

Stathmin 在胃癌中的表达及其与多西他赛疗效的关系

The Expression of Stathmin in Gastric Cancer and its Relationship with the Effect of Docetaxel
XIAO Jun-juan, LI Yan

肖俊娟, 李 岩

(山东省千佛山医院, 山东 济南 250014)

摘 要: [目的] 探讨 Stathmin 在胃癌中的表达及其与多西他赛化疗疗效关系。[方法] 应用免疫组化法分析 Stathmin 在胃癌及癌旁组织中的表达情况, 研究其与胃癌临床病理特征的关系; 研究 Stathmin 表达与术后辅助 DC (多西他赛+顺铂) 方案化疗有效率、临床获益率、1 年生存率、3 年生存率之间的关系。[结果] 胃癌组织 Stathmin 表达较癌旁组织增高 ($P < 0.05$), 与胃癌组织分化程度、浸润深度、有无淋巴结转移及临床分期均相关 ($P < 0.05$), 而与患者的年龄、性别无关; Stathmin 过表达较低表达患者化疗敏感性下降 ($P < 0.05$), 1 年生存率、3 年生存率尚无统计学意义 ($P > 0.05$)。[结论] Stathmin 表达与胃癌组织的生物学行为相关; 胃癌组织中 Stathmin 蛋白的表达与患者对含多西他赛化疗方案的敏感性有关, 但对生存时间的影响证据尚不足。

关键词: 胃肿瘤; Stathmin; 免疫组织化学; 多西他赛; 药物治疗

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2017)03-0210-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.03.B010

药物遗传学和药物基因组学的迅速发展提示我们, 根据肿瘤组织的基因表达情况选用特异的化疗药物, 可以提高化疗敏感性, 延长生存期, 并将不良反应降到最低成为可能。Stathmin 在多种恶性肿瘤中均有高水平表达, 其具有独特的微管解聚活性, 而许多化疗药物是通过干扰细胞微管功能发挥抑制细胞增殖作用^[1,2]。本实验从临床工作出发, 选择与胃癌密切相关的 Stathmin, 应用免疫组织化学方法, 研究其在胃癌中的表达及其与临床病理特征之间的关系, 分析其与化疗敏感性及生存率的相关性, 有助于临床指导胃癌术后化疗药物的选择及预后判断。

1 资料与方法

1.1 病例选择

收集山东省千佛山医院 2009 年 1 月至 2010 年 1 月手术切除 (根治术、姑息性切除术) 并经病理证实资料完整的胃癌组织及其癌旁组织各 56 例, 术前均未接受放、化疗及微创治疗, 其中男性 31 例, 女性

25 例, 年龄 25~73 岁, 平均 51 岁, 所有切片均按全国胃癌协作组标准并由病理科医师复检, 病理类型: 高分化腺癌 10 例, 中分化腺癌 17 例, 低分化腺癌 29 例; 淋巴结转移 44 例, 无淋巴结转移 12 例; TNM 分期: I~II 期 14 例, III~IV 期 42 例, 其中未浸透浆膜者 10 例, 穿透浆膜者 46 例。

56 例患者中 32 例符合以下病例标准: 有组织病理学诊断, KPS 评分 ≥ 70 分, 白细胞计数 $> 4 \times 10^9/L$, 血小板计数 $> 80 \times 10^9/L$, 肝肾功能正常, 心电图正常, 无化疗禁忌证, 预计生存期在 3 个月以上, 有明确的观察指标, 没有第二原发肿瘤, 所有患者均获得知情同意, 并签署化疗知情同意书。

1.2 方 法

1.2.1 免疫组化方法

组织切片常规脱蜡, 微波修复抗原, 滴加一抗 (兔 IgG, 美国 Abcam 公司) 置于 4℃ 冰箱中过夜。滴加生物素化二抗 (北京中杉公司), DAB 显色, 苏木素复染, 阴性对照切片用 PBS 液替代一抗, 双盲法判定结果, 细胞阳性染色为棕黄色颗粒沉淀。由两名未参与实验的病理科医师协助判断免疫组化结果, 显微镜下观察染色结果。每例标本选择 5 个有代表性的高倍视野, 每个视野计数 200 个肿瘤细胞, 计算

通讯作者: 肖俊娟, 主治医师, 硕士; 山东省千佛山医院肿瘤化疗科, 山东省济南市经十路 16766 号 (250014); E-mail: xiaojunjuan@126.com

收稿日期: 2016-06-16; **修回日期:** 2016-07-13

阳性细胞百分比,取平均值,参照 Wachters 等^[3]的方法来分 析 Stathmin 蛋白在细胞质上的表达水平,即 阴性表达:不表达或阳性细胞数<10%; 阳性表达: 阳性细胞数>10%。

1.2.2 化疗方案

32 例均于术后 1 个月开始化疗,具体为 DC 方 案:多西他赛(齐鲁制药)75mg/m²,d₁; 顺铂(齐鲁制 药)25mg/m²,静脉滴注,d₁₋₃,21d 为 1 个周期,每周期 评价不良反应,每化疗 2 个周期依据 RECIST1.0 标准评价疗效,治疗持续至患者病情进展或出 现不可耐受的毒性,所有患者均接受不少于 6 个周期化疗。评价两组患者的有效率、临床获益 率。

1.2.3 疗效评定标准

按照 RECIST1.0 标准分为完全缓解(com- plete response,CR),部分缓解(partial response, PR)、稳定(stable disease,SD)、进展(progressive disease,PD)。有效率为(CR+PR)/总例数×100%, 临床获益率为(CR+PR+SD)/总例数×100%。

1.2.4 生存期及 1 年、3 年生存率

生存期(overall survival,OS)为化疗开始至 死亡或末次随访时间,以生存 1 年以上的病例 数/随诊 1 年以上的总病例数×100%统计 1 年生 存率,以生存 3 年以上的病例数/随诊 3 年 以上的总比例数×100%统计 3 年生存率, 并对两组 1 年、3 年生存率进行比较。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS15.0 软件进行,组 间比较行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学 意义。分类资料用百分率进行描述。

2 结 果

2.1 Stathmin 蛋白在胃癌及癌旁组织中的 表达

Stathmin 阳性显色为棕黄色或棕褐色 颗粒,癌组织区域内多数细胞的细胞质呈 阳性染色,但在癌旁组织中的表达则明显 减弱(Figure 1a,1b)。

56 例胃癌标本中,Stathmin 蛋白在胃 癌组织中的阳性表达率为 71.4%(40/56),

在 56 例癌旁组织中的阳性表达率为 37.5% (21/ 56),Stathmin 蛋白在癌组织中的阳性表达率高于癌 旁组织中,差异具有统计学意义 ($\chi^2=23.893,P< 0.001$)。

2.2 Stathmin 蛋白表达与胃癌患者临床病理特征关系

Stathmin 蛋白表达与浸润深度、淋巴转移、分化 程度及肿瘤 TNM 分期均有关,而与性别及年龄无关 (Table 1)。

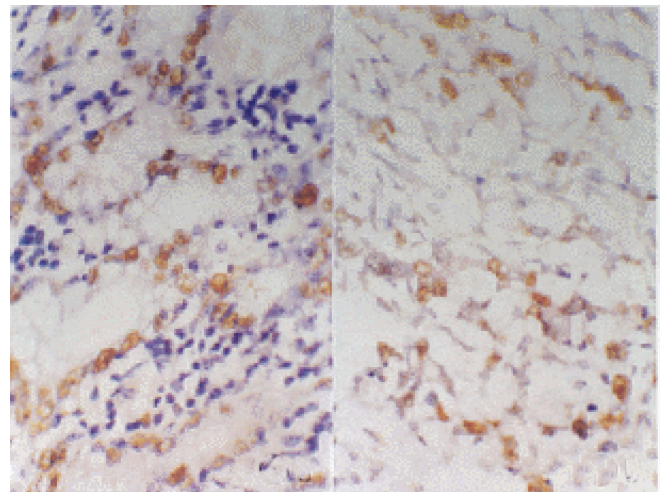


Figure 1 Stathmin expression in gastric cancer tissue and cancer adjacent tissue(×400)

Table 1 The relationship of Stathmin expression with clinico- pathologic features in gastric cancer patients[n(%)]

Parameters	N	Stathmin expression		P
		Positive	Negative	
Age(years old)				
≥60	27	19(70.4)	8(29.6)	0.698
<60	29	19(65.5)	10(34.5)	
Gender				
Male	31	18(58.1)	13(41.9)	0.877
Female	25	14(56.0)	11(44.0)	
TNM stage				
I ~ II	14	6(42.9)	8(57.1)	0.034
III ~ IV	42	31(70.5)	11(29.5)	
Differentiation degree				
High+moderate	27	15(55.6)	12(44.4)	<0.001
Low	29	24(82.8)	5(17.2)	
Infiltration degree				
Non-infiltration of serous membrane	10	2(20.0)	8(80.0)	<0.001
Infiltration of serous membrane	46	38(82.6)	8(17.4)	
Lymph metastasis				
Yes	44	40(90.9)	4(9.1)	<0.001
No	12	3(25.0)	9(75.0)	

2.3 Stathmin 表达与化疗疗效及预后

Stathmin 阳性表达组的有效率、临床获益率分别为 10.5%、52.6%，均低于阴性表达组的 23.1%、69.2%，差异有统计学意义(有效率 $P=0.022$ ，临床获益率 $P=0.020$) (Table 2)。对两组患者随访 1 年发现，阳性表达组患者 6 例死亡，阴性表达组 4 例死亡，两组 1 年生存率分别为 68.4% 和 69.2%， $P=0.879$ 。随访 3 年发现，阳性表达组患者 16 例死亡，阴性表达组 9 例死亡，两组 3 年生存率分别为 31.5% 和 30.8%，无显著性差异($P=0.917$)。

3 讨论

Stathmin 是一种广泛存在细胞内的细胞信号传导分子，是对细胞增殖和分化起重要作用的微管稳定负向调节蛋白。Stathmin 通过自身位点的磷酸化和去磷酸化作用来调节微管系统的动力学平衡，以控制细胞周期，改变细胞的生物学行为。Stathmin 的表达受多种转录因子和激酶/磷酸化酶的调控，对细胞周期、细胞动力学、神经系统的发育，尤其是恶性肿瘤的发生、发展及肿瘤细胞对化疗的敏感性均具有重要意义^[4]。

本研究应用免疫组化法，发现 Stathmin 在胃癌组织中的表达显著高于癌旁组织，提示 Stathmin 与胃癌发生、发展密切相关，这与国内外学者的研究结果一致^[5]。Stathmin 在乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、肺癌、口腔鳞癌、食管癌、肝癌等多种肿瘤组织中高水平表达^[6]，而所有的正常非增殖体细胞均未见上调。通过分析 Stathmin 表达与胃癌临床病理特征的关系发现，Stathmin 蛋白的表达与分化程度、浸润深度、淋巴转移及临床分期均呈有关，提示 Stathmin 与胃癌浸润、转移等生物学行为有关，Stathmin 可以作为胃癌有效的预后指标。研究显示，低分化肺腺癌中 Stathmin 蛋白和 mRNA 表达水平明显高于中度分化或高分化的标本^[7]。Oishi 等^[8]认为 Stathmin 可作为转移性锁骨上淋巴结的预后指标之一及潜在的诊断指标。Kuo 等^[9]研究证实，Stathmin 可作为神经管细胞瘤独立的预后指标。

多西他赛是一种半合成的紫杉类衍生物，通过作用微管系统，促进微管装配，使微管稳定，阻滞细

Table 2 The relationship of Stathmin expression with chemotherapy efficacy and overall survival

Stathmin expression	N	CR+PR (%)	CR+PR+SD (%)	1-year survival rate(%)	3-year survival rate(%)
Positive group	19	10.5	52.6	68.4	31.5
Negative group	13	23.1	69.2	69.2	30.8

胞于 G/M 期，抑制肿瘤细胞的有丝分裂和增殖，其在细胞内浓度比紫杉醇高 3 倍，具有更强的抗肿瘤活性。Stathmin 通过调节自身位点的磷酸化和去磷酸化来改变微管系统动力平衡。Stathmin 蛋白的过表达，减少了微管聚合，减少与紫杉醇的结合^[10]。本实验中 Stathmin 阳性表达组的有效率、临床获益率均明显低于阴性表达组，提示 Stathmin 高表达与紫杉类耐药相关，抑制 Stathmin 蛋白的高表达，能增加肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性。Stathmin 部分拮抗细胞系 K562 的紫杉醇的微管稳定作用，提示 Stathmin 可能是抗微管化疗药物耐药的因素^[5]。通过应用 Western blot 分析，Balachandran 等^[11]发现紫杉醇耐药的卵巢癌细胞系中 Stathmin 表达增加。Rosell 等^[12]应用 RT-PCR 法检测接受紫杉醇+卡铂化疗的肺癌组织中 Stathmin RNA 的表达，发现 Stathmin 低水平组 PR 率高于高水平组(21.4% vs 37.5%)。Stathmin 呈阳性表达时，肺癌术后患者对含紫杉类的化疗药物的敏感性下降，预后较差。原少斐等^[13]观察发现单用抗 Stathmin 单克隆抗体及紫杉醇在体外均能抑制乳腺癌细胞的生长，且两者联用的抑制作用更加显著。通过应用反义核酸、核酶、丝氨酸位点突变体及 Stathmin 蛋白抑制剂等方法封闭 Stathmin 基因的表达，可使细胞受阻于 G₂/M 期，同时可以使恶性肿瘤表型发生逆转^[14]。siRNA 可以抑制 Saos-2 细胞中 64.3% 及 MG62 细胞中 78.2% 的 Stathmin mRNA 的表达，并提高了这些细胞对紫杉醇和多西他赛的敏感性^[15]。

研究证实，癌组织高表达 Stathmin 的患者 5 年生存率明显低于 Stathmin 低表达的患者^[16]。本文中 Stathmin 阳性表达及阴性表达组 1 年生存率无明显差异，这可能与随访时间较短、入组标本数量限制等因素有关。Golouh 等^[17]应用单因素分析发现 Stathmin 染色强度与无病生存期和疾病特异性生存率密切相关。蒲晓麟等^[18]研究发现，Stathmin 低表达的晚期非小细胞肺癌患者，其化疗的有效率、进展时间、

中位生存时间等指标均明显优于高表达的患者,提示 Stathmin 可作为晚期 NSCLC 患者选择化疗药物的参考。

Stathmin 参与恶性肿瘤发生、发展的确切机制尚不清楚。恶性肿瘤 Stathmin 高表达的机制之一可能与野生型 p53 基因的突变或缺失,其介导 Stathmin 蛋白表达的负性调节明显减弱有关^[19]。Baldassarre 等^[20]发现增加癌细胞中 p27 表达可以抑制 Stathmin 促进癌细胞分裂增殖的作用,其机制可能为 p27 抑制了 Stathmin 与微管的分离,从而影响微管功能。有效抑制 Stathmin 在恶性肿瘤中的表达既可以抑制肿瘤细胞分裂增殖,促进其凋亡,又可协同抗微管类药物发挥良好抗肿瘤作用。Stathmin 有可能成为一种新的预测肿瘤恶性程度、预后等的参考指标,指导肿瘤的个体化治疗方案。

参考文献:

- [1] Mistry SJ, Atweh GF. Role of Stathmin in the regulation of the mitotic spindle; potential applications in cancer therapy[J]. Mt Sinai J Med, 2002, 69(5): 299-304.
- [2] Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, et al. Taxol and anti-Stathmin therapy: a synergistic combination that targets the mitotic spindle[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3537-3541.
- [3] Wachters FM, Wong LS, Timens W, et al. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumor response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy [J]. Lung Cancer, 2007, 50(2): 211-219.
- [4] Campostrini N, Marimpietri D, Totolo A, et al. Proteomic analysis of anti-angiogenic effects by a combined treatment with vinblastine and rapamycin in an endothelial cell line [J]. Proteomics, 2006, 6(15): 4420-4431.
- [5] Jeon TY, Han ME, Lee YW. Overexpression of stathmin 1 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): 710-718.
- [6] Rana S, Maples PB, Senzer N, et al. Stathmin 1: a novel therapeutic target for anticancer activity [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(9): 1461-1470.
- [7] Chen G, Wang H, Charib TG, et al. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung ad endocarcinomas[J]. Mol Cell Proteomics, 2003, 2(2): 107-116.
- [8] Oishi Y, Nagasaki K, Miyata S, et al. Functional pathway characterized by gene expression analysis of supraclavicular lymphnode metastases in positive breast cancer[J]. J Hum Genet 2007, 52(3): 271-279.
- [9] Kuo MF, Wang HS, Kuo QT, et al. High expression of stathmin protein predicts a fulminant course in medulloblastoma[J]. Neurosurg Pediatr, 2009, 4(1): 74-82.
- [10] Alli E, Yang JM, Ford JM, et al. Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(5): 1233-1240.
- [11] Balachandran R, Welsh MJ, Day BW. Altered levels and regulation of stathmin in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells[J]. Oncogene, 2003, 22(55): 8924-8930.
- [12] Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(23): 3548-3553.
- [13] Yuan SF, Chen WJ, Zheng WE, et al. Anti-human stathmin monoclonal antibody and its inhibition effect on human breast cancer cells combination with paclitaxel[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2010, 15(8): 861-864. [原文斐, 陈文俊, 郑维镠, 等. 抗人 Stathmin 单克隆抗体及其联合紫杉醇对人乳腺癌细胞的生长抑制作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(8): 861-864.]
- [14] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy[J]. Mol Interv, 2002, 2(3): 158-167.
- [15] Wang R, Dong K, Lin F, et al. Inhibiting proliferation and enhancing chemosensitivity to taxanes in osteosarcoma cells by RNA interference-mediated downregulation of stathmin expression[J]. Mol Med, 2007, 13(11-12): 567-575.
- [16] Yuan RH, Jeng YM, Chen HL, et al. Stathmin overexpression cooperates with p53 mutation and osteopontin overexpression, and is associated with tumor progression, early recurrence, and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Pathol, 2006, 209(4): 549-558.
- [17] Golouh R, Cufer T, Sadikov A, et al. The prognostic value of Stathmin-1, S100A2, and SYK proteins in ER-positive primary breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen monotherapy: an immunohistochemical study [J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 110: 317-326.
- [18] Pu XL, Wang J, Xu L, et al. Relationship between β -tubulin-III and Stathmin and chemotherapy sensitivity in advanced non small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2009, 1(12): 49-53. [蒲晓麟, 王峻, 许林, 等. β -tubulin-III 和 Stathmin 与晚期非小细胞肺癌化疗敏感性的关系[J]. 中国肺癌杂志, 2009, 1(12): 49-53.]
- [19] Curmi PA, Nogues C, Lachkar S, et al. Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours[J]. Br J Cancer, 2000, 82(1): 142-150.
- [20] Baldassarre G, Belletti B, Nicoloso MS, et al. p27 (kip1) stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion [J]. Cancer Cell, 2005, 7(1): 51-63.