

宫颈癌患者 Kruppel 样因子 6, p21 蛋白表达水平与病理特征及化疗敏感性的相关性分析

徐晓锋^a, 王 纯^b, 卢国丰^a, 孟亚萍^a, 周勤芬^a, 胡明珠^a, 石 琴^a

(上海健康医学院附属嘉定区中心医院 a. 妇产科; b. 病理科, 上海 201800)

摘要:目的 探讨宫颈癌患者 Kruppel 样因子 6 (KLF6), p21 蛋白表达水平与病理特征及化疗敏感性的相关性。方法 回顾性分析 2016 年 1 月~2018 年 12 月接受化疗的 40 例宫颈癌患者, 化疗结束后根据化疗效果将患者分为化疗敏感组 (CR+PR)、化疗抵抗组 (SD+PD)。采用免疫组化检测宫颈癌组织 KLF6, p21 蛋白的表达, 分析其与临床病理特征、化疗敏感性及总生存期 (OS) 的关系。结果 宫颈癌中 KLF6, p21 蛋白阳性率与病理分期、肿瘤直径、分化类型及化疗敏感性相关 ($\chi^2=2.14\sim5.74$, 均 $P<0.05$)。KLF6+/p21- 者 ORR 为 85.71%, 显著高于非 KLF6+/p21- 者 42.11% ($\chi^2=8.33$, $P<0.05$)。宫颈癌患者的中位 OS 为 11.20 个月 (95%CI: 9.73~12.71), 其中 KLF6 阳性者中位 OS 为 11.90 个月 (95%CI: 10.81~12.99), 显著高于阴性表达者 9.20 个月 (95%CI: 9.05~9.35); p21 蛋白阳性者中位 OS 为 9.14 个月 (95%CI: 8.26~10.22), 显著低于 p21 阴性表达者 11.62 个月 (95%CI: 9.63~13.58) ($\chi^2=11.50$, 6.23, 均 $P<0.05$)。结论 宫颈癌患者 KLF6, p21 表达水平与其临床病理特征相关。KLF6 高表达、p21 低表达者化疗敏感性高, 且预后更好, 可作为预后、个体化治疗方案选择的评价指标。

关键词: 宫颈癌; Kruppel 样因子 6; p21 蛋白; 病理特征; 化疗敏感性; 相关性

中图分类号: R737.33; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-012-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.004

Correlation Analysis of KLF6 and p21 Protein Expression Levels and Pathological Features and Chemotherapy Sensitivity in Patients with Cervical Cancer

XU Xiao-feng^a, WANG Chun^b, LU Guo-feng^a, MENG Ya-ping^a, ZHOU Qin-fen^a, HU Ming-zhu^a, SHI Qin^a

(a. Department of Obstetrics and Gynecology; b. Department of Pathology, Jiading Central Hospital Affiliated to Shanghai Health Medical College, Shanghai 201800, China)

Abstract: Objective To explore the correlation analysis of Kruppel like factor 6 (KLF6) and p21 protein expression levels and pathological features and chemotherapy sensitivity in patients with cervical cancer. **Methods** Retrospective analysis was performed on 40 patients with cervical cancer who received chemotherapy from January 2016 to December 2018. After chemotherapy, the patients were divided into chemotherapy sensitive group (CR+PR) and chemotherapy resistance group (SD+PD) according to the effect of chemotherapy. The expression of KLF6 and p21 protein in cervical cancer tissues was detected by immunohistochemistry, and its correlation with clinicopathological features, sensitivity to chemotherapy and overall survival (OS) was analyzed. **Results** The positive rates of KLF6 and p21 proteins in advanced cervical cancer were correlated with pathological stage, tumor diameter, differentiation type and chemotherapy sensitivity ($\chi^2=2.14\sim5.74$, all $P<0.05$). The ORR of KLF6+/p21- was 85.71%, significantly higher than that of non-KLF6+/p21- (42.11%) ($\chi^2=8.33$, $P<0.05$). The median OS of patients with cervical cancer was 11.20 months (95% CI: 9.73~12.71), among which the median OS of KLF6-positive patients was 11.90 months (95%CI: 10.81~12.99), which was significantly higher than that of those with negative expression 9.20 (95%CI: 9.05~9.35). The median OS of p21 protein positive expression was 9.14 months (95%CI: 8.26~10.22), which was significantly lower than that of p21 protein negative expression 11.62 months (95%CI: 9.63~13.58) ($\chi^2=11.50$, 6.23, all $P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of KLF6 and p21 protein in patients with cervical cancer were correlated with their clinicopathological characteristics. Those with high expression of KLF6 and low expression of p21 protein had higher sensitivity to chemotherapy and better prognosis, which can be used as evaluation indexes for prognosis and individualized treatment option.

基金项目: 上海市嘉定区中心医院中青年骨干培养基金 (ZQN2017011)。

作者简介: 徐晓锋 (1984-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤微创治疗, E-mail: xiaoxfeng999@sina.com。

通讯作者: 石琴, 主任医师, E-mail: shiqin0901@126.com。

Keywords: cervical cancer; Kruppel like factor 6; p21 protein; pathological features; chemotherapy sensitivity; correlation

近年来, 宫颈癌的治疗取得明显突破, 但宫颈癌患者的复发率、死亡率仍然居高不下。手术后同步化疗是宫颈癌患者首选的治疗方案, 但由于个体的化疗敏感性差异, 部分患者未能从化疗中获益, 治疗难度大^[1]。寻找一种科学、可行的途径筛选化疗敏感患者增强化疗疗效, 改善预后一直是宫颈癌治疗领域的研究热点^[2-3]。Kruppel样因子6(KLF6), p21蛋白均为抑癌基因, 研究认为其与细胞增殖、分化及血管生成等调控过程密切相关, 同时参与多种恶性肿瘤的发生、发展, 但国内关于二者表达水平与宫颈癌患者化疗敏感性的关系及作用机制研究仍鲜有报道, 具有较大研究价值^[4-5]。本研究拟采用免疫组化染色法检测宫颈癌患者KLF6, p21蛋白的表达, 探讨其对化疗敏感性的评估价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 回顾性分析2016年1月~2018年12月我院妇科收治的40例宫颈癌患者。入组标准: ①均经影像学检查及组织病理确诊, 且临床资料完整; ②临床分期为II~IV期, 均接受同步化疗, 预计存活期超过3个月; ③排除化疗药物过敏、并发化疗禁忌症、精神障碍、严重心肝肾功能障碍者。年龄42~74(56.22±5.19)岁; 病理类型: 鳞癌14例, 腺癌26例; 低分化者13例, 中分化者19例, 高分化者8例。

1.2 仪器与试剂 鼠抗人KLF6多克隆抗体、鼠抗人p21单克隆抗体(美国Santa Cruz公司)。

1.3 方法

1.3.1 化疗方法: 所有患者均接受TC化疗方案: 卡铂(山东齐鲁药业, 批准文号: 国药准字H10920028)按照曲线下面积(AUC)=5计算剂量后静脉滴注, d1; 紫杉醇(意大利百时美施贵宝公司, 批准文号: 国药准字H20020582)175 mg/m²静脉滴注, d1; 3周为1个疗程, 共3个疗程。

1.3.2 观察指标

1.3.2.1 KLF6, p21蛋白表达: 测定所有宫颈癌组织标本均以甲醛固定, 石蜡包埋、切片、烤片、脱蜡、染色。采用免疫组化Envision二步法检测, KLF6, p21蛋白分别采用鼠抗人KLF6多克隆抗体、鼠抗人p21单克隆抗体, 工作浓度分别为1:300, 1:100。阳性对照采用已知标准片, 阴性对照采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。

1.3.2.2 免疫组化结果判定: 将染色强度分为4个等级, 其中无染色为0分, 浅黄色为1分, 黄褐色为2分, 棕褐色为3分; 高倍光镜下观察染色的阳性细胞范围, 百分比≤5%为0分, 6%~25%为1分, 26%~50%为2分, ≥51%为3分。根据染色强度、

阳性细胞比例二者得分乘积计算阳性强度: 0~1分为阴性(-), 2~3分为弱阳性(+), 4~6分为中阳性(++), >6分为强阳性(+++)。

1.3.3 化疗敏感性评估: 以化疗效果为基础, 参照1.1版实体瘤疗效评价标准^[6]评估化疗敏感性。完全缓解(CR): 原发肿瘤病灶完全消失; 部分缓解(PR): 原发肿瘤病灶最大径及其最大垂直径的乘积下降超过50%, 且维持4周以上; 病变稳定(SD): 原发肿瘤病灶两径乘积下降25%~50%, 未见新发病灶, 且维持4周以上; 病变进展(PD): 原发肿瘤病灶两径乘积增加超过25%, 或可见新发病灶。其中, CR, PR纳入化疗敏感组[即客观缓解率(ORR)=(CR+PR)/总病例数×100%], SD, PD纳入化疗抵抗组。

1.3.4 随访: 化疗后通过电话、门诊复查或入户等形式进行随访, 了解患者病情进展情况及死亡的具体死因。总生存期(OS)是指从初次治疗至死亡或随访截止之间的时间, 随访截止时间为2020年3月。

1.4 统计学分析 采用SPSS 18.0版统计软件包, 计数资料以阳性率(%)表示, 比较采用 χ^2 检验; 采用Kaplan-Meier生存分析法分析KLF6, p21蛋白表达与OS的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌患者KLF6, p21蛋白阳性表达与临床病理特征的相关性 见表1。宫颈癌中KLF6, p21蛋白阳性率与病理分期、肿瘤直径、分化类型及化疗敏感性相关, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$), 而与年龄无显著相关性($P>0.05$)。

2.2 KLF6, p21联合检测与宫颈癌化疗敏感性关系 KLF6+/p21-者ORR(CR+PR)为85.71%(18/21), SD+PD为14.29(3/21), 显著高于非KLF6+/p21-者42.11%(8/19), SD+PD为57.89%(11/19), 差异有统计学意义($\chi^2=8.33$, $P<0.05$)。

2.3 宫颈癌KLF6, p21蛋白阳性表达与OS的相关性 见图1, 图2。Kaplan-Meier法显示, 宫颈癌患者的中位OS为11.20个月(95%CI: 9.73~12.71), 其中KLF6阳性者中位OS为11.90个月(95%CI: 10.81~12.99), KLF6阴性表达者中位OS为9.20个月(95%CI: 9.05~9.35)。p21蛋白阳性者中位OS为9.14个月(95%CI: 8.26~10.22), p21蛋白阴性表达者中位OS为11.62个月(95%CI: 9.63~13.58)。经log-rank检验, KLF6阳性者的中位OS显著高于阴性表达者, 而p21蛋白阳性者的中位OS显著低于阴性表达者, 差异均有统计学意义($\chi^2=11.50$, 6.23, 均 $P<0.05$)。

表1 宫颈癌患者 KLF6, p21 蛋白阳性表达与临床病理特征的相关性

临床参数		n	KLF6 阳性表达		χ^2	P	p21 阳性表达		χ^2	P
			n	阳性率 (%)			n	阳性率 (%)		
年龄 (岁)	≥ 50	22	13	59.09	0.05	0.822	14	63.64	0.03	0.870
	< 50	18	10	55.56			11	61.11		
分化类型	低分化	13	5	38.46	2.14	0.033	11	84.62	2.21	0.027
	中分化	19	11	57.89			11	57.89		
	高分化	8	7	87.50			3	37.50		
病理分期	II 期	8	7	87.50	2.92	0.001	3	37.50	2.17	0.030
	III 期	10	8	80.00			5	50.00		
	IV 期	22	8	36.36			17	77.27		
肿瘤直径 (cm)	≥ 3	23	10	43.48	4.35	0.037	18	78.26	5.74	0.017
	< 3	17	13	76.47			7	41.18		
化疗敏感性	敏感组	26	18	69.23	4.18	0.041	13	50.00	4.95	0.026
	抵抗组	14	5	35.71			12	85.71		

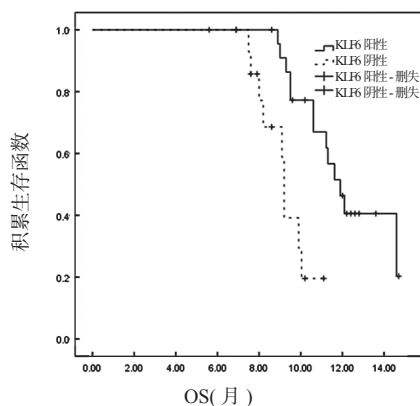


图1 宫颈癌患者 KLF6 蛋白表达水平与 OS 的关系

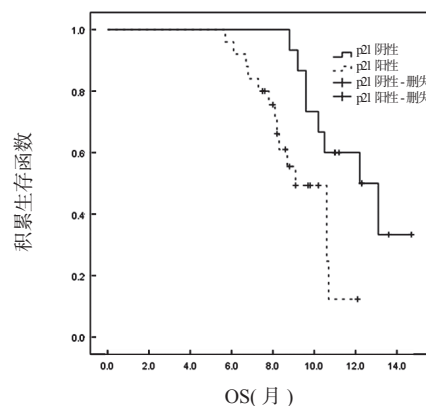


图2 宫颈癌患者 p21 蛋白表达水平与 OS 的关系

3 讨论

近年来,宫颈癌的发病率不断升高,且发病年龄也趋于年轻化,其原因尚不完全清楚,研究认为可能与基因的缺失或异常表达有关^[7]。TC 方案是宫颈癌患者常用的化疗方式,主要通过结合细胞 DNA 形成稳定加合物导致 DNA 损伤,阻断肿瘤细胞恶性增殖。NCCN 指南推荐将以顺铂为基础的每周化疗方案用于复发或转移性宫颈癌一线治疗,可将此类患者 5 年无复发生存率提高 20%^[8]。但由于个体差异性,部分患者对化疗药物的敏感性较低,经足量化疗后肿瘤消退仍不令人满意,且往往预后不佳。

KLF6 基因是普遍表达的锌指转录因子 9,研究显示其对心肺等组织器官生长发育、血管生成具

有诱导作用,还可通过蛋白酶依赖途径、Rb 通路以及多种基因启动子结合的方式调节细胞凋亡、增殖及分化等过程^[9]。ZHANG 等^[10]研究表明,KLF6 基因在肾细胞癌、肺癌等多种恶性肿瘤中的突变和向下调节作用,与浸润深度、分化程度及同步化疗敏感性有关。p21 蛋白作为一种细胞周期依赖激酶(CDK)抑制物,通过 CDK 抑制细胞分裂,阻断细胞周期从 G 期向 S 期的过渡,从而抑制细胞生长。研究发现,p21 可调节细胞周期与 DNA 复制、修复之间的关系,与恶性肿瘤缓解率、治疗效果有关,并可作为判断预后的重要指标^[11]。本研究结果显示,宫颈癌中 KLF6, p21 蛋白阳性率与病理分期、肿瘤直径、分化类型及化疗敏感性相关($P < 0.05$),KLF6 高表达、p21 蛋白低表达者化疗敏感性更高,

与 WANG 等^[12] 研究结果相符。有研究认为, p21 是 KLF6 的直接靶基因, KLF6 通过非 p53 依赖通路上调 p21, 促进 CDK 对细胞周期的阻滞作用, 从而抑制细胞增殖^[13-14]。

进一步分析发现, KLF6+/p21- 者 ORR 为 85.71%, 显著高于非 KLF6+/p21- 者的 42.11% ($P<0.05$), 表明 KLF6 高表达且 p21 蛋白低表达者化疗敏感性最高, 二者联合检测可作为宫颈癌患者化疗敏感性的预测指标。生存分析显示, 宫颈癌患者的中位 OS 为 11.20 个月 (95%CI: 9.73~12.71), 其中 KLF6 阳性表达、p21 蛋白阴性表达者中位 OS 显著高于 KLF6 阴性表达、p21 蛋白阳性表达者 ($P<0.05$), 表明 KLF6, p21 蛋白表达水平均可作为宫颈癌的独立预后因素, 与车亚等^[15] 研究结果基本一致。由此可见, 检测 KLF6, p21 表达有助于筛查完全宫颈癌化疗敏感患者, 同时可用于化疗的近远期疗效预测, 从而优化治疗方案, 进一步提高治疗效果。

综上所述, 宫颈癌患者 KLF6, p21 蛋白表达水平与其临床病理特征相关, KLF6 高表达、p21 蛋白低表达者化疗敏感性高, 且预后更好, 可作为预后、个体化治疗方案选择的评价指标。

参考文献:

- [1] DITTO A, BOGANI G, LEONE ROBERTI MAGGIORE U, et al. Oncologic effectiveness of nerve-sparing radical hysterectomy in cervical cancer[J]. Journal of Gynecologic Oncology, 2018, 29(3): e41.
- [2] 周静, 李智, 周玉, 等. 宫颈癌组织中 Ep-CAM 和 Ki67 的表达及临床意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 24-27.
ZHOU Jing, LI Zhi, ZHOU Yu, et al. Expression and clinical value of Ep-CAM and Ki67 in the cervical carcinoma tissue[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(6): 24-27.
- [3] SAMAR K, JEAN-PIERRE M, SOPHIE R, et al. Use of metabolic parameters as prognostic factors during concomitant chemoradiotherapy for locally advanced cervical cancer[J]. American Journal of Clinical Oncology, 2017, 40(3): 250-255.
- [4] LI Fei, ZHANG Qianyun, GONG Yange, et al. The lncKLF6/KLF6 feedback loop regulates the growth of non-small cell lung cancer[J]. American Journal of Cancer Research, 2018, 8(8): 1427-1439.
- [5] LIN Chikang, LIU Shuting, CHANG Chengchang, et al. Regulatory mechanisms of fluvastatin and lovastatin for the p21 induction in human cervical cancer HeLa cells[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0214408.
- [6] EISENHAUER E A, THERASSE P, BOGAERTS J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. European Journal of Cancer, 2009, 45(2): 228-247.
- [7] KAWAI S, OKADA R. Interstitial cell infiltrate and myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy: a special type of cardiomegaly corresponding to sequelae of myocarditis[J]. Heart and Vessels, 1990, 5(4): 230-236.
- [8] 刘健, 刘静, 李胜泽, 等. 抑制热休克蛋白 70 表达可增强宫颈癌细胞对顺铂化疗的敏感性 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37 (4): 475-481.
LIU Jian, LIU Jing, LI Shengze, et al. Inhibiting HSP70 expression enhances cisplatin sensitivity of cervical cancer cell[J]. Journal of Southern Medical University, 2017, 37(4): 475-481.
- [9] GUO F F, JIANG M M, HONG L L, et al. Long non-coding RNA OR3A4 promotes metastasis of ovarian cancer via inhibiting KLF6[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(6): 2360-2365.
- [10] ZHANG Xu, GAO Yu, LI Hongzhao, et al. KLF6 suppresses metastasis of clear cell renal cell carcinoma via transcriptional repression of E2F1[J]. Cancer Res, 2016, 77(2): 330-342.
- [11] NAG D, BHANJA P, RIHA R, et al. Auranofin protects intestine against radiation injury by modulating p53/p21 pathway and Radiosensitizes human colon tumor[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(15): 4791-4807.
- [12] WANG Kai, HUYNH N, WANG Xiao, et al. Inhibition of p21 activated kinase enhances tumour immune response and sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine[J]. International Journal of Oncology, 2018, 52(1): 261-269.
- [13] BAHARUDDIN P, SATAR N, FAKIRUDDIN K S, et al. Curcumin improves the efficacy of cisplatin by targeting cancer stem-like cells through p21 and cyclin D1-mediated tumour cell inhibition in non-small cell lung cancer cell lines[J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 13-25.
- [14] VACANTE F, SENESI P, MONTESANO A, et al. Metformin counteracts HCC progression and metastasis enhancing KLF6/p21 expression and downregulating the IGF axis[J]. International Journal of Endocrinology, 2019, 2019(23): 7570146.
- [15] 车亚, 郭峰, 任英红, 等. KLF6、p21 表达与中晚期宫颈癌同步放化疗敏感性的关系 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(8): 1346-1350.
CHE Ya, GUO Feng, REN Yinghong, et al. Relationships between KLF6 and p21 expressions and concurrent chemoradiotherapy sensitivity in middle and late stage cervical cancer[J]. Journal of Modern Oncology, 2020, 28(8): 1346-1350.

收稿日期: 2020-07-14

修回日期: 2020-08-19