

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.06.034

◇临床医学◇

肿瘤坏死因子受体相关因子6的表达 对食管鳞状细胞癌预后的影响

杨兰艳,殷芳,王建刚,孔娜

作者单位:云南省第三人民医院消化内科,云南 昆明 650000

通信作者:殷芳,女,副主任医师,研究方向为肝脏疾病, E-mail: woazhouenlai5@163.com

摘要:目的 探讨肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达与复发和生存的关系。方法 选取2012年12月至2014年2月在云南省第三人民医院接受根治性切除术治疗的经病理证实为ESCC的病人478例作为研究对象。采用免疫组织化学法检测ESCC病人癌组织中TRAF6的表达。并探讨TRAF6的表达与ESCC病人复发和生存的相关性。结果 478例ESCC病人中,341例(71.3%)符合TRAF6表达阳性标准。TRAF6表达与性别、年龄、肿瘤大小无关($P > 0.05$),但是与ESCC病人的TNM分期、淋巴结转移、复发和死亡状况显著相关($P < 0.05$)。淋巴结转移、较高临床分期、发生复发或死亡的病人TRAF6阳性表达率高。进一步分析发现,TRAF6阳性表达的ESCC病人复发和死亡风险增加[HR (95%CI):2.47(1.63~3.84), 3.05(2.37~3.48)]。结论 TRAF6在ESCC癌组织中的表达参与ESCC的发生发展,TRAF6表达阳性病人复发和死亡的风险增加;TRAF6可作为ESCC潜在的治疗靶点。

关键词:食管肿瘤; 肿瘤坏死因子受体相关因子6; 复发; 生存

Effect of TRAF6 expression on the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma

YANG Lanyan, YIN Fang, WANG Jiangang, KONG Na

Author Affiliation: Department of Gastroenterology, The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) expression and the recurrence and survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** A total of 478 patients pathologically confirmed with ESCC who underwent radical resection in The Third People's Hospital of Yunnan Province from December 2012 to February 2014 were included as the research subjects. The expression of TRAF6 in cancer tissues of ESCC patients was evaluated by immunohistochemistry. The relationship between the expression of TRAF6 and the recurrence and survival of ESCC patients were investigated. **Results** Among the 478 ESCC patients, 341 (71.3%) met the TRAF6 positive expression criteria. TRAF6 expression was not associated with gender, age, and tumor size ($P > 0.05$), but was significantly associated with TNM stage, lymph node metastasis, recurrence, and death status in ESCC patients ($P < 0.05$). Patients with lymph node metastasis, higher clinical stage, and recurrence or death, have a high rate of TRAF6 positive expression. Further analysis suggested an increased risk of recurrence and death in ESCC patients showing positive TRAF6 expression [HR (95%CI):2.47 (1.63-3.84), 3.05 (2.37-3.48)]. **Conclusions** The expression of TRAF6 in ESCC cancer tissues is involved in the development of ESCC. The risk of recurrence and death is increased in patients with positive TRAF6 expression. TRAF6 can be used as a potential therapeutic target for ESCC.

Key words: Esophageal neoplasms; Tumor necrosis factor receptor-related factor 6; Recurrence; Survival

食管癌是最常见的消化道恶性肿瘤,其预后不良,居全球癌症相关死因第6位^[1]。西方国家大多数食管癌病理类型为腺癌,而在我国则以鳞状细胞癌居多。随着以手术治疗为主、化疗和放疗为辅的综合治疗措施的出现,食管癌病人的生存率有所提高,但其5年总生存率仍然较低^[2]。肿瘤坏死因子受体相关因子6(Tumor necrosis factor receptor asso-

ciated factor 6, TRAF6)是一种新型天冬酰胺基内肽酶蛋白酶,具有促进蛋白质稳定的作用^[3],最近的研究表明TRAF6与多种肿瘤的发生发展相关^[4-6]。然而国内尚未发现TRAF6与食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)复发和生存的相关性研究。本研究通过检测TRAF6在ESCC组织中的表达及其与生存和复发的相关性,以期为

ESCC的治疗和预后评估提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2012年12月至2014年2月在云南省第三人民医院接受根治性切除术治疗的经病理证实为ESCC的病人作为研究对象。共有478例ESCC病人纳入本研究,年龄(59.3±7.6)岁,年龄范围为44~75岁。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,所有研究对象在参与本研究前均已签署知情同意书。

1.2 免疫组织化学及阳性判断标准 采用10%甲醛对术中切除的新鲜的食管癌组织标本进行固定,并行常规石蜡包埋,将石蜡标本切成4 μm连续切片,60℃烤片8h备用。将切片脱蜡和水化。采用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗3次,每次3min。蒸馏水浸泡后行抗原修复。采用PBS 100℃修复10min。并自然冷却至室温。在PBS摇床上进行2~3次冲洗,每次5min。然后滴入过氧化氢酶阻断溶液,室温下孵育10min;滴加生物素标记二抗(羊抗兔IgG),室温下孵育1h;PBS冲洗3次,每次3min;行DNA染色,蒸馏水冲洗后,使用苏木素复染,酒精脱水,采用流水进行缓慢冲洗反蓝,空气干燥,中性胶封片。

由2名高级职称病理科医师对免疫结果进行判定^[7]:在高倍镜下,每张切片观察15个视野。平均100个细胞中TRAF6阳性细胞的个数为阳性细胞率。细胞质中观察到棕黄色颗粒为阳性,阳性细胞染色程度评分标准为0分:阴性;1分:淡黄色;2分:黄色;3分:棕黄色。阳性细胞百分比评分标准:0分:<1%;1分:1%~10%;2分:>10%~30%;3分:>30%~60%;4分:>60%。最终得分为细胞质阳性细胞染色程度评分与阳性细胞百分比评分之和。最终结果判定:0~2分:阴性,3~7分:阳性。

1.3 随访 采用电话随访和门诊随访相结合的方式,病人出院后每3个月随访1次,了解病人术后复发和生存状况等信息,随访截止日期为2019年5月。478例ESCC病人中,445例完成随访,失访23例,随访率95.2%。中位随访时间为33个月(范围为5~60个月)。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0进行统计分析。连续资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。分类资料用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。用Kaplan-Meier并Log-rank检验进行单因素生存分析,单因素分析差异有统计学意义的变量纳入Cox多因素模型分析影响ESCC病人复发和死亡的独立危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAF6表达与ESCC病人临床病例特征的关系 478例ESCC病人中,341例(71.3%)符合TRAF6表达阳性标准。TRAF6阳性表达癌组织细胞质呈淡黄色、棕黄色或棕褐色,见图1。TRAF6表达与性别、年龄、肿瘤大小无关($P > 0.05$)。TRAF6表达与ESCC病人的TNM分期、淋巴结转移、复发和死亡状况显著相关($P < 0.001$)。淋巴结转移、较高临床分期、发生复发或死亡的病人TRAF6阳性表达率高。见表1。

表1 肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)表达与食管鳞状细胞癌临床病例特征的关系/例(%)

临床病例特征	例数	TRAF6阳性	TRAF6阴性	χ^2 值	P值
性别				1.118	0.290
男	307	214(62.76)	93(67.88)		
女	171	127(37.24)	44(32.12)		
年龄				0.351	0.554
<65岁	241	169(49.56)	72(52.55)		
≥65岁	237	172(50.44)	65(47.45)		
肿瘤大小				1.302	0.254
<5 cm	242	167(48.97)	75(54.74)		
≥5 cm	236	174(51.03)	62(45.26)		
TNM分期				33.719	<0.001
I期	29	18(5.28)	11(8.03)		
II期	284	178(52.20)	106(77.37)		
III期	165	145(42.52)	20(14.60)		
淋巴结转移				88.763	<0.001
是	306	263(77.13)	43(31.39)		
否	172	78(22.87)	94(68.61)		
复发				51.465	<0.001
是	283	239(73.54)	44(36.67)		
否	162	86(26.46)	76(63.33)		
死亡				121.625	<0.001
是	256	238(73.23)	18(15.00)		
否	189	87(26.77)	102(85.00)		

2.2 ESCC病人单因素生存分析 Kaplan-Meier并Log-rank检验显示,较高TNM分期、淋巴结转移、TRAF6阳性表达可增加ESCC病人复发风险($P < 0.001$)。较高TNM分期、淋巴结转移、复发、TRAF6阳性表达可增加ESCC病人死亡风险($P < 0.001$)。结果见表2,图2。

2.3 ESCC病人多因素Cox回归分析结果 将Kaplan-Meier并Log-rank分析结果显示差异有统计学意义的变量纳入Cox回归模型,结果显示:较高TNM分期、淋巴结转移、TRAF6阳性表达是ESCC病人复发的独立危险因素($P < 0.001$)。较高TNM分期、淋巴结转移、复发、TRAF6阳性表达是ESCC病人死亡的独立危险因素($P < 0.001$)。见表3。

表2 食管鳞状细胞癌445例单因素生存分析

临床病例特征	复发		死亡	
	HR(95%CI)	P值	HR(95%CI)	P值
性别(男vs.女)	1.17 (0.83~2.23)	0.173	1.21 (0.88~2.47)	0.483
年龄 (≥65岁vs.<65岁)	1.24 (0.86~1.93)	0.321	1.17 (0.94~2.01)	0.533
肿瘤大小 (≥5 cm vs. <5 cm)	1.83 (0.76~3.14)	0.582	1.92 (0.86~2.89)	0.638
TNM分期[Ⅲ期 vs.(Ⅰ+Ⅱ)期]	3.74 (3.26~4.58)	<0.001	3.24 (2.85~4.13)	<0.001
淋巴结转移 (是vs.否)	2.86 (2.43~3.54)	<0.001	2.93 (2.37~3.18)	<0.001
复发(是vs.否)	—	—	2.14 (1.24~2.63)	<0.001
TRAF6表达 (阳性vs.阴性)	2.34 (1.78~3.63)	<0.001	3.14 (2.15~3.68)	<0.001

注:TRAF6为肿瘤坏死因子受体相关因子6

表3 食管鳞状细胞癌445例多因素生存分析

临床病例特征	复发		死亡	
	HR(95%CI)	P值	HR(95%CI)	P值
TNM分期[Ⅲ期vs. (Ⅰ+Ⅱ)期]	3.53 (3.36~4.17)	<0.001	3.08 (2.95~3.89)	<0.001
淋巴结转移 (是vs.否)	2.74 (2.52~3.42)	<0.001	2.88 (2.41~3.02)	<0.001
复发(是vs.否)	—	—	2.04 (1.38~1.78)	<0.001
TRAF6表达 (阳性vs.阴性)	2.47 (1.63~3.84)	<0.001	3.05 (2.37~3.48)	<0.001

注:TRAF6为肿瘤坏死因子受体相关因子6

3 讨论

近年来,虽然ESCC的治疗技术取得了突破性的进展,然而其总体生存率并没有得到显著改善。ESCC具有家族聚集性的临床特征,表明遗传易感性可能在食管癌发生发展中起关键作用^[8]。然而,由于肿瘤的异质性,具有相似临床特征的ESCC病人预后也可能不同。因此,鉴定新的敏感和特异性分子标志物对于ESCC的早期诊断和治疗非常重要。TRAF6是肿瘤坏死因子受体和白细胞介素-1受体/Toll样受体超家族诱导信号的衔接因子,并在先天免疫反应中发挥关键作用^[9]。动物试验发现TRAF6在ESCC细胞系中表达上调,并可调节细胞生长^[10-11]。然而,TRAF6对ESCC病人复发和死亡影响的研究仍然有限。

本研究发现TRAF6阳性表达和ESCC病人的性别、年龄、肿瘤大小无关,但与ESCC病人的TNM分期、淋巴结转移、复发和死亡状况显著相关。TRAF6阳性表达阳性病人复发和死亡的风险增加。这与先前关于TRAF6对其他肿瘤病人预后影响的研究

一致:TRAF6高表达与胃癌、舌癌、卵巢癌等肿瘤的不良预后相关^[4-5,12]。表明TRAF6可能是ESCC复发和死亡的新型生物标志物。TRAF6可以同时调控核因子-κB(NF-κB)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)两条信号通路。通过调控食管癌组织中NF-κB、MAPK两条信号通路的异常激活,NF-κB转录活性的升高,可以增加食管癌化疗的耐药抵抗。MAPK家族主要包括细胞外信号调控激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、JNK/SAPK(c-Jun氨基末端激酶/应激活化蛋白激酶)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)3个信号通路。ERK和p38 MAPK均在食管癌组织中存在高表达,并影响食管癌病人的预后^[13]。JNK/SAPK磷酸化后可促进食管癌组织中瘤体的生长和血管的形成,抑制JNK/SAPK的活性可抑制食管癌侵袭^[14-15]。此外,抑制TRAF6的表达可显著抑制多种肿瘤细胞的增殖和侵袭,并促进细胞周期的凋亡^[13,16-18]。提示TRAF6可能在肿瘤的发生发展中发挥重要的病理生理学作用。

综上所述,TRAF6在ESCC癌组织中的表达参与ESCC的发生发展,TRAF6表达阳性病人复发和死亡的风险增加,TRAF6可作为ESCC潜在的治疗靶点。

(本文图1,2见封3)

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] 刘曙正, 于亮, 李变云, 等. 林州市食管癌筛查病例与非筛查病例生存情况比较[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(3): 238-242.
- [3] LIN Y, QIU Y, XU C, et al. Functional role of asparaginyl endopeptidase ubiquitination by TRAF6 in tumor invasion and metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(4): dju012.
- [4] 石琳, 李丽. TRAF6在卵巢癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(12): 1695-1698.
- [5] 章国良, 孙元水, 唐智亮, 等. TRAF6表达与胃癌患者营养状况及预后的关系[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(14): 951-954.
- [6] 胡卉华, 许凌, 徐海鹏, 等. TRAF6基因表达与非小细胞肺癌EGFR突变患者临床EGFR-TKIs治疗疗效的关系[J]. 中国医药指南, 2016, 14(9): 29-30.
- [7] LIU H, TAMASHIRO S, BARITAKI S, et al. TRAF6 activation in multiple myeloma: a potential therapeutic target[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2012, 12(3): 155-163.
- [8] 孙秀彬. 小地域内食管癌空间流行病学特征及其地理危险因素研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [9] MAO F, LI J, ZHANG Y, et al. Molecular cloning and functional analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) in *Crossostrea gigas*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 68: 37-45.

- [10] YAO F, HAN Q, ZHONG C, et al. TRAF6 promoted the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(5): 3201-3207.
- [11] HAN Q, YAO F, ZHONG C, et al. TRAF6 promoted the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1): 715-721.
- [12] 邓卓峰, 周峥, 齐娟. 舌癌组织肿瘤坏死因子受体相关因子6表达变化及临床意义 [J]. *山东医药*, 2017, 57(8): 89-91.
- [13] RONG Y, WANG D, WU W, et al. TRAF6 is over-expressed in pancreatic cancer and promotes the tumorigenicity of pancreatic cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(11): 260.
- [14] WANG B, ZHANG L, ZHAO L, et al. LASP2 suppresses colorectal cancer progression through JNK/p38 MAPK pathway mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Commun Signal*, 2017, 15(1): 21.
- [15] ZHAO L, MA M, WU H, et al. p-Hydroxycinnamaldehyde slows the progression of 4NQO-induced oesophageal tumorigenesis via the RhoA-MAPK signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(10): 1319-1331.
- [16] CHEN L, LI YC, WU L, et al. TRAF6 regulates tumour metastasis through EMT and CSC phenotypes in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2): 1337-1349.
- [17] HAN F, ZHANG L, QIU W, et al. TRAF6 promotes the invasion and metastasis and predicts a poor prognosis in gastric cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2016, 212(1): 31-37.
- [18] HE Z, HUANG C, LIN G, et al. siRNA-induced TRAF6 knock-down promotes the apoptosis and inhibits the invasion of human lung cancer SPC-A1 cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(4): 1933-1940.

(收稿日期: 2019-06-24, 修回日期: 2019-08-27)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.06.035

◇ 临床医学 ◇

2017年某医院感染情况调查与分析

庄婧¹, 高月²作者单位:¹泗阳县人民医院检验科, 江苏 宿迁 223700; ²重庆市北碚区中医院检验科, 重庆 400700

通信作者: 高月, 女, 副主任技师, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤分子生物学, E-mail: moon19740000@163.com

摘要: **目的** 监测2017年某医院感染发生、分布状况及多重耐药菌分布, 为医院感染控制提供防控策略, 降低医院感染率。 **方法** 回顾性分析泗阳县人民医院2017年1—12月期间住院病人9 750例的临床资料, 利用医院感染监控管理系统对医院感染率、感染部位、细菌耐药情况及多重耐药菌分布情况等进行分析。 **结果** 9 750例病人, 发生医院感染297例次, 医院感染患病率为3.05%。感染率居前三位的科室依次为: 重症监护室(ICU)、呼吸科、神经科, 分别占6.12%, 4.55%, 3.84%。共检出423株病原菌, 其中革兰阳性菌有94株, 占22.22%, 革兰阴性菌有288株, 占68.09%, 真菌41株, 占9.69%。医院感染病原菌主要分布在上、下呼吸道、泌尿道和手术切口。表皮葡萄球菌、肠球菌和金黄色葡萄球菌是检出率较高的主要革兰阳性菌, 除对万古霉素、亚胺培南敏感性较强, 对其他抗菌药均有不同程度的耐药。铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌是检出率较高的主要革兰阴性菌, 除对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦和阿米卡星有较强的敏感性外, 对其他抗菌药均有不同程度的耐药。多重耐药菌监测结果显示共检出多重耐药菌22株, 主要为大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌等。 **结论** 医院感染主要以革兰阴性菌感染为主; 产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌为主要的多重耐药菌。正确合理地使用抗菌药物, 临床治疗应根据药敏试验结果合理选择药物, 以降低医院感染率。

关键词: 交叉感染; 抗药性; 细菌; 微生物敏感性试验; 病原菌; 分布; 监测分析

Investigation and analysis of hospital infection in 2017

ZHUANG Jing¹, GAO Yue²Author Affiliations: ¹Department of Clinical Laboratory, Siyang People's Hospital, Suqian, Jiangsu 223700, China;²Department of Clinical Laboratory, The Chinese Traditional Medicine Hospital of Beibei District, Chongqing 400700, China

Abstract: Objective To monitor the occurrence and distribution of hospital infection and the distribution of multidrug-resistant bacteria in a hospital in 2017 for providing prevention and control strategies for hospital infection control and reducing hospital infection rate. **Methods** Clinical data of 9 750 hospitalized patients in Siyang People's Hospital from January 2017 to December 2017 were retrospectively analyzed, and hospital infection rate, infection site, bacterial resistance and distribution of multidrug-resistant bacteria were analyzed using hospital infection monitoring and management system. **Results** There were 297 cases of nosoco-