

小细胞肺癌中 MTA1 蛋白的表达及其与化疗敏感性和预后的关系*

210002 南京 第二军医大学南京临床医学院 南京军区南京总医院肿瘤内科
陈一天, 徐益琛, 陶累累¹, 印洪林², 余波², 陈龙邦^{1,3}

【摘要】 目的 检测转移相关基因 1(MTA1)蛋白在小细胞肺癌(SCLC)组织中的表达情况,探讨其在 SCLC 转移、预后和化疗敏感性预测中的作用。方法 采用免疫组织化学法检测 52 例无远处转移 SCLC 组织标本中 MTA1 的表达,根据免疫组化结果分为两类:低表达(≤ 6 分)和高表达(> 6 分);分析 MTA1 表达水平与临床病理特征、EP 方案(足叶乙甙 100mg/m² 静滴, d₁~d₃; 顺铂 60mg/m² 静滴, d₁, 3 周为 1 周期, 共 4~6 个周期)化疗疗效及预后的关系。结果 52 例 SCLC 组织中 MTA1 高表达率为 71.2%(37/52), 18 例癌旁组织均为低表达(100.0%); MTA1 表达在不同肿瘤直径、TNM 分期、淋巴结转移与否和有无脉管侵犯之间的差异有统计学意义($P < 0.05$), 而在性别、年龄、VALG 分期及肿瘤部位之间的差异无统计学意义($P > 0.05$); MTA1 高表达组的 EP 方案化疗敏感率低于 MTA1 低表达组(54.1% vs. 80.0%, $P = 0.020$); MTA1 低表达组的中位无进展生存期和总生存期均优于 MTA1 高表达组(20 个月 vs. 8 个月, 33 个月 vs. 18 个月), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MTA1 在 SCLC 组织中高表达, 且与肿瘤转移、耐药及预后密切相关。

【关键词】 小细胞肺癌; 转移; 耐药; 预后; 转移相关基因 1 蛋白

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2014)02-0102-05

Expression of MTA1 protein in small cell lung cancer and its correlation with chemotherapy sensitivity and prognosis

CHEN Yitian, XU Yichen, TAO Leilei, YIN Honglin, YU Bo, CHEN Longbang. Department of Medical Oncology, Nanjing Clinical College of the Second Military Medical University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: CHEN Longbang, E-mail: dr.chenlb@163.com

【Abstract】 Objective To detect the expression of metastasis-associated-gene 1(MTA1) protein in tissues of small cell lung cancer(SCLC) and explore the role of MTA1 in metastasis, prognosis and chemotherapy sensitivity of SCLC. **Methods** The expression of MTA1 was detected in 52 non-distal metastatic SCLC tissues by immunohistochemical staining. The results were divided into low-level expression(≤ 6) and high-level expression(> 6) according to the immunohistochemical staining counting method. The relationships between expression of MTA1 and clinicopathological characteristics, efficacy of EP regimen(etoposide 100mg/m² iv, d₁-d₃; cisplatin 60mg/m² iv d₁; 3-week cycle for 4-6 cycles) and prognosis were investigated. **Results** Thirty-seven SCLC tissues were found of high-level MTA1 expression(71.2%), while MTA1 was expressed at a low-level in all 18 adjacent tissues. There were significant correlations between the expression of MTA1 and tumor size, TNM stage, lymph node metastasis and vascular invasion($P < 0.05$). No significant correlation existed between the expression of MTA1 and gender, age, VALG stage and tumor sites($P > 0.05$). The low-level expression group was more sensitive to EP chemotherapy than the high-level expression group(80.0% vs. 54.1%, $P = 0.020$). The median progression-free survival and overall survival of the low-level expression group were superior to those of the high-level expression group(20 months vs. 8 months, 33 months vs. 18 months) with statistical significance($P < 0.05$). **Conclusion** MTA1 is highly expressed in SCLC tissue, and is closely correlated with tumor metastasis, drug resistance and prognosis.

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272734)

2 210002 南京军区南京总医院病理科

1 210002 南京大学医学院临床学院

3 通讯作者, E-mail: dr.chenlb@163.com

【Key Words】 Small cell lung cancer (SCLC); Metastasis; Drug resistance; Prognosis; Metastasis-associated gene 1 (MTA1) protein

小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 是肺癌中较为特殊的一种类型, 与非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 相比, SCLC 的恶性程度更高, 侵袭性更强, 更易发生广泛转移^[1]。转移相关基因 1 (metastasis-associated gene 1, MTA1) 是最近被发现的一个肿瘤转移相关基因。MTA1 在多种人类肿瘤中异常高表达, 具有促进肿瘤细胞恶性增殖的作用, 并在肿瘤血管生成、侵袭和转移过程中扮演重要角色。但 MTA1 在 SCLC 中的表达及其与化疗疗效的关系尚未见报道。本研究采用免疫组化法检测无远处转移 SCLC 组织中 MTA1 蛋白的表达, 并探讨其与足叶乙甙 (VP-16) 联合顺铂 (DDP) 方案 (EP) 化疗疗效及预后的关系, 为治疗及预后判断提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例为南京军区南京总医院 2001 年 1 月至 2010 年 1 月经外科手术切除或穿刺活检病理确诊的 52 例无远处转移 SCLC, 随访资料均相对完整; 其中手术标本 18 例, 穿刺活检标本 34 例; 男性 36 例, 女性 16 例; 年龄范围 16~80 岁, 平均 (56.9±10.7) 岁; 按照美国退伍军人协会 (VALG) 的 SCLC 分期: 局限期 43 例, 广泛期 9 例; 根据国际抗癌联盟 (UICC) 2009 年第 7 版国际肺癌分期标准: I 期 11 例, II 期 16 例, III 期 25 例; 肿瘤直径: ≤3cm 者 15 例, >3 且 ≤5cm 者 24 例, >5cm 者 13 例; 39 例有淋巴结转移, 20 例有脉管侵犯。纳入标准: (1) 随访资料完善; (2) 初治患者; (3) 经病理检查确诊; (4) 治疗前 PS 评分 0~2 分; (5) 均以 EP 方案化疗 4~6 个周期; (6) 无远处转移。

1.2 主要试剂与仪器 鼠抗人 MTA1 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 兔抗鼠二抗购自福州迈新生物技术公司, DAB 显色液、En Vision 即用型二抗购自丹麦 DaKo 公司, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 购自上海凌峰化学试剂有限公司, EDTA 抗原修复液购自上海硕盟生物科技服务有限公司。CKX31 型倒置显微镜购自日本 Olympus 公司, RM-2235 超薄切片机构购自德国 Leica 公司, YD-AB 生物组织摊烤片机购自金华益迪医疗设备有限公司。

1.3 免疫组化检测 采用 En Vision 法检测 52 例

SCLC 组织及其中 18 例对应癌旁组织的 MTA1 表达水平。所有采集组织经甲醛固定、脱水、石蜡包埋, 4μm 厚连续切片。标本常规脱蜡至水, 经高压抗原修复 2min, 抗原修复液为枸橼酸盐缓冲液, 3% H₂O₂ 作用 10min, 阻断内源性过氧化物酶活性, 鼠抗人 MTA1 多克隆抗体按 1:100 稀释后 4℃ 孵育过夜, 次日取出后室温恢复 30min, PBS 清洗后, 滴加即用型二抗, 37℃ 孵育 30min, PBS 清洗后, DAB 染色, 复染后封片。用已知阳性表达的 SCLC 组织作阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定 MTA1 蛋白阳性表达于细胞核, 表现为棕黄色颗粒。切片均由两名病理专家根据双盲法原则共同做出判断, 不一致时通过协商以达成共识。采用免疫组化染色结果半定量分析计数系统, 根据染色细胞百分率和染色强度综合计分进行结果判定。染色细胞百分率: 无阳性细胞计为 0 分, <10% 计 1 分, 10%~50% 计 2 分, 51%~80% 计 3 分, >80% 计 4 分; 染色强度: 无染色计为 0 分, 弱染色计 1 分, 中等染色计 2 分, 强染色计 3 分。将两项评分的乘积分为两个等级: ≤6 分分为低表达, >6 分为高表达。

1.5 治疗方法 52 例患者均用 EP 方案化疗, 具体方案: VP-16 100mg/m² 静滴, d₁~d₅; DDP 60mg/m² 静滴 d₁, 3 周为 1 周期, 化疗 4~6 个周期。

1.6 疗效评价 按 RECIST 1.1 版标准评价疗效, 分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、稳定 (SD) 和进展 (PD)。化疗结束后 6 个月后评定化疗敏感性。化疗敏感是指化疗结束后 6 个月无肿瘤复发, 即 CR+PR+SD; 化疗耐药是指化疗过程中肿瘤进展或化疗结束后 6 个月内肿瘤复发, 即 PD。

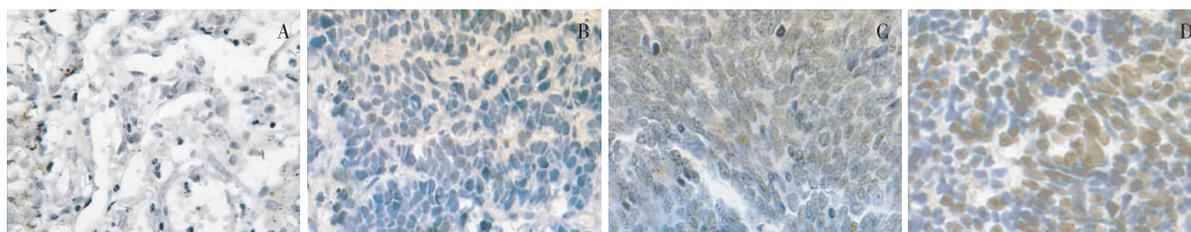
1.7 随访 通过门诊复诊、电话及通信等方式定期随访患者, 记录肿瘤复发或转移的部位及时间。52 例患者均获随访, 随访截止日期为 2012 年 8 月。随访时间为 26~64 个月, 中位随访 46.6 个月。研究指标包括无进展生存期 (PFS) 及总生存期 (OS)。PFS 定义为自肿瘤明确诊断至病情进展或患者死亡的时间, OS 定义为自肿瘤明确诊断至患者死亡的时间。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 18.0 版软件进行处理。率的比较采用 χ^2 检验, 生存分析采用 Kaplan-

Meier 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTA1 蛋白在 SCLC 组织和癌旁组织中的表达



A: 癌旁组织不表达; B: 癌组织不表达; C: 癌组织低表达; D: 癌组织高表达

图 1 SCLC 和癌旁组织中 MTA1 的表达 (En Vision $\times 400$)

2.2 MTA1 表达与 SCLC 临床病理特征的关系

MTA1 表达在肿瘤直径、TNM 分期、淋巴结转移与否、有无脉管侵犯之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在性别、年龄、VALG 分期及肿瘤部位之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 MTA1 蛋白表达与 SCLC 临床病理特征的关系 [例 (%)]

临床病理参数	n	低表达	高表达
性别			
男	36	9(25.0)	27(75.0)
女	16	6(37.5)	10(62.5)
年龄(岁)			
≤55	20	6(30.0)	14(70.0)
>55	32	9(28.1)	23(71.9)
直径(cm)			
≤3	15	10(66.7)	5(33.3)*
>3 且 ≤5	24	2(8.3)	22(91.7)
>5	13	3(23.1)	10(76.9)
TNM 分期			
I	11	9(81.8)	2(18.2)*
II	16	4(25.0)	12(75.0)
III	25	2(8.0)	23(92.0)
VALG 分期			
局限期	43	14(32.6)	29(67.4)
广泛期	9	1(11.1)	8(88.9)
肿瘤部位			
周围型	36	12(33.3)	24(66.7)
中央型	16	3(18.8)	13(81.3)
淋巴结转移			
无	13	8(61.5)	5(38.5)*
有	39	7(18.0)	32(82.1)
脉管侵犯			
无	32	13(40.6)	19(59.4)*
有	20	2(10.0)	18(90.0)

注: * $P < 0.05$

MTA1 蛋白在 SCLC 组织中的阳性表达主要定位于细胞核, 呈不同程度的棕黄色颗粒; 其中 37 例高表达 (71.2%), 15 例为低表达 (28.8%)。MTA1 蛋白在 18 例癌旁组织中均为低表达。见图 1。

2.3 MTA1 表达与 EP 方案化疗疗效的关系

37 例 MTA1 高表达患者中有 20 例化疗敏感 (54.1%), 15 例 MTA1 低表达患者中有 12 例化疗敏感 (80.0%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.644, P = 0.020$)。

2.4 MTA1 表达与 SCLC 预后的关系

52 例 SCLC 患者的中位 OS 为 20 个月 (5~74 个月), 中位 PFS 为 11 个月 (3~70 个月)。MTA1 蛋白低表达组的中位 OS 明显长于高表达组 (33 个月 vs. 18 个月), 且中位 PFS 也明显长于高表达组 (20 个月 vs. 8 个月), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

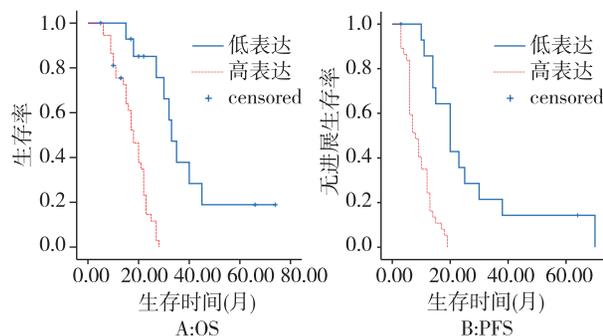


图 2 不同 MTA1 表达 SCLC 患者的生存曲线

3 讨论

SCLC 起源于支气管神经内分泌细胞, 是肺癌中较为特殊的一种类型, 占全球每年新发肺癌病例的 15%~20%。与 NSCLC 相比, SCLC 生长迅速, 增殖率高, 分化程度低, 更易发生广泛转移, 恶性程度在所有类型肺癌中最高。尽管 SCLC 对放、化疗呈现出较好的初始反应, 但很快即出现复发或转移^[1]。耐药的形成, 尤其是肿瘤的多药耐药 (multi-

drug resistance, MDR) 是导致化疗失败的主要原因^[2-3]。

MTA1 是 Toh 等^[4-5] 在具有转移潜能的鼠乳腺癌细胞株 13762NF 中分离出的候选肿瘤转移相关基因,后在人的高转移性乳腺癌细胞中发现了同源的 MTA1 基因,定位于染色体 14q32.3。MTA1 在多种人类肿瘤中高表达,具有促进肿瘤细胞恶性增殖的作用,并在肿瘤血管生成以及侵袭转移过程中扮演重要角色^[6-7]。Martin 等^[8] 发现,早期原发性乳腺癌中 MTA1 表达上调,而且 MTA1 过表达的乳腺癌淋巴结转移阴性者,其疾病复发风险与淋巴结转移阳性者相当。Kidd 等^[9] 发现小肠类癌组织中 MTA1 基因 mRNA 或蛋白表达可预测其恶性潜能和转移倾向,与非转移的原发性肿瘤相比,MTA1 基因在高度恶性小肠类癌组织及肝脏和淋巴结转移灶中表达升高。胰腺癌细胞系中 MTA1 mRNA 的表达水平亦与其转移潜能有关,胰腺癌组织中 MTA1 mRNA 的表达水平升高,则患者淋巴结转移概率升高^[10]。在肺癌中,Zhu 等^[11] 通过免疫组化检测 100 例 NSCLC 患者 MTA1 蛋白的表达,发现 61.0% 的癌组织高表达,而相应正常组织仅 9.4% 为高表达,且 MTA1 表达与临床分期和淋巴结转移相关,生存分析表明 MTA1 高表达提示预后不良。Li 等^[12] 也证实,在早期 NSCLC 组织中,MTA1 高表达与微血管密度增高,肿瘤复发及预后不良相关。但 MTA1 在 SCLC 中的表达及临床意义尚未见报道。

本研究发现,SCLC 组织 MTA1 阳性表达均定位于细胞核,而在癌旁组织中均为低表达。另外,MTA1 的表达与肿瘤直径、TNM 分期、淋巴结转移、脉管侵犯密切相关,而与年龄、性别、肿瘤部位和 VALG 分期均无关,提示 MTA1 蛋白高表达可能与抑制 SCLC 细胞的分化成熟,促进肿瘤生长、侵袭及转移密切相关。

既往研究表明,MTA 家族在肿瘤发生及演进过程中的作用机制可能包括以下几种:(1) MTA 家族参与核小体重塑及组蛋白去乙酰化(NuRD)复合体的形成,从而参与基因转录调节,包括 p14^{ARF}、p21^{WAF1} BRCA1 及 HIC1 等^[13]。(2) 介导蛋白与蛋白间相互作用:MTA 家族参与组成的 NuRD 复合体对非组蛋白同样也起作用,例如含有 MTA1 或 MTA2 蛋白的组蛋白去乙酰化酶 1 复合体具有使 p53 蛋白^[14] 及低氧诱导因子 1α (HIF-1 α)^[15] 去乙酰化作用。(3) 促进上皮间质转化(EMT):有研究表

明 MTA1 是转化生长因子 β 的下游蛋白之一,活化转录因子 Snail 和 Slug^[16],后两者直接抑制上皮型钙粘蛋白表达,促使 EMT 发生,肿瘤转移潜能增加;(4) 参与 DNA 损伤修复;上述机制中,DNA 损伤修复可减轻化疗药物(如 DDP 等)的治疗作用,明确与 MDR 有关。EMT 表现为上皮细胞失去分化特征,细胞与细胞间的紧密连接以及细胞极性消失,并获得间质细胞特性,包括耐受凋亡能力的增加,因此对化疗药物的敏感性降低。另外,MTA 基因参与转录调节及介导蛋白-蛋白相互作用,也可能通过间接作用影响 MDR 形成,例如 MTA1 通过调节 BCAS3 基因表达,与乳腺癌患者对他莫西芬的耐受性有关^[17]。因此,尽管目前 MTA 家族基因与化疗耐药的关系鲜见报道,但两者之间存在必然联系。本研究发现 MTA1 高表达者的化疗敏感率低于 MTA1 低表达者,表明 MTA1 的表达情况可能影响 SCLC 对 EP 方案的化疗敏感性。另外,生存分析显示 MTA1 不同表达者 PFS 和 OS 的差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 MTA1 表达可影响 SCLC 的生存预后。

综上所述,MTA1 蛋白表达与 SCLC 的转移和预后密切相关,且与 EP 方案化疗疗效相关。由此提示 MTA1 有可能成为肺癌转移的标志物,MTA1 高表达可能是 SCLC 细胞 MDR 表型形成的一个重要分子机制。对 MTA1 进一步深入研究,明确其对肿瘤转移及其在 SCLC MDR 中的作用及可能机制,进一步寻找 MTA1 的作用底物,阻断其作用途径,发掘 MTA1 的特殊抑制剂,将对控制肿瘤转移和进展发挥重要作用,并可为逆转其耐药探索新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Lopez-Chavez A, Sandler A. Systemic issues in small cell lung cancer[J]. *Curr Probl Cancer*, 2012, 36(3):131-155.
- [2] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(4):265-283.
- [3] 陈一天,封冰,陈龙邦.小细胞肺癌化疗耐药进展[J].*医学研究生学报*,2012, 25(5):515-519.
- [4] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37):22958-22963.
- [5] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. Analysis of the complete se-

- quence of the novel metastasis-associated candidate gene, mta1, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines[J]. *Gene*, 1995, 159(1):97-104.
- [6] Li SH, Tian H, Yue WM, et al. Metastasis-associated protein 1 nuclear expression is closely associated with tumor progression and angiogenesis in patients with esophageal squamous cell cancer [J]. *World J Surg*, 2012, 36(3):623-631.
- [7] Li DQ, Pakala SB, Nair SS, et al. Metastasis-associated protein 1/nucleosome remodeling and histone deacetylase complex in cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(2):387-394.
- [8] Martin MD, Fischbach K, Osborne CK, et al. Loss of heterozygosity events impeding breast cancer metastasis contain the MTA1 gene[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(9):3578-2580.
- [9] Kidd M, Modlin IM, Mane SM, et al. The role of genetic markers-NAP1L1, MAGE-D2, and MTA1--in defining small-intestinal carcinoid neoplasia[J]. *Ann Surg Oncol*, 2006, 13(2):253-262.
- [10] Iguchi H, Imura G, Toh Y, et al. Expression of MTA1, a metastasis-associated gene with histone deacetylase activity in pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(6):1211-1214.
- [11] Zhu X, Guo Y, Li X, et al. Metastasis-associated protein 1 nuclear expression is associated with tumor progression and clinical outcome in patients with non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(8):1159-1166.
- [12] Li SH, Tian H, Yue WM, et al. Overexpression of metastasis-associated protein 1 is significantly correlated with tumor angiogenesis and poor survival in patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(7):2048-2056.
- [13] Van Rechem C, Boulay G, Pinte S, et al. Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(16):4045-4059.
- [14] Luo J, Su F, Chen D, et al. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 408(6810):377-381.
- [15] Yoo YG, Kong G, Lee MO. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1[J]. *EMBO J*, 2006, 25(6):1231-1241.
- [16] Li DQ, Ohshiro K, Reddy SD, et al. E3ubiquitin ligase COP1 regulates the stability and functions of MTA1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(41):17493-17498.
- [17] Gururaj AE, Holm C, Landberg G, et al. Breast cancer-amplified sequence 3, a target of metastasis-associated protein 1, contributes to tamoxifen resistance in premenopausal patients with breast cancer[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(13):1407-1410.

收稿日期:2013-08-30; 修回日期:2013-10-22