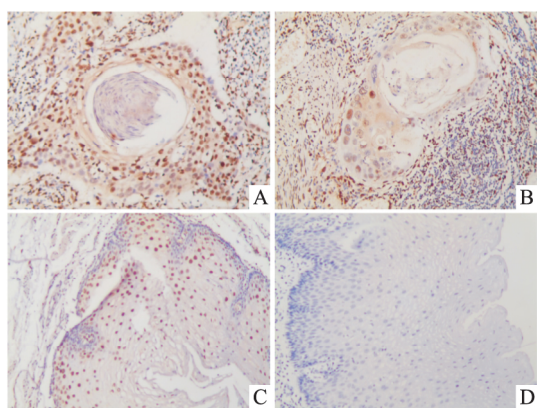


图1 ESCC组织中SAMHD1免疫组织化学染色表达 SP $\times 400$
A: 强阳性; B: 中度阳性; C: 弱阳性; D: 阴性

1.5 统计学处理 应用SPSS 20.0软件进行统计分析, 用 χ^2 检验比较在不同组之间SAMHD1表达与临床病理参数的相关性。采用Kaplan-Meier法绘制累积生存率曲线和无进展生存率曲线, 计算累积生存率及无进展生存率, Log-rank检验进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAMHD1在ESCC中的表达情况 SAMHD1主要在ESCC细胞的细胞质或细胞核中表达, 204例ESCC组织中SAMHD1免疫组织化学染色表达水平, 119例高表达, 强阳性有59例(图1A), 中度阳性有60例(图1B); 85例低表达, 弱阳性有33例(图1C), 阴性有52例(图1D)。

2.2 SAMHD1表达与食管癌临床病理特征的关系

SAMHD1的表达在患者的年龄、性别、肿瘤(T、N、TNM)分期、上纵膈淋巴结的转移间差异无统计学意义。与肿瘤长径 < 4 cm的相比, 肿瘤长径 ≥ 4 cm的病例中, SAMHD1低表达更为显著($P = 0.013$), 且肿瘤分化程度越差, SAMHD1表达越低($P = 0.001$), 有腹腔淋巴结转移的食管癌病例中SAM-

HD1的表达更低($P = 0.044$)。见表1。

表1 SAMHD1在ESCC组织中的表达与临床病理特征的关系

临床病理参数	SAMHD1		χ^2 值	P值
	低表达($n=85$)	高表达($n=119$)		
性别(男/女)	66/19	97/22	0.461	0.497
年龄(岁, $< 60/\geq 60$)	26/59	43/76	0.681	0.409
肿瘤长径(cm, $< 4/\geq 4$)	38/47	74/45	6.118	0.013
T分期(1/2/3/4)	18/19/45/3	28/26/62/3	0.306	0.955
N分期(0/1/2/3)	43/25/12/5	75/30/10/4	3.866	0.276
M分期(0/1)	76/9	115/4	4.340	0.037
TNM分期(I/II/III/IV)	15/31/33/6	26/50/37/6	2.026	0.573
上纵膈淋巴结(0/1)	60/25	96/23	2.802	0.131
腹腔淋巴结(0/1)	67/18	107/12	4.864	0.044

2.3 SAMHD1表达与食管癌患者预后的关系

2.3.1 SAMHD1在ESCC中的表达对累积生存率和无疾病进展生存率的影响 与高表达SAMHD1组相比, 低表达SAMHD1组的累积生存率更低(图2A), 差异有统计学意义($P = 0.044$); 与高表达SAMHD1组相比, 低表达SAMHD1组的无进展生存率更低(图2B), 差异有统计学意义($P = 0.011$)。

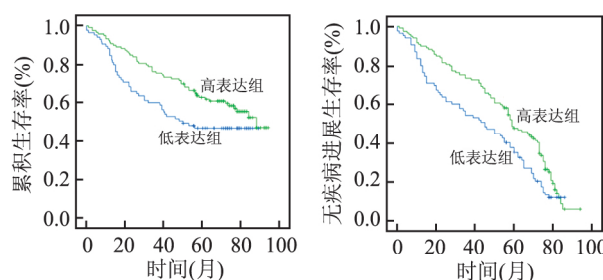


图2 SAMHD1在ESCC中的表达对累积生存率和无疾病进展生存率的影响

2.3.2 204例患者临床特征影响累积生存率和无疾病进展生存率的单因素分析 累积生存率和无疾病进展生存率的单因素分析如表2所示: 肿瘤大小、T分期、N分期、TNM分期、上纵膈淋巴结转移、腹腔淋巴结转移、SAMHD1表达影响累积生存率($P < 0.05$), 而肿瘤大小、分化程度、T分期、N分期、TNM分期、上纵膈淋巴结转移、腹腔淋巴结转移、SAMHD1表达影响无疾病进展生存率($P < 0.05$)。

2.3.3 患者临床特征影响累积生存率和无疾病进展生存率的多因素分析 累积生存率和无疾病进展生存率的多因素分析结果见表3: 腹腔淋巴结转移是影响累积生存率的危险因素($P < 0.05$), 分化程度、T分期、转移、腹腔淋巴结转移、SAMHD1表达是影响无疾病进展生存率的危险因素($P < 0.05$)。

表2 204名患者临床特征影响累积生存率和无进展生存率的单因素分析

一般资料	无进展率单因素分析			累积生存率单因素分析		
	HR(95% CI)	χ^2 值	P 值	HR(95% CI)	χ^2 值	P 值
性别(男/女)	1.094(0.750~1.595)	0.218	0.641	1.246(0.738~2.104)	0.680	0.410
年龄(≥ 60 岁)	1.161(0.839~1.607)	0.810	0.368	1.148(0.749~1.760)	0.404	0.525
肿瘤长径(≥ 4 cm)	1.521(1.120~2.066)	7.324	0.007	1.683(1.128~2.510)	6.552	0.011
T分期(3/4)	1.868(1.363~2.560)	15.591	<0.001	1.914(1.256~2.915)	9.462	0.003
N分期(1/2/3)	2.302(1.689~3.137)	29.318	<0.001	2.334(1.559~3.495)	17.950	<0.001
M分期(1)	3.328(1.814~6.107)	16.961	<0.001	2.632(1.316~5.261)	8.092	0.006
TNM分期(Ⅲ/Ⅳ)	2.445(1.792~3.335)	33.828	<0.001	2.469(1.651~3.693)	20.673	<0.001
上纵隔淋巴结(1)	1.816(1.293~2.551)	12.186	0.001	2.002(1.314~3.050)	10.856	0.001
腹腔淋巴结(1)	3.135(2.079~4.727)	32.999	<0.001	2.822(1.745~4.563)	19.549	<0.001
SAMHD1高表达	0.676(0.497~0.920)	6.293	0.013	0.665(0.445~0.992)	4.050	0.044

表3 204名患者临床特征影响累积生存率和无进展生存率的多因素分析

一般资料	无进展生存率			累积生存率		
	HR(95% CI)	χ^2 值	P 值	HR(95% CI)	χ^2 值	P 值
肿瘤长径(≥ 4 cm)	1.058(0.762~1.469)	0.113	0.737	1.244(0.813~1.904)	1.013	0.314
T分期(3/4)	1.616(1.144~2.283)	7.420	0.006	1.513(0.957~2.392)	3.138	0.076
N分期(1/3)	0.913(0.310~2.686)	0.027	0.869	0.910(0.247~3.356)	0.020	0.887
M分期(1)	1.796(0.920~3.508)	2.943	0.086	1.364(0.627~2.971)	0.612	0.434
TNM分期(Ⅲ/Ⅳ)	1.647(0.575~4.714)	0.865	0.352	1.560(0.437~5.571)	0.468	0.494
上纵隔淋巴结(1)	1.058(0.670~1.668)	0.058	0.810	1.346(0.714~2.174)	0.597	0.440
腹腔淋巴结(1)	1.820(1.123~2.950)	5.908	0.015	1.827(1.026~3.255)	4.187	0.041
SAMHD1高表达	0.663(0.455~0.881)	7.340	0.007	0.750(0.492~1.144)	1.784	0.182

3 讨论

临床资料^[12]表明,ESCC患者术后5年生存率远高于未行手术切除的。然而,由于早期ESCC没有明显的症状且临床缺乏其早期诊断检测方法,大多数ESCC患者被诊断时为晚期,并且失去了手术最佳治疗窗口。当前,传统的肿瘤标志物,如CEA和细胞角蛋白19片段,被用于诊断和评估ESCC进展^[13-14]。但是,CEA和Cyfra 21-1检测的敏感性和有效性不足以进行早期ESCC检测。因此,迫切需要能够早期ESCC检测的改良生物标记。

SAMHD1在细胞中的生理功能是通过其dNTP酶活性维持细胞内dNTP的体内平衡。dNTPs由核糖核苷酸还原酶(RNR)合成并由SAMHD1水解。Franzolin et al^[15]发现SAMHD1在细胞静止期中表达最高,在培养人体细胞中于细胞周期的S期表达最低。且外,在增殖细胞中SAMHD1的下调抑制了细胞周期进程和dNTP库的调节,这表明SAMHD1是DNA前体库的重要调节因子。因此,推测SAMHD1的下调或功能障碍可导致异常的dNTP池和异常细胞周期,可以诱发癌细胞的产生。SAMHD1在几种癌症中的突变或下调,与本研究食管鳞状细胞癌中的低表达结果相吻合。以上结果表明SAM-

HD1可能是一种潜在肿瘤抑制因子^[11]。此外,与参与细胞周期负调控的*Rb*、*p53*、*CDKN2A*等抑癌基因和负调控转录因子的*WT*、*DCC*等基因相似,SAMHD1作为肿瘤抑制基因,参与肿瘤发生发展,并且如上述研究结果表明,SAMHD1与食管鳞状细胞癌的临床病理学特征具有相关性,SAMHD1低表达的食管鳞癌患者中,其临床病理中肿瘤直径大、肿瘤分化程度差且腹腔淋巴结阳性转移率也高,均预示着肿瘤远期预后较差,且通过单因素与多因素分析结果判断,食管鳞状细胞癌中SAMHD1的表达与患者预后具有相关性,即SAMHD1越低表达,食管鳞状细胞癌患者的生存预后越差。

总之,SAMHD1在ESCC组织中的表达明显低于配对的正常组织,并与腹腔区域淋巴转移、TNM分期和肿瘤组织学分化程度相关。较低SAMHD1表达的ESCC患者中,术后生存率及无进展生存率亦较低。因此,SAMHD1可作为预测ESCC肿瘤进展和预后的分子标记物。同时,设想通过一定的方式恢复SAMHD1在癌细胞中的表达,甚至有所提高,也可以成为癌症治疗的一个手段。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics

- 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin* ,2018 ,68 (6) : 394 – 424.
- [2] Yuequan J ,Shifeng C ,Bing Z ,et al. Prognostic factors and family history for survival of esophageal squamous cell carcinoma patients after surgery [J]. *Ann Thorac Surg* ,2010 ,90(3) : 908 – 13.
- [3] Ruan H ,Xiang Y ,Ko J ,et al. Comprehensive characterization of 87 circular RNAs in ~ 1000 human cancer cell lines [J]. *Genome Med* ,2019 ,11(1) : 55.
- [4] 钟磊,彭倩. 食管鳞癌 HDAC1 表达及其与临床病理参数的相关性 [J]. *安徽医科大学学报* 2019 ,54(4) : 158 – 60.
- [5] Song Y ,Li L ,Ou Y ,et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer [J]. *Nature* 2014. 509(7498) : 91 – 5.
- [6] Coquel F ,Silva M J ,Técher H ,et al. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction [J]. *Nature* ,2018 ,557(7703) : 57 – 61.
- [7] Rossi D. SAMHD1: a new gene for CLL [J]. *Blood* 2014 ,123 (7) : 951 – 2.
- [8] Rentoft M ,Lindell K ,Tran P ,et al. Heterozygous colon cancer-associated mutations of SAMHD1 have functional significance. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2016 ,113(17) : 4723 – 8.
- [9] Shi Y ,Lv G ,Chu Z ,et al. Identification of natural splice variants of SAMHD1 in virus-infected HCC [J]. *Oncol Rep* 2014 ,31(2) : 687 – 92.
- [10] de Silva S ,Wang F ,Hake T S ,et al. Downregulation of SAMHD1 expression correlates with promoter DNA methylation in secondary syndrome patients [J]. *J Invest Dermatol* ,2014 ,134(2) : 562 – 5.
- [11] Wang J ,Lu F ,Shen X ,et al. SAMHD1 is down regulated in lung cancer by methylation and inhibits tumor cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2014 ,455(3-4) : 229 – 33.
- [12] Mariette C ,Finzi L ,Fabre S ,et al. Factors predictive of complete resection of operable esophageal cancer: a prospective study [J]. *Ann Thorac Surg* ,2003 ,75(6) : 1720 – 6.
- [13] Kosugi S I ,Nishimaki T ,Kanda T ,et al. Clinical significance of serum carcinoembryonic antigen , carbohydrate antigen 19-9 , and squamous cell carcinoma antigen levels in esophageal cancer patients [J]. *World J Surg* ,2004 ,28(7) : 680 – 5.
- [14] Zhang H ,Li H ,Ma Q ,et al. Predicting malignant transformation of esophageal squamous cell lesions by combined biomarkers in an endoscopic screening program [J]. *World J Gastroenterol* 2016 ,22 (39) : 8770 – 8.
- [15] Franzolin E ,Pontarin G ,Rampazzo C ,et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ,110(35) : 14272 – 7.

Expression characteristics and its clinical significance of SAMHD1 protein in esophageal cancer

Huang Yunlong ,Zhang Renquan ,Yao Long ,et al

(Dept of General Thoracic Surgery ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract *Objective* To investigate the expression level and clinical significance of SAMHD1 protein in esophageal squamous cell carcinoma tissue. *Methods* Immunohistochemically staining was used to detect SAMHD1 protein expression in 204 cases of esophageal squamous cell carcinoma tissues. Then we analyzed the relationship between it and the gender , age , clinic pathological characteristics of patients with esophageal squamous cell carcinoma and the five-year survival prognosis of patients. *Results* SAMHD1 was mainly expressed in the cytoplasm or nucleus of esophageal squamous cell carcinoma cells. The positive rate of SAMHD1 expression was not correlated with the patient's age , gender , tumor T , N , TNM stage , and upper mediastinal lymph node metastasis. However , in large tumors , the low expression of SAMHD1 was more significant ($P=0.013$) . The poorer the degree of tumor differentiation , the lower the expression of SAMHD1 ($P=0.001$) . The expression of SAMHD1 was lower in cases of esophageal cancer with abdominal lymph node metastasis ($P=0.044$) . Compared with the high expression SAMHD1 group , the low expression SAMHD1 group had lower cumulative survival (rate) and disease-free survival (rate) ($P<0.05$) . *Conclusion* SAMHD1 is lowly expressed in esophageal squamous cell carcinoma , the lower the expression level , the worse the prognosis survival.

Key words SAMHD1; esophageal squamous cell carcinoma; survival prognosis