

网络出版时间: 2018-4-27 9:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180426.1411.030.html>

STIL 在肝细胞癌中高表达及其预后价值

袁勇刚^{1,2}, 李文娟³, 周杭城⁴, 彭燕⁴, 王伟¹, 胡冰¹

摘要 目的 探索 STIL 在肝细胞癌(肝癌)患者中的表达水平及其预后意义。方法 采用癌症公共数据库 Oncomine 和 TCGA 对 STIL 基因的表达情况和预后价值进行生物信息学预测; 回顾性收集 67 例肝癌患者癌与配对癌旁正常组织标本, 应用免疫组化的方法对 STIL 基因蛋白表达水平进行检测; 最后通过 Kaplan-Meier 单因素和 Cox 多因素分析探索 STIL 表达水平与肝癌患者预后的关系。结果 Oncomine 数据库预测 STIL 基因 mRNA 水平在肝癌组织中显著高于正常组织 ($P < 0.05$), TCGA 数据显示 STIL 基因 mRNA 水平高表达的肝癌患者预后明显差于低表达者 ($P = 0.003$)。免疫组化结果证实了上述预测结果, 肝癌中 STIL 蛋白水平呈现高表达 ($P < 0.001$), 且高表达 STIL 的肝癌患者预后差于低表达者 ($P < 0.001$), 单因素及多因素生存分析均提示: STIL 高表达可以作为肝癌患者预后不佳的独立预测因子 (P 值均 < 0.001)。结论 STIL 基因在肝癌中高表达, 且高表达的 STIL 可以作为预测肝癌患者预后不佳的独立预测因子。未来 STIL 基因有望成为肝癌患者治疗的新靶点。

关键词 肝细胞癌; STIL; 预后; 生物信息学

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)05-0801-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.030

肝细胞癌, 简称肝癌, 是常见的消化道恶性肿瘤之一, 具有易侵袭转移等特点, 患者预后极差^[1-2]。目前有关肝癌诊疗及找寻预测预后的有效生物学指标是该领域的研究热点。STIL(SCL/TAL1 interrupting locus, STIL) 基因是从人类急性 T 淋巴细胞白血病相关染色体重排中克隆而来, 其进化高度保守, 主要与中心体形成及数目调控、纺锤体形成和染色体分离密切相关^[3-4]。研究^[5-6]表明, STIL 还可作为一种癌基因在肺癌、胰腺癌等组织中表达增高, 且其高表达与肿瘤侵袭及预后有关, 但在肝癌中的表达及预后意义尚未见详细报道。该研究采用生物信息

学预测结合免疫组化验证的方法探讨 STIL 在肝癌中的表达水平及其预后价值。

1 材料与方法

1.1 生物信息学预测 选择癌症公共数据库 Oncomine 和 TCGA 进行生物信息学预测。在 Oncomine 数据库中输入基因名“STIL”和差异基因分析模块输入“Hepatocellular carcinoma vs normal”检索分析结果; 下载 TCGA 数据库中的肝癌数据, 共有 364 例肝癌患者具有 STIL 基因表达的信息, 按其表达水平高低降序排列, 排名前 50% 计为 STIL 高表达(182 例), 排名后 50% 计为 STIL 低表达(182 例), 而后与患者的总生存期(overall survival, OS) 关联, 运用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。

1.2 肝癌患者标本及其临床病理资料 回顾性收集 2010 年 6 月~2016 年 9 月在安徽医科大学附属省立医院行肝切除术的肝癌患者(共计 67 例)的癌与癌旁配对的石蜡组织标本, 术后病理均证实肝癌, 随访时间截止到 2017 年 9 月。患者相关的临床信息包括: 性别、年龄、肿瘤大小、有无肝硬化、有无脉管侵犯、TNM 分期等。本研究已经安徽医科大学附属省立医院伦理委员会审批, 所有患者已签署知情同意书。

1.3 免疫组化染色及结果判读 采用免疫组织化学染色 SP 法对上述标本进行检测, 具体操作方法按照试剂说明书进行。一抗为 STIL 兔多克隆抗体(货号: ab222838), 购自英国 Abcam 公司, 工作浓度为 1:500。染色结果判读: 结果采用盲法测定, 每张切片均由两名病理科医师进行独立判断, 参照之前的判读方法^[7], 根据染色强度(staining intensity, SI) 乘以染色阳性细胞数(percentage of positive cells, PP) 的百分比计算免疫反应性评分(IRS), 详细评分标准如下: SI(0~3 分): 0 为阴性, 1 例为弱阳性, 2 例为中度阳性, 3 例为强阳性; PP(0~4 分): 0 为阴性, 1 为 1%~25%, 2 为 26%~50%, 3 为 51%~75%, 4 为 76%~100%。IRS 评分范围为 0~12 分, 若 IRS > 4 分, 则计为 STIL 高表达; 若 IRS ≤ 4 分, 则定义为 STIL 低表达。

2018-02-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81201906)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 肿瘤科、³ 西区肿瘤内科、⁴ 病理科, 合肥 230001

² 庐江县人民医院肿瘤科, 合肥 231500

作者简介: 袁勇刚, 男, 硕士研究生;

胡冰, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hubing3756@sina.com

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。公共数据库 Oncomine 和 TCGA 下载的肝癌与正常组织数据之间的对比采用两独立样本 t 检验。率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法, Kaplan-Meier 法(log-rank test) 进行单因素生存分析, 而后将在单因素生存分析有意义的因素代入进行 Cox 多因素生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌及癌旁组织中 STIL 的表达水平 Oncomine 数据库共检索到 4 项有关“肝细胞癌 vs 正常肝

组织”的研究涉及到有 STIL 基因 mRNA 表达水平的信息(图 1), 结果均显示: 与正常肝组织相比, STIL 基因 mRNA 在肝癌中呈现显著高表达, 差异有统计学意义。随后, 为验证上述预测结果, 采用免疫组化法对 67 例肝癌和癌旁配对组织进行检测, 结果显示: STIL 蛋白主要表达于肝癌细胞质中(图 2A), 其在肝癌中高表达阳性率为 65.7%, 而在配对癌旁正常组织中多为低表达(图 2B), 高表达阳性率仅为 37.3%, 两组的表达率差异有统计学意义($\chi^2 = 10.786, P = 0.001$), 见表 1。这一蛋白表达结果与 Oncomine 数据库预测的 mRNA 表达结果相一致。

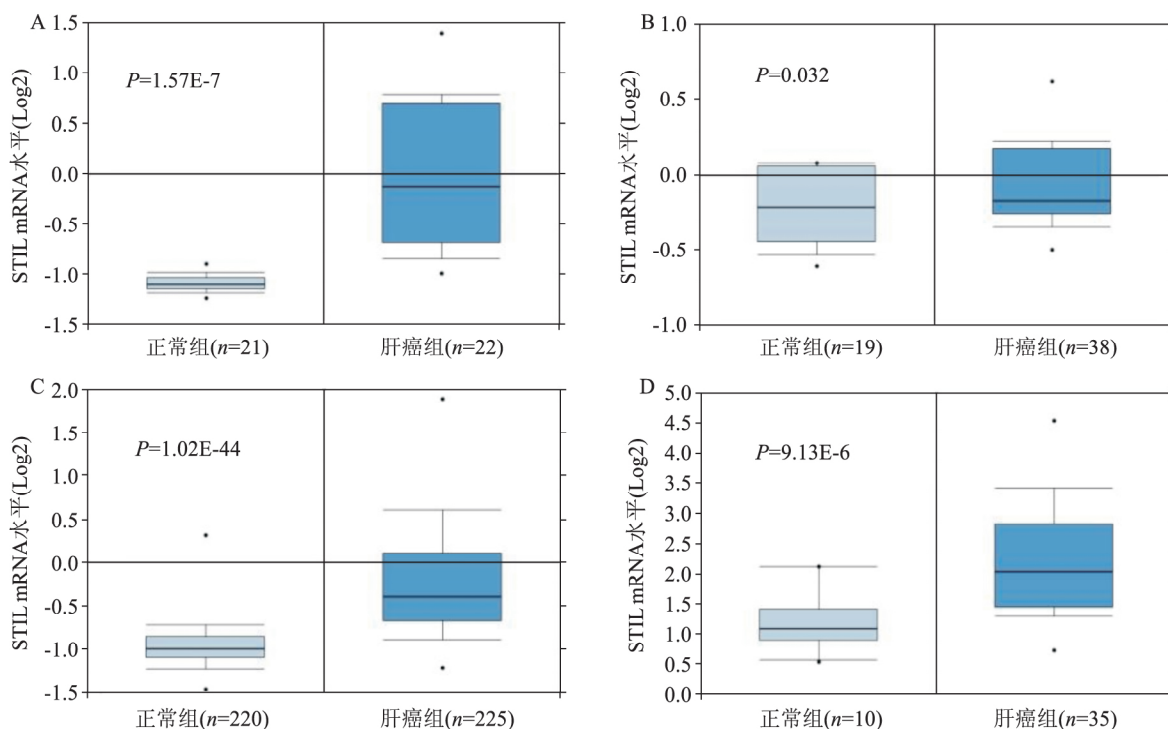


图1 Oncomine 数据库预测 STIL 基因在肝癌中高表达

A: Roessler Liver(GEO: GSE14520); B: Mas Liver(GEO: GSE14323); C: Roessler Liver 2(GEO: GSE14520); D: Wurnbach Liver(GEO: GSE6764)

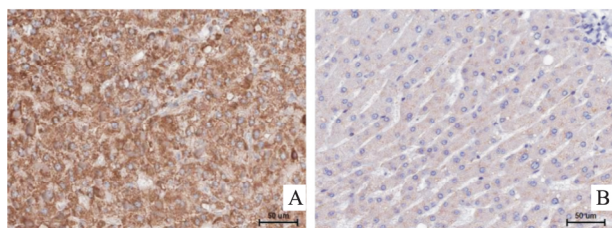


图2 STIL 基因在肝癌及癌旁正常组织中的蛋白表达水平(bar = 50 μ m)

A: STIL 在肝癌组织中高表达; B: STIL 在癌旁正常组织中低表达

2.2 肝癌中 STIL 的差异表达与患者临床病理参数的关系 随后, 对肝癌中 STIL 差异表达水平与患

表1 STIL 在肝癌及配对癌旁组织中的蛋白表达水平 [n(%)]

标本类型	STIL 表达水平		χ^2 值	P 值
	高水平	低水平		
肝癌组织	44(65.7)	23(34.3)	10.786	0.001
配对癌旁组织	25(37.3)	42(62.7)		

者的各项临床病理参数的关系进行检测显示(表 2): STIL 的不同表达水平(高表达 vs 低表达) 与患者的年龄(≤ 60 岁 vs > 60 岁)、性别(男性 vs 女性)、Edmondson 分级(I ~ II 级 vs III ~ IV 级)、肿瘤大小(≤ 5 cm vs > 5 cm)、脉管侵犯(有 vs 无) 及肝硬化(有 vs 无) 指标差异均有统计学意义, 而仅与

TNM 分期(I ~ II 期 *vs* III ~ IV 期) 有关($P = 0.006$)。

表 2 STIL 差异表达水平与肝癌患者各临床病理参数的关系(n)

参数	n	STIL 表达水平		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄(岁)					
≤60	52	6	16	1.305	0.253
>60	15	8	7		
性别					
男	8	4	4	0.975	0.323 ^a
女	59	40	19		
Edmondson 分级					
I ~ II	42	29	13	0.569	0.451
III ~ IV	25	15	10		
肿瘤大小(cm)					
≤5	30	18	12	0.775	0.379
>5	37	26	11		
脉管侵犯					
有	7	6	1	1.372	0.241 ^a
无	60	38	22		
肝硬化					
有	31	17	14	3.003	0.083
无	36	27	9		
TNM 分期					
I ~ II	34	17	17	7.520	0.006
III ~ IV	33	27	6		

^a 表示采用 Fisher 精确概率法,其余应用 χ^2 检验

2.3 肝癌中 STIL 的表达预测患者预后的价值
对 STIL 基因差异表达水平与肝癌患者预后的关系进行探索。TCGA 数据库预测的结果显示: STIL 基因 mRNA 水平高表达的肝癌患者预后显著差于其低表达患者(图 3A, $P = 0.003$)。为验证这一结果,随后对免疫组化检测的结果进行统计分析显示: 与之相似, STIL 基因蛋白高表达的肝癌患者的生存时间显著低于其低表达者,差异有统计学意义(图 3B, $P < 0.001$); Kaplan-Meier 单因素生存分析显示: STIL 表达水平(高表达 *vs* 低表达)、脉管侵犯(有 *vs* 无) 以及 TNM 分期(I - II 期 *vs* III - IV 期) 是影响肝癌患者生存时间差异的显著因素(表 3); 而将这 3 个有意义的单因素代入 Cox 多因素生存分析中显示: STIL 表达水平以及 TNM 分期可作为肝癌患者预后的独立预测因子($P < 0.001$, $P = 0.001$), 见表 4。

3 讨论

肝癌在我国属于较常见高发的恶性消化道肿

表 3 肝癌患者的 Kaplan-Meier 单因素生存分析

单参数	平均生存时间(月)	95% CI	P 值
STIL 表达水平			
高表达	23.074	17.165 ~ 28.983	<0.001
低表达	58.466	49.793 ~ 67.139	
年龄(岁)			
≤60	33.899	26.156 ~ 41.641	0.151
>60	48.667	35.469 ~ 61.864	
性别			
男	43.625	22.704 ~ 64.546	0.392
女	36.360	29.122 ~ 43.599	
Edmondson 分级			
I ~ II	40.030	31.157 ~ 48.902	0.245
III ~ IV	32.738	22.279 ~ 43.198	
肿瘤大小(cm)			
≤5	44.788	34.576 ~ 54.999	0.078
>5	31.459	22.571 ~ 40.346	
脉管侵犯			
有	16.286	3.395 ~ 29.176	0.020
无	39.721	32.465 ~ 46.978	
肝硬化			
有	40.079	29.463 ~ 50.695	0.524
无	35.283	26.350 ~ 44.216	
TNM 分期			
I ~ II	48.842	39.620 ~ 58.063	0.001
III ~ IV	22.240	15.790 ~ 28.691	

表 4 肝癌患者的 Cox 多因素生存分析

因素	HR(95% CI)	P 值
STIL 表达水平(高 <i>vs</i> 低)	3.989(1.778 ~ 8.953)	0.001
脉管侵犯(有 <i>vs</i> 无)	2.382(0.957 ~ 5.925)	0.062
TNM 分期(I ~ II <i>vs</i> III ~ IV)	1.985(1.029 ~ 3.831)	0.041

瘤,具有富血管性、易复发转移等特点,其常见治疗手段包括肝切除术、肝移植、TACE 介入治疗等,但对传统的化疗药物不敏感,患者一般预后较差。因此,进一步探索及开发有价值的生物标志物来预测疗效或成为靶向治疗的有效药物显得尤为必要和迫切。STIL 基因属于中心粒复制相关因子,源于与人类急性淋巴细胞白血病相关染色体重排克隆,近期有研究^[8-9]表明其可通过调节中心体结构与数目,影响染色体不稳定性形成,参与恶性肿瘤的发生和发展。但 STIL 基因在肝癌中的表达情况及其是否对肝癌患者的预后预测价值尚不清楚。

因此在本实验中,首先运用生物信息学的方法,在 Oncomine 公共数据库预测到 STIL 基因在肝癌组织中的表达明显高于正常组织($P < 0.05$); 然后,采用免疫组化的方法对收集的 67 例肝癌及配对的癌旁组织进行检测显示: 与正常肝组织相比, STIL 蛋白在肝癌组织中显著高表达,差异有统计学意义(P

<0.001)。这一真实数据结果与生物信息学预测结果相一致。事实上,STIL 基因在已报道的多种恶性肿瘤中呈现高表达,如肺癌^[8]、结肠癌^[9]、胰腺癌^[10]及胃癌^[11]。这些结果也一定程度上提示:STIL 基因在恶性肿瘤中可能扮演着促癌基因的角色参与着肿瘤发生发展等生物学进程。

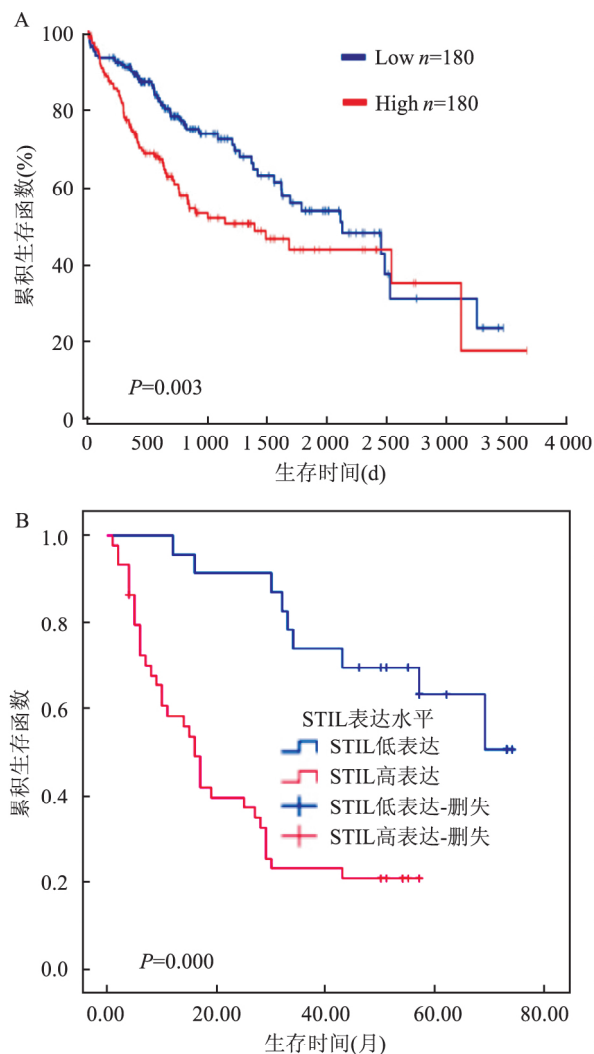


图3 基于 STIL 差异表达水平应用 Kaplan-Meier 法绘制的总生存曲线

A: 基于 TCGA 数据库预测的 STIL 基因 mRNA 水平与总生存期曲线; B: 基于真实数据 STIL 基因蛋白水平与总生存曲线

随后,又对 STIL 基因表达水平与肝癌患者的临床预后意义进行了探索。首先相关性分析显示:STIL 的差异表达与肝癌患者的 TNM 分期有关;随后运用 Kaplan-Meier 单因素生存分析(log-rank test 法)显示:STIL 高与低的差异表达水平、有无脉管侵犯以及 TNM 不同分期的肝癌患者其生存时间差异具有统计学意义;而将这 3 个有意义的单因素代入

Cox 多因素生存分析显示:STIL 高表达以及 TNM 分期(Ⅲ-Ⅳ)是可作为预测肝癌患者预后不佳的独立预测因子。这一结果与利用 TCGA 公共数据库的数据预测结果相一致。而在其它恶性肿瘤中,研究者们也发现与之类似的现象:STIL 基因高表达可以促进肿瘤细胞增殖、生长、侵袭转移。上述结果提示:STIL 基因高表达预示着肝癌患者预后不佳,该基因可能是参与肝癌生长、转移等过程的关键靶点基因,但其详细机制尚不清楚。

综上,本研究结果证实 STIL 基因在肝癌中高表达,且高表达的 STIL 可以作为预测肝癌患者预后不佳的独立预测因子。未来 STIL 基因有望成为肝癌患者治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics,2017 [J]. CA Cancer J Clin,2017,67(1): 7 - 30.
- [2] Llovet J M, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers,2016,2: 16018.
- [3] Izraeli S, Colaizzo-Anas T, Bertness V L, et al. Expression of the SIL gene is correlated with growth induction and cellular proliferation [J]. Cell Growth Differ, 1997,8(11): 1171 - 9.
- [4] Curry J D, Smith M T. Measurement of SIL-TAL1 fusion gene transcripts associated with human T-cell lymphocytic leukemia by real-time reverse transcriptase-PCR [J]. Leuk Res,2003,27(7): 575 - 82.
- [5] Erez A, Perelman M, Hewitt S M, et al. Sil overexpression in lung cancer characterizes tumors with increased mitotic activity [J]. Oncogene, 2004,23(31): 5371 - 7.
- [6] Kasai K, Inaguma S, Yoneyama A, et al. SCL/TAL1 interrupting locus derepresses GLI1 from the negative control of suppressor-of-fused in pancreatic cancer cell [J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7723 - 9.
- [7] Wang W, Zhang M, Peng Y, et al. Ubiquitin associated protein 2-like (UBAP2L) overexpression in patients with hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. Med Sci Monit,2017, 23: 4779 - 88.
- [8] Zhou H, Di Palma S, Preisinger C, et al. Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome [J]. J Proteome Res,2013, 12(1): 260 - 71.
- [9] Erez A, Castiel A, Trakhtenbrot L, et al. The SIL gene is essential for mitotic entry and survival of cancer cells [J]. Cancer Res, 2007,67(9): 4022 - 7.
- [10] 王 举, 张 勇, 高小平, 等. RNA 干扰沉默 STIL 基因表达对胃癌细胞生物学行为的影响 [J]. 国际外科学杂志,2015, 42(10): 684 - 8.

(下转第 808 页)

Clinical application of autologous bone combined with platelet-rich fibrin in alveolar cleft

Jiang Sijing, Rong Jielin, Wang Xinwei, et al

(*Dept of Plastic and Aesthetic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract To evaluate the effect of autologous iliac cancellous bone combined with platelet-rich fibrin in repairing alveolar cleft. 20 patients with alveolar cleft were filled alveolar fissure with autologous iliac cancellous bone. 10 patients were treated with platelet-rich fibrin combined with autologous iliac cancellous bone (study group); other 10 cases were treated with single autologous iliac cancellous bone (control group). Through three-dimensional reconstruction of CT, the situation of bone graft area and clinical effect were observed at all time points. In the observation of the results, the 3D reconstruction of the CT graph: at 3 months and 6 months after operation, it was observed that the bone reabsorption of the control groups were more obvious than that of the experimental groups. 7 cases and 4 cases with satisfactory results were obtained respectively in test and control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Iliac cancellous bone mixed with platelet-rich fibrin has a better clinical effect on the repair of alveolar cleft than single bone graft.

Key words platelet-rich fibrin; alveolar cleft; autologous iliac

(上接第 804 页)

Overexpression of STIL in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance

Yuan Yonggang^{1,2}, Li Wenjuan³, Zhou Hangcheng⁴, et al

(¹Dept of Medical Oncology, ³Dept of Medical Oncology in West District, ⁴Dept of Pathology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001; ²Dept of Medical Oncology, Lujiang County Hospital, Hefei 231500)

Abstract Objective To explore the expression levels of STIL in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and its prognostic significance. **Methods** The expression and prognostic value of STIL gene were initially predicted by Oncomine and TCGA. And then, 67 cases of HCC patients tissue samples and matched normal tissues were retrospectively collected and STIL expression level was measured by immunohistochemistry. Kaplan-Meier univariate and Cox multivariate analyses were used to explore the relationship and prognostic value between STIL expression and HCC patients. **Results** The Oncomine database predicted that the mRNA level of STIL gene was significantly higher in HCC than that of normal tissues ($P < 0.05$). TCGA data showed that HCC patients with high mRNA expression of STIL gene had significantly lower overall survival (OS) than that of patients with STIL low expression ($P = 0.003$). Subsequent immunohistochemical results confirmed the above predictive results, and the levels of STIL protein in HCC were highly expressed ($P = 0.001$). HCC patients with high protein expression of STIL had dramatically decreased OS than that of patients with STIL protein low expression ($P < 0.001$). Univariate and multivariate survival analyses revealed that STIL high expression could be used as an independent predictor of poor prognosis in HCC patients (all P values < 0.001). **Conclusion** STIL gene is highly expressed in HCC and high expression of STIL may be used as an independent predictor of poor prognosis in HCC patients. STIL gene is expected to be a new potentially therapeutic target for the treatment of HCC patients.

Key words hepatocellular carcinoma; STIL; prognosis; bioinformatics