

结直肠癌组织中 MST3 的表达和临床意义

孙 昭 高鹤丽 周 娜 白春梅 韩 钦

摘要 目的 检测 MST3 在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)组织的表达,评价其对 CRC 预后的影响。方法 免疫组化检测 MST3 在 CRC 肿瘤组织及瘤旁正常组织中的表达,分析 MST3 和临床病理因素之间的关系以及 MST3 表达对 CRC 患者无病生存期(disease free survival, DFS)的影响。结果 75 例 CRC 患者中,肿瘤组织 MST3 表达阴性的为 39 例,阳性的 36 例,而瘤旁组织中 MST3 阳性的为 52 例,阴性的为 23 例, MST3 表达在肿瘤组织中显著低于瘤旁组织($P=0.030$)。肿瘤组织中 MST3 阳性的患者 DFS 为 74.9 ± 7.4 个月(95% CI: 60.5 ~ 87.3 个月),阴性患者 DFS 为 43.2 ± 5.3 个月(95% CI: 32.9 ~ 53.5 个月)比较差异有统计学意义($P=0.043$)。结论 MST3 在结直肠癌肿瘤组织表达低于瘤旁组织, CRC 患者肿瘤组织 MST3 阳性的 DFS 更长。

关键词 MST3 结直肠癌 预后

中图分类号 R735.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.008

MST3 Expression in Colorectal Carcinoma and Its Clinical Significance. Sun Zhao, Gao Heli, Zhou Na, et al. Department of Oncology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

Abstract Objective To detect the MST3 expression in colorectal carcinoma (CRC) and to evaluate its effect on the prognosis of CRC. **Methods** Expression of MST3 in CRC tumor tissues and adjacent normal tissues was detected by immunohistochemistry. The association between MST3 expression and clinicopathological parameters and prognosis was subsequently determined. **Results** Of 75 CRC patients, MST3 expression of cancer tissue was positive in 36 patients, negative in 39 patients, MST3 expression of pericarcinoma tissue was positive in 52 patients and negative in 23 patients. MST3 expression rate was significantly lower in CRC cancer tissue than in pericarcinoma tissue ($P=0.030$). The DFS of MST3-positive colorectal cancer patients was 74.9 ± 7.4 m (95% CI: 60.5 - 87.3 months), which was significantly longer than that of MST3-negative patients [DFS is 43.2 ± 5.3 months (95% CI: 32.9 - 53.5 months)], $P=0.043$.

Conclusion MST3 expression decreases in colorectal cancer tissue, and a positive MST3 expression predicts a better prognosis in CRC patients.

Key words MST3; Colorectal carcinoma; Prognosis

结直肠癌是全世界最常见的消化道恶性肿瘤之一,发生率和病死率均居全球恶性肿瘤的第 3 位。每年全球有超过 120 万例患者诊断为结直肠癌,超过 60 万人死于该病^[1]。我国 2015 年的数据显示,发生率男性中占第 5 位,女性中占第 4 位,为癌症死亡的第 5 位^[2]。复发转移转移是结直肠癌患者死亡的主要原因之一,大约 50% ~ 60% 的结直肠癌患者术后复发并发生远处转移,这些患者的 5 年生存率 < 12%^[3]。目前常用的临床病理因素并不能准确筛选出术后高复发转移的患者,所以探索新的分子标志物将有助于结直肠癌的精准治疗。MST3 (mammalian

STE20-like kinase 3) 是 Ste20-related kinases 家族的成员,又被称为 STK24, Hennig 等研究发现 MST3 在结肠腺瘤和结肠癌肿瘤组织中 mRNA 和蛋白水平表达均低于正常结肠组织^[4-6]。但是 MST3 和结肠癌预后之间的关系尚未见诸报道,所以笔者计划研究 MST3 表达是否与结直肠癌无病生存期相关。

材料与方 法

1. 临床资料:患者纳入标准:2008 ~ 2010 年在北京协和医院基本外科手术的结直肠癌患者;经病理科医生阅片,明确诊断为结直肠癌;手术为 R₀ 切除;术后均进行过辅助化疗;有明确随访结果并可以进行评估的患者。最终纳入研究的患者共 75 例,其中男性 40 例,女性 35 例, >65 岁的老年患者 30 例, <65 岁非老年患者的 45 例,结肠癌患者 48 例,直肠癌患者 27 例,根据美国国立癌症网络肿瘤分期标准判断为 II 期的患者 18 例, III 期的患者 57 例,患者的辅助化

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472785、81672313)

作者单位:100730 中国医学科学院北京协和医院肿瘤内科(孙昭、高鹤丽、周娜、白春梅);中国医学科学院基础医学院细胞生物学系(韩钦)

通讯作者:韩钦,电子信箱:hanqinhanqin@126.com

疗方案为 FOLFOX(奥沙利铂联合氟尿嘧啶/叶酸)的 24 例,为 XELOX(奥沙利铂联合卡培他滨)的 41 例。随访日期截止到患者复发或者 2015 年 12 月,中位随访时间为 38 个月。由病理科医生对所有患者的 HE 染色的病理片进行重新阅片,分别选择肿瘤组织和癌旁组织的蜡块进行切片,免疫组化染色。

2. 免疫组合法检测 MST3 在结直肠癌和结直肠正常上皮组织中的表达:石蜡组织切片常规脱蜡至水,0.01mol/L 柠檬酸缓冲液微波修复 10min,过氧化酶阻断溶液阻断内源性过氧化物酶的活性,山羊血清封闭 15min,加抗 MST3 抗体(1:100,Genetex 公司),4℃过夜,加生物素标记的二抗(中杉金桥公司),室温孵育 60min。DAB 显色液(购自迈新公司)显色,然后切片常规脱水到二甲苯,树脂封片,在显微镜下观察计数阳性细胞。免疫组化染色判断标准:阳性细胞数 < 10% 者为阴性, > 10% 为阳性。

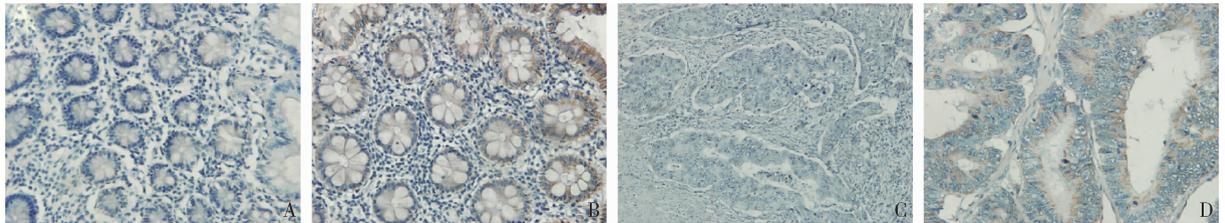


图 1 免疫组化检测 MST3 在结直肠癌患者癌旁组织和肿瘤组织中的表达(×400)
A. 癌旁组织 MST3 阴性;B. 癌旁组织 MST3 阳性;C. 肿瘤组织 MST3 阴性;D. 肿瘤组织 MST3 阳性

3. 肿瘤组织中 MST3 表达和其他临床病理因素之间的关系:将 CRC 组织中的 MST3 表达与 75 例患者的临床病理资料进行统计学分析,CRC 患者肿瘤组织中的 MST3 表达情况和临床病理因素均不相关(P 均 > 0.05,表 1)。

4. MST3 表达水平对结直肠癌患者术后无病生存期的影响:在本研究所有患者中的无病生存期(disease free survival,DFS)为 63.9 ± 5.3 个月(95% CI:53.5 ~ 74.4 个月),肿瘤组织中 MST3 阴性的患者 DFS 为 43.2 ± 5.3 个月(95% CI:32.9 ~ 53.5 个月)。肿瘤组织中 MST3 阳性的患者 DFS 为 74.9 ± 7.4 个月(95% CI:60.5 ~ 87.3 个月)。肿瘤组织 MST3 阳性的患者 DFS 较长,和阴性患者比较,差异有统计学意义($P = 0.043$)。癌旁组织 MST3 阴性的患者 DFS 为 49.2 ± 5.2 个月(95% CI:38.9 ~ 59.4 个月),癌旁组织 MST3 阳性的患者 DFS 为 67.4 个月(95% CI:52.4 ~ 82.4 个月),癌旁 MST3 阳性的患者 DFS 较长,但差异无统计学意义($P = 0.618$,图 2)。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.00 统计学软件进行统计分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用 χ^2 检验或四格表确切概率检验,生存数据分析采用 Kaplan - Meier 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患者的临床病理特点:75 例结直肠癌患者中,腺癌 70 例(93.33%),其中高分化 9 例,中分化 54 例,低分化 7 例,黏液腺癌 4 例,印戒细胞癌 1 例,其中黏液腺癌和印戒细胞癌未描述分化情况。截止随访有 34 例复发,41 例没有复发。

2. MST3 在肿瘤组织和癌旁组织中表达水平:在 75 例结直肠癌患者中,肿瘤组织 MST3 表达阴性的为 39 例,阳性的为 36 例,而癌旁组织中 MST3 阳性的为 52 例,阴性的为 23 例,两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.722, P = 0.030$,图 1)。

表 1 肿瘤组织 MST3 表达和其他临床病理特征之间的关系 (n)

组别	MST3 阴性	MST3 阳性	χ^2	P
年龄(岁)				
≤65	24	21	0.08	0.777
>65	15	15		
性别				
男性	25	15	3.786	0.052
女性	14	21		
部位				
结肠	24	24	2.931	0.087
直肠	19	8		
分化				
高分化	5	4	0.052	0.82
中低分化	34	32		
分期				
Ⅱ期	10	8	0.12	0.729
Ⅲ期	29	28		
脉管癌栓				
有	7	2	1.948	0.163
无	34	30		
T 分期				
1~2	4	6	0.666	0.415
3~4	3	30		

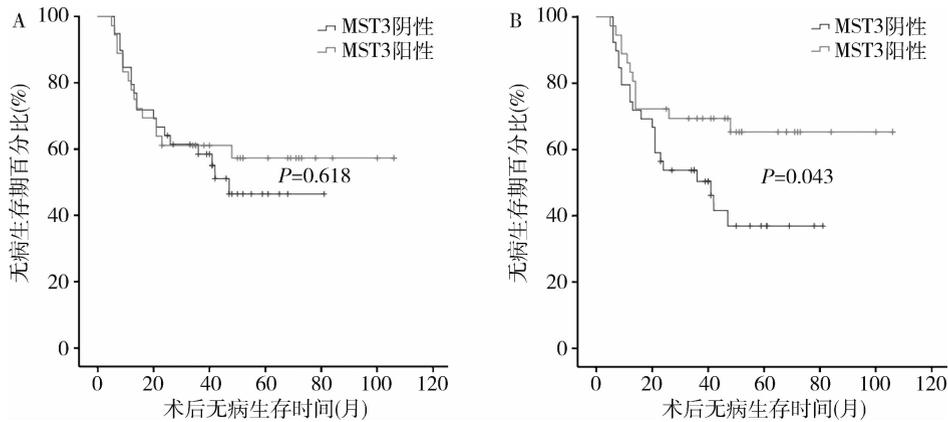


图2 MST3表达对结直肠癌患者术后无病生存时间的影响

A. 瘤旁组织; B. 肿瘤组织

讨 论

目前,临床上仍然应用 TNM 分期来判断结直肠癌患者预后,但是相同分期的患者可能会有完全不同的临床转归,所以探索新的分子生物学标志物,可以将相同分期的患者进一步区分开来,指导临床个体化治疗。近年来,微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)、KRAS 突变、BRAF 突变、PIK3 突变、CpG 岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype, CIMP)及免疫检测点蛋白表达水平都被报道可能成为结直肠癌预后因子,但其作为预后及疗效预测因子在临床实际应用中仍有争议^[7-12]。

MST3 属于 Ste20 - related kinases 家族,是 MAPK 信号通路上游的一个丝/苏氨酸激酶。在肿瘤中 MST3 可能参与了细胞增殖,凋亡和转移等多个细胞生物学过程。首先 MST3 可以通过 NDR (nuclear Dbf2 - related kinase) 调控细胞周期和增殖, NDR 作为一个丝/苏氨酸激酶可以直接磷酸化细胞周期蛋白 p21, 调控其稳定性^[13]。在乳腺癌细胞系中, MST3 可以通过通过 VAV2/ Rac1 信号轴促进乳腺癌细胞系的增殖,主要是通过调控 Cyclin D1 的表达,影响细胞周期^[14]。其次, MST3 过表达可能促进细胞的凋亡,这种半胱天冬酶依赖的 MST3 羧基端蛋白水解可以导致 MST3 核转位,从而促使 DNA 片段化和细胞出现凋亡形态^[15]。另外也可能在氧化应激过程中通过依赖 JNK 的信号途径介导凋亡^[16]。最后 MST3 可能影响肿瘤细胞的迁移,干扰 MST3 的表达可以下调 E - cadherin 的表达,同时还可以通过酪氨酸磷酸酶 Paxillin 的磷酸化,影响肿瘤细胞的移动^[17,18]。Paxillin 是在细胞骨架组织中起关键作用的细胞内衔接蛋

白,可以将整合素连接到 FAK 从而影响细胞黏附和脱落^[19,20]。因此 Paxillin 的磷酸化可抑制细胞迁移和侵袭。

MST3 在结直肠癌中的功能尚无报道,在本研究中笔者选取了 75 例有完整随访资料的结直肠癌 II 期和 III 期术后的患者作为研究对象,免疫组化法检测 MST3 蛋白在结直肠癌组织和相应的正常结肠上皮中的表达,发现 MST3 在肿瘤组织中表达显著低于正常上皮,和既往报道的结果相似^[6]。随后笔者分析了肿瘤组织中 MST3 表达和临床病理因素的关系,发现 MST3 的表达和临床病理因素均不相关,这可能是由于病例数目较少的原,而在生存分析中,肿瘤组织 MST3 阳性和阴性患者比较,DFS 显著更长,对于临床结直肠癌术后,筛选高复发风险患者人群,有一定的指导意义。

综上所述, MST3 在结直肠癌肿瘤组织表达低于瘤旁组织,结直肠癌患者肿瘤组织中 MST3 阳性的无进展生存期更长。由于随访患者中死亡人数较少,所以 MST3 和总生存之间的关系尚不清楚, MST3 在结直肠癌中的作用及作用机制仍需要进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115 - 132
- 3 Siegel R, Desantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(4): 220 - 241
- 4 Thompson BJ, Sahai E. MST kinases in development and disease[J]. J Cell Biol, 2015, 210(6): 871 - 882
- 5 Olesen SH, Zhu JY, Martin MP, et al. Discovery of diverse small - molecule inhibitors of mammalian sterile20 - like kinase 3 (MST3)

- [J]. *Chem Med Chem*,2016, 11(11): 1137 - 1144
- 6 Hennig EE, Mikula M, Rubel T, *et al.* Comparative kinome analysis to identify putative colon tumor biomarkers[J]. *J Mol Med: Berl*, 2012, 90(4): 447 - 456
 - 7 Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil - based adjuvant therapy in colon cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(20): 3219 - 3226
 - 8 Sinicrope FA, Shi Q. Combining molecular markers with the TNM staging system to improve prognostication in stage II and III colon cancer: are we ready yet? [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(21): 1616 - 1618
 - 9 Hutchins G, Southward K, Handley K, *et al.* Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(10): 1261 - 1270
 - 10 Shiovitz S, Bertagnolli M M, Renfro L A, *et al.* CpG island methylator phenotype is associated with response to adjuvant irinotecan - based therapy for stage III colon cancer[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(3): 637 - 645
 - 11 Marisa L, Svrcsek M, Collura A, *et al.* The balance between cytotoxic T - cell lymphocytes and immune checkpoint expression in the prognosis of colon tumors[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(1): 32 - 39
 - 12 Li Y, Liang L, Dai W, *et al.* Prognostic impact of programmed cell death - 1 (PD - 1) and PD - ligand 1 (PD - L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 55
 - 13 Cornils H, Kohler R S, Hergovich A, *et al.* Human NDR kinases control G(1)/S cell cycle transition by directly regulating p21 stability[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(7): 1382 - 1395
 - 14 Cho CY, Lee KT, Chen WC, *et al.* MST3 promotes proliferation and tumorigenicity through the VAV2/Rac1 signal axis in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 14586 - 14604
 - 15 Le TL, Joseph SR, Yap AS, *et al.* Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E - cadherin [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 283(2): C489 - C499
 - 16 Lin CY, Wu HY, Wang PL, *et al.* Mammalian Ste20 - like protein kinase 3 induces a caspase - independent apoptotic pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1): 98 - 105
 - 17 Mardakheh FK, Self A, Marshall CJ. RHO binding to FAM65A regulates Golgi reorientation during cell migration[J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(24): 4466 - 4479
 - 18 Lu TJ, Lai WY, Huang CY, *et al.* Inhibition of cell migration by autophosphorylated mammalian sterile 20 - like kinase 3 (MST3) involves paxillin and protein - tyrosine phosphatase - PEST[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(50): 38405 - 38417
 - 19 Kanteti R, Batra SK, Lennon FE, *et al.* FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 31586 - 31601
 - 20 Qin J, Wang F, Jiang H, *et al.* MicroRNA - 145 suppresses cell migration and invasion by targeting paxillin in human colorectal cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1328 - 1340

(收稿日期:2017 - 09 - 21)

(修回日期:2017 - 09 - 30)

(上接第 31 页)

- 9 Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, *et al.* The miR - 29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury [J]. *Physiol Genomics*,2012,44(4):237 - 244
- 10 Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russell RC, *et al.* YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K - TOR pathways by suppressing PTEN via miR - 29 [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(12): 1322 - 1329
- 11 Liu J, Li L, Suo WZ. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties [J]. *Life Sci*, 2009, 84(9 - 10): 267 - 271
- 12 Fischer GW, Lin HM, Krol M, *et al.* Noninvasive cerebral oxygenation may predict outcome in patients undergoing aortic arch surgery [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*,2011,141(3):815 - 821
- 13 Kurth CD, Steven JM, Nicolson SC. Cerebral oxygenation during pediatric cardiac surgery using deep hypothermic circulatory arrest [J]. *Anesthesiology*,1995,82(1):74 - 82
- 14 Zhang N, Komine - Kobayashi M, Tanaka R, *et al.* Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain [J]. *Stroke*,2005,36(10):2220 - 2225
- 15 Shen L, Wang J, Liu K, *et al.* Hydrogen - rich saline is cerebroprotective in a rat model of deep hypothermic circulatory arrest [J]. *Neurochem Res*,2011,36(8):1501 - 1511
- 16 Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [J]. *Physiol Rev*,2007,87(1):315 - 424
- 17 Imlay JA. Pathways of oxidative damage [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2003,57(395 - 418)
- 18 Griffiths - Jones S, Saini HK, van Dongen S, *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics [J]. *Nucleic Acids Res*,2008,36:D154 - 158
- 19 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*,2005,120(1):15 - 20

(收稿日期:2017 - 09 - 04)

(修回日期:2017 - 09 - 06)