

磁共振弥散加权成像参数 ADC 值与食管癌瘤体组织 Sirtuin1 蛋白表达的相关性

王 准¹, 叶智敏^{1,2}, 江明祥¹, 谢铁明¹, 方 军¹, 林清认¹, 李 开¹, 张 谷¹, 王跃珍¹
(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江省头颈肿瘤转化医学研究重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘 要: [目的] 探讨磁共振弥散加权成像(MRI-DWI)参数表观弥散系数(ADC)值与食管癌组织 Sirtuin1 (SIRT1)蛋白表达的相关性,寻找预测食管癌辐射抵抗的生物靶标。[方法] 入组 32 例食管癌患者,收集所有患者治疗前肿瘤组织标本,行免疫组化检查,定量计算 SIRT1 蛋白表达情况。所有患者均接受根治性放疗,并于放疗前及放疗至第 5 次分割时接受两次 MRI-DWI 检查,利用脱机分析软件根据既定方法于食管癌瘤床区勾画感兴趣区域(ROI),得出相应 ROI 区域 ADC 值,取三次测量平均值为相应参数值。测量得出治疗前及放疗至第 5 次分割时 ADC 值,分别标记为 pre-ADC、intra-ADC,通过前后两次 ADC 值计算得出 Δ ADC 值。分析上述各 ADC 值与 SIRT1 蛋白表达的线性相关性。[结果] 32 例患者中 25 例患者为影像学缓解反应组(完全缓解+部分缓解),7 例患者为影像学稳定组(疾病稳定),缓解反应组和稳定组 SIRT1 表达水平分别为 $36.11\% \pm 4.66\%$ 和 $61.72\% \pm 4.08\%$ ($P=0.001$)。治疗前 32 例食管癌瘤床区测量所得 pre-ADC 平均值为 $1.26 \pm 0.22 (10^{-3} \text{mm}^2/\text{s})$;放疗至第 5 次分割时,食管癌瘤床区测量所得 intra-ADC 平均值为 $1.58 \pm 0.31 (10^{-3} \text{mm}^2/\text{s})$;治疗前、放疗至第 5 次时 ADC 差值 Δ ADC 为 $0.32 \pm 0.18 (10^{-3} \text{mm}^2/\text{s})$ 。SIRT1 表达水平与不同 ADC 值之间呈不同程度相关性 (Δ ADC: $r=-0.967, P=0.002$; intra-ADC: $r=-0.746, P=0.002$; pre-ADC: $r=0.109, P=0.558$)。[结论] MRI-DWI 检查功能参数 ADC 值与 SIRT1 表达水平之间具有不同程度相关性,可能在预测食管癌辐射抵抗中发挥重要作用。

主题词: 食管肿瘤; 弥散加权成像; ADC; SIRT1

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)12-1181-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.12.B008

Correlation between ADC Value of MR-DWI and Expression Level of Sirtuin1 in Esophageal Carcinoma

WANG Zhun¹, YE Zhi-min^{1,2}, XIE Tie-ming¹, FANG Jun¹, LIN Qing-ren¹, LI Kai¹, ZHANG Gu¹, WANG Yue-zhen¹

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Head & Neck Cancer Translational Research, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Objective] To investigate the correlation between parameter apparent diffused coefficient (ADC) of magnetic resonance diffusion weighted imaging(MR-DWI) and the expression level of protein Sirtuin 1(SIRT1) in esophageal carcinoma patients.[Methods] Thirty two patients with pathologically diagnosed esophageal carcinoma undergoing radical chemoradiotherapy were enrolled. The expression of SIRT1 in cancer tissue before treatment were detected with immunohistochemical(IHC) method. All patients underwent esophageal MR-DWI examinations before treatment and after 5th fraction radiotherapy. The regions of interest(ROIs) were contoured in advance with off-line software according to the stipulated rules and the value of ADC in ROIs was generated automatically. The values of ADC at baseline and after 5th fraction RT were labeled as pre-ADC and intra-ADC, and Δ ADC was calculated. Pearson correlation coefficient was acquired to estimate the correlation between ADC values and SIRT1 level. [Results] Among 32 patients, there were 25 cases of imaging response (complete response+partial response) and 7 cases of imaging non-response(stable disease). The expression levels of SIRT1 were $36.11\% \pm 4.66\%$ in responders and $61.72\% \pm 4.08\%$ in non-responders ($P=0.001$). The average pre-ADC, intra-ADC and Δ ADC were $1.26 \pm 0.22 (10^{-3} \text{mm}^2/\text{s})$, $1.58 \pm 0.31 (10^{-3} \text{mm}^2/\text{s})$ and $0.32 \pm 0.18 (10^{-3} \text{mm}^2/\text{s})$, respectively. The expression of SIRT1 was correlated with pre-ADC ($r=0.109, P=0.558$), intra-ADC ($r=-0.746, P=0.002$) and Δ ADC ($r=-0.967, P=0.002$). [Conclusion] Parametric ADC of MRI-DWI is correlated with the expression of SIRT1 in tumor tissue and it may be used as a bio-marker to predict radiation response for esophageal carcinoma patients.

Subject words: esophageal carcinoma; diffused weighed imaging; apparent diffused coefficient; sirtuin1

基金项目: 浙江省自然科学基金青年项目(LQ15H160001); 浙江省自然科学基金一般项目(LY18H160031, LY17H160039); 浙江省卫生厅一般计划项目(2015KYB063, 2015KYB048, 2016KYA051)

通讯作者: 王跃珍, 主任医师, 硕士; 浙江省肿瘤医院放疗科, 杭州市拱墅区半山东路 1 号(310022); E-mail: wangyuezheng88@126.com

收稿日期: 2018-04-27; **修回日期:** 2018-07-12

食管癌作为严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,占恶性肿瘤致死率第4位,5年生存率甚少超过40%^[1,2]。多数患者一经诊断即为晚期,此时放化疗在食管癌治疗中扮演着至关重要的作用。然而食管癌辐射抵抗的发生往往决定食管癌放射治疗成败,因此,如何更好的提前预测食管癌放化疗敏感性,预测放化疗抵抗的发生,从而达到食管癌个体化治疗?传统影像学仅反映解剖学改变,评价疗效具有滞后性,易造成信息误判,无法评判肿瘤组织治疗前后生物功能学信息变化,缺乏“预警”功能,无法提前预测食管癌放化疗抵抗的发生。

SIRT1 蛋白(sirtuin type 1)属于依赖 NAD⁺的组蛋白去乙酰化酶家族之一,参与多种细胞生物学过程,如细胞周期调节、基因转录,细胞应激反应等^[3,4]。同时高表达 SIRT1 的肿瘤细胞对多种化疗药物抵抗,而且高表达 SIRT1 通常预示着临床预后差^[5,6]。近来研究显示 SIRT1 参与 DNA 损伤同源重组修复(homologous recombination repair,HR),而高等真核生物中,DNA 双链断裂主要通过 HR 和非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)两种方式进行修复,其中 HR 在辐射诱导的 DNA 损伤修复中发挥着重要作用^[7,8]。

我们前期开展了磁共振弥散加权成像参数 ADC 值早期预测食管癌辐射敏感性的价值,以及 SIRT1 蛋白在食管癌辐射抵抗中的作用研究^[9-12]。本研究旨在前期研究的基础上,探寻磁共振弥散加权成像 ADC 值与 SIRT1 表达之间的相关性,探讨 SIRT1 作为一种新的生物标志预测食管癌治疗反应的临床价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2015 年 1 月至 2016 年 12 月收集就诊于浙江省肿瘤医院,均经病理学诊断不能手术或拒绝手术的中晚期食管癌患者 32 例,男性 18 例,女性 14 例,中位年龄 62 岁(47~78 岁);颈段 5 例,胸上段 10 例,胸中段 13 例,胸下段 4 例;T 分期:T₃ 期 17 例,T₄ 期 15 例,T 分期根据 NCCN 第 7 版分期,T 分期结合胸部 CT 及超声胃镜检查(Table 1)。入组标准:(1)病理证实为食管鳞状细胞癌;(2)无第二原发瘤;(3)ECOG

Table 1 General clinical data of 32 esophageal carcinoma patients with different short-term response

Characteristics	Responder	Non-responder	P
Age(years)	48.76±11.66	52.45±9.82	0.080
Gender			0.669
Male	15	3	
Female	10	4	
PS			0.577
0	19	5	
1	6	2	
Location of tumor			0.356
Neck+ upper thoracic	13	2	
Middle thoracic	9	4	
Lower thoracic	3	1	
T stage			0.424
T ₃	14	3	
T ₄	11	4	

PS:performance status

PS 评分≤2 分;(4)脏器功能正常;(5)全程合作治疗。剔除标准:(1)对 MR 检查禁忌患者,如内置金属器械、造影剂过敏;(2)治疗过程中断患者;(3)存在远处转移患者。所有患者均签署知情同意书。

1.2 免疫组化检测 SIRT1 表达

收集 32 例食管癌治疗前瘤体组织标本,行免疫组化检测 SIRT1 蛋白表达水平,于 40 倍(10×4)低倍镜下寻找强染色区后转至 400 倍(10×40)高倍镜下进行图像观察,显微镜通过电荷耦合装置(E-clipse,Nikon,Tokyo)将图片传输至计算机并利用分析软件定量计算 SIRT1 表达水平,表达水平以百分数表达。

1.3 MRI 检查及 DWI 检测

所有入组患者采用配有相阵列线圈的 1.5-T MR (Philips,Best and Heeren,the Netherlands)检查,两次 MRI 及 DWI 检查分别安排在治疗前及放疗至第 5 次分割时,相关检查方法详见既往研究内容^[9,10]。

1.4 DWI 图像分析

将 32 例患者治疗前及放疗至第 5 次分割时采集的 DWI 图像利用脱机软件进行分析,针对 DWI 成像图勾画感兴趣区域(ROI),ROI 勾画遵循原则:(1)结合病灶增强图像显示强化情况,针对增强区勾画 ROI;(2)ROI 选取食管病灶最大横断面连续 3 层勾画 ROI 区域,通过矢状位及水平位综合评价食管癌瘤床区最大横径;(3)勾画 ROI 区域时,尽量沿高信号区域肿瘤侧勾画。每次勾画 ROI 将 DWI 图像

上勾画所得 ROI 拷贝到 ADC 图像中,从而得出相应的 ADC 值。三次测量所得 ADC 值的平均值代表每次 ADC 测量值(详见既往研究),治疗前、放疗至第 5 次分割所得 ADC 值分别标记为 pre-ADC、intra-ADC,通过前后两次 ADC 值差值计算得出 Δ ADC 值。

1.5 根治性放化疗

患者均行根治性放化疗。食管癌靶区勾画由从事食管癌放疗工作 5 年以上经验的医生勾画,每一例患者均由 2 名放疗医生共同阅片勾画。同步化疗方案遵循 NCCN 一线化疗方案执行。

1.6 近期疗效评价

所有患者治疗结束后 1 个月复查食管吞钡造影、胃镜、胸部增强 CT 检查,综合上述检查情况评价。肿瘤消退情况遵循 RECIST 1.1 标准进行评价,其中影像学完全缓解(CR)、部分缓解(PR)划分为缓解反应组,疾病稳定划分为稳定组。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。连续性变量进行统计学描述,其数据结果以均数 $\pm$ 标准差表示,单因素方差分析用于明确连续性变量与治疗效果之间的统计学意义,LSD 法用于两两之间比较。Pearson 相关系数用于评价各 ADC 值与 SIRT1 表达水平之间的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 近期疗效

32 例患者中 9 例患者获得影像学完全缓解(CR),16 例患者获得影像学部分缓解(PR),共计 25 例患者为缓解反应组;7 例患者疗效评价疾病稳定(SD),列入稳定组。

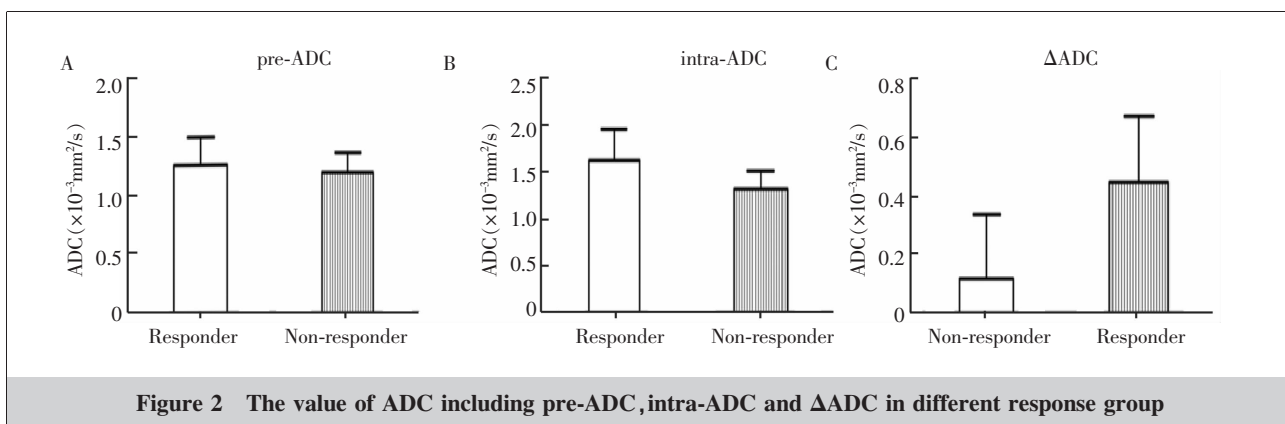
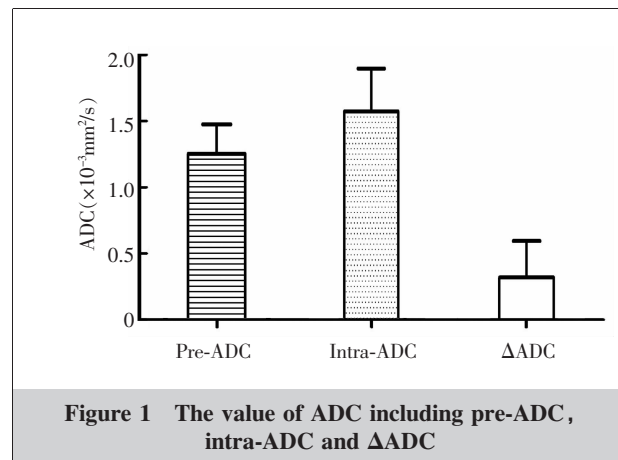
2.2 不同治疗反应组 ADC 值与 SIRT1 表达

32 例患者治疗前参数 pre-ADC 平均值为 $1.26\pm 0.22(10^{-3}\text{mm}^2/\text{s})$ 。放疗至第 5 次分割时,食管癌瘤床区测量 intra-ADC 平均值为 $1.58\pm 0.31(10^{-3}\text{mm}^2/\text{s})$, Δ ADC 为 $0.32\pm 0.18(10^{-3}\text{mm}^2/\text{s})$ (Figure 1)。Pre-ADC、intra-ADC 与 Δ ADC 值在缓解反应组与稳定组情况如 Figure 2, 其中 Δ ADC 值在不同近期疗效组间差异有统计学意义。

32 例食管癌患者瘤体组织 SIRT1 表达平均值为 $46.03\%\pm 21.95\%$, 缓解反应组 SIRT1 表达水平 $36.11\%\pm 4.66\%$, 稳定组为 $61.72\%\pm 4.08\%$, 两者差异有统计学意义($P=0.001$)见 Figure 3。

2.3 参数 ADC 和 SIRT1 表达相关性

计算不同 ADC 值与 SIRT1 表达水平之间线性相关性,SIRT1 表达水平与不同 ADC 值之间呈不同程度相关性(Δ ADC: $r=-0.967, P=0.002$; intra-ADC: $r=-0.746, P=0.002$; pre-ADC: $r=0.109, P=0.558$), SIRT1 表达水平与 Δ ADC 呈强负性线性相关性(Figure 4)。



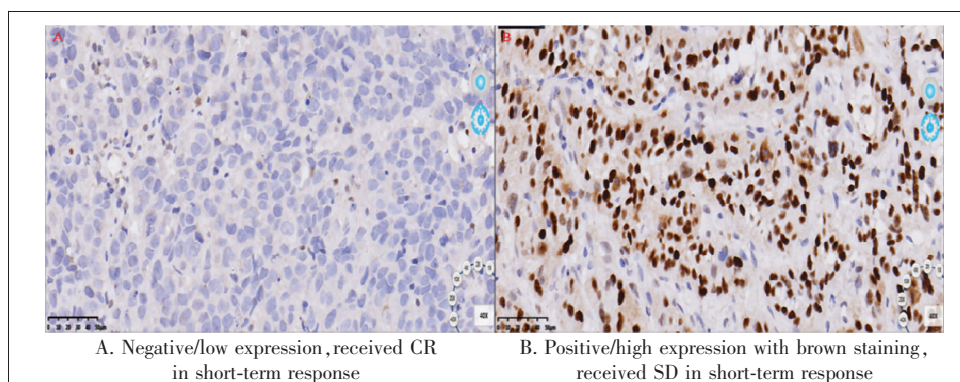


Figure 3 Expression of SIRT1 in EC patients before chemoradiotherapy (IHC×400)

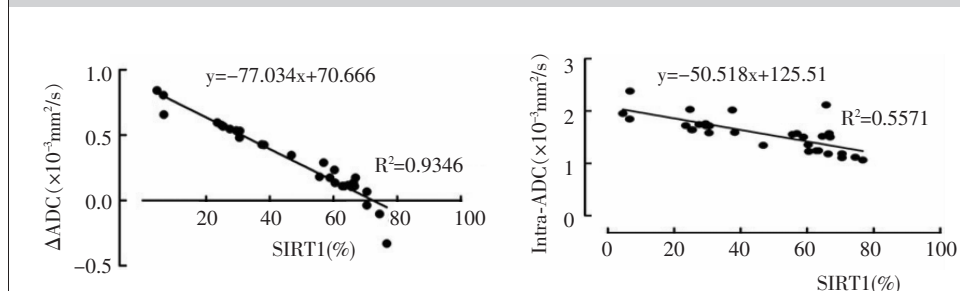


Figure 4 The correlation between the ADC value including intra-ADC, Δ ADC and the expression level of SIRT1

3 讨论

近年来,磁共振弥散加权成像应用于早期预测肿瘤放化疗敏感性的研究较为热门,理念主要基于不同组织有其独特弥散特性,能够先于肿瘤形态学变化之前更早发现肿瘤微环境变化,如细胞组织结构及肿瘤组织微环境变化,且敏感性高^[13]。我们前期临床研究显示磁共振弥散加权成像参数表观弥散系数(ADC)值在预测食管癌放化疗敏感性上具有潜在临床价值,基础实验部分结果显示高表达 SIRT1 蛋白与食管癌辐射抵抗存在相关性,因此两者之间是否具有相关性值得探讨。

本研究结果发现不同治疗反应组中,放疗至第 5 次分割时 ADC 值与治疗前 ADC 值的差值即 Δ ADC 显示出差异性,高 Δ ADC 值预示着食管癌放化疗敏感性好,反之,则治疗敏感性差。这可能与治疗过程中 ADC 值升高,瘤体组织中水分子弥散受限得到改善,从而使得瘤体组织内渗透压力改变,增加了药物及氧气输注,高 Δ ADC 预示着弥散受限改善良好,基础研究也证实了相关表现^[13,14]。DWI 用于预测食管癌的治疗研究鲜见报道,De Cobelli 等^[15]

将 DWI 用于食管胃交界癌新辅助治疗疗效监测,发现“治疗前后”ADC 变化(Δ ADC)与食管癌组织消退分级(TRG)之间呈负相关性,而食管癌的 TRG 直接与患者预后相关,因此认为 Δ ADC 与肿瘤治疗反应相关,并得出 Δ ADC 的切点值,用以预测治疗相关反应。然而,仍存在着一些不同的研究,Chen 等^[16]利用 DWI 评价动物转移瘤治疗疗效,分别给予治疗前、治疗后第 1、3、7d DWI 检查,“治疗后”ADC 值可以用于评价转移瘤放疗疗效评价,而支持治疗

前高 ADC 预示治疗反应差的实验则认为“治疗前”高 ADC 值预示细胞坏死成分多,血供差合并氧供差,预示对放化疗抵抗^[17,18]。因此,ADC 值作为预测食管癌放化疗敏感性的生物靶标价值值得肯定,然而究竟是治疗前 ADC 值,还是治疗后 ADC 值,抑或是治疗前后 ADC 变化值与治疗疗效相关,以及治疗后监测时机问题,尚需进一步研究。

另外,我们前期研究显示辐射抵抗食管癌细胞株高表达 SIRT1,可能与其介导 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活性参与食管癌的辐射抵抗有关,而既往研究已明确 PI3K/PTEN/Akt 通路参与肿瘤细胞的侵袭、凋亡及化疗抵抗^[19,20]。本研究中,缓解反应组低表达 SIRT1,稳定组高表达 SIRT1,从临床角度进一步证实了 SIRT1 可能参与食管癌辐射抵抗的发生, SIRT1 蛋白有可能成为食管癌放化疗敏感性的“分子标记”。另外,线性相关分析结果显示 SIRT1 与 Δ ADC 值之间具有较强的负性线性相关性,将临床靶标与分子生物学靶标有机整合,相互佐证。我们推测 ADC 值变化率与 SIRT1 表达水平之间负性线性相关性可能与 Δ ADC 值反映的细胞密度变化正好与治疗前肿瘤细胞 SIRT1 表达水平相吻合。据笔者

了解,日本学者做过类似整合研究,分析了 ADC 值与 VEGF 表达之间的相关性,揭示了 ADC 值与 VEGF 之间的负性线性相关性,将分子标记物同临床生物靶标相结合^[21]。上述研究将 ADC 值与预测肿瘤治疗敏感性的蛋白分子相关联,充分阐释了 ADC 预测肿瘤放化疗敏感性的价值。本研究不足之处在于样本量较小,亟待大样本量进一步加以证实。

总之,磁共振弥散加权成像参数 ADC 值在早期预测食管癌放化疗敏感性中具有一定的临床价值,其作为“生物靶标”预测食管癌放化疗敏感性与食管癌组织相关蛋白分子表达之间具有一定的相关性。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Taylor LJ,Greenberg CC,Lidor AO,et al. Utilization of surgical treatment for local and locoregional esophageal cancer:analysis of the National Cancer Data Base [J]. Cancer,2017,123(3):410-419.
- [3] Schiedel M,Robaa D,Rumpf T,et al. The current state of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets[J]. Med Res Rev,2018,38(1):147-200.
- [4] Karbasforooshan H,Roohbakhsh A,Karimi G. SIRT1 and microRNAs:The role in breast,lung and prostate cancers [J]. Exp Cell Res,2018,367(1):1-6.
- [5] Cao B,Shi Q,Wang W. Higher expression of SIRT1 induced resistance of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin[J]. J Thorac Dis,2015,7(4):711-719.
- [6] Ling S,Li J,Shan Q,et al. USP22 mediates the multidrug resistance of hepatocellular carcinoma via the SIRT1/AKT/MRP1 signaling pathway[J]. Mol Oncol,2017,11(6):682-695.
- [7] Chen G,Zhang B,Xu H,et al. Suppression of Sirt1 sensitizes lung cancer cells to WEE1 inhibitor MK-1775-induced DNA damage and apoptosis[J]. Oncogene,2017,36(50):6863-6872.
- [8] Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks [J]. Mutat Res,2017,803-805:51-55.
- [9] Qiu L,Ding ZX,Xie TM,et al. Reproducibility of ADC value on DWIMR in measurement of primary tumors for patients with esophageal cancer [J]. Journal of Chinese Oncology,2017,23(12):1074-1078. [裴丽,丁忠祥,谢铁明,等. 基于 DWI 磁共振成像技术测量食管癌原发灶 ADC 值观察者内与观察者间一致性的临床研究[J]. 肿瘤学杂志,2017,23(12):1074-1078.]
- [10] Ye Z,Fang J,Dai S,et al. Inter- and intra-observer reproducibility of ADC measurements in esophageal carcinoma primary tumors[J]. Oncotarget,2017,8,(54):92880-92889.
- [11] Ye Z,Fang J,Dai S,et al. MicroRNA-34a induces a senescence-like change via the down-regulation of SIRT1 and up-regulation of p53 protein in human esophageal squamous cancer cells with a wild-type p53 gene background[J]. Cancer Lett,2016,370(2):216-221.
- [12] Ye ZM,Dai SJ,Yan FQ,et al. DCE-MRI-derived volume transfer constant (Ktrans) and DWI apparent diffusion coefficient as predictive markers of short- and long-term efficacy of chemoradiotherapy in patients with esophageal cancer [J]. Technol Cancer Res Treat,2018,1 (17):1533034618765254.
- [13] Chandarana H,Kang SK,Wong S,et al. Diffusion-weighted intravoxel incoherent motion imaging of renal tumors with histopathologic correlation[J]. Invest Radiol,2012,47(12):688-96.
- [14] Hamstra DA,Lee KC,Moffat BA,et al. Diffusion magnetic resonance imaging:an imaging treatment response biomarker to chemoradiotherapy in a mouse model of squamous cell cancer of the head and neck[J]. Transl Oncol,2008,1(4):187-194.
- [15] De Cobelli F,Giganti F,Orsenigo E,et al. Apparent diffusion coefficient modifications in assessing gastro-esophageal cancer response to neoadjuvant treatment:comparison with tumour regression grade at histology [J]. Eur Radiol,2013,23(8):2165-2174.
- [16] Chen J,Sheng J,Xing W,et al. Monitoring early response of lymph node metastases to radiotherapy in animal models:diffusion-weighted imaging vs. morphological MR imaging[J]. Acta Radiol,2011,52(9):989-994.
- [17] Monguzzi L,Ippolito D,Bernasconi DP,et al. Locally advanced rectal cancer:Value of ADC mapping in prediction of tumor response to radiochemotherapy [J]. Eur Radiol,2013,82(2):234-240.
- [18] Koh DM,Scurr E,Collins D,et al. Predicting response of colorectal hepatic metastasis:value of pretreatment apparent diffusion coefficients [J]. AJR Am J Roentgenol,2007,188(4):1001-1008.
- [19] Ming GF,Tang YJ,Hu K,et al. Visfatin attenuates the ox-LDL-induced senescence of endothelial progenitor cells by upregulating SIRT1 expression through the PI3K/Akt/ERK pathway[J]. Int J Mol Med,2016,38(2):643-649.
- [20] Hildebrandt MA,Yang H,Hung MC,et al. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway are associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy[J]. J Clin Oncol,2009,27(6):857-871.