

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.014

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.014>

STC-1在宫颈癌中的表达及其在预后判断中的价值

丁晶晶, 刘欣艳

(上海市普陀区中心医院老年科, 上海 200062)

[摘要] 目的: 研究宫颈癌中分泌蛋白斯坦尼钙调节蛋白1(stanniocalcin 1, STC-1)的表达情况及其与预后的关系。方法: Western印迹分析STC-1在宫颈癌细胞系的表达, 免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)检测STC-1在宫颈癌和正常组织的表达, 分析STC-1表达水平与宫颈患者临床病理特征之间关系, 通过网上数据库初步探索STC-1表达与预后的关系。结果: 宫颈正常上皮细胞Ect1/E6E7细胞株中几乎检测不到STC-1, 宫颈癌细胞株中STC-1呈不同程度表达; IHC结果显示: STC-1主要在宫颈细胞的胞质和胞膜中表达, 与匹配的癌旁正常组织相比, STC-1蛋白水平在宫颈癌组织中更高($P<0.05$), 并且与患者淋巴结转移正相关($P=0.038$); 另外, 通过对数据库中宫颈癌患者的样本分析发现: 高表达STC-1的宫颈癌患者预后更差($P<0.01$)。结论: STC-1表达与宫颈患者的总体存活负相关, STC-1可能具有预测宫颈癌患者预后生存时间的潜在价值。

[关键词] 宫颈癌; 斯坦尼钙调节蛋白1; 预后; 存活; 转移

Expression of stanniocalcin I in cervical cancer and its clinical value in prognosis

DING Jingjing, LIU Xinyan

(Department of Geriatrics, Putuo District Central Hospital, Shanghai 200062, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of stanniocalcin 1 (STC-1) in cervical cancer and its relation with prognosis. **Methods:** STC-1 protein expression in cervical cancer cell lines was determined by Western blot. We examined STC-1 expression in human cervical cancer tissues by immunohistochemical staining (IHC), and investigated the clinical correlation between STC-1 tissue levels and the clinicopathological characteristics of cervical cancer patients. Kaplan-Meier curves for survival in cervical cancer patients were determined based on the analysis of STC-1 expression from online database. **Results:** STC-1 was markedly overexpression in all cervical cancer cell lines compared with normal cells. IHC results revealed that STC-1 was mainly expressed in the cell membrane and plasma. STC-1 protein levels were significantly higher in cervical cancer tissues when compared with matched non-cancerous tissues ($P<0.05$), and associated with lymph node metastasis ($P=0.038$). Kaplan-Meier curves for survival analysis of online database showed that patients with high STC-1 expression had poor prognosis ($P<0.01$). **Conclusion:** STC-1 expression is

收稿日期 (Date of reception): 2017-04-27

通信作者 (Corresponding author): 刘欣艳, Email: xyan020699@163.com

correlated with lymph node metastasis of cervical cancer patient and associated with prognosis, may be a potential bio-marker for prognosis.

Keywords cervical cancer; stanniocalcin 1; prognosis; survival; metastasis

在全球范围内, 宫颈癌排在女性癌症相关死亡原因的第四位, 每年约诊断53万例新发的宫颈癌病例, 约占女性新发癌症病例9%。目前宫颈癌5年生存率为68%^[1-2]。进一步阐明宫颈癌的发病机制, 利于提高宫颈癌的诊治水平。

人类斯坦尼钙调节蛋白1(stanniocalcin 1, STC-1)基因位于8p11.2-p21。STC-1参与多种生理过程的调节, 可通过抑制肠道钙的吸收并促进肾重吸收磷酸盐调节钙和磷酸盐的稳态; STC-1参与调节Ca²⁺/Pi代谢, 抑制缺血性脑伤的危害; STC-1可以阻断L型钙通道, 发挥保护心肌细胞的作用^[3-5]。近来研究^[6-7]发现STC-1与肿瘤的发生也有密切的关系, STC-1在很多癌症细胞中的表达不同于其正常组织。在结肠癌中, STC-1的表达上调对肿瘤血管的发生起重要作用^[8]。研究^[9]发现STC-1在宫颈癌组织中表达过高, 降低STC-1可以抑制宫颈癌细胞生长, 但尚缺乏STC-1在宫颈癌预后判断中价值的研究报道。本研究旨在探讨STC-1在宫颈癌组织中的表达情况, 并初步分析STC-1的表达与宫颈癌患者预后的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

86例宫颈癌石蜡切片标本由本院病理科提供并用于分析, 病理类型均为鳞状细胞癌, 患者的最终诊断均经2位病理医师复诊确认。患者均为女性, 年龄为35~71(中位年龄49)岁, 病理分级I级为13例, II级28例, III级45例, 所有病例均在本院行宫颈癌根治术, 具有完整的诊疗记录、一般信息、临床资料和组织病理学报告。本次实验临床标本使用征得患者同意并通过伦理审查。

1.2 细胞株与材料

人宫颈癌细胞株(ME-180细胞和C-33A细胞)购自中国科学院上海细胞所, 宫颈癌细胞株(HeLa细胞和Siha细胞)购自上海艾研生物科技有限公司; 人宫颈永生鳞状细胞株Ect1/E6E7细胞购自上海康朗生物科技有限公司; DMEM培养液购自南京凯基生物科技发展有限公司;

兔抗人STC-1抗体购于英国Abcam公司, 免疫组织化学用EnVision试剂盒、对二甲氨基偶氮苯(dimethylamino-azobenzene, DAB)酶底物显示试剂盒和多聚赖氨酸购于北京中杉金桥生物技术有限公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白抽提试剂盒、羊抗兔IgG二抗和PBS购自上海碧云天生物试剂有限公司。

1.3 Western 印迹分析 STC-1 蛋白表达

收集足量细胞并提取总蛋白, 以二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法定量; 制作10%分离胶, 取蛋白25 μg加5×十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)上样缓冲液, 沸水加热5 min后上样进行凝胶电泳, 转膜, 封闭。兔抗人STC-1抗体(1:1 000), 4 ℃过夜, 漂洗后加入辣根过氧化物酶(horseradish Peroxidase, HRP)标记羊抗兔IgG(1:1 000)二抗, 室温孵育2 h, 漂洗、显影并摄影。

1.4 免疫组织化学染色和评价 STC-1 蛋白在组织的表达

使用两步法进行免疫组织化学染色。阳性为细胞染色出现明显的黄色或棕黄色颗粒, 免疫染色的组织以双盲方式由2位病理医师独立评估。根据染色强度和阳性细胞百分比综合判断。染色强度评分分为: 无着色0分, 淡黄色为1分, 棕黄色2分, 棕褐色3分。利用光学显微镜随机选择病理切片上的5个高倍视野, 计数肿瘤细胞总数和免疫组化阳性的细胞个数, 阳性细胞比例为阳性细胞除以肿瘤细胞总数, 阳性细胞百分比<10%为0分, 11%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~75%为3分, >75%为4分。根据两项乘积综合判定STC-1染色评分: 0~4分被定义为低STC-1表达, 5~12分被定义为高表达。

1.5 统计学处理

本实验采用SPSS 20.0版软件处理数据, 定性资料采用 χ^2 检验, 生存分析系采用<http://www.oncolnc.org/>在线数据库提供的Cox回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STC-1 在宫颈癌细胞中表达

不同细胞株(Ect1/E6E7, ME-180, C-33 A, HeLa和Siha细胞)中的STC-1表达见图1。STC-1在人宫颈永生鳞状细胞株Ect1/E6E7种不表达, 在4种宫颈癌细胞株呈不同程度表达, 提示STC-1在正常宫颈上皮细胞和宫颈癌细胞中存在差异表达。

2.2 STC-1 在宫颈癌组织和正常组织中的表达

进一步分析STC-1在宫颈癌组织和正常组织中的表达, 免疫组织化学染色结果显示: STC-1蛋白主要定位于肿瘤细胞的细胞质和细胞膜。在所分析的86例宫颈鳞状细胞癌组织和癌旁正常组织样品中, 按上述评分标准, STC-1阳性表达率分别为58.1%和16.3%。统计分析显示: 在组织中STC-1蛋白的表达显著高于匹配的癌旁正常组织

($P < 0.001$, 图2)。

2.3 STC-1 表达与患者临床病理特征之间的关系

对有完整临床资料的86例标本, 分析STC-1的表达与宫颈癌患者临床病理特征之间的关系, 结果发现STC-1表达水平与肿瘤淋巴结转移呈正相关($P = 0.038$, 表1), 并未发现STC-1表达水平与患者的年龄、分化、FIGO分期、肿瘤大小、HPV感染情况存在相关性(表1)。

2.4 STC-1 mRNA 水平与宫颈癌患者预后的关系

本研究利用<http://www.oncolnc.org/>在线数据分析STC-1 RNA水平和患者总生存的关系, 初步探查STC-1在预后判断中的价值, 数据分析纳入174例亚裔宫颈癌患者。结果显示: STC-1 mRNA水平和预后显著相关性, STC-1 mRNA水平越高患者预后越差($P < 0.01$, 图3)。

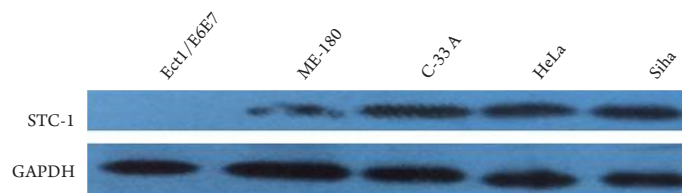


图1 STC-1在不同细胞株中的表达

Figure 1 Expression of STC-1 protein in different cell lines

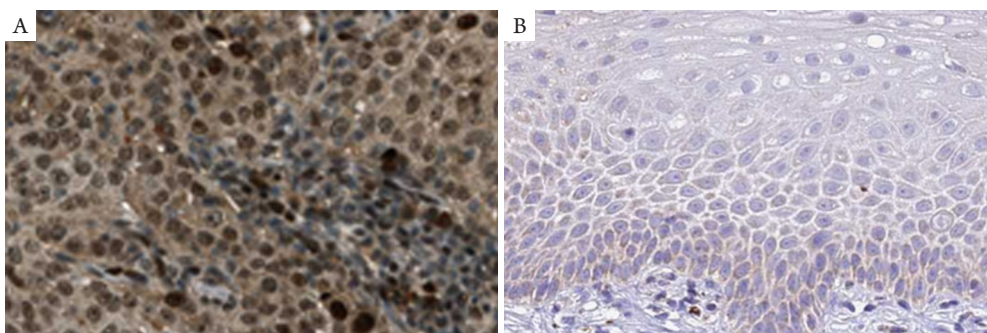


图2 免疫组织化学检测STC-1蛋白在宫颈鳞状细胞癌组织和正常组织中的表达(EnVision, $\times 200$)

Figure 2 STC-1 protein expression in cervical cancer and the normal tissues detected by IHC (EnVision, $\times 200$)

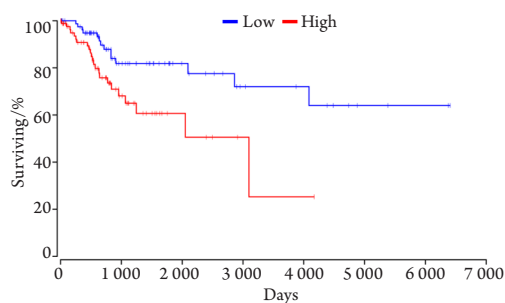
(A)宫颈鳞状细胞癌组织; (B)正常组织。

(A) Cervical squamous cell carcinoma tissue; (B) Normal tissue.

表1 STC-1蛋白表达与宫颈癌临床病理学特征的关系

Table 1 Correlation of STC-1 expression and clinicopathological parameters

临床病理参数	n	STC-1表达/[例(%)]		P
		Score ≤4	Score ≥5	
年龄/岁				0.823
<50	25	10 (40.0)	15 (60.0)	
≥50	61	26 (42.6)	35 (57.4)	
分化程度				0.316
高分化	18	10 (55.6)	8 (26.7)	
中分化	46	19 (41.3)	27 (53.2)	
低分化	22	7 (31.8)	15 (75.0)	
FIGO分期				0.058
I	52	26 (50.0)	26 (50.0)	
II	34	10 (29.4)	24 (70.6)	
淋巴结转移				0.038
无	70	33 (47.1)	37 (52.9)	
有	16	3 (35.5)	13 (81.3)	
肿瘤大小/cm				0.214
<4	41	20 (48.8)	21 (51.2)	
≥4	45	16 (35.6)	29 (64.4)	
HPV感染				0.103
无	32	17 (53.1)	15 (46.9)	
有	54	19 (35.2)	35 (64.8)	

图3 STC-1表达与宫颈癌患者预后的Kaplan-Meier生存曲线 ($P<0.01$)Figure 3 Kaplan-Meier plots of overall survival in patients who had tumors with negative or positive STC-1 expression ($P<0.01$)

3 讨论

宫颈癌是我国女性常见的恶性肿瘤, 虽然近年来发病率有所降低, 但是病死率仍很高, 对女性健康构成很大威胁, 而宫颈癌转移是引起不良预后的重要原因。早期发现以及预测宫颈癌的转移对于宫颈癌的治疗具有重要意义^[2]。研究^[10]表明: 在肿瘤发生发展并改造肿瘤微环境的过

程中, 癌细胞分泌的蛋白(如细胞因子、生长因子、蛋白酶等)起关键作用。金属蛋白酶MMP1和MMP2是已知的对转移具有促进作用的癌细胞分泌蛋白^[11]。癌细胞分泌的蛋白可以改变肿瘤微环境, 且能调节肿瘤细胞的运动能力促进细胞转移^[12]。分泌性蛋白存在于癌细胞外, 容易在血液或体液中检测到, 也容易通过药物进行靶向治疗, 可作为早期诊断、预后判断及靶向治疗的分子标志物, 具有重要的临床应用价值。

STC是一种分泌型糖蛋白, 可调节血清钙和磷平衡, 包括2个成员, 即STC-1和STC-2, STC-1位于人染色体8p11.2~p21。STC-1最初发现于鱼类中, 进一步研究发现人类及其他哺乳动物中也广泛存在STC-1。STC-1存在于多种组织, 通过自分泌或旁分泌发挥作用^[13-14]。已明确STC-1在调节肾及小肠钙磷平衡及细胞代谢等方面发挥着重要功能。近年来研究发现STC-1在多种肿瘤患者的组织和血液中表达异常, Zhou等^[15]分析喉癌患者及正常人外周血中STC-1 mRNA的表达, 发现喉癌患者外周血中STC-1 mRNA水平显著高于健康志愿者, STC-1表达水平与临床分期显著相关。Tamura等^[16]

使用RT-PCR检测202例结直肠癌患者的癌组织和癌旁正常黏膜标本中STC-1的基因水平,发现癌组织中STC-1 mRNA相对表达水平明显高于癌旁正常组织,且高表达STC-1预示着较低的生存率,STC-1基因高表达可作为结直肠癌患者术后独立的预后因素。

本研究首先使用蛋白定量分析STC-1蛋白在正常宫颈鳞状上皮和宫颈癌细胞株中的表达,发现STC-1在宫颈癌细胞株中显著表达。之后通过免疫组织化学技术检测STC-1蛋白在宫颈癌中的表达情况及其与临床参数的关系,发现STC-1蛋白表达定位于癌细胞的细胞质和细胞膜,并证实STC-1在宫颈癌组织中的表达率为58.1%,显著高于癌旁正常组织表达率16.3%。提示STC-1可能促进宫颈癌的发生、发展。Peña等^[17]研究发现PDGF以STC-1依赖性方式刺激成纤维细胞,增加共培养的结肠直肠癌细胞的迁移和侵袭;在STC-1缺陷成纤维细胞形成的结肠直肠癌的原位小鼠模型中,肿瘤细胞侵袭和远处转移能力更弱。本研究结果显示STC-1表达水平与肿瘤淋巴结转移呈正相关,提示STC-1参与调控宫颈癌细胞的转移。另外本研究使用在线数据探讨STC-1 mRNA与预后生存的关系,发现STC-1基因水平和宫颈癌患者预后具有显著相关性,基因表达水平越高则患者预后越差,提示STC-1可能具有预测宫颈癌患者预后生存时间的潜在价值,值得进一步研究。

参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in china, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- Liu D, Huang L, Wang Y, et al. Human stanniocalcin-1 suppresses angiotensin ii-induced superoxide generation in cardiomyocytes through ucp3-mediated anti-oxidant pathway[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36994.
- Terra SR, Cardoso JC, Felix RC, et al. Stc1 interference on calcitonin family of receptors signaling during osteoblastogenesis via adenylate cyclase inhibition[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 403: 78-87.
- Chen MC, Wu SV, Reeve JR Jr, et al. Bitter stimuli induce ca²⁺ signaling and cck release in enteroendocrine stc-1 cells: Role of l-type voltage-sensitive ca²⁺ channels[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(4): C726-739.
- Jeon M, Han J, Nam SJ, et al. Stc-1 expression is upregulated through an akt/nf-kappab-dependent pathway in triple-negative breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(3): 1717-1722.
- Hayase S, Sasaki Y, Matsubara T, et al. Expression of stanniocalcin 1 in thyroid side population cells and thyroid cancer cells[J]. *Thyroid*, 2015, 25(4): 425-436.
- Law AY, Wong CK. Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in huvecs via vegf/vegfr2 and angiopoietin signaling pathways[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 374(1/2): 73-81.
- 李亚林. STC1在宫颈癌中的表达及作用机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
LI Yalin. Expression of STC1 in cervical cancer and its mechanism[D]. Changsha: Central South University, 2011.
- Luo Z, Wang Q, Lau WB, et al. Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis?[J]. *Cancer Lett*, 2016, 377(2): 174-182.
- Liu M, Hu Y, Zhang MF, et al. Mmp1 promotes tumor growth and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 377(1): 97-104.
- Coelho RM, Lemos JM, Alho I, et al. Dynamic modeling of bone metastasis, microenvironment and therapy: Integrating parathyroid hormone (pth) effect, anti-resorptive and anti-cancer therapy[J]. *J Theor Biol*, 2016, 391: 1-12.
- Varghese R, Wong CK, Deol H, et al. Comparative analysis of mammalian stanniocalcin genes[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(11): 4714-4725.
- Luo CW, Pisarska MD, Hsueh AJ. Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 469-476.
- Zhou H, Li YY, Zhang WQ, et al. Expression of stanniocalcin-1 and stanniocalcin-2 in laryngeal squamous cell carcinoma and correlations with clinical and pathological parameters[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95466.
- Tamura S, Oshima T, Yoshihara K, et al. Clinical significance of stc1 gene expression in patients with colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 325-329.
- Pena C, Cespedes MV, Lindh MB, et al. Stc1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(4): 1287-1297.

本文引用: 丁晶晶, 刘欣艳. STC-1在宫颈癌中的表达及其在预后判断中的价值[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(9): 1850-1854. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.014

Cite this article as: DING Jingjing, LIU Xinyan. Expression of stanniocalcin 1 in cervical cancer and its clinical value in prognosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1850-1854. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.014