

## 基于 CD133 及上皮-间质转化相关因子的 列线图模型对上皮性卵巢癌预后的预测价值

张娟娟,张春莲,张志军,王超云

作者单位:十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)生殖医学中心,湖北 十堰 442000

通信作者:张春莲,女,主任医师,研究方向为卵巢癌发病机制与临床治疗,E-mail:zha5s6@126.com

**摘要:**目的 构建预测上皮性卵巢癌(EOC)预后的列线图模型,验证其应用价值。方法 对2009年1月至2012年1月十堰市太和医院152例经手术病理确诊的初治EOC病人进行术后持续随访。检测其病理标本中CD133、Snail、E-cadherin蛋白表达情况,统计病人一般资料及临床病理资料,通过Cox风险比例模型确定病人累积生存率的影响因素,应用R语言建立基于上述因素的列线图模型,并验证其应用价值。结果 152份病理标本中,CD133阳性表达87例,占57.24%,E-cadherin阳性表达50例,占32.89%,Snail阳性表达89例,占58.55%。CD133、Snail阳性者及E-cadherin阴性者,累积生存时间明显短于对应对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CD133阳性、伴腹部脏器或淋巴结转移是病人预后的危险因素,E-cadherin阳性是病人预后的保护因素( $P < 0.05$ )。经R语言建立列线图模型及校准曲线,校准图形接近于斜率为1的直线,列线图模型的内部一致性参数C-index = 0.699。结论 CD133及E-cadherin表达情况是EOC病人预后的影响因素,构建列线图能够有效预测病人生存率。

**关键词:**卵巢肿瘤; E-钙黏蛋白; 流式细胞术; 印迹法,蛋白质; 列线图; 预后; 存活率

## The predict value of nomogram model based on CD133 and EMT related factors for the prognosis of epithelial ovarian cancer

ZHANG Juanjuan,ZHANG Chunlian,ZHANG Zhijun,WANG Chaoyun

Author Affiliation: Reproductive Medicine Center, Shiyan Taihe Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China

**Abstract: Objective** To build a nomogram model for the predicting of in from Shiyan Taihe Hospital January 2009 to January 2012, prognosis of epithelial ovarian cancer (EOC), and verify its value. **Methods** 152 patients with EOC newly diagnosed by histopathology in Shiyan Taihe Hospital from January 2009 to January 2012 were followed up continuously after operation. The expression of CD133, Snail, E-cadherin protein in tumor tissue were detected. Patients' general materials and clinical pathological data were counted. The influencing factors of cumulative survival rate were analyzed by Cox proportional hazard model. The proportional hazard model was drawn by R language to verify its application value. **Results** Among the 152 pathological specimens, 87 cases were CD133 positive, accounting for 57.24%, 50 cases were E-cadherin positive, accounting for 32.89%, and 89 cases were Snail positive, accounting for 58.55%. The cumulative survival time of the patients with CD133, Snail positive and E-cadherin negative were significantly shorter than that of the corresponding control group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). CD133 positive, abdominal organ or lymph node metastasis were risk factors for prognosis, and E-cadherin positive was an protective factor for prognosis ( $P < 0.05$ ). The nomogram model and the calibration curve were established by R language, and the calibration curve was close to a straight line with slope near 1, C-index of this nomogram model was 0.699. **Conclusion** The expression of CD133 and E-cadherin expression were influencing factors affecting the prognosis of patients with EOC. Constructing nomograms can effectively predict the survival rate of the patients.

**Key words:** Ovarian neoplasms; E-cadherin; Flow cytometry; Blotting, western; Nomograms; Prognosis; Survival rate

上皮性卵巢癌(Epithelial ovarian cancer, EOC)是妇科常见恶性肿瘤,国内报道显示其发病率及病死率均呈上升趋势<sup>[1-2]</sup>。由于该疾病起病隐匿,早期症状不典型,多数病人确诊时已为晚期,即便接受标准化的治疗方案,病人预后仍不理想<sup>[3]</sup>。早期预测病人预后,制定针对性的治疗方案,有助于改

善病人结局<sup>[4]</sup>。肿瘤干细胞是肿瘤组织中具备自我更新、无限增殖、成瘤能力强,且可影响肿瘤侵袭、转移及抗放化疗的细胞<sup>[5]</sup>;上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可使肿瘤细胞摆脱细胞间粘附,从而提升其侵袭能力<sup>[6]</sup>。CD133蛋白是肿瘤干细胞重要标志物,Snail、E-cadherin蛋白

是反应 EMT 的重要标志物,已有研究证实上述蛋白与 EOC 病人预后具有一定的相关性<sup>[7-8]</sup>,但目前尚缺乏能够具体预测病人术后生存情况的模型。因此,本研究利用 Cox 风险比例模型、R 语言构建病人术后生存情况的列线图模型,有助于解决上述问题,报告如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 纳入 2009 年 1 月至 2012 年 1 月于十堰市太和医院接受治疗的 152 例 EOC 病人为对象,进行持续随访研究,随访截至病人死亡或至 2017 年 10 月,随访时间为 6~103 个月。病人年龄范围为 27~82 岁,年龄(58.45±12.17)岁,其中<55 岁 78 例,≥55 岁 74 例;组织学分型:浆液性癌 107 例、黏液性癌 24 例、宫内膜样癌 12 例、透明细胞癌 9 例;国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)手术病理分期<sup>[9]</sup> I~II 期 74 例、III~IV 期 78 例;肿瘤最长直径≥5 cm 者 56 例、<5 cm 者 96 例;伴腹部脏器或淋巴结转移者 56 例;伴腹水者 53 例。

**1.2 纳入标准** 术后病理确诊为上皮性卵巢癌;初治病人,均选择肿瘤细胞减灭术治疗,术后接受以铂类为主的联合化疗;病理、临床及随访资料完整;本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,病人及近亲属知情同意。

**1.3 排除标准** 既往已接受放疗、化疗或其他抗肿瘤治疗者;随访期间失访者。

## 1.4 方法

**1.4.1 实验室检测** 试剂:鼠抗人 CD133 单克隆抗体,兔抗人 Snail 多克隆抗体,购自美国 Abcam;鼠抗人 E-cadherin 多克隆抗体、DAB 显色试剂盒、Elivision™ plus 试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。方法:收集所有对象存档的手术标本石蜡块,4 μm 连续切片、烤干,脱蜡至水洗后参考试剂盒说明书进行免疫组织化学染色,选用已知阳性切片为阳性对照,以 PBS 代替一抗为空白对照。结果判定:由 3 名病理医师采用多数法独立双盲阅片判断免疫组织化学染色结果。CD133、E-cadherin 蛋白阳性以细胞膜和细胞质出现棕黄色颗粒为准,Snail 阳性以细胞核出现棕黄色颗粒为准,表达结果从着色强度和范围两方面综合计分。着色强度:0、1、2、3 分分别表示无色、淡黄色、棕黄色、棕褐色;着色范围:1、2、3、4 分分别表示高倍镜下阳性细胞占比<10%、11%~50%、51%~75%、>75%,两者得分乘积为最终得分,积分≤2 分为标本阴性,>2 分为阳性。每个标本随机计数 10 个×400 倍视野,取中

位值进行判定。

**1.4.2 观察指标** 统计病人年龄、FIGO 手术病理分期、组织学分型、肿瘤直径、转移及腹水情况。采用电话、门诊复查及上门随访等方式对病人进行持续随访,观察病人生存情况。

**1.5 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 及 R 语言 3.4.2 版进行数据统计分析。单因素分析采用 $\chi^2$ 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 Log-rank  $\chi^2$ 检验进行单因素分析,采用 Cox 风险比例模型进行多因素分析,以明确病人累积生存率的影响因素,自变量筛选方案选择条件参数估计似然比检验,进入标准  $P<0.05$ ,删除标准  $P>0.10$ 。根据上述影响因素的回归系数等信息,利用 R 语言构建累积生存率的列线图模型和校准曲线。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CD133、E-cadherin、Snail 表达情况** 152 份病理标本中,CD133 阳性表达 87 例,占 57.24% (87/152),E-cadherin 阳性表达 50 例,占 32.89% (50/152),Snail 阳性表达 89 例,占 58.55% (89/152)。

**2.2 CD133、E-cadherin、Snail 表达与累积生存情况的关系** 病人中位生存时间 51 月(95% CI: 44.637~57.363 月),1 年、3 年、5 年累积生存率分别为 93.4%、63.3%、37.5%。CD133、Snail 阳性者,累积生存时间明显短于对应阴性者(Log-rank  $\chi^2 = 25.762, P < 0.001$ ; Log-rank  $\chi^2 = 16.463, P < 0.001$ ),E-cadherin 阴性者,累积生存时间明显短于阳性者(Log-rank  $\chi^2 = 37.159, P < 0.001$ ),见图 1。

**2.3 累积生存率的影响因素分析** 经 Log-rank  $\chi^2$  检验,除 CD133、E-cadherin、Snail 表达情况外,FIGO 分型 III~IV 期、伴腹部脏器或淋巴结转移病人累积生存时间也分别明显短于 FIGO 分型 I~II 期、不伴腹部脏器或淋巴结转移病人(Log-rank  $\chi^2 = 7.373, P = 0.007$ ; Log-rank  $\chi^2 = 31.023, P < 0.001$ ),而年龄、组织学分型、肿瘤最长直径、腹水均与累积生存时间无明显关系( $P > 0.05$ )。将 CD133、E-cadherin、Snail、FIGO 分型、腹部脏器或淋巴结转移作为自变量,按如下方案赋值:CD133、E-cadherin、Snail 阳性为 1,阴性为 0,FIGO 分型 I~II 期为 1,III~IV 期为 2,有伴腹部脏器或淋巴结转移为 1,无为 0,将累积生存情况纳为因变量,经 Cox 风险比例模型分析显示,CD133 阳性、伴腹部脏器或淋巴结转移是影响病人预后的危险因素,E-cadherin 阳性是影响病人预后的保护因素( $P < 0.05$ ),见表 1。

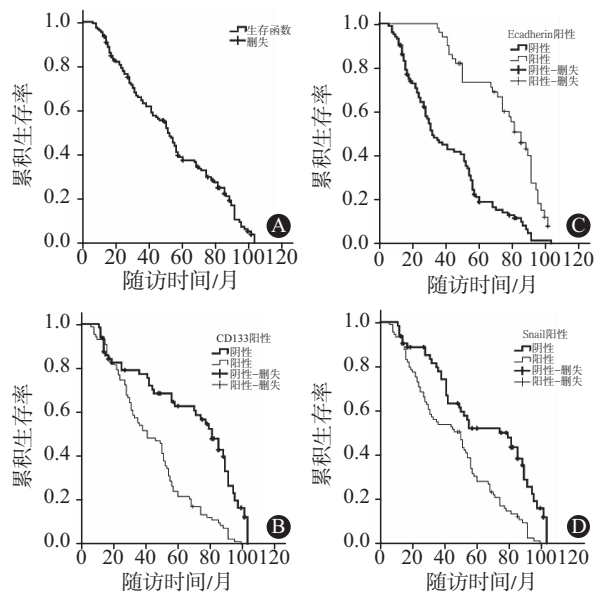


图1 CD133、E-cadherin、Snail 表达与上皮性卵巢癌累积生存情况的关系:A 为总体情况;B 为 CD133 与累计生存情况的关系;C 为 E-cadherin 与累计生存情况的关系;D 为 Snail 与累计生存情况的关系

表1 上皮性卵巢癌病人 152 例累积生存率影响因素分析

指标	$\beta$ 值	标准误	Wald $\chi^2$ 值	P 值	HR(95% CI)
CD133 阳性	0.560	0.227	6.106	0.013	1.751 (1.123 ~ 2.730)
E-cadherin 阳性	-0.905	0.222	16.578	0.000	0.405 (0.262 ~ 0.625)
伴腹部脏器或淋巴结转移	0.420	0.214	3.854	0.050	1.523 (1.001 ~ 2.317)

2.4 病人预后的预测列线图模型建立 根据 Cox 风险比例模型分析结果,建立基于 CD133、E-cadherin 是否阳性及有无伴腹部脏器或淋巴结转移的列线图模型用于预测病人 1 年、3 年、5 年生存率,如图 2。

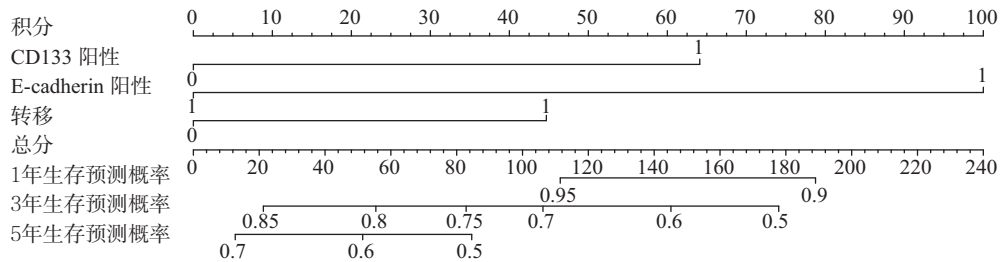


图2 根据上皮性卵巢癌病人预后影响因素建立的列线图模型

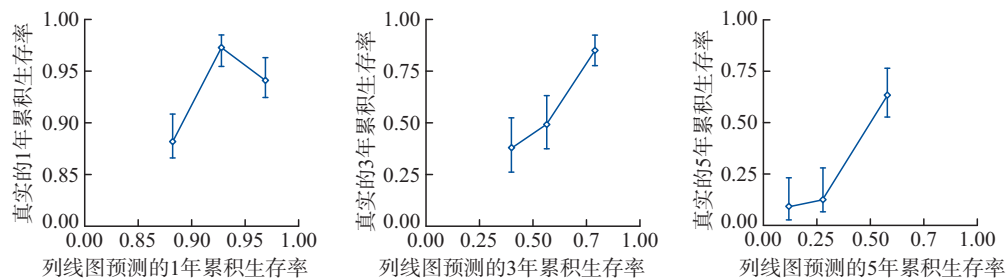


图3 列线图预测上皮性卵巢癌病人累积生存率的校准曲线

列线图预测值的实例:某病人 CD133、E-cadherin 均阳性,伴腹腔脏器转移,则该病人的总评分为:64 + 0 + 44 = 108 分,对应的术后 1 年生存率高于 95% ,3 年生存率约为 69% ,5 年生存率低于 50%。

2.5 列线图模型验证 经内部验证,该模型一致性参数 C-index = 0.699,校准图形接近于斜率为 1 的直线,提示列线图较准确地预测病人术后死亡风险。见图 3。

### 3 讨论

肿瘤组织中多数细胞增殖能力有限,数次分裂后就会死亡,但小群细胞具备无限增殖和分化的潜能,这是肿瘤形成、侵袭和转移的重要基础,此类细胞即肿瘤干细胞<sup>[10]</sup>。CD133 可以作为卵巢癌肿瘤干细胞标志物<sup>[11]</sup>,其高表达多与 FIGO 高分期、肿瘤转移有关<sup>[12]</sup>,据文献报道,联合 CD133 检测对 EOC 病人的早期诊断、治疗及预后可能有参考价值<sup>[13]</sup>。本研究 CD133 阳性可明显缩短病人累积生存时间,提示肿瘤干细胞水平与病人预后存在一定的相关性。EMT 具有细胞极性消失、黏附力下降、细胞骨架重塑,且获得间充质细胞迁移、侵袭及抗凋亡的生物学特性,肿瘤细胞出现 EMT 变化,则能够获得干细胞特性<sup>[14]</sup>。EMT 过程受不同生长因子和信号通路转导信号共同调节,相关研究提示 Snail/E-cadherin 信号通路与 EMT 密切相关<sup>[15]</sup>;E-cadherin 是广泛存在于上皮组织的钙依赖性细胞粘附分子;Snail 能够与其启动子区域含有 CAGGTG 核心碱基序列的 E-box 元件结合,从而抑制 E-cadherin 表达,导致细胞粘附下降,肿瘤细胞易脱落并转移。Zhang 等<sup>[16]</sup>发现高 Snail 表达、低 E-cadherin 表达多与 FIGO

高分期、肿瘤转移有关。本研究证实 Snail 阳性表达者及 E-cadherin 阴性表达者,其累积生存时间明显缩短,提示 EMT 与病人预后有一定相关性。已有研究证实发生 EMT 的细胞能够促使肿瘤干细胞亚群数量提升,从而使肿瘤细胞获得干性,同时,肿瘤干细胞又具备间质样细胞的特点,能够表达 EMT 相关因子,促进 EOC 肿瘤干细胞的干性特征产生及 CD133 表达,从而导致肿瘤的侵袭性增强,严重影响病人预后<sup>[17]</sup>。

Cox 风险比例模型指出仅 CD133、E-cadherin 表达及是否伴腹部脏器或淋巴结转移与病人预后相关,其剔除了 Snail 表达情况,可能因后者对病人预后的影响被其它因素掩盖所致。目前对 EOC 病人预后影响因素的测评,主要基于 Cox 回归模型<sup>[18-19]</sup>,虽有一定指导价值,但难以为个体病人提供准确、具体的生存率信息,仍不能满足临床需求。本研究利用 Cox 回归分析结果,结合 R 语言,构建预测病人生存率的列线图模型,结果显示其具备良好的内部一致性和预测效能,可能能够为日后开展同类研究提供参考,即构建列线图模型有助于为病人提供个体化的生存率预测信息,这与其他肿瘤报道<sup>[20-21]</sup>结论一致。

综上,CD133 及 E-cadherin 表达情况是 EOC 病人预后的影响因素,构建列线图能够有效预测病人生存率。从发展前景来看,CD133 及 E-cadherin 联合检测有可能成为评估 EOC 病人临床预后的重要参考指标,有必要在严格设计的大样本、多中心研究中进一步验证。

### 参考文献

- [1] 朱陈,李辉章,王悠清,等. 2010 年至 2014 年浙江省肿瘤登记地区癌症死亡情况分析[J]. 中国肿瘤临床,2017,44(11):552-557.
- [2] 王丽琴. 熊果酸对人上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 安徽医药,2016,20(4):647-650.
- [3] SEWARD SM, WINER I. Primary debulking surgery and neoadjuvant chemotherapy in the treatment of advanced epithelial ovarian carcinoma[J]. Cancer Metastasis Rev,2015,34(1):5-10.
- [4] 梁培培,俞凤,张泓. 探索血降钙素原和 C 反应蛋白对心搏骤停后综合征患者早期病情评估及预后的价值[J]. 安徽医药,2015,19(2):284-287.
- [5] FRIEDMANN-MORVINSKI D, VERMA IM. Dedifferentiation and reprogramming:origins of cancer stem cells[J]. EMBO Rep,2014,15(3):244-253.
- [6] TAN TZ, MIOW QH, MIKI Y, et al. Epithelial- mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients[J]. EMBO Mol Med,2014,6(10):1279-1293.
- [7] GARSON K, VANDERHYDEN BC. Epithelial ovarian cancer stem cells; underlying complexity of a simple paradigm[J]. Reproduction,2015,149(2):R59-R70.
- [8] WAKAHASHI S, SUDO T, OKA N, et al. VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug; a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer[J]. Transl Res,2013,162(3):181-190.
- [9] PEREIRA A, PÉREZ-MEDINA T, MAGRINA JF, et al. International federation of gynecology and obstetrics staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum; estimation of survival in patients with node-positive epithelial ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer,2015,25(1):49-54.
- [10] 易红艳. 肿瘤干细胞在妇科肿瘤的研究进展[J]. 实用妇产科杂志,2015,31(11):824-827.
- [11] LONG Q, YANG R, LU W, et al. Adenovirus-mediated truncated Bid overexpression induced by the Cre/LoxP system promotes the cell apoptosis of CD133 + ovarian cancer stem cells[J]. Oncol Rep,2017,37(1):155-162.
- [12] JI YI, LEE BY, KANG YJ, et al. Expression patterns of Thymosin  $\beta$ 4 and cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancers[J]. Pathol Oncol Res,2013,19(2):237-245.
- [13] 杨丽萍,侯俊德,段爱红,等. 肿瘤干细胞标志物 CD133 和 Nestin 在卵巢癌中的表达及意义[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(4):301-304.
- [14] RUSCETTINI, QUACHB, DADASHIAN EL, et al. Tracking and functional characterization of epithelial- mesenchymal transition and mesenchymal tumor cells during prostate cancer metastasis[J]. Cancer Res,2015,75(13):2749-2759.
- [15] JI Q, LIU X, HAN Z, ET AL. Resveratrol suppresses epithelial- to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression[J]. BMC Cancer,2015,15:97. DOI:10.1186/s12885-015-1119-y.
- [16] ZHANG Y, FAN N, YANG J. Expression and clinical significance of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , Snail and E-cadherin in human ovarian cancer cell lines[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3):3393-3399.
- [17] 俞岚,周蕾,武世伍,等. 上皮性卵巢癌中 CD133 与 EMT 相关因子表达的关系[J]. 南方医科大学学报,2015,35(9):1297-1302.
- [18] 张维维,马丹宇,李小庭,等. 术前血小板/淋巴细胞比值与卵巢癌患者预后的关系[J]. 实用医学杂志,2014,30(23):3781-3784.
- [19] 张洁,王晓慧,张苗,等. 56 例复发性卵巢癌无瘤生存期影响因素及治疗后预后分析[J]. 实用妇产科杂志,2016,32(5):354-357.
- [20] CALLEGARO D, MICELI R, BONVALOT S, et al. Development and external validation of two nomograms to predict overall survival and occurrence of distant metastases in adults after surgical resection of localised soft-tissue sarcomas of the extremities; a retrospective analysis[J]. Lancet Oncol,2016,17(5):671-680.
- [21] 杨梅,莫永洋,韩晓蓉,等. 分子标记列线图模型建立及评估三阴性乳腺癌预后的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2016,23(15):988-995.

(收稿日期:2017-11-28,修回日期:2018-02-05)