

Spinophilin 的表达与垂体腺瘤侵袭性的关系

阳 荣 牟 吉 周 龙 田仁富

【摘要】目的 探讨垂体腺瘤(PA)组织Spinophilin(SPN)的表达及其与腺瘤侵袭性的关系。**方法** 选取2018年8月至2021年6月手术切除并经术后病理确诊的PA组织98例和瘤旁组织64例,用免疫组化染色检测SPN蛋白表达水平,应用PCR检查PA组织SPN mRNA表达水平。根据Knosp分类法评估肿瘤侵袭性。**结果** 98例中,侵袭性46例,非侵袭性52例。PA组织SPN阳性表达率(21.43%,21/98)明显低于瘤旁组织(71.87%,46/64; $P<0.05$)。侵袭性PA组织SPN阳性表达率(13.04%,6/46)明显低于非侵袭性PA组织(28.85%,15/52; $P<0.05$)。PA组织SPN mRNA相对表达量(1.21 ± 0.37)明显低于瘤旁组织(2.89 ± 0.75 ; $P<0.05$)。SPN阴性表达($OR=2.876$; $95\%CI\ 1.003\sim5.121$; $P<0.001$)是PA侵袭性的独立危险因素。ROC曲线分析显示,SPN mRNA预测PA侵袭性的AUC为0.830($95\%CI\ 0.813\sim0.916$; $P<0.001$),诊断临界值为0.84,灵敏度和特异度分别为95.23%和83.12%。**结论** 侵袭性PA组织SPN呈低表达,检测SPN表达水平对PA侵袭性有一定评估作用。

【关键词】 垂体腺瘤;Spinophilin;肿瘤侵袭性;基因表达

【文章编号】 1009-153X(2022)05-0373-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Expression of Spinophilin in pituitary adenoma tissues and its relationship with tumor invasiveness

YANG Rong, MOU Ji, ZHOU Long, TIAN Ren-fu. Department of Neurosurgery, Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital, Enshi 445500, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of Spinophilin (SPN) expression in pituitary adenoma (PA) tissues and tumor invasiveness. **Methods** The SPN expression was detected in PA tissues obtained from 98 PA patients who underwent microsurgery from August 2018 to June 2021 and in 64 paratumor tissues. The expression level of SPN mRNA was detected by real-time fluorescent PCR in PA tissues. PA invasiveness was assessed by Knosp grade. **Results** Of 98 PA patients, 46 patients were classified as invasive PA and 52 non-invasive. The positive rate of SPN expression in paratumor tissues (71.87%, 46/64) was significantly higher than that in PA tissues (21.43%, 21/98; $P<0.05$). The positive rate of SPN expression in invasive PA tissues (13.04%, 6/46) was significantly lower than that (28.85%, 15/52) in non-invasive PA tissues ($P<0.05$). The relative expression of SPN mRNA in PA tissues (1.21 ± 0.37) was significantly lower than that (2.89 ± 0.75) in paratumor tissue ($P<0.05$). The relative expression of SPN mRNA in invasive PA tissues (0.73 ± 0.16) was significantly lower than that (1.68 ± 0.80) in non-invasive PA tissues ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that negative expression of SPN was an independent risk factor of PA invasion ($OR=2.876$; $95\%CI\ 1.003\sim5.121$; $P<0.05$). ROC curve analysis showed that the AUC of SPN mRNA ≥ 0.84 for predicting PA invasion was 0.830, with a sensitivity and specificity of 95.23% and 83.12%, respectively. **Conclusions** The expression of SPN in invasive PA tissues is low, and the detection of SPN expression has a certain value in assessing the invasiveness of PA.

【Key words】 Pituitary adenoma; Spinophilin; Tumor invasion; Gene expression

垂体腺瘤(pituitary adenoma, PA)是常见的颅内良性肿瘤^[1],但部分PA呈侵袭性生长,称为侵袭性PA,可侵犯海绵窦、颅骨和颈内动脉等,手术治疗效果较差^[2]。PA侵袭性涉及多种基因及信号通路的异常,蛋白磷酸酶调节底物的磷酸化在瘤细胞增殖、侵袭过程中发挥重要作用^[3,4]。Spinophilin(SPN)是从神经元树突棘中分离出来的,定位于染色体17q21.33,与蛋白磷酸酶1及F肌动蛋白存在相互作用^[5]。SPN参与突触可塑性、细胞骨架组装和细胞内信号转导,与阿尔茨海默症、帕金森病和胶质瘤等中枢神经系统疾病的发生、发展有关^[6-8]。既往研究发现SPN与肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移有关^[9]。本文探讨SPN在PA中的表达及其与肿瘤侵袭性的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 纳入标准:①术前未接受放、化疗;②组织病理学检查证实为PA;③年龄 ≥ 18 岁。排除标准:①合并其他部位肿瘤;②存在急慢性感染性疾病;③合并严重肝肾肾脏疾病;④合并免疫系统疾病。

2018年8月至2021年6月收治符合标准的PA

共 98 例,其中 64 例获取瘤旁组织(距腺瘤组织 ≥ 2 cm)。98 例中,男 53 例,女 45 例;年龄 21 岁~72 岁,平均(49.23 ± 11.29)岁;肿瘤直径 8~65 mm,平均(34.27 ± 10.03)mm;混合型 20 例,生长激素型 12 例,泌乳素型 24 例,促肾上腺皮质激素型 9 例,无功能型 33 例。根据 Knosp 分类法^[10]:侵袭性 46 例,非侵袭性 52 例。

1.2 免疫组化染色检测 SPN 的表达 PA 组织和瘤旁组织经 10%福尔马林固定,石蜡包埋、切片由本院病理科制作,厚度为 1.5 μ m。常规脱蜡后,进行抗原修复。PBS 洗涤 3 次后,加入 SPN 抗体(1 000:1,美国 Sigma 公司)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,随后温室放置 30 min。PBS 洗涤两次后加入二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,洗涤 2 次。进行 DAB 显色(武汉卡诺斯科技有限公司),避光下观察,3 min 内终止显色。最后用苏木素(上海懋康生物科技有限公司)复染 1 min,脱水、封片。显微镜下观察,细胞呈棕黄色为 SPN 阳性表达(图 1)。将阳性细胞百分比评分(阳性细胞百分比 $< 5\%$ 、 $6\% \sim 25\%$ 、 $26\% \sim 50\%$ 、 $\geq 51\%$,分别计 0、1、2、3 分)与染色强度评分(无染色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计 0、1、2、3 分)相乘, ≤ 2 分为阴性, ≥ 3 分为阳性^[11]。

1.3 荧光定量 PCR 检测 SPN mRNA 表达水平 用 TRIzol 试剂(上海源叶生物科技有限公司)提取组织总 RNA。通过反转录获取 cDNA,随后用荧光定量试剂盒(美国 Sigma 公司)进行检测,操作步骤按照试剂盒说明书进行,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 SPN mRNA 相对表达量。引物序列:SPN 上游 5'-GGCGATCATACTGGGAGATG-3',下游 5'-TGTGATTCAAGTTGGGTCAC-3';内参 GAPDH 上游 5'-AGCATAATACAGCAGGCACAGAC-3',下游 5'-AAAGGTTGTTCTCCACTCTCTCAC-3'。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件处理;计量资料

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验;计数资料用 χ^2 检验;应用多因素 logistic 回归模型分析侵袭性的影响因素;用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析 SPN mRNA 判断 PA 侵袭性的价值,计算曲线下面积(area under curve, AUC)、灵敏度和特异度; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PA 组织 SPN 的表达水平 PA 组织 SPN 阳性表达率(21.43%, 21/98)明显低于瘤旁组织(71.87%, 46/64; $P < 0.05$)。侵袭性 PA 组织 SPN 阳性表达率(13.04%, 6/46)明显低于非侵袭性 PA 组织(28.85%, 15/52, $P < 0.05$)。混合型 PA 组织 SPN 阳性表达率为 30.00%(6/20)、生长激素型为 25.00%(3/12)、泌乳素型为 20.83%(5/24)、促肾上腺皮质激素型为 22.22%(2/9)、无功能型为 15.15%(5/33),各种类型 PA 组织 SPN 阳性表达率无统计学差异($P > 0.05$)。PA 组织 SPN mRNA 相对表达量(1.21 ± 0.37)明显低于瘤旁组织(2.89 ± 0.75 ; $P < 0.05$)。侵袭性 PA 组织 SPN mRNA 相对表达量(0.73 ± 0.16)明显低于非侵袭性 PA 组织(1.68 ± 0.80 ; $P < 0.05$)。

2.2 PA 侵袭性的影响因素 单因素分析显示,肿瘤大小、增殖水平、SPN 表达水平与 PA 侵袭性有关($P < 0.05$, 表 1)。多因素 logistic 回归分析显示,肿瘤直径 > 3 cm (OR=4.103; 95% CI 1.351~10.672; $P < 0.001$)、Ki-67 增殖指数高 (OR=1.675; 95% CI 1.271~3.802; $P < 0.05$)、SPN 阴性表达 (OR=2.876; 95% CI 1.003~5.121; $P < 0.001$) 是 PA 侵袭性的独立危险因素。

2.3 SPN mRNA 预测 PA 侵袭性的价值 ROC 曲线分析显示,SPN mRNA 预测 PA 侵袭性的 AUC 为 0.830 (95%CI 0.813~0.916; $P < 0.001$),诊断临界值为 0.84,灵敏度和特异度分别为 95.23%和 83.12%,见图 2。

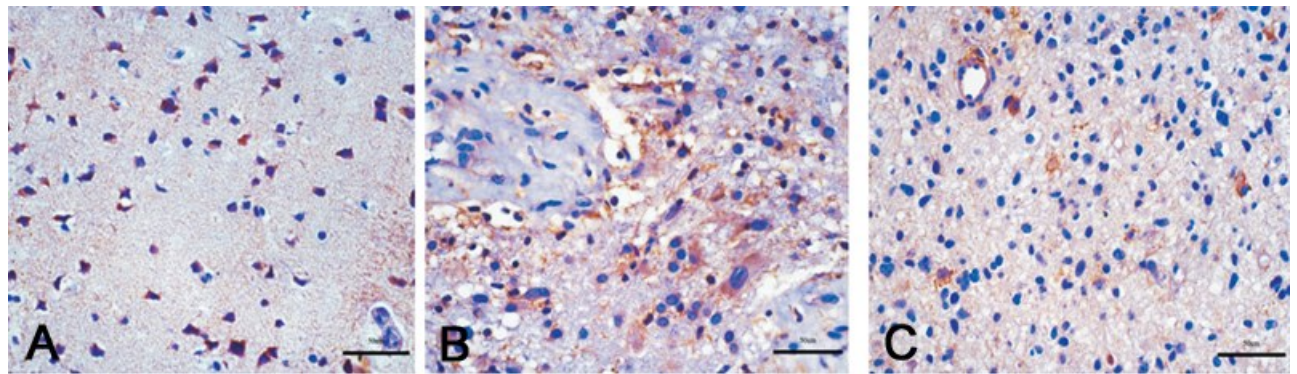


图 1 免疫组化染色检测组织 SPN 表达($\times 200$)

A. 垂体腺瘤瘤旁组织;B. 非侵袭性垂体腺瘤;C. 侵袭性垂体腺瘤

表 1 本文 98 例垂体腺瘤侵袭性危险因素的单因素分析

危险因素	侵袭性(n=46)	非侵袭性(n=52)
性别(例)		
男	24	29
女	22	23
年龄(例)		
≥60 岁	11	20
<60 岁	35	32
肿瘤直径(例)		
<1 cm	0	15
1~3 cm	8	26
>3 cm	38(82.6%)*	11(21.2%)
Ki-67 增殖指数	6.56±2.01*	4.89±1.94
肿瘤囊性变(例)	7	5
肿瘤类型(例)		
无功能型	13	20
促肾上腺皮质激素型	5	4
泌乳素型	12	12
生长激素型	7	5
混合型	9	11
SPN 表达(例)		
阳性	6	15
阴性	40(87.0%)*	31(71.2%)

注:与非侵袭性组相应值比,* P<0.05

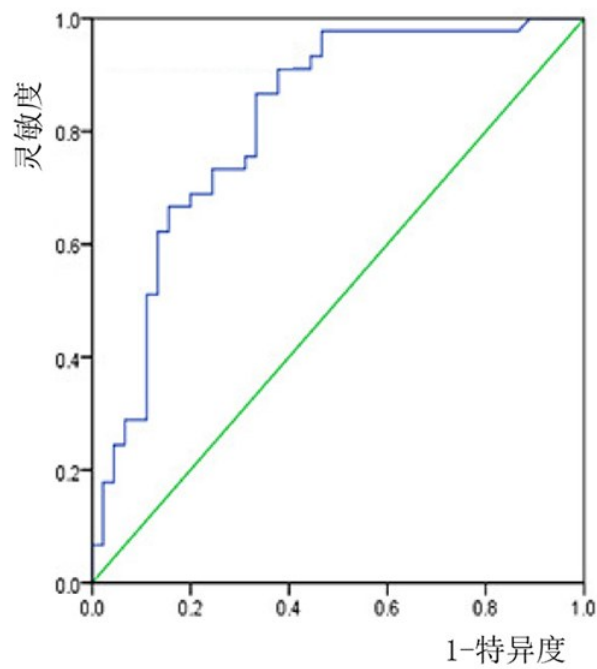


图 2 ROC 曲线分析 SPN mRNA 预测垂体腺瘤侵袭性的效果

3 讨论

PA 属于良性肿瘤,部分 PA 具有侵袭性。PA 侵袭性受多种因素影响。本文发现肿瘤直径和 Ki-67 增殖指数是 PA 侵袭性密切相关。这与既往报道一致^[11,12]。本文还发现,SPN 低水平表达与 PA 侵袭性有关。SPN 是黏度信号蛋白,在人体多种组织中均有表达,特别是在脑组织(脑皮质、海马和尾壳核)中表达丰富^[13]。SPN 可以与磷酸酶 PP1 结合,又被称为 PPP1R9B,可能参与肿瘤进展^[14]。研究发现 SPN 在肺腺癌细胞中低表达,与肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移密切相关^[15]。SPN 不仅与 PP1 结合,在脑组织中还与黏附分子、细胞骨架蛋白等多种蛋白相互作用,参与突触可塑性、细胞骨架组装和细胞内信号转导,与阿尔茨海默症、帕金森病和胶质瘤等中枢神经系统疾病的发生发展有关^[6,7,13]。研究发现 SPN 可以调节胶质母细胞瘤的侵袭性,下调 SPN 可以增强肿瘤细胞侵袭性,并且促进细胞外基质降解^[16]。本文发现,PA 组织 SPN 表达水平明显低于瘤旁组织,表明 SPN 可能在 PA 中发挥抑癌基因的作用。本文还发现侵袭性 PA 组织 SPN 阳性表达率明显低于非侵袭性 PA 组织;并且侵袭性 PA 组织 SPN mRNA 相对表达量明显低于非侵袭性 PA 组织;多因素 logistic 回归分析显示,SPN 阴性表达是 PA 侵袭性的独立危险因素;ROC 曲线分析显示 SPN mRNA 水平预测 PA 侵袭性的 AUC 为 0.830,诊断临界值为 0.84,灵敏度和特异度分别为 95.23% 和 83.12%。这提示 SPN mRNA 水平判断 PA 侵袭性具有较高的价值。

总之,PA 组织 SPN 呈低表达,检测 SPN 表达水平对 PA 侵袭性有一定评估作用。

【参考文献】

[1] 朱惠娟,王任直. 垂体腺瘤临床诊治进展[J]. 协和医学杂志,2020,11(5):533-536.

[2] Li J, Qian Y, Zhang C, et al. LncRNA LINC00473 is involved in the progression of invasive pituitary adenoma by upregulating KMT5A via ceRNA-mediated miR-502-3p evasion [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(6): 580.

[3] Zhou R, Wu Q, Wang M, et al. The protein phosphatase PPM1A dephosphorylates and activates YAP to govern mammalian intestinal and liver regeneration [J]. PLoS Biol, 2021, 19(2): e3001122.