

Stathmin 在胰腺癌中的表达及意义

黄敏^{1,2},余跃¹,张旭²,丁飞¹,高萌¹,许朝¹,胡闻³

摘要 目的 探讨 Stathmin 在胰腺癌中的表达水平以及与临床、病理特征方面的关系。方法 通过免疫组化法和原位杂交技术分别检测 40 例胰腺癌组织、27 例胰腺癌旁正常组织中 Stathmin 及其 mRNA 的表达情况。结果 Stathmin 在胰腺癌组织的阳性率显著高于胰腺癌旁正常组织 (77.5% vs 7.4%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Stathmin mRNA 的表达阳性率也明显高于癌旁正常组织 (80.0% vs 7.4%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同分化程度、有无淋巴结转移、有无远处转移以及 TNM 分期等方面胰腺癌组织之间的 Stathmin 表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 Stathmin 及其 mRNA 在胰腺癌组织的高水平表达, 与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期密切相关, 提示 Stathmin 可能参与了胰腺癌发生、发展, Stathmin 对胰腺癌的早期诊断及预后判断有重要意义。

关键词 胰腺癌; Stathmin; 免疫组化; 原位杂交

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)03-0446-04

胰腺癌为常见消化道恶性肿瘤之一, 5 年生存率仅 6%^[1]。Stathmin 化学本质是一种微管不稳定磷蛋白, 在细胞周期不同阶段通过磷酸化和去磷酸化作用来影响细胞内微管系统动力状态, 从而对细胞周期的进程变化发挥了至关重要作用。研究^[2]显示 Stathmin 在多种人类恶性肿瘤中呈高水平表达, 但在胰腺癌的过表达现象国内外研究却鲜有报道。该研究通过采用免疫组化、原位杂交方法分析 Stathmin 及 mRNA 在胰腺癌组织高水平表达情况, 探讨其与临床、病理特征方面的关系, 旨在为胰腺癌的早期诊断、预后判断提供一种新的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 临床资料与组织标本 选取安徽医科大学附属省立医院 2009 年 4 月~2014 年 5 月经手术切除治疗, 临床资料完整的胰腺癌患者 40 例, 均经病理组织学检查证实。其中男 23 例, 女 17 例; 年龄 41~73 (60.52 ± 7.54) 岁; 肿瘤 ϕ 2~8 cm; 高、中分化组 18 例, 低分化组 22 例; 无淋巴结转移组 19 例, 有

2016-01-07 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085SQH224)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

² 安徽省蚌埠市第三人民医院消化内科, 蚌埠 233000

³ 安徽医科大学附属省立医院病理科, 合肥 230001

作者简介: 黄敏, 硕士研究生;

余跃, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

yuyuemd@hotmail.com

thyroid carcinoma (PTC). **Methods** Immunohistochemical staining was performed in 100 specimens of PTC and 100 specimens of adjacent normal thyroid tissue to examine the expression of Survivin protein, VEGF protein and EGFR protein. **Results** ① The positive ratios of Survivin, EGFR and VEGF in PTC were 58%, 75% and 84%, which were significantly higher than the expression levels of adjacent normal thyroid tissue. There was all statistical difference between them ($P < 0.05$). ② The positive ratios of Survivin and VEGF in PTC with lymph node metastasis were 73.3% and 90%, which were prominently higher than those without lymph node metastasis. No relationships were found between expression of the makers and other clinicopathological features in PTC. ③ The positive expression rates of EGFR in female patients was 90.2%, dramatically higher than that of male patients 55.6%. There was statistical difference between them ($P < 0.05$). ④ The expressions of Survivin and VEGF were positively correlated in PTC ($\chi^2 = 5.595, P < 0.05, r = 0.237$). **Conclusion** The Survivin, VEGF and EGFR may be involved in the occurrence and development process of PTC. Moreover, Survivin and VEGF may promote the procedure of cancer cell spreading to lymph nodes; there may exist synergistic effect between Survivin and EGFR. The over expression of Survivin, VEGF and EGFR in PTC may provide preliminary experimental basis for the treatment of PTC, which using corresponding targeted drugs.

Key words papillary thyroid carcinoma; Survivin; VEGF; EGFR

淋巴结转移组 21 例;无远处转移组 21 例,有远处转移组 19 例;TNM 分期:Ⅰ期 0,Ⅱ期 19 例,Ⅲ~Ⅳ期 21 例。术前所有患者均没有接受放疗、化疗等相关治疗。选取了同期手术的胰腺癌旁正常组织 27 例作对照。

1.2 主要试剂及探针 鼠抗人的 Stathmin 抗体(英国 Abcam 公司);浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);Stathmin mRNA 的原位杂交试剂盒(武汉博士德公司);Stathmin 基因的寡核苷酸探针序列为:5'-TCTTTCACCTGGATATCAGAAGAAGCCAT-3'。

1.3 方法

1.3.1 应用原位杂交法检测 石蜡切片先脱蜡,再脱水;然后用 3% H_2O_2 来灭活内源性的过氧化物酶,在室温下处理 30 min 之后,再用蒸馏水冲洗;用新鲜配制的胃蛋白酶暴露 mRNA 的核酸片段,37 °C 消化 10~30 min,随后用 PBS 冲洗;湿杂交盒准备:干杂交盒在底部添加 20% 甘油约 20 ml 来保持湿度;预杂交:先滴加些预杂交液,20 μ l/片,再放置于 42 °C 的恒温箱内连续孵育 4 h;杂交:先甩去了玻片上的多余液体,再滴加些杂交液,20 μ l/片,随后将原位杂交的专用盖玻片上保护膜揭开,随即盖在切片上面,再放置于 42 °C 的恒温箱内连续孵育 14 h;杂交之后洗涤:先揭开了盖玻片,再把上述玻片用 30~37 °C 间水温的 2 $\times$ SSC 冲洗 2 次,每次 5 min,之后 0.5 $\times$ SSC 冲洗 1 次,每次 15 min,再后 0.2 $\times$ SSC 冲洗 1 次,每次 15 min;之后滴加上封闭液,予 20 μ l/片,随后放置于 37 °C 恒温箱中 30 min;滴加以生物素化鼠抗地高辛:放置于 37 °C 恒温箱内 60 min,PBS 冲洗;滴加了 SABC:放置于 37 °C 恒温箱内 20 min,PBS 冲洗;滴加了生物素化过氧化物酶:放置于 37 °C 恒温箱内 20 min,PBS 冲洗;经过 DAB 显色、之后复染、随后脱水,再后透明,最后封片。

1.3.2 应用免疫组化法染色 先脱蜡、之后水化其组织切片,再抗原修复,3% H_2O_2 去离子水孵育,来阻断内源性的过氧化物酶,之后加 Stathmin 一抗(1:100)放置在 37 °C 恒温箱内持续孵育 2 h,再用 PBS 冲洗,再滴加通用型的 IgG 抗体-HRP 多聚体,放置于 37 °C 恒温箱内孵育 15 min,PBS 冲洗。DAB 显色、复染、脱水、透明、封片。阴性对照试验:使用 PBS 替代一抗。其余同上所述的操作步骤。

1.3.3 结果判定标准 Stathmin mRNA 以及 Stathmin 蛋白的阳性表达都位于细胞的胞质,其着色呈棕黄色,在高倍显微镜下观察时随机地选取 5 个视

野(观察细胞数不少于 200 个/每个视野),按照细胞的着色深浅程度、阳性细胞所占百分率两方面结合起来进行结果判定^[3]。①按照细胞着色深浅的程度评分:0 分,细胞无显色;1 分,呈淡黄色;2 分,呈棕黄色;3 分,呈棕褐色。②按阳性细胞数所占百分率,<5% 视为 0 分,5%~25% 视为 1 分,26%~50% 视为 2 分,51%~75% 视为 3 分,>75% 视为 4 分。取①②两项的评分乘积值作为总积分,总积分 0 分判为阴性(-),1~4 分判为弱阳性(+),5~8 分判为阳性(++) ,9~12 分判为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析。采用了四格表资料 χ^2 检验进行两样本率比较。

2 结果

2.1 胰腺癌 Stathmin mRNA 表达 Stathmin mRNA 原位杂交表达阳性的显色,位于胞质,显示棕黄色颗粒(图 1)。在胰腺癌组织、癌旁正常组织呈不同水平表达,阳性表达率分别为 80.0%、7.4%,差异有统计学意义($\chi^2=33.985, P<0.05$)。

2.2 胰腺癌的 Stathmin 蛋白表达 Stathmin 蛋白阳性表达,位于胞质,显示棕黄色颗粒(图 2)。在胰腺癌组织、癌旁正常组织呈不同水平表达,阳性表达率分别为 77.5%、7.4%。差异有统计学意义($\chi^2=31.685, P<0.05$)。

2.3 Stathmin 蛋白的表达与胰腺癌临床病理特征的关系 对免疫组织化学检测结果进一步分析显示 Stathmin 蛋白的表达水平与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期存在密切相关性,即分化程度越低、有淋巴结转移、有远处转移,TNM 分期越晚者 Stathmin 蛋白表达的阳性率越高,差异有统计学意义。其中胰腺癌低分化组的 Stathmin 蛋白阳性表达率 95.5%,显著高于高、中分化组 55.6% ($P<0.05$);有淋巴结转移组阳性率为 95.2%,显著高于无淋巴结转移组 57.9% ($P<0.05$);有远处转移组阳性率 94.7%,显著高于无远处转移组 61.9% ($P<0.05$);临床分期Ⅲ+Ⅳ期组阳性率为 95.2%,显著高于Ⅰ+Ⅱ期组 57.9% ($P<0.05$)。但是 Stathmin 蛋白胰腺癌的表达,与年龄、性别及病理类型均无关,差异无统计学意义。见表 1。

3 讨论

众多研究报道 Stathmin 在多种恶性肿瘤中如口腔鳞癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤等表达增高。研究^[4]显示人类乳腺癌中含有突变型的 p53

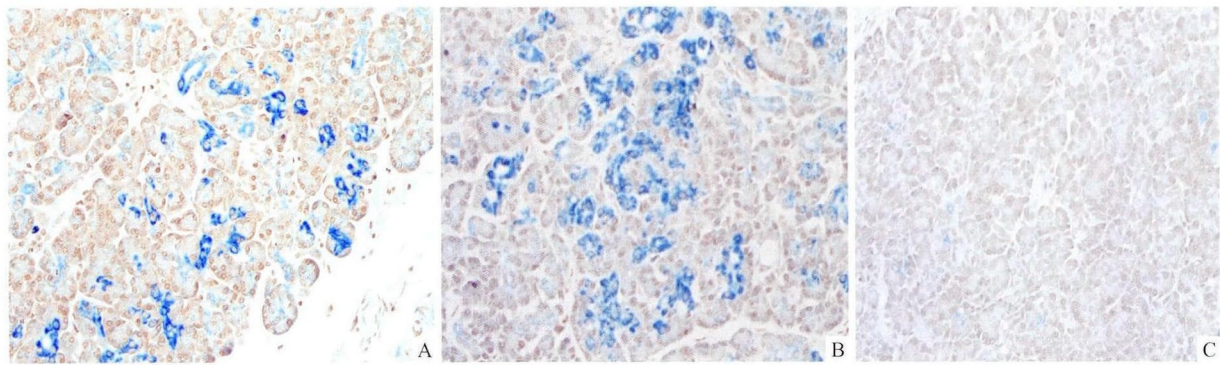


图1 胰腺癌与癌旁正常组织 Stathmin mRNA 的表达 原位杂交 ×400
A:胰腺高-中分化腺癌;B:胰腺低分化腺癌;C:胰腺癌旁正常组织

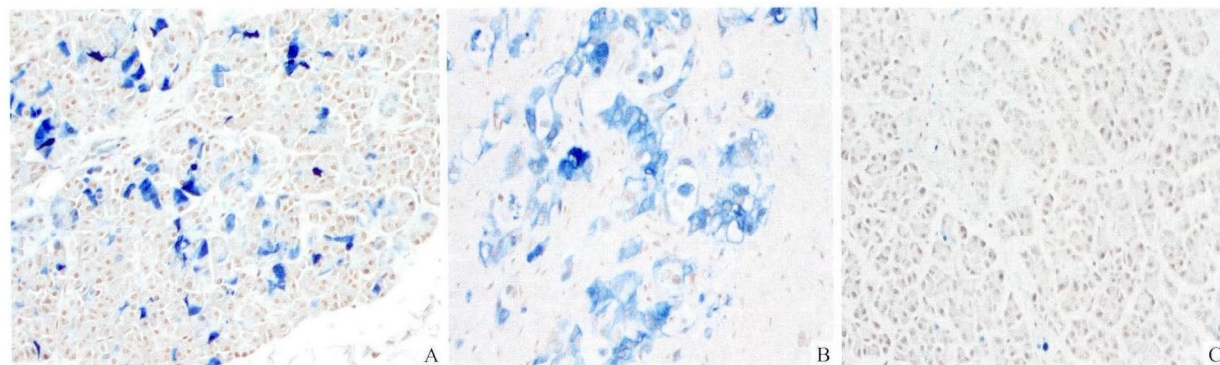


图2 胰腺癌与癌旁正常组织 Stathmin 蛋白表达 免疫组化 ×400
A:胰腺高-中分化导管腺癌;B:胰腺低分化腺癌;C:胰腺癌旁正常组织

表1 胰腺癌 Stathmin 蛋白表达与临床、病理学特征的关系					
病理学特征	n	Stathmin 蛋白 阳性数	阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)					
≤60	16	11	68.8	0.484	0.487
>60	24	20	83.3		
性别					
男	23	17	73.9	0.062	0.803
女	17	14	82.4		
病理类型					
导管腺癌及亚型	30	24	80.0	0.048	0.827
其他类型	10	7	70.0		
分化程度					
高、中分化	18	10	55.6	6.895	0.009
低分化	22	21	95.5		
淋巴结转移					
无	19	11	57.9	5.979	0.014
有	21	20	95.2		
远处转移					
无	21	13	61.9	4.427	0.035
有	19	18	94.7		
TNM 分期					
I + II	19	11	57.9	5.979	0.014
III + IV	21	20	95.2		

基因细胞系的 Stathmin 增强表达。发现其中由于野生型 p53 的基因突变或缺失,从而使野生型 p53 的基因介导 Stathmin 的蛋白表达负性调节作用明显减弱,这很可能是多种恶性肿瘤 Stathmin 高水平表达方式的主要机制之一。研究^[5]通过观察在肝癌细胞中表达 Stathmin,发现了其中 p27 通过抑制其 Stathmin 阻止与微管分离作用,干扰了细胞间期的微管功能,若上调 p27 肝癌细胞中表达,可能抑制了 Stathmin 蛋白的促肝癌细胞的分裂、增殖功能,从而降低分裂、增殖能力。本研究显示 Stathmin mRNA 和蛋白在胰腺癌的组织中均呈现高水平表达,与胰腺癌旁正常组织表达的差异有统计学上意义。提示 Stathmin 可能与胰腺癌发生相关连,这与国外文献报道 Stathmin 在其他多种恶性肿瘤的生物学行为上是一致的。Jiang et al^[6]发现 Stathmin 过表达能阻止转化生长因子 β 诱导早期基因 1 介导的肿瘤细胞生长抑制,靶向 Stathmin 的小干扰 RNA 能抑制胰腺癌细胞生长。

本研究还观察到低分化组胰腺癌组织阳性表达率明显高于高、中分化组,差异有统计学意义。

Stathmin 呈弥漫性分布,且肿瘤细胞分化程度越低,则 Stathmin 表达越增强。因此,表明了 Stathmin 表达与其细胞的分化程度相关。Stathmin 的表达很可能是胰腺癌的分化程度标志之一。

本研究进一步观察到淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组,远处转移组显著高于无远处转移组,临床分期较晚的Ⅲ+Ⅳ期组显著高于较早的Ⅰ+Ⅱ期组。表明 Stathmin 异常高水平表达,与胰腺癌生物学行为间有密切相关。王峰等^[7]研究发现食管鳞癌的细胞系的 Stathmin mRNA 及其蛋白均出现高表达水平。其与食管鳞癌分化的程度、淋巴结的转移、肿瘤的浸润深度以及 TNM 分期等方面显著相关,食管鳞癌的组织中 Stathmin mRNA 及蛋白阳性表达率较癌旁组织以及正常的食管黏膜组织相比明显增高。Jeon et al^[8]也发现 Stathmin 蛋白过表达现象可能与胃癌分化的程度、淋巴结的转移、癌瘤浸润深度等方面以及 TNM 分期有关;胃癌 Stathmin 的蛋白阳性表达患者其无复发的中位生存期明显小于 Stathmin 的蛋白阴性表达的患者。使用 siRNA 技术把 SNV16 胃癌的细胞系 Stathmin 敲除后,发现其细胞增殖、移行以及浸润等方面恶性的生物学行为上受到了明显抑制。

综上所述,Stathmin 及其 mRNA 在胰腺癌组织中表达明显增高。Stathmin 高水平表达与胰腺癌患者的年龄、性别及病理类型方面无关,而与其分化的

程度、淋巴结的转移、远处转移和临床分期等生物学行为密切相关。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.
- [2] Belletti, Baldassarre, Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer[J]. Expert Opin Ther Targets,2011,15(11):1250-65.
- [3] Gfroerer S, Metzger R, Fiegel H, et al. Differential changes in intrinsic innervation and interstitial cells of Cajal in small bowel atresia in newborns[J]. World J Gastroenterol,2010,16(45):5716-21.
- [4] Afli E, Bash Bnhula J, Yang J M, et al. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer[J]. Cancer Res,2002,62(23):6864-9.
- [5] Wang X Q, Lui E L, Cai Q, et al. p27Kip1 promotes migration of metastatic hepatocellular carcinoma cells[J]. Tumour Biol,2008,29(4):217-23.
- [6] Jiang L, Chen Y, Chan C Y, et al. Down-regulation of stathmin is required for TGF-beta inducible early gene 1-induced growth inhibition of pancreatic cancer cells[J]. Cancer Lett,2009,274(1):101-8.
- [7] 王峰,王留兴,何伟,等. Stathmin 基因在食管鳞癌中的表达及生物学意义[J]. 南方医科大学学报,2010,30(7):1552-7.
- [8] Jeon T Y, Han M E, Lee Y W, et al. Overexpression of stathmin1 in the diffuse type of gastric cancer and its roles in proliferation and migration of gastric cancer cells[J]. Br J Cancer,2010,102(4):710-8.

Clinical significance of expression of stathmin in pancreatic cancer

Huang Min^{1,2}, Yu Yue¹, Zhang Xu², et al

(¹Division of Gastroenterology, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Division of Gastroenterology, The Third Hospital of Bengbu City, Bengbu 233000;

³Division of Pathology, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the relationship between the clinicopathological features and Stathmin expression in pancreatic cancer. **Methods** Expressions of Stathmin and Stathmin mRNA were detected in 40 pancreatic cancer samples, 27 adjacent normal samples of pancreatic cancer by immunohistochemistry and in situ hybridization, respectively. **Results** Stathmin positive rate in pancreatic cancer samples was significantly higher than that of adjacent normal samples of pancreatic cancer (77.5% vs 7.4%, $P < 0.05$); the positive rate of Stathmin mRNA expression was also higher than that of adjacent normal samples of pancreatic cancer (80.0% vs 7.4%, $P < 0.05$). Stathmin expression levels were significantly correlated to the differentiation degree, lymph node metastasis, distant metastasis and TNM staging for pancreatic cancer ($P < 0.05$). **Conclusion** Higher expression of Stathmin and mRNA in pancreatic cancer were closely related to the differentiation degree for pancreatic cancer, lymph node metastasis, distant metastasis and TNM staging, suggesting Stathmin may be involved in oncogenesis of pancreatic cancer. Stathmin may play important roles in early diagnosis and prognosis of pancreatic cancer.

Key words pancreatic cancer; Stathmin; immunohistochemistry; in situ hybridization