

食管鳞状细胞癌患者循环肿瘤细胞中细胞分裂周期 20 基因表达的临床意义分析

李 硕¹, 范志刚¹, 穆旭东²

1. 三二〇一医院肿瘤内一科, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省肿瘤医院微创介入科, 陕西 西安 710000

【摘要】 目的 探讨食管鳞状细胞癌患者循环肿瘤细胞(CTCs)中细胞分裂周期 20(CDC20)基因表达的临床意义。方法 2020 年 4 月至 2022 年 10 月在三二〇一医院接受治疗的组织病理学诊断为 ESCC 患者 72 例。收集治疗前外周血样本, 进行 CTCs 分离和计数, 分析 CTCs 中 CDC20 mRNA 表达, 记录患者生存情况, 随访截止日期为 2023 年 8 月。结果 72 例食管鳞状细胞癌患者 CTCs 中 CDC20 mRNA 水平为 2.76(1.41, 6.39)。将患者分为 CDC20 mRNA 高表达组和低表达组, 与 CDC20 低表达组比较, 高表达组肿瘤浸润深度 T3/4、TNM 分期 III/IV 的例数和 CTCs 计数较高($P < 0.05$)。相关性分析显示, CTCs 计数和 CDC20 表达呈显著正相关性($P < 0.001$)。在随访期间, 低表达组和高表达组分别死亡 9 例、18 例。Kaplan-Meier 曲线显示, CDC20 高表达组患者的存活率显著低于 CDC20 低表达组($P < 0.05$)。多变量 Cox 模型分析显示年龄、CTCs 计数、淋巴结转移和 CDC20 水平是总生存率的独立预测因子($P < 0.05$)。结论 食管鳞状细胞癌患者 CTCs 中 CDC20 高表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、CTCs 计数和不良生存结果显著相关, CTCs 中 CDC20 可能是判断食管鳞状细胞癌患者预后有价值的指标。

【关键词】 食管鳞状细胞癌; 循环肿瘤细胞; 细胞分裂周期 20; 预后

【中图分类号】 R735.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-6170(2024)05-0080-04

Analysis of the clinical significance of expressions of cell division cycle 20 gene in circulating tumor cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma LI Shuo¹, FAN Zhi-gang¹, MU Xu-dong² 1. Ward 1, Department of Oncology, The 3201 Hospital, Hanzhong 723000, China; 2. Department of Minimally Invasive Intervention, Shaanxi Provincial Cancer Hospital, Xi'an 710000, China

【Corresponding author】 FAN Zhi-gang

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of expressions of cell division cycle 20 (CDC20) gene in circulating tumor cells (CTCs) of patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** From April, 2020 to October, 2022, 72 patients with ESCC diagnosed by pathology and treated in our hospital were selected. Peripheral blood samples were collected before any treatment, and CTCs in the samples were separated and counted. The expressions of CDC20 mRNA in CTCs were analyzed by RT-qPCR. The patient's survival was recorded. The deadline for follow-up was August 2023. **Results** The median level (Q1, Q3) of CTCs 20 mRNA in the 72 patients with ESCC was 2.76 (1.41, 6.39). The patients were divided into a low expression group and a high expression group according to the expressions of CDC20. Compared with the low expression group, the tumor infiltration depth was T3/4 and the number of TNM stage III/IV cases and CTCs count in the high expression group were higher ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that there was a significant positive correlation between CTCs counts and CDC20 expressions ($P < 0.001$). During the follow-up period, 9 patients died in the low expression group and 18 patients died in the high expression group. Kaplan-Meier curve showed that the survival rate of the high expression group was significantly lower than that of the low expression group ($P < 0.05$). Multivariate Cox model analysis showed that age, CTCs count, lymph node metastasis, and CDC20 level were independent predictors of overall survival ($P < 0.05$). **Conclusions** The high expression of CDC20 in CTCs of ESCC patients is significantly correlated with tumor invasion depth, lymphatic metastasis, CTCs count, and poor survival outcome. Therefore, CDC20 in CTCs may be a useful index for the prognosis of ESCC patients.

【Key words】 Esophageal squamous cell carcinoma; Circulating tumor cells; Cell division cycle 20; Prognosis

尽管发展了综合治疗策略, 食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者的总体存活率仍然很低^[1], 迫切需要进一步研究确定预后标记物和潜在的药物靶点, 以提供更好的预后和个体化治疗。细胞分裂周期 20 (cell division cycle 20, CDC20) 是一种重要的纺锤体装配检查点蛋白, 由 499 个氨基酸组成, 具有用于蛋白质结合的 C-末

端 WD40 结构域, 作为识别后期促进因子复合体(anaphasepromoting complex, APC) 亚单位的底物^[2]。除了调节细胞周期外, 最近的证据表明 CDC20 在致癌和癌症进展中也起着重要作用, 并可能成为一个有希望的治疗靶点^[3]。一些微阵列研究已经报告了 CDC20 在各种肿瘤中过表达, 如口腔肿瘤、胃肿瘤、胰管肿瘤、膀胱肿瘤和卵巢肿瘤^[4]。此外, 包括 CDC20 在内的一些特定基因可以预测卵巢癌、肝癌的不良预后^[5,6]。然而, 目前关于 CDC20 在 ESCC 中的作用十分有限。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是癌症预后中有价值

【基金项目】 陕西省科技计划项目(编号:KGF2021043)

【通讯作者】 范志刚

的一个指标,因为它们很容易获得,可能较少受到肿瘤异质性的损害,同时可以保持癌症特异性并反映肿瘤的时间演变^[7]。本研究旨在分析 ESCC 患者 CTCs 中 CDC20 基因表达的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2020 年 4 月至 2022 年 10 月三二〇一医院接受治疗的 72 例组织病理学诊断为 ESCC 患者。纳入标准:①年龄 18~85 岁;②无其他恶性肿瘤病史;③无急性感染或自身免疫性疾病。排除标准:患者临床资料不完整。男性 65 例(90.3%),年龄为(70.4±8.8)岁,吸烟 58 例(80.6%)和饮酒 63 例(87.5%)。肿瘤浸润深度:T1 期 29 例(40.3%)、T2 期 10 例(13.9%)、T3 期 26 例(36.1%)、T4 期 7 例(9.7%)。30 例(41.7%)患者淋巴结转移,和 3 例(4.2%)远处转移。TNM 分期:I 期 25 例(34.7%)、II 期 20 例(27.8%)、III 期 22 例(30.6%)、IV 期 5 例(6.9%)。CTCs 计数为(13.81±2.34)。根据美国癌症联合委员会 TNM 食管癌分期标准(第 8 版)对分期进行评估^[8]。所有参与者都提供了知情同意书。本研究获得了医院伦理委员会的批准(编号:H-1804-005)。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 收集病史、体格检查、全血细胞计数检测、血液化学、内镜超声检查以及使用胸部和腹部计算机断层扫描(CT)和/或正电子发射断层扫描(PET-CT)进行肿瘤分期的成像等数据。出院后通过门诊或电话随访患者,随访截止日期为 2023 年 8 月。患者的生存期定义为从手术到死亡或最后一次随访的持续时间。

1.2.2 CTCs 的分离 收集治疗前外周血样本。进行 CTCs 分离和计数^[9]。将外周血或奇静脉血样(7.5 ml)收集在 STRECK 试管中,保存于 4℃ 环境下,并在 72 h 内进行 CTCs 计数处理。红细胞裂解后,用 CTChip® FR1 微流控芯片(ClearCell® FX1 System,新加坡 Biolidics 公司)和免疫荧光计数富集较大的 CTCs,并通过离心力按大小从较小的白细胞中分离。用结合了 pan-CK/EpCAM/MUC1-Alexa488 抗体(pan Keratin C11,美国 Cell Signaling 公司;pan Cytokeratin AE1/AE3,美国 eBioscience 公司;EpCAM VU1D9,美国 Cell Signaling 公司;USA CD227/Mucin1 SM3,美国 eBioscience 公司)鉴定 CTCs。根

据美国食品药品监督管理局批准的定义,CTCs 应对上皮细胞粘附分子(EpCAM)、黏蛋白 1(MUC1)和 A.53B/A2 鉴定的细胞角蛋白(CK)和核染色 DAPI 呈阳性,对白细胞标志物 CD45 呈阴性。染色 DAPI +/CD45-(pan-CK/EpCAM/MUC1)+的细胞被认为是 CTCs。CTCs 计数报告每 7.5 ml 血液中的数量。

1.2.3 RNA 提取和 RT-qPCR 分析 CTCs 中 CDC20 mRNA 表达 收集 CTCs,并使用 Arcturus PicoPure RNA 提取缓冲液(美国 Life Technologies 公司)在 4℃ 下裂解捕获的细胞持续 30 min,提取总 RNA 样本,储存在-80℃,制备 cDNA。使用 Ambion 试剂盒(美国 Life Technologies 公司)从总 RNA 样品合成 cDNA,然后使用 KOD SYBR qPCR Mix(日本 Toyobo Life Science 公司)进行 qPCR 分析。热循环条件:98℃ 2 min 循环 1 次,98℃ 10 s 和 61℃ 30 s 的循环 40 次。使用 2- $\Delta\Delta C_q$ 评估 CDC20 的 mRNA 表达水平,GAPDH 用作内部参考基因。所用的引物序列如下: CDC20 正向,5'-GCAGACATTCCACG-CATCA-3'和反向,5'-CATCCAGGCACTCAGACAG-3';以及 GAPDH 正向,5'-GAGTCACTGGCGTCTT-CAC-3'和反向,5'-TGCTGATGATCTTGAGGCTTT-3'。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 26.0 软件分析数据。使正态分布数据表示为平均值±标准差。组间比较使用独立样本 *t* 检验。 χ^2 检验或 Fisher 精确概率检验用于评估 CTCs 中 CDC20 表达水平与临床病理肿瘤因素之间的相关性。使用 Kaplan - Meier 方法计算生存率。基于 Cox 比例风险回归进行单变量和多变量分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC 患者 CTCs 中 CDC20 mRNA 水平

72 例 ESCC 患者 CTCs 中 CDC20 mRNA 中位水平为 2.76(1.41, 6.39)。

2.2 不同 CDC20 mRNA 水平临床病理特征比较

将患者样本按 CDC20 mRNA 表达水平的中位数(2.76)进行划分,分为高表达组和低表达组。与低表达组比较,高表达组肿瘤浸润深度 T3/4、TNM 分期 III/IV 的例数和 CTCs 计数显著增加($P < 0.05$)。见表 1。相关性分析显示,CTCs 计数和 CDC20 表达呈显著正相关性($\gamma = 0.45, P < 0.001$),见图 1。

表 1 ESCC 患者 CTCs 中不同 CDC20 mRNA 水平临床病理特征的比较

特征	<i>n</i>	高表达(<i>n</i> =36)	低表达(<i>n</i> =36)	统计量	<i>P</i>
性别 [<i>n</i> (%)]	男性	65	32 (44.4)	$\chi^2 = 0.158$	0.691
	女性	7	4 (5.6)		

特征		n	高表达(n=36)	低表达(n=36)	统计量	P
年龄[n(%)]	<65岁	14	6(8.3)	8(11.1)	$\chi^2=0.355$	0.551
	≥65岁	58	30(41.7)	28(38.9)		
肿瘤浸润深度[n(%)]	T1~2	39	15(20.8)	24(33.3)	$\chi^2=4.531$	0.033
	T3~4	33	21(29.2)	12(16.7)		
淋巴结转移[n(%)]	阴性	42	17(23.6)	25(35.7)	$\chi^2=3.657$	0.056
	阳性	30	19(26.4)	11(35.7)		
远处转移[n(%)]	阴性	69	33(45.8)	36(50.0)	$\chi^2=3.130$	0.077
	阳性	3	3(4.2)	0(0.0)		
TNM分期[n(%)]	I+II	45	16(22.2)	29(40.3)	$\chi^2=10.015$	0.001
	III+IV	27	20(27.8)	7(9.7)		
CTCs计数(个)			15.58±2.24	9.87±1.74	$t=2.261$	0.047

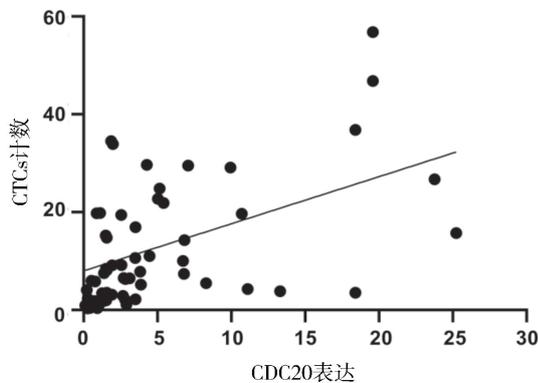


图1 ESCC患者CTCs计数和CDC20表达之间的关系

2.3 不同CDC20 mRNA水平的总生存率比较

CTCs中CDC20表达的预后效应 在随访期间,低表达组有9例患者死亡和高表达组有18例患者死亡。Kaplan-Meier曲线显示,CDC20高表达组的患

者的生存率显著低于CDC20低表达组的患者($\chi^2=5.867, P<0.05$)。见图2。

2.4 CDC20诊断ESCC预后的价值分析 多变量Cox模型分析显示年龄、CTCs计数、淋巴结转移和CDC20水平是总生存率的独立预测因子($P<0.05$)。见表2。

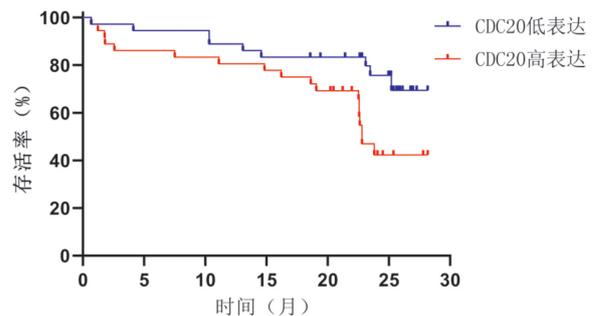


图2 ESCC患者CTCs中CDC20高表达和低表达的总生存率的Kaplan-Meier生存曲线

表2 ESCC患者总生存率的多变量Cox回归分析

危险因素	B	SE	Wald χ^2	P	OR	95% CI
年龄(<65 vs. ≥65)	0.004	0.001	39.486	0.018	1.682	1.095~2.586
淋巴结转移(阴性 vs. 阳性)	~0.019	0.007	7.477	0.011	2.252	1.206~4.208
CTCs计数	~0.110	0.041	7.217	0.032	2.083	1.084~4.033
CDC20表达(高 vs. 低)	1.506	0.418	12.983	<0.001	2.208	1.417~3.440

3 讨论

ESCC是我国常见的恶性肿瘤,约占全球所有新发ESCC病例和死亡病例的一半^[1]。尽管在ESCC的手术切除、放疗、化疗和免疫治疗方面取得了相当大的进展,但这些治疗方案对局部晚期ESCC的临床疗效仍然不令人满意^[10]。因此,迫切需要探索有效的生物标志物来更好地预测ESCC患者的预后。

CTCs来自从原发肿瘤中逃逸出来的肿瘤细胞,

然后在血管系统中循环,并外渗到远处的器官中形成转移瘤^[7]。最近,CTCs报道为癌症早期诊断和治疗效果及预后预测的有前景的生物标志物^[11]。还有研究报道了CTCs在食管癌症中的临床意义;CTCs与较高的T分期、淋巴结转移和食管癌进展有关,并可能作为肿瘤侵袭和转移的启动子^[12]。此外,CTCs还可用于局部晚期食管鳞状细胞癌治疗结果的系列监测^[9]。然而,目前公布的CTC检测的最佳阳性标准仍存在争议(每7.5 ml血液至少有1、2

或 5 个 CTC), 并且 CTC 检测也有不同的方法, 可以分为依赖于上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的方法 (如 CellSearch 系统) 和不依赖于 EpCAM 的方法 (配体靶向聚合酶链式反应、CytteI、按上皮肿瘤细胞大小分离 (ISET) 和基于端粒酶的方法)^[13]。本研究采用美国食品药品监督管理局推荐的依赖 EpCAM 的 CellSearch 系统检测 CTCs, 并发现 CTCs 计数可作为 ESCC 患者总生存率的独立预测因子。这些发现为 CTCs 在 ESCC 的诊断、监测和预后价值方面提供了重要证据。

目前, 关于 CTCs 如何外渗到远处的器官中并形成转移瘤的机制仍不清楚。CDC20 是一种对染色体分离和有丝分裂退出至关重要的蛋白, 它可以通过靶向包含破坏盒 (D-box) 的关键底物进行破坏来调节细胞周期进程^[14]。最近研究表明, 由 CDC20 调节的信号转导复合物与癌症的发展和进展有关^[15]。此外, CDC20 在许多类型的癌症中上调, 包括卵巢癌、肝癌和食管鳞状癌, 并介导细胞周期调节和有丝分裂 DNA 凝聚, 其高表达对肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力有积极影响^[16,17]。本研究中, 我们发现 CTCs 中 CDC20 高表达与肿瘤浸润深度 T3/4、TNM 分期 III/IV 和 CTCs 计数密切相关, 表明 CDC20 可能参与 CTCs 的远处转移机制。重要的是, CTCs 中 CDC20 高表达的 ESCC 患者表现出比 CDC20 低表达患者明显更短的生存时间, 并且 CDC20 高表达可作为 ESCC 患者总生存率的独立预测因子。我们的结果支持 Yang 等^[18] 利用生物信息学分析证实 CDC20 是 ESCC 潜在核心基因的结论。这些结果表明, CTCs 中 CDC20 可能在 ESCC 的肿瘤转移和进展中发挥重要作用。

总之, 本研究表明, ESCC 患者 CTCs 中 CDC20 高表达与肿瘤浸润深度、淋巴转移、CTCs 计数和不良生存结果显著相关。因此, CTCs 中 CDC20 可能是 ESCC 患者预后的有用指标。由于本研究是一项单中心回顾性研究, 仍需要在多中心、前瞻性研究中得到验证。另外本研究病例数较少, 且没有阐明 CDC20 表达状态与化疗敏感性的关系及其机制, 需要进一步的研究来确定 CDC20 在促进 ESCC 相关 CTCs 的生物学功能及其潜在的调控机制。

【参考文献】

[1] Morgan E, Soerjomataram I, Rungay H, et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: new estimates from GLOBOCAN 2020[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(3): 649-658.

[2] Zhang Q, Huang H, Liu A, et al. Cell division cycle 20 (CDC20)

drives prostate cancer progression via stabilization of β -catenin in cancer stem-like cells[J]. *EBioMedicine*, 2019, 42: 397-407.

[3] Song C, Lowe V J, Lee S B. Inhibition of Cdc20 suppresses the metastasis in triple negative breast cancer (TNBC) [J]. *Breast Cancer*, 2021, 28(5): 1073-1086.

[4] Jeong SM, Bui QT, Kwak M, et al. Targeting Cdc20 for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(6): 188824.

[5] Xi X, Cao T, Qian Y, et al. CDC20 is a novel biomarker for improved clinical predictions in epithelial ovarian cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(7): 3303-3317.

[6] Xiong C, Wang Z, Wang G, et al. Identification of CDC20 as an immune infiltration-correlated prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Investigational New Drugs*, 2021, 39(5): 1439-1453.

[7] Yang YP, Giret TM, Cote RJ. Circulating tumor cells from enumeration to analysis: Current challenges and future opportunities [J]. *Cancers*, 2021, 13(11): 2723.

[8] Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(2): 93-99.

[9] Ko JMY, Lam KO, Kwong DLW, et al. Circulating Tumor Cell Enumeration for Serial Monitoring of Treatment Outcomes for Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. *Cancers*, 2023, 15(3): 832.

[10] Chen B, Deng M, Yang C, et al. High incidence of esophageal fistula on patients with clinical T4b esophageal squamous cell carcinoma who received chemoradiotherapy: A retrospective analysis [J]. *Radiother Oncol*, 2021, 158: 191-199.

[11] Farshchi F, Hasanzadeh M. Microfluidic biosensing of circulating tumor cells (CTCs): Recent progress and challenges in efficient diagnosis of cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111153.

[12] Lee HJ, Kim GH, Park SJ, et al. Clinical significance of TWIST-positive circulating tumor cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gut liver*, 2021, 15(4): 553-561.

[13] Shi Y, Ge X, Ju M, et al. Circulating tumor cells in esophageal squamous cell carcinoma-mini review [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 8355-8365.

[14] Li F, Liu C S, Wu P, et al. CCT4 suppression inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma by interacting with Cdc20 [J]. *Chin Med J*, 2021, 134(22): 2721-2729.

[15] Chen Y, Yang P, Wang J, et al. p53 directly downregulates the expression of CDC20 to exert anti-tumor activity in mantle cell lymphoma[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2023, 12(1): 28.

[16] Zhao S, Zhang Y, Lu X, et al. CDC20 regulates the cell proliferation and radiosensitivity of P53 mutant HCC cells through the Bel-2/Bax pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(13): 3608-3621.

[17] Xi X, Cao T, Qian Y, et al. CDC20 is a novel biomarker for improved clinical predictions in epithelial ovarian cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(7): 3303-3317.

[18] Yang X, Tian M, Zhang W, et al. Identification of potential core genes in esophageal carcinoma using bioinformatics analysis [J]. *Medicine*, 2021, 100(27): e26428.

(收稿日期:2023-12-13;修回日期:2024-04-16)

(本文编辑:侯晓林)