

Stathmin/Oncoprotein 18(Op18)基因在人骨肉瘤中的表达及其意义*

张大鹏¹ 张圣洁¹ 于大淼² 富 勇^{1△}

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001 2 伊春市第一医院 黑龙江 伊春 153000)

摘要 目的 探讨 stathmin/oncoprotein 18 (Op18)基因在人骨肉瘤中的表达规律及意义。方法 分别采用免疫组化法和 Western blot 法检测 10 例正常骨组织和 56 例骨肉瘤中 stathmin 蛋白的表达。结果 免疫组化法检测 stathmin 蛋白在正常骨组织、低级别骨肉瘤(G1 级组)及高级别骨肉瘤(G2 级组)中阳性表达率分别为 20 %、65 %、100 %。正常骨组织分别与 G1 级组、G2 级组比较 均有显著性差异($P < 0.05$) ,G1 级组与 G2 级组比较 有显著差异($P < 0.05$)。Western blot 法检测显示 stathmin 蛋白在正常骨组织、G1 级组、G2 级组表达相对值分别为 (0.34 ± 0.15) 、 (0.68 ± 0.21) 、 (0.90 ± 0.17) 。正常骨组织分别与 G1 级组、G2 级组比较 差异均有显著性($P < 0.01$) ,G1 级组与 G2 级组比较 差异有显著性($P < 0.01$)。结论 Stathmin 在骨肉瘤中过表达 与骨肉瘤的发生及发展密切相关。

关键词 骨肉瘤 stathmin/oncoprotein 18 免疫组化法 Western blot

中图分类号 R738.1 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)19-3709-04

Expression and Significance of Stathmin/Oncoprotein 18(Op18) Gene in Human Osteosarcoma*

ZHANG Da-peng¹, ZHANG Sheng-jie¹, YU Da-miao², FU Yong^{1△}

(1 Department of Orthopaedics, the Fourth Clinical College of Harbin medical university, Harbin, 150001, China;

2 the First Hospital In YiChun, 153000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of stathmin/ oncoprotein 18 (Op18) in human osteosarcoma and its relation to biological behaviors of osteosarcoma. **Methods:** The stathmin protein expressions of 56 cases with human osteosarcoma and 10 cases of normal bone tissues were examined by immunohistochemical staining and Western blot methods. **Results:** The positive rate of stathmin in normal human bone tissues, G1 grade and G2 grade were 20%, 65%, 100% respectively. The difference between normal human bone tissues and G1 grade, G2 grade were significant ($P < 0.05$) respectively; the difference between G1 grade and G2 grade were significant ($P < 0.05$). Expression of stathmin in normal human bone tissues , G1 grade and G2 grade were (0.34 ± 0.15) , (0.68 ± 0.21) , (0.90 ± 0.17) respectively. The difference between normal human bone tissues and G1 grade, G2 grade were significant ($P < 0.01$) respectively; the difference between G1 grade and G2 grade were significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** Overexpression of stathmin plays an important role in development and progression of human osteosarcoma.

Key Words: Osteosarcoma; Stathmin/oncoprotein 18; Western blot; Immunohistochemical staining

Chinese Library Classification(CLC): R738.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)19-3709-04

前言

骨肉瘤是骨科最常见的骨肿瘤,其发病率约占全部原发性恶性肿瘤的 35 %~40 %。由于骨肉瘤生长方式多呈浸润式,且复发率高。有学者统计过去的 30 年中骨肉瘤的治愈率,特别是恶性骨肉瘤病人的治愈率没有得到明显的提高。过去传统的治疗包括手术切除后联合放疗及化疗都没有显著提高骨肉瘤的治愈率。因此,早期发现骨肉瘤,采用手术联合基因治疗骨肉瘤的新方法成为广大学者的共识,肿瘤的基因治疗逐渐在近年被广大学者重视。而 Stathmin 提供了一个骨肉瘤基因治疗的新方向^[1]。

1 材料与方法

1.1 病例选择

选择哈尔滨医科大学附属第四医院 2000 年 1 月 -2009 年 1 月收治的 56 例骨肉瘤患者切除骨组织及 10 例截肢的正常骨组织。患者年龄在 14~35 岁之间,平均年龄 21 岁。所有患者均为第一次手术,术前均未行任何抗肿瘤放、化疗和介入治疗。按照人卫出版社第 6 版外科教科书骨肉瘤分类标准进行病理分级

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法 免疫组化组将一部分骨组织用福尔马林固定,用于 stathmin 兔抗人多克隆抗体购自美国 C.S.T 公司 S-P 免疫组织化学染色试剂盒及 DAB 染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。经高压修复 stathmin 抗原,一抗浓度

* 基金项目 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No. 11551168)

作者简介 张大鹏(1973-) 男,主治医师,硕士,研究方向:骨关节外科。电话:13704811345 E-Mail: zdap2006@yahoo.com.cn.

△通讯作者 富勇 E-Mail: fuyong01@126.com

(收稿日期 2011-02-04 接受日期 2011-03-17)

是 1:100,实验步骤按试剂盒说明书操作,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。stathmin 蛋白表达阳性信号定位于肿瘤细胞的胞浆,呈浅黄、棕黄或棕褐色阳性颗粒。Stathmin 蛋白免疫组化阳性细胞判定标准,参照 sulzers 分级法。①以着色强度分为 4 级:无阳性着色,定 0 分;可见浅棕色阳性颗粒,定 1 分;可见棕色阳性颗粒,定 2 分;可见棕褐色阳性颗粒,定 3 分。②以阳性细胞分 4 级:查 5 个高倍视野,计算 100 个细胞中的阳性百分率,并求出平均值。I 无阳性细胞着色,定 0 分;阳性细胞数小于 25%,定 1 分;阳性细胞数占 26-50%,定 2 分;阳性细胞数大于 51%,定 3 分。Stathmin 蛋白免疫组化阳性细胞判定标准为①、②之积,0 分视为阴性(-),1~2 分视为阳性(+),3~6 分视为中度阳性(++),7~9 分视为强阳性(+++)。

1.2.2 Western blot 法 液氮速冻一部分标本,用 -70℃低温冰箱保存,用于免疫印迹:Stathmin 兔抗人多克隆抗体购自美国 C.S.T 公司,兔抗人 β -actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,羊抗兔 IgG-HRP 购自武汉博士德生物工程有限公司。在手术离体后无菌条件下取患骨、用 RPMI-1640、(RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品)培养液冲洗骨髓腔制备骨髓悬液,红细胞裂解液去除红细胞后,用 RPMI-1640 全培养液调细胞密度为 2×10^6 个/ml,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。每两天换一次液,去除非贴壁细胞,到第 6 天时纯度可达 80%以上。另将肿瘤于 30 分钟内迅速投入 -70℃液氮冻存。①组织蛋白提取:取新鲜标本各 200 mg,抽提全蛋白,测浓度后 -70℃冻存备用。②检测

stathmin 蛋白:先后灌制 200 g/L 和 80 g/L 的 SDS-聚丙烯酰胺分离胶和积层胶,并加电泳缓冲液(Tris-甘氨酸)后,拔去梳子加样。每处加样 50 μ L,第一泳道加入预染的低分子量标准分子质量蛋白。起始电压 8V/cm,样品进入分离胶后提至 15 V/cm。电泳完毕后用将蛋白转印于 NC 膜上,脱脂奶粉封闭膜后加入兔抗人 stathmin 多克隆抗体(1:500)的 TBST,4℃过夜;洗膜,加过氧化物酶(1:1000 辣根)标记的羊抗兔 IgG,反应 1h。凝胶电泳鉴定后,从凝胶中纯化回收 Stathmin 的 DNA 片段。蛋白的检测均以 PBS 替代一抗作为阴性对照,以 β -actin 作为阳性对照。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0.0 统计软件进行 t 检验,所得结果用均数 $\pm$ 标准差表示。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化法检测 Stathmin 在骨肉瘤中的表达

表达阳性 Stathmin 蛋白信号位于胞浆,呈褐紫色阳性颗粒(见图 1)。Stathmin 蛋白表达情况见表 1,其在正常骨组织、G₁ 级、G₂ 级组的阳性表达率分别为 20.0%、65.0%、100%,呈逐渐上升趋势。经统计学分析显示,正常骨组织分别与 G₁ 级组、G₂ 级组比较,有显著性差异(P<0.05),G₁ 级组与 G₂ 级组比较,有显著差异(P<0.05)。

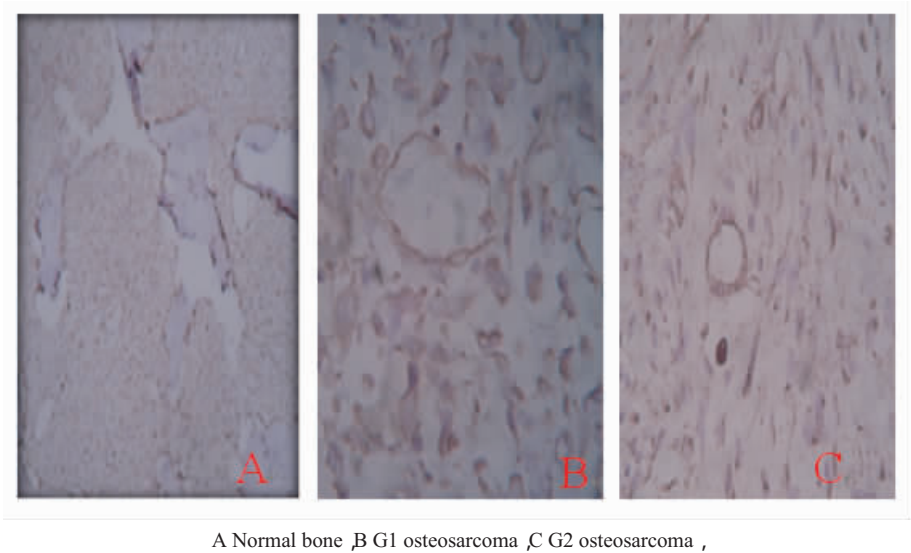


Figure 1 The immuno-positive products of Stathmin in different grade osteosarcoma

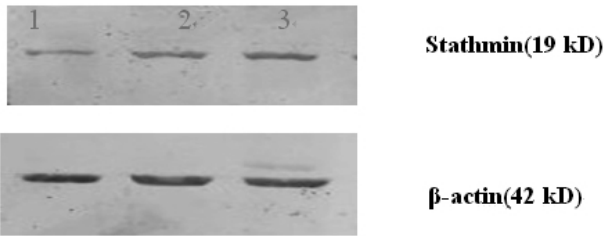
表 1 stathmin 在骨肉瘤的表达
Table 1 Expression of stathmin in osteosarcoma

Group	n	Stathmin			x ²	P
		-	+	%		
Normal bone	10	8	2	20.0	11.61*	0.0277
Osteosarcoma						
Grade G1	20	7	13	65.0	11.64#	<0.05
Grade G2	36	0	36	100	29.52**	<0.05

Note: * Compared with G1, # Compared with G2, ** Compared with normal bone

2.2 Western blot 法检测 Stathmin 在骨肉瘤中的表达

Western blot 法检测发现 Stathmin 蛋白在正常骨组织、G₁ 级组、G₂ 级组表达(见图 2)。分别与相应样本 β-actin 相比,求出其比值(见表 2)。经统计分析显示,与正常骨组织比较,G₁ 级组、G₂ 级组比较,差异均有显著性(P<0.01),G₁ 级组与 G₂ 级组比差异有显著性(P<0.01)。



Note :1 normal bone,2 osteosarcoma of G₁, 3 osteosarcoma of G₂

图 2 Stathmin 蛋白在正常骨组织和各级骨肉瘤中的表达

Figure 2 The expressions of Stathmin protein in the bone and osteosarcoma

表 2 stathmin 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Express of stathmin protein($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Relative Expression
Normal bone	10	0.34± 0.15
Osteosarcoma		
Grade G ₁	20	0.68± 0.21*
Grade G ₂	36	0.90± 0.17*#

Note :* P <0.01 compared with normal bone, # compared with Grade G₁

3 讨论

肿瘤的基因治疗随着细胞、分子生物学在近年高速发展已逐渐为广大学者重视。国内外寻找基因治疗的靶点成为研究热点。选择合理、有效的靶点是基因治疗的关键和主要方向。

人 Stathmin 是最先从淋巴瘤中挑选出的特征性的表达基因^[2]。是原癌基因蛋白-18(oncogene protein18, p18),也称为 p18, p19, Proso1in 及 Metablastin。其广泛存在细胞质中的磷酸蛋白,经检测有 150 个氨基酸构成。包括中心区、N 端的结构调节域和 C 端的蛋白相互作用结构域。中心区包括 4 个域构成其核心区域连接 N 端和 C 端,可构成与微管蛋白相互作用的 Stathmin 最小片段。人们最初开始发现认识 stathmin 是由于其在急性白血病细胞胞质中的高表达。以及 stathmin 对胞外信号所产生的甲基化、乙酰化、磷酸化的反应。近年来的研究发现, stathmin 是一种主要的微管不稳定蛋白,其调节微管从生长阶段过渡到停止阶段,使微管发生 "破坏"。即在细胞周期的不同阶段通过甲基化、乙酰化、磷酸化和去磷酸化作用来调节细胞周期的不同阶段的细胞微管系统动力平衡,从而并以此改变细胞的增殖、分化、活性等生物学行为^[3]。由于 stathmin 在细胞的增殖和分化中起着重要的调节作用,其表达的紊乱可能导致与肿瘤的发生和发展有关,即在正常细胞的增殖和分化中所起

起着 "负面" 的调节作用,使其癌变。stathmin 还能改变肉瘤细胞的形态,调节其运动和转移。在复发和转移的肉瘤中 stathmin 表达更高,提示 stathmin 也可能与肉瘤的发展和转移相关。已有文献报道 stathmin 基因与口腔鳞癌^[4]、肺癌^[5]、乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌^[6]等多种实体恶性肿瘤实体的发生和发展有着直接密切关系。多种恶性肿瘤中 Stathmin 都有高水平表达,也有学者认为 Stathmin 的高水平表达是恶性细胞维持高增殖率和转化表型所必需微管与肿瘤血管生成的可塑性密切相关^[7]。而通过抑制其表达可以干扰恶性细胞的分裂。并且抑制 Stathmin 表达能够协同增效某些化疗药物的抗癌疗效^[7]。Mistry 等^[8]证实了其设计的抗 Stathmin 核酶的能力,抗 Stath-min 核酶能够从癌变细胞中分离的总 RNA 混合物中选择性分离纯 Stathmin RNA,并利用某病毒投递系统进行肿瘤细胞中抗 Stathmin 核酶的有效基因转移,从而提供了一种新的、有效的肿瘤基因治疗形式^[9,10]。最近的研究还发现, stathmin 可以直接调节一些组织的发育^[11]。虽然人们对 stathmin 基因在一些组织发育和相关疾病做了有关研究,但其在人骨肉瘤中的表达及对肿瘤生物学行为特征的评价研究尚未见报道。

在本研究中,Western blot 法检测显示 stathmin 蛋白在正常骨组织、G₁ 级、G₂ 级组表达相对值分别为 (0.34± 0.15)、(0.68± 0.21)、(0.90± 0.17)。正常骨组织分别与 G₁ 级级组、G₂ 级组比较,差异均有显著性(P<0.01),G₁ 级组、G₂ 级组比较,差异有显著性(P<0.01)。免疫组化法显示,在正常骨组织、G₁ 级级组、G₂ 级组骨肉瘤中 stathmin 蛋白阳性表达率分别为 20.0、65.0、100,正常骨组织分别与 G₁ 级级组、G₂ 级组比较,有显著差异 (P<0.05),G₁ 级组、G₂ 级组比较,有显著差异(P<0.05)。Stathmin 蛋白除在肿瘤细胞胞浆中有表达外,在各级别骨肉瘤中表达呈阳性,这些提示 stathmin 在骨肉瘤的发生和发展中起了重要的作用,可能参与了骨肉瘤血管生成,对骨肉瘤的生长、转移和浸润起促进作用。

Stathmin 是细胞内微管相关蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化和去磷酸化磷酸化过程中的重要调节因子,其主要功能是促进微管蛋白的解聚作用是其主要功能,后者能有效促使纺垂体的有丝分裂^[11]。也就是说 stathmin 在细胞的有丝分裂过程中 stathmin 起着重要的调节作用,通过控制细胞周期来影响细胞的增殖与分化是通过控制细胞周期来影响^[11]。由于 stathmin 在细胞有丝分裂过程中的重要的调节作用以及在肿瘤组织中的高表达,一些学者试图通过抑制 stathmin 的表达既控制微管从生长阶段过渡到停止阶段来以及阻断 stathmin^[12]。通过用 siRNA 能在 mRNA 水平上抑制 stathmin 的表达,增加 G₂/M 期骨肉瘤细胞数量,抑制微管的生成,明显促进凋亡的发生。反义核酸单克隆抗体核酶 stathmin 蛋白抑制剂及丝氨酸酶位点突变体等方法封闭该基因表达也均证实,抑制其表达可使细胞受阻于 G₂/M 期,明显促进凋亡的发生^[13]。所以 stathmin 的生物学功能成为了目前研究恶性肿瘤生物治疗的热点之一。stathmin 基因治疗现已证明也能明显抑制肝、前列腺癌细胞的增殖^[14], stathmin 联合使用抑制微管功能的药物如紫杉烷和长春花碱抗癌作用还有协同作用^[15]。

综上所述,本文发现 Stathmin 基因及表达产物是一个极具

可行性的提供了分子标志的早期诊断和治疗恶性骨肉瘤的生物治疗的新靶点。并进一步为认识骨肉瘤发生发展的分子机制提供理论基础。由于本文仅研究了 stathmin 表达水平与骨肉瘤临床病理特征之间的关系，没有相关预后资料，所以 stathmin 表达水平与骨肉瘤患者的预后关系有待进一步研究。

参考文献(Reference)

- [1] Mistry SJ, Benham C, Atweh GF. Development of ribozymes that target stathmin, a major regulator of the mitotic spindle [J]. *Anti-sense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, 11(1): 41-49
 - [2] Stephan A, Vorburger, Kelly K. Hunt. Adenoviral gene therapy. The *Oncologist*, 2002,7(1):46-59
 - [3] Ng DC, Zhao TT, Yeap YY, et al. c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of stathmin confers protection against cellular stress [J]. *J Biochem*, 2010,285(37):29001-29013
 - [4] Kouzu Y, Uzawa K, Koike H, et al. Overexpression of stathmin in oral squamous-cell carcinoma correlation with tumour progression and poor prognosis[J]. *Br J Cancer*,2006,94(5):717-723
 - [5] Chen G, Wang H, Charib TG, et al. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung adenocarcinomas [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003,2(2):107 -116
 - [6] Zhang D, Tari AM, Akar AU. Silencing kinase-interacting stathmin gene enhances erlotinib sensitivity by inhibiting Ser(1) p27 phosphorylation in epidermal growth factor receptor-expressing breast cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(11):3090-3099
 - [7] Mistry SJ, Atweh GF. Therapeutic interactions between stathmin inhibition and chemotherapeutic agents in prostate cancer[J]. *Mol Cancer Ther*,2006,5(12):3248-3257
 - [8] Akao Y, Kusakabe S, Banno Y, et al. Ceramide accumulation is independent of camptothecin-induced apoptosis in prostate cancer LNCaP cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002,294:363-370
 - [9] 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
 - [10] Tamminga CA, Sobel A, Curmi PA, et al. Phosphorylation of the tubulin-binding protein, stathmin, by Cdk5 and MAP kinases in the brain[J]. *J Neurochem*,2006,99(1): 237-250
 - [11] Shumyatsky GP, Malleret G, Bolshakov VY, et al. Stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear [J]. *Cell*, 2005,123(4) : 697-709
 - [12] Ohkawa N, Fujitan IK, Tokunaga E, et al. The microtubule destabilizer stathmin mediates the development of dendritic arbors in neuronal cells [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(3): 1447-1456
 - [13] Larsson N, Melander H, Marklund U, et al. G₂/M transition requires multisite Phosphorylation of oncoprotein 18 by two distinct protein kinase systems[J]. *J Biol Chem*,1995,270(23):14175-14183
 - [14] Iancu C, Mistry SJ, Aikin S, et al. Taxol and anti-stathmin therapy: a synergistic combination that targets the mitotic spindle [J]. *Cancer Res*, 2000,60(13):3537-3541
 - [15] Segerman B, Larsson N, Holmfeldt P, et al. Mutational analysis of OP18/Stathmin tubulin-interacting surfaces [J]. *BiolChem*, 2000, 275 (46):35759-35766
-
- (上接第 3679 页)
- [12] 谢红旗. 急性血行播散型肺结核 26 例误诊分析[J]. *中国实用内科杂志*, 2000, 20 (11) : 694-695
Xie Hong-qi. Analysis of 26 diagnostic errors in acute disseminated pulmonary tuberculosis [J]. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*, 2000, 20 (11) : 694-695
 - [13] Im JG, Song KS, Kang HS, et al. Mediastinal tuberculosis mimicking pharyngitis: Clinical manifestations[J]. *Radiology*, 2000, 164 (12): 115-119
 - [14] 张淑萍, 杨健, 蔡洪贺. 高分辨 CT 在肺结核诊断和鉴别诊断的价值[J]. *医学影像学杂志*, 2003, 13: 758-760
Zhang Shu-ping, Yang Jian, Cai Honghe. The value of high-resolution CT in diagnosis and differential diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. *Journal of Medical Imaging*, 2003, 13: 758-760
 - [15] Kim Y, Lee KS, Yoon JH, et al. Tuberculosis of the trachea and main bronchi: CT findings in 27 patients [J]. *AJR*, 2000, 168 (12): 1051-1056