

SPAG5 在原发性乳腺癌中的表达与 TEC 方案新辅助化疗敏感性的关系

王俊艳¹ 吴正升² 裴静¹ 任敏¹ 王本忠¹

摘要 目的 观察精子相关抗原 5 (SPAG5) 在乳腺癌组织中的表达, 探讨其表达情况与临床病理因素及 TEC 方案 (T: 多西他赛, E: 表柔比星, C: 环磷酰胺) 新辅助化疗疗效之间的关系。方法 收集 107 例接受 TEC 方案新辅助化疗的乳腺癌患者化疗前的组织标本, 通过免疫组织化学法检测各标本中 SPAG5 蛋白的表达, 结合临床病理因素及新辅助化疗疗效进行分析。结果 107 例原发性乳腺癌组织中 SPAG5 蛋白高表达率 48.6% (52/107), 与人类表皮生长因子受体 2 过表达呈正相关性 ($P=0.000$), 与细胞增殖核抗原过表达呈正相关性 ($P=0.019$)。SPAG5 的表达在患者年龄、肿瘤大小、肿瘤分期、组织学分级、淋巴结状况、雌激素受体及孕激素受体的表达情况中均差异无统计学意义。化疗总体客观缓解 (OR) 率为 70.1% (75/107), 其中病理完全缓解 (pCR) 率 9.3% (10/107), SPAG5 高表达组 OR 率为 82.7% (43/52), 低表达组 56.1% (32/57), 差异有统计学意义 ($P=0.006$)。SPAG5 高表达组 pCR 率为 15.4% (8/44), SPAG5 低表达组 pCR 率为 3.6% (2/53), 差异有统计学意义 ($P=0.048$)。结论 SPAG5 作为肿瘤增殖指标, 其表达状态对于乳腺癌患者 TEC 方案新辅助化疗的疗效具有预测作用。

关键词 SPAG5; 增殖指标; 乳腺肿瘤; 新辅助化疗; TEC
中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1704-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.027

乳腺癌的患病率近年来呈明显上升, 且成年轻化趋势; 然而其死亡率明显下降, 这得益于全身系统性治疗。辅助性化疗作为一种非靶向全身性治疗应用最为广泛, 其中新辅助化疗不仅为晚期乳腺癌患者提高可手术切除率, 更为部分具有保乳要求的年轻患者提高了保乳概率; 而且经新辅助化疗达到病理完全缓解 (pathological complete response, pCR) 的患者生存期明显延长, 远期预后良好。然而仍有约

30%^[1] 患者新辅助化疗期间出现疾病进展, 不仅影响治疗, 药物的毒副作用进一步损害了患者健康, 鉴别出对细胞毒药物敏感的乳腺癌患者意义重大。由于乳腺癌肿瘤的异质性, 目前尚无准确预测新辅助化疗疗效的肿瘤标志物, 不能满足“个体化精准治疗”要求。精子相关抗原 5 (sperm associated antigen 5, SPAG5) 主要表达于精子细胞的抗原, 其他正常组织几乎不表达。近年来发现其在宫颈癌、乳腺癌及非小细胞肺癌中有不同程度表达^[2-4]。SPAG5 作为纺锤体结合蛋白与肿瘤的发生发展关系密切^[5]。该研究旨在通过检测 SPAG5 在原发乳腺癌中的表达情况及与临床病理特征的关系, 进一步探讨与新辅助化疗疗效之间的关系, 以期寻找能准确预测疗效的生物分子指标。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2013 年 2 月~2016 年 2 月就诊于安徽医科大学第一附属医院行新辅助化疗并接受手术的 107 例女性乳腺浸润性导管癌患者的资料, 年龄 25~77 (48.12±8.95) 岁。患者入组标准: ① 依据《美国癌症联合会 (AJCC) 癌症分期手册》第 7 版标准, 纳入患者均为临床分期 II 或 III 期; ② 无其他恶性肿瘤病史, 排除远处转移; ③ 患者的临床一般情况及临床病理资料完整; ④ 所有入组患者采用中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范推荐多西他赛+表柔比星+环磷酰胺联合方案 (TEC), 除疾病进展外均按预定方案完成 6 周期化疗; ⑤ 人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 阳性的乳腺癌患者术前均未接受曲妥珠单抗的治疗; ⑥ 所有患者化疗前经空芯针活检病理确诊为浸润性导管癌, 有临床可测量的病灶。排除标准: ① 行乳腺肿物切除活检术确诊乳腺癌而无法判断肿瘤大小的患者; ② 经影像学检查显示有远处转移; ③ 伴有心脏、肝肾疾病及其他严重疾病, 而不能化疗或手术的患者; ④ 哺乳期和妊娠期乳腺癌患者; ⑤ 临床资料不完整的患者; ⑥ 发生严重的化疗毒性反应导致化疗推迟超过 2 周或提前终止的

2017-07-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81472493); 安徽省自然科学基金 (编号: 1608085MH238)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 乳腺外科、² 病理科, 合肥 230022

作者简介: 王俊艳, 女, 硕士研究生;

王本忠, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangbenzhong2459@126.com

患者。化疗方案:多西他赛 75 mg/m² 静滴(第 1 天) 表柔比星 100 mg/m² 静滴(第 1 天) 环磷酰胺 500 mg/m² 静滴(第 1 天) 21 d 为 1 个周期,共 6 个周期,所有周期用重组人粒细胞集落刺激因子支持。

1.2 方法

1.2.1 疗效判定 每完成一次新辅助化疗后均行 B 超检查检测肿物大小变化,并结合临床体检和术后病理结果综合判断化疗疗效。临床完全缓解指临床手段未发现乳腺肿物。部分缓解指乳腺肿物最大径乘积缩小 $\geq 50\%$ 。疾病稳定指乳腺肿物最大径乘积缩小 $< 50\%$ 增大 $< 25\%$ 。疾病进展指靶病灶最大径乘积增加 $\geq 25\%$ 。客观缓解(objective response, OR) 率指肿瘤缩小达到一定量并且保持一定时间的患者的比例,包括临床完全缓解 + 部分缓解的病例。pCR 指在肿瘤原发灶未发现浸润性癌细胞,即原发灶中未发现残余癌细胞或仅存原位癌成分,同时腋窝淋巴结未发现肿瘤细胞。

1.2.2 免疫组化检测及结果判读 采用 SP 二步法免疫组化检测 SPAG5 蛋白(bs-0717R),一抗购自北京博奥森生物有限公司,二抗试剂盒(PV-6000) 购自北京中杉生物技术有限公司。所有穿刺标本经 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,连续 4 μm 切片,经脱蜡、水化,微波修复 20 min 和 3% 过氧化氢孵育 5 min, PBS 冲洗;滴加一抗,SPAG5 兔抗人单克隆抗体(1:100 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温 40 min, PBS 冲洗,滴加二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, DAB 显色常规复染封片。阴性对照用 PBS 代替一抗,正常睾丸组织作为 SPAG5 阳性对照。SPAG5 主要在细胞质表达,染色以细胞质出现明显的黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色,每个标本随机取 5 个高倍视野,每个视野取 100 个细胞进行阳性细胞率计数,取平均值记为最终结果。SPAG5 表达阳性细胞率 $> 10\%$ 视为阳性^[6], $< 10\%$ 为阴性(-), 10% ~ 30% 为弱阳性(+), 30% ~ 50% 为中度阳性(2+), $> 50\%$ 分为强阳性(3+)。其中阴性和弱阳性视为低表达,中度阳性和强阳性视为高表达。雌激素受体(estrogen receptor, ER) 和孕激素受体(progesterone receptor, PR) 阳性为肿瘤细胞核染色任何强度着色阳性百分比 $\geq 1\%$; HER2 免疫组化 2+ 行 Fish 检测进一步明确。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。样本率之间比较采用 χ^2 检验。蛋白表达的相关性采用 Spearman 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPAG5 在乳腺癌组织中的表达情况及与临床病理因素关系 SPAG5 在乳腺癌组织中表达定位于癌细胞胞质(图 1), 107 例乳腺癌组织中 SPAG5 高表达者占 48.6% (52/107), HER2 阳性患者中 SPAG5 高表达者占 84.1% (37/44), 表达率远高于 HER2 阴性组, 差异有统计学意义($P = 0.000$)。细胞增殖核抗原(Ki67) 过表达患者中 SPAG5 呈高表达, 为 54.9% (45/82), 表达率高于 Ki67 低表达组, 差异有统计学意义($P = 0.019$)。另外 SPAG5 的表达在患者年龄、肿瘤大小、肿瘤分期、组织学分级、淋巴结状况、ER 及 PR 表达情况中均差异无统计学意义。见表 1。

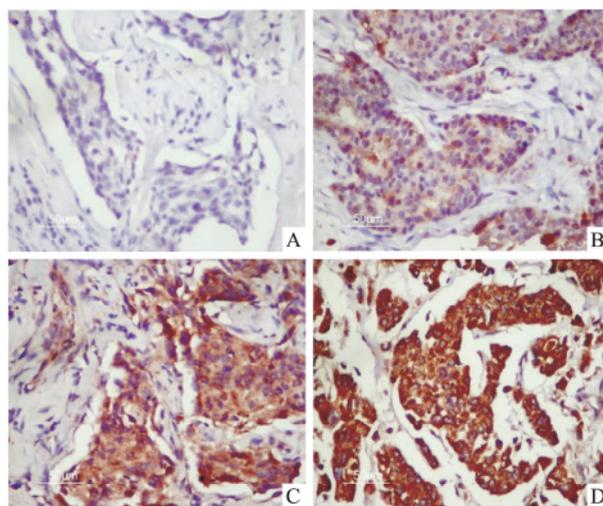


图 1 SPAG5 在乳腺癌组织中表达于细胞质 SP 染色 $\times 50$

A: SPAG5 蛋白(-); B: SPAG5 蛋白(1+); C: SPAG5 蛋白(2+); D: SPAG5 蛋白(3+)

2.2 SPAG5 与 Ki67、HER2 在乳腺癌中的相关性

在乳腺癌组织中 SPAG5 的表达与 Ki67、HER2 的表达呈正相关性($r = 0.222, 0.510, P = 0.019, 0.000$)。见表 2。

2.3 SPAG5 的表达与新辅助化疗疗效之间的关系

107 例患者接受新辅助化疗后临床完全缓解者 25 例(23.4%), 其中 pCR 有 10 例(9.3%), 部分缓解者 50 例(46.7%), 疾病稳定者 18 例(16.8%), 疾病进展者 14 例(13.1%); 化疗总体 OR 率为 70.1% pCR 率 9.3%。在 SPAG5 的高表达组 OR 率为 82.7% (48/52), 低表达组 OR 率为 56.1% (32/57), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。SPAG5 高表达组 pCR 率为 15.4% (8/44), SPAG5 低表达组

pCR 率为 3.6% (2/53) ,Fisher 确切概率法分析差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

表 1 SPAG5 在乳腺癌中的表达以及与临床病理参数的关系 [n(%)]

临床病理参数	总数	SPAG5		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
年龄(岁)					
<50	63(58.9)	34(31.8)	29(27.1)	0.404	0.052
≥ 50	44(41.1)	21(19.6)	23(21.5)		
肿瘤直径(cm)					
<3	42(39.3)	26(24.3)	16(15.0)	3.053	0.081
≥ 3	65(60.7)	29(27.1)	36(33.6)		
淋巴结情况					
N0	38(35.5)	15(14.0)	23(21.5)	3.356	0.067
N+	69(64.5)	40(37.4)	29(27.1)		
组织学分级					
G1/G2	90(84.1)	47(43.9)	43(40.2)	0.153	0.696
G3	17(15.9)	8(7.5)	9(8.4)		
ER					
-	52(48.6)	27(25.2)	25(23.4)	0.011	0.916
+	55(51.4)	28(26.2)	27(25.2)		
PR					
-	61(57.0)	32(29.9)	29(27.1)	0.063	0.801
+	46(43.0)	23(21.5)	23(21.5)		
Her2					
-	63(58.9)	48(44.9)	15(14.0)	37.686	0.000
+	44(41.1)	7(6.5)	37(34.6)		
Ki67					
<14	25(23.4)	18(16.8)	7(6.5)	5.541	0.019
≥ 14	82(76.6)	37(34.6)	45(42.1)		

表 2 SPAG5 与 Ki67、HER2 的相关性 [n(%)]

分子指标	总数	SPAG5		χ^2 值	r 值	P 值
		低表达	高表达			
Ki67						
<14	25(23.4)	18(16.8)	7(6.5)	5.541	0.222	0.019
≥ 14	82(76.6)	37(34.6)	45(42.1)			
HER2						
-	63(58.9)	48(44.9)	15(14.0)	37.686	0.510	0.000
+	44(41.1)	7(6.5)	37(34.6)			

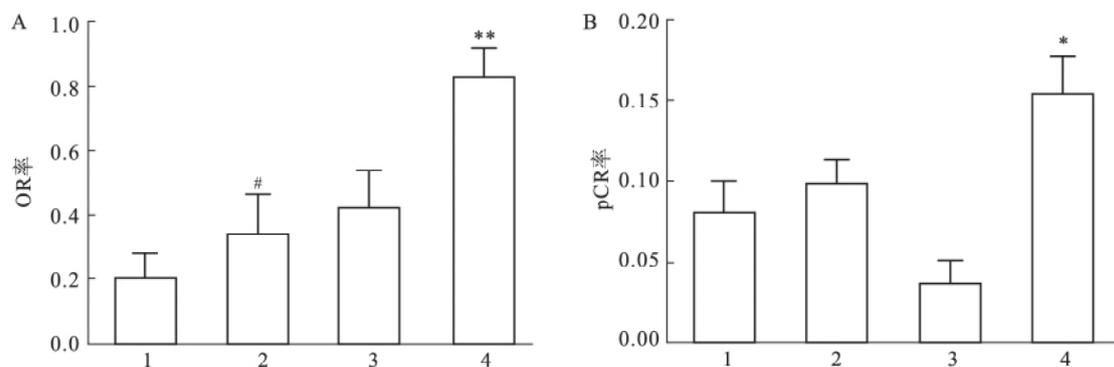


图 2 SPAG5、Ki67 的表达与化疗疗效之间的关系

A: SPAG5、Ki67 的表达与 OR 率的关系; B: SPAG5、Ki67 的表达与 pCR 率的关系; 1: Ki67 < 14%; 2: Ki67 $\geq 14\%$; 3: SPAG5 低表达; 4: SPAG5 高表达; 与 Ki67 < 14% 比较: $^{\#} P < 0.05$; 与 SPAG5 低表达比较: $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$

3 讨论

紫杉醇类药物以微管为作用靶点,促使微管装配并阻止其解聚,形成稳定的非功能性的微管束,从而破坏肿瘤细胞的有丝分裂。蒽环类药物为细胞周期非特异性药物,通过嵌入 DNA 链的碱基之间形成稳定复合物及抑制拓扑异构酶 2 的活性,影响 DNA 超螺旋化成为松弛状态阻碍 DNA 的复制转录,影响细胞的有丝分裂。TEC 方案作为蒽环类联合紫杉醇类方案,是目前乳腺癌新辅助化疗的主要方案之一,应用最为广泛,且疗效显著。然而,有部分患者存在对化疗药物的先天性及获得性耐药,TEC 方案治疗无效不仅延误治疗时机且其产生的药物毒副作用损害患者健康。精准预测乳腺癌患者对 TEC 方案的敏感性具有重要意义。

SPAG5 基因位于染色体 Ch17q11.2,属于纺锤体结合蛋白之一,调控有丝分裂中纺锤体的装配时间及姐妹染色体分离,在细胞周期的 M 期表达升高,SPAG5 表达的高低与细胞的增殖状态密切相关;下调细胞的 SPAG5 蛋白表达,将导致多级异常纺锤体的形成,分裂停止;SPAG5 可以被糖原合成酶-3 β 磷酸化,从而调节纺锤体和着丝粒功能^[7-8]。已有研究^[2]在宫颈癌细胞中显示下调 SPAG5 将抑制细胞增殖促进凋亡,降低肿瘤细胞的侵袭能力。近年来研究^[3-9]显示其在乳腺癌组织中高表达,且与肿瘤组织学分级、P53 的突变以及 HER2 的扩增有关。在乳腺癌组织中,SPAG5 蛋白的表达状态影响患者的预后,高表达患者预后不良,10 年乳腺癌特异性生存率下降^[3];但在行含有蒽环类药物的新辅助化疗的乳腺癌患者中,SPAG5 高表达患者对蒽环类药物更加敏感,拥有相对较长的无复发生存期,SPAG5 是蒽环类新辅助化疗的独立预测因子之一^[9-10]。目前暂无肿瘤细胞 SPAG5 表达状态与蒽环类药物敏感性具体机制的研究,但有研究^[1]通过宫颈癌细胞显示,SPAG5 可以通过雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路促进细胞凋亡来增强肿瘤细胞对紫杉醇药物的敏感性。因此推测 SPAG5 高表达乳腺癌患者对蒽环类药物更加敏感可能与激活 mTOR 信号通路有关。本研究显示在行 TEC 新辅助化疗的乳腺癌患者中,SPAG5 高表达率可高达 48.6%,并与 HER2、Ki67 表达状态相关。SPAG5 高表达患者 OR 率为 82.7%,明显高于低表达组,差异有统计学意义;SPAG5 高表达组 pCR 率为 15.4% (8/44),SPAG5 低表达组 pCR 率为 3.6% (2/53),

差异具有统计学意义,SPAG5 高表达患者对 TEC 方案化疗更加敏感,且更倾向于达到 pCR。本研究中同样显示 SPAG5 表达与 HER2 表达情况密切相关,且呈正相关性($r=0.510$, $P=0.000$)。既往研究^[11]表明 HER2 信号途径的激活可以进一步通过 PI3K-AKT-mTOR 途径促进细胞增殖,参与肿瘤的发生;而 SPAG5 可在氧化应激过程中下调哺乳动物 mTOR 信号转导途径,抑制细胞凋亡,影响肿瘤发生^[5];因此本研究推测 SPAG5 可能与 HER2 共同作用促进肿瘤的发生发展,具体机制有待于进一步研究。

目前用于指导临床化疗方案的预测系统(Onco-type DX、PAM50 index、proliferation signature、genomic grade index)主要是依据多基因表达谱或生物分子的表达状态联合相关临床参数形成的多基因预测模型,其中起主要预测效能的基因大多跟肿瘤的增殖状态有关。Abdel-Fatah et al^[9]利用人工神经网络分析技术发现作为肿瘤细胞增殖指标,SPAG5 比 Ki67 更能代表细胞的增殖状态预测蒽环类药物的疗效,成为独立预测因子之一。本研究表明在 TEC 方案新辅助化疗的乳腺癌患者中 SPAG5 与 Ki67 的表达呈正相关性,SPAG5 高表达组与 OR 率及 pCR 率有关,而 Ki67 过表达组仅与 OR 率有关,未显示与 pCR 率有关。因此 SPAG5 作为肿瘤的增殖指数,更能准确预测 TEC 方案疗效。且相较于多基因预测模型,SPAG5 单基因预测具有检测方便,费用低,易于普及的优点。

本研究中 SPAG5 的表达与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤分期、组织学分级、淋巴结状况、ER 及 PR 表达状况均无关,与以往研究^[3-9]不一致,可能与检测方法及样本量的大小差异有关。鉴于本研究收集患者发病距今时间较短,尚不具备生存因素的分析,进一步的生存分析将揭示 SPAG5 的表达对 TEC 方案新辅助化疗的乳腺癌长期预后的影响。

综上所述,SPAG5 作为肿瘤增殖指标之一,对于 TEC 方案的个体化的选择具有指导意义。在原发性乳腺癌患者中,乳腺癌组织中 SPAG5 的表达与 TEC 方案的疗效有关,高表达患者对此方案更加敏感,可能成为该方案疗效的预测因子。SPAG5 可能成为通过影响肿瘤细胞有丝分裂发挥抗肿瘤作用药物的新靶标,且鉴于其在除了睾丸组织以外的正常组织几乎不表达,全身副作用小,意义重大。目前关于 SPAG5 的临床及基础研究较少,其与肿瘤相关作用机制尚不十分清楚,因此仍需更多相关机制的研究及大量临床实验验证。

参考文献

- [1] Peto R , Davies C , Godwin J , et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 ,000 women in 123 randomised trials [J]. *Lancet* ,2012 ,379(9814) : 432 -44.
- [2] Yuan L J , Li J D , Zhang L , et al. SPAG5 upregulation predicts poor prognosis in cervical cancer patients and alters sensitivity to taxol treatment *via* the mTOR signaling pathway [J]. *Cell Death Dis* ,2015 ,6 : e1784.
- [3] Buechler S. Low expression of a few genes indicates good prognosis in estrogen receptor positive breast cancer [J]. *BMC Cancer* , 2009 9: 243.
- [4] Vällk K , Vooder T , Koled R , et al. Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers [J]. *Oncology* 2010 79(3 -4) : 283 -92.
- [5] Thedieck K , Holzwarth B , Prentzell M T , et al. Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells [J]. *Cell* 2013 ,154(4) : 859 -74.
- [6] Abdel-Fatah TM , Perry C , Dickinson P , et al. Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination(ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings [J]. *Ann Oncol* ,2013 24(11) : 2801 -7.
- [7] Chang M S , Huang C J , Chen M L , et al. Cloning and characterization of hMA-P126 , a new member of mitotic spindle-associated proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 287(1) : 116 -21.
- [8] Cheng T S , Hsiao Y L , Lin C C , et al. Glycogen synthase kinase 3beta interacts with and phosphorylates the spindle-associated protein astrin [J]. *J Biol Chem* 2008 283(4) : 2454 -64.
- [9] Abdel-Fatah T M , Agarwal D , Liu D X , et al. SPAG5 as a prognostic biomarker and chemotherapy sensitivity predictor in breast cancer: a retrospective , integrated genomic , transcriptomic , and protein analysis [J]. *Lancet Oncol* ,2016 ,17(7) : 1004 -18.
- [10] Bartlett J M , McConkey C C , Munro A F , et al. Predicting anthracycline benefit: TOP2A and CEP17-not only but also [J]. *J Clin Oncol* ,2015 33(15) : 1680 -7.
- [11] Kataoka Y , Mukohara T , Shimada H , et al. Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines [J]. *Ann Oncol* ,2010 21(2) : 255 -62.

Correlation between expression of SPAG5 and the sensitivity to TEC regimens neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer

Wang Junyan¹ , Wu Zhengsheng² , Pei Jing¹ , et al

(¹Dept of Breast Surgery ²Dept of Pathology The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the expression of sperm associated antigen5(SPAG5) and discuss the relationship between expression , clinicopathologic characteristics and sensitivity to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. **Methods** The tissue of 107 patients treated with TEC(T: Docetaxel E: Epirubicin C: Cytosan) neoadjuvant chemotherapy with primary breast cancer were collected to measure the expression of SPAG5 by immunohistochemical staining. Data were analysed to investigate the correlation to clinicopathologic factors and chemotherapy response. **Results** The over-expressed rate of SPAG5 from tissues of primary breast cancer was 48. 6% (52/ 107) and proved to be positively correlated to the over-expression of human epidermal growth factor receptor-2($P = 0. 000$) and proliferating cell nuclear antigen($P = 0. 019$) . However there were no significant correlations between age , tumor size , TNM stage , histological grading , lymphnode status and the expression level of estrogen receptor and progesterone receptor. The overall objective response(OR) rate was 70. 1% (75/107) and the pathologic complete response(pCR) rate was 9. 3% (10/107) after neoadjuvant chemotherapy. The objective response rates were 82. 7% (43/52) in SPAG5 over-expression group and 56. 1% (32/57) in low-expression group , and the difference was statistically significant($P = 0. 006$) . The rates of pCR were 15. 4% (8/44) in group of SPAG5 over-expression and 3. 6% (2/53) in low-expression group , which proved significantly different by Fisher exact probability test($P = 0. 048$) . The OR rate and pCR rate of patients with over-expression of SPAG5 were higher than low-expression ones. **Conclusion** SPAG5 as a tumor proliferation index , its expression status for breast cancer patients with TEC regimen neoadjuvant chemotherapy has a predictive effect.

Key words SPAG5; proliferation; breast neoplasms; neoadjuvant chemotherapy; TEC