

## SPAG5低表达与早期卵巢高级别浆液性癌患者预后关系

袁林静<sup>1</sup>, 郑敏<sup>2</sup>, 黄舒婷<sup>2</sup>, 黄佳明<sup>1</sup>, 邓松清<sup>1</sup>, 姚书忠<sup>1</sup>

(中山大学 1. 附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080; 2. 肿瘤防治中心妇科, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】探讨SPAG5对卵巢高级别浆液性癌细胞生长及紫杉醇药物敏感性的影响,分析原发灶组织中表达水平差异与患者预后关系。【方法】体外实验中通过瞬时敲降卵巢腺癌细胞株中SPAG5,紫杉醇处理细胞后,MTT法检测细胞活力及绘制细胞生长曲线,研究SPAG5对细胞生长增殖及紫醇敏感性的影响;然后通过免疫组织化学染色,研究110例患者组织中SPAG5表达水平与患者预后的关系。【结果】SKOV3细胞中敲降SPAG5后发生细胞周期G2/M期阻滞,使细胞生长明显受抑;免疫组织化学染色显示,12例接受新辅助化疗患者肿瘤组织中SPAG5表达明显升高,对于未接受新辅助化疗患者,SPAG5低表达者疾病无进展生存较差,早期患者中差异更显著,患者总生存也有相似趋势,但差异无统计学意义;在卵巢腺癌细胞株OVCAR3 A2780及SKOV3中敲降SPAG5后,细胞对0.5 μmol/L紫杉醇抵抗能力增强。【结论】SPAG5在卵巢腺癌细胞中调控细胞周期,促进细胞增殖,但早期卵巢高级别浆液性癌患者中SPAG5低表达者对紫杉醇的药物作用敏感性差,相应预后差,因此卵巢高级别浆液性癌辅助化疗方案应个体化选择。

**关键词:**卵巢高级别浆液性癌;SPAG5;紫杉醇

中图分类号:R737.31

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)03-0418-09

### Relationship between SPAG5 Low Expression and Poor Prognosis of Ovarian Early Stage High Grade Serous Carcinoma Patients

YUAN Lin-jing<sup>1</sup>, ZHENG Min<sup>2</sup>, HUANG Shu-ting<sup>2</sup>, HUANG Jia-ming<sup>1</sup>, DENG Song-qing<sup>1</sup>, YAO Shu-zhong<sup>1</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Gynecology, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Corresponding to: YAO Shu-zhong, E-mail: yszlfy@163.com

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the role SPAG5 play in ovarian adenocarcinoma cell mitosis, Taxol sensitivity and ovarian high grade serous carcinoma patients' prognosis. 【Methods】 Transient knockdown of SPAG5 in SKOV3 cell were performed, and MTT assay and cell cycle flow cytometry assay were carried out. IHC staining of SPAG5 protein in 110 high grade serous carcinoma patients' tumor tissues were performed, and the expression were analyzed with clinical data and prognosis. Finally, SPAG5 were knocked down in OVCAR3 A2780 and SKOV3 cells followed by 0.5 μM Taxol treatment, MTT assay were performed to detect cell viability. 【Results】 SPAG5 knockdown inhibited cell mitosis of ovarian adenocarcinoma cell SKOV3 by G2/M arrest. High grade serous carcinoma patients after neoadjuvant chemotherapy gained the expression of SPAG5. Patients without neoadjuvant chemotherapy with low SPAG5 expression have poor progress free survival, especially in early stage patients. Patients with low SPAG5 expression also have poorer overall survival, but the difference was not statistically significant. Furthermore, SPAG5 knockdown in OVCAR3 A2780 and SKOV3 cells reduced Taxol sensitivity. 【Conclusion】 SPAG5 regulated cell mitosis and promoted cell proliferation in ovarian adenocarcinoma cell lines. Expression of SPAG5 in patients' tumor tissues predicted patients' prognosis and Taxol sensitivity. As the results, individualized treatment of high grade serous carcinoma patients is necessary.

**Key words:** ovarian high grade serous carcinoma; SPAG5; Taxol

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(3): 418-426]

收稿日期:2017-01-20

基金项目:广东省自然科学基金(2016A030310171)

作者简介:袁林静,博士,医师,E-mail: yuanlinjing@163.com;姚书忠,通信作者,教授,博士生导师,E-mail: yszlfy@163.com

卵巢癌(ovarian cancer)是女性生殖系统三大肿瘤之一,其中卵巢上皮性癌(epithelial ovarian cancer, EOC)占有新发病例的95%,而EOC中超过一半为卵巢高级别浆液性癌(high grade serous carcinoma, HGSC)<sup>[1]</sup>。卵巢HGSC发病隐匿,易发生播撒转移,患者初诊时多已发展到疾病的进展期,预后差,因此卵巢HGSC严重威胁女性健康<sup>[2-3]</sup>。卵巢癌的治疗以手术为主,虽然手术是否能达到满意减灭是患者预后的决定性因素,但是化疗作为最重要的辅助治疗手段,在巩固患者手术疗效及改善患者预后中,也有着举足轻重的地位。目前卵巢HGSC一线化疗药物为铂类联合紫杉类,临床上最常用卡铂联合紫杉醇静脉化疗(NCCN指南 卵巢癌 2016 v1)。卵巢HGSC作为一种异质性极强的实体肿瘤,其对化疗药物的敏感性千差万别。多年来研究及临床实践已证实,卵巢HGSC对铂类的敏感与否为最重要的临床预后指标之一,但卵巢HGSC对紫杉醇药物敏感性的探讨与研究相对薄弱。随着对紫杉醇周疗等方案的研究深入,卵巢HGSC对紫杉醇敏感性及其分子机制的研究应受到更多重视,以期待在此基础上指导卵巢HGSC患者化疗中紫杉醇的应用<sup>[4]</sup>。SPAG5(sperm-associated antigen 5)是一个纺锤体结合蛋白,调控细胞完成正确有序的分裂过程<sup>[5-6]</sup>,在细胞的正常增殖过程中发挥保护作用<sup>[7-8]</sup>。目前,肿瘤组织中SPAG5的过表达被认为与ER阳性乳腺癌、非小细胞肺癌患者较差的预后相关<sup>[9-11]</sup>,具体作用机制并没有研究。由于紫杉醇主要通过固定细胞微管结构达到抑制细胞有丝分裂的作用,目前微管结合蛋白对紫杉醇药物作用的调节,是细胞对紫杉醇耐药的研究重点<sup>[12]</sup>。SPAG5虽然不属于微管结合蛋白,但是因为它主要通过结合微管结构发挥其功能,所以SPAG5的表达及功能可能与紫杉醇药物作用有密切关系。我们前期研究结果显示,宫颈癌中SPAG5影响肿瘤细胞对紫杉醇药物敏感性并且作用与药物浓度有关<sup>[13]</sup>,据此我们推测,紫杉醇在肿瘤细胞中的作用可能与SPAG5的表达存在着更为复杂的相互作用。本实验将研究SPAG5与卵巢HGSC患者预后之间的关系,以及卵巢腺癌细胞中SPAG5表达与细胞生长增殖及紫杉醇药物作用间的关系,探讨卵巢HGSC患者紫杉醇相关化疗的敏感性及其药物作用机制,为卵巢HGSC患者化疗方案的个体化选择提

供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 卵巢癌患者组织标本处理

卵巢癌患者肿瘤组织取自中山大学肿瘤防治中心2002-2014年间手术切除标本。患者经过充分知情同意,并了解标本用于实验研究工作。110例患者组织学均为高级别浆液性癌(因卵巢浆液性癌两级分级系统为2004年由M.D. Anderson癌症中心Malpica提出,本实验入组病例大部分仍采用WHO分级系统。Malpica同时提出,WHO分级2~3级归类为高级别浆液性癌)<sup>[14]</sup>,包括FIGO分期I~IV期患者(分期标准为Federation International of Gynecology and Obstetrics Staging Guideline 2014),其中I期肿瘤病理分期均为3级,有术后辅助化疗指征。部分患者术前经新辅助化疗,常规行经腹卵巢癌全面分期手术或经腹卵巢癌肿瘤细胞减灭术,术后患者均接受辅助化疗,随访时间为2~14年。标本经甲醛固定后,送中山大学肿瘤防治中心病理科石蜡包埋。切片HE染色后,经2位中级职称以上病理医生确定病时类型为卵巢高级别浆液性癌,确定癌巢组织位置后,制组织芯片。

### 1.2 细胞培养

卵巢腺癌细胞均由含10%FBS(Gibco,美国)DMEM完全培养基(Gibco)37℃体积分数为5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养,细胞需传代或铺板时,弃去培养基后,PBS洗3次,加入Trypsin·EDTA(Gibco)至刚好没过细胞进行消化,完全培养基终止消化,细胞悬液150×g,5 min离心,弃上清,按需要加入培养基重悬并种入新培养瓶/皿中继续培养。

### 1.3 细胞总RNA抽提及qPCR检测SPAG5 mRNA表达水平

细胞重悬并洗涤后去上清,加入TRIZol(Gibco)500 μL充分匀浆后,向管中加入200 μL氯仿/mL TRIZol,动作轻柔混匀,室温放置10 min,4℃12 000×g离心15 min,取最上层无色透明液体转移至新1.5 mL EP管,加入500 μL异丙醇/mL TRIZol上下颠倒混匀,室温放置5~10 min,4℃12 000×g离心10 min,弃上清,加入1 mL 750 mL/L乙醇/mL TRIZol洗涤沉淀,4℃8 000×g离心5 min,弃上清,室温干燥后加入适量无酶水溶解

RNA 沉淀, NanoDrop 测定 RNA 浓度。依据 M-MLV 逆转录酶(Promega, 美国)说明书步骤, Random Primer(Promega)对细胞总 RNA 进行逆转录, 得到 cDNA。依据 GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix(Promega)说明书步骤, Bio-rad CFX96 荧光定量 PCR 仪对目标蛋白 mRNA 含量进行 qPCR 检测, Bio-Rad CFX Manager 对数据进行分析。

NCBI 查阅 SPAG5 mRNA 序列后, 利用 Primer Premier 5 设计引物序列如下: SPAG5 Forward Primer: 5'-CATCTCACAGTGGGATAACTAATAAAC-3'; SPAG5 Reverse Primer: 5'-CAGGGATAGGTGAAGCAAGGATA-3'; GAPDH Forward Primer: 5'-CTCCTCTGTTTCGACAGTCAGC-3'; GAPDH Reverse Primer: 5'-CCCAATACGACCAAATCCGTT-3'。

#### 1.4 免疫组化检测 SPAG5 蛋白表达水平

将组织芯片 60 °C 烤 30 min 后即放入二甲苯中脱蜡 10 min×3 次梯度浓度乙醇各 5 min 水化, PBS 洗 5 min×3 次, 枸橼酸钠缓冲液微波抗原修复, 自然冷却至室温, PBS 洗 5 min×3 次, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (甲醇) 室温 10 min, 去除内源性过氧化物酶, PBS 洗 1 min×5 次, 山羊血清工作液室温 30 min 封闭, SPAG5 一抗 1:400 稀释后 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 1 min×5 次, 带 HRP 二抗室温避光孵育 30 min, PBS 洗 1 min×5 次, DAB 底物显色 1 min 中止, 苏木素室温染色 5 min 后, 盐酸酒精分化 2 s, 清水冲洗 30 min 返蓝, 梯度浓度乙醇各 5 min 脱水, 二甲苯中 5 min×3 次透明后中性快干胶盖玻片封片。染色后请 2 位中级职称以上病理医生对组织染色情况进行评分, 按染色强度从阴性至强阳性分别评 0、1、2、3 分, 再与相应面积所占百分比相乘, 乘积之和为标本染色评分。

#### 1.5 细胞中 SPAG5 瞬时敲降

siSPAG5: CAGACUUAUCUUCAGAACATT, UGUUCUGAAGAUAAAGUCUGTT; siNC: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT, ACGUGACACGUUCGGAGAAATT。依据 LipofectamineRNAiMax (Invitrogen, 美国)说明书瞬转 siRNA Mimic 至卵巢癌细胞中, 敲降 SPAG5 mRNA 表达。

#### 1.6 MTT 法检测细胞活力

向已更换培养基细胞中加入 MTT 母液至终浓度 0.5 mg/mL, 培养 4 h, 弃去培养基后加入 150 μL/96 孔板孔 DMSO, 充分溶解紫色结晶, 酶标仪检测 490 nm 波长 OD 值, 计算细胞活力。

#### 1.7 细胞蛋白抽提及 Western Blot

细胞弃去培养基洗涤后加 Trypsin EDTA 消化为细胞悬液, 150×g, 5 min 离心弃上清, 依据说明书要求加入 ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent (Invitrogen), 室温放置 10 min 充分裂解, 4 °C 12 000×g 离心 10 min 得到细胞总蛋白, 依据 Pierce BCA 蛋白定量试剂盒说明书, 利用 Bio-Rad 酶标仪检测 562 nm 波长 OD 值, 检测样品蛋白浓度。将已定量的蛋白用 ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent 稀释至相同浓度, 加入 1/3 体积 4× DualColor<sup>™</sup> Protein Loading Buffer 及 1/19 体积 20× Reducing Agent (2 mol/L DTT), 100 °C 煮沸 5 min, 自然冷却至室温, Bio-Rad 电泳仪进行 SDS-PAGE 电泳并转至 PVDF 膜, TBST 洗涤 15 min, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 稀释一抗溶液 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 15 min×3 次, 稀释二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 15 min×3 次, ECL Western Blotting Substrate 发光, 胶片显影。

#### 1.8 流式细胞周期检测

细胞消化, PBS 洗涤 3 次, 以 2 mL -20 °C 预冷 750 mL/L 乙醇重悬细胞至单细胞悬液, -20 °C 固定 1 h, 离心乙醇, PBS 洗涤并重悬后, 加入 Rnase A 孵育 37 °C 30 min, 加入 400 μL PI 溶液 4 °C 避光孵育 1 h, BECKMAN 流式细胞仪 488nm 激发光检测。

#### 1.9 统计学分析

数据采用 SPSS Statistics 22 软件进行统计学分析, 计数资料比较采用卡方检验, 计量资料采用独立样本 *t* 检验, 生存分析采用 Log-rank (Mantel-Cox) test 及 Gehan-Breslow-Wilcoxon test。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

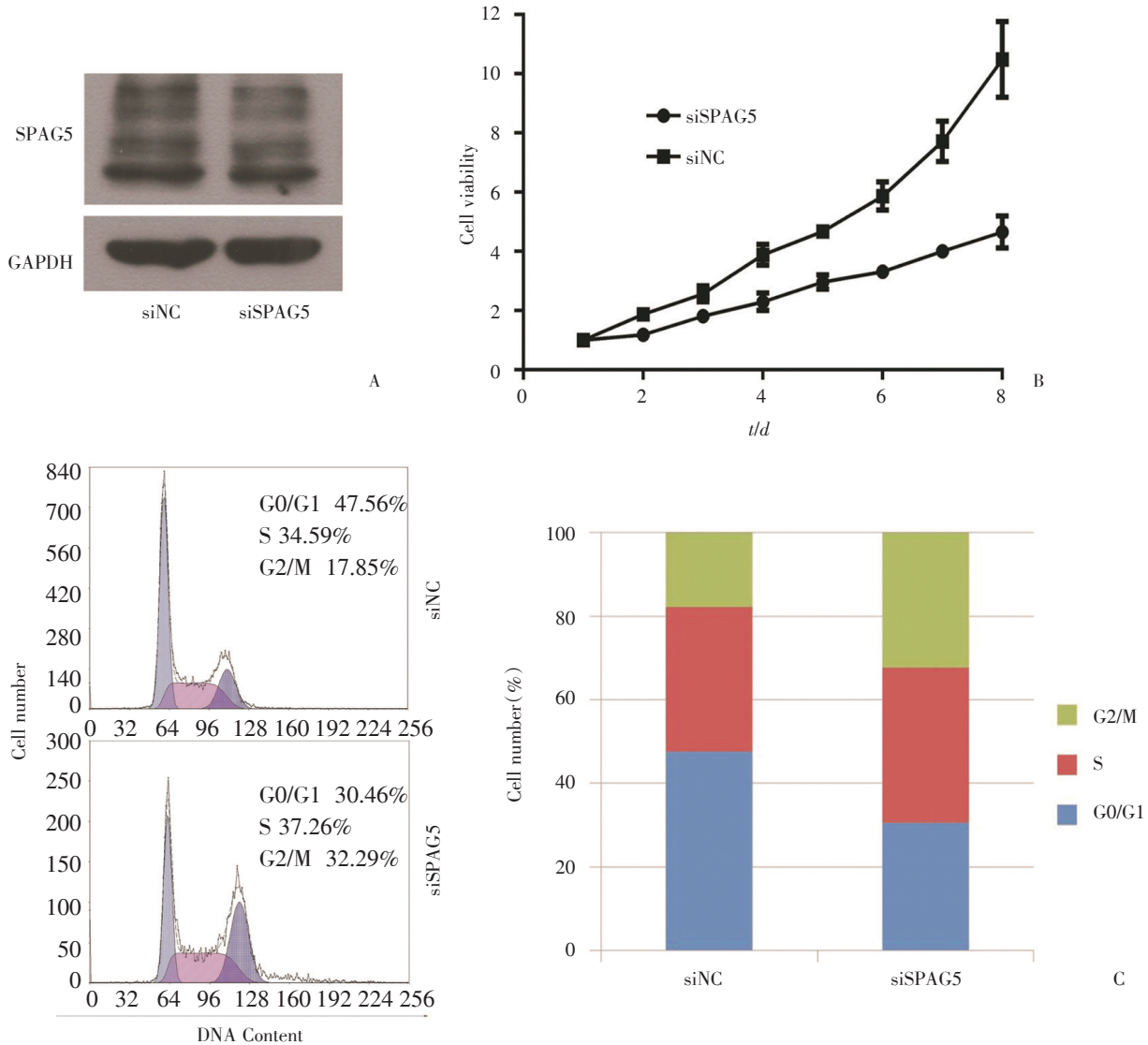
## 2 结 果

#### 2.1 SPAG5 敲降抑制卵巢腺癌细胞生长增殖

SPAG5 为细胞有丝分裂调控蛋白, 参与纺锤体的形成及姐妹染色单体分裂过程。通过设计并合成针对 SPAG5 mRNA 的 siRNA 序列, 并将 siRNA 利用脂质体瞬时转染至卵巢腺癌细胞株 SKOV3 中, 我们得以下调 SKOV3 中 SPAG5 的蛋白表达 (图 1A)。MTT 法连续 8 d 检测细胞活力, 绘制细胞生长曲线, 可以看出敲降 SPAG5 后 SKOV3 细胞生长受到明显抑制, 从第 2 天起, 两组细胞间细胞活力变化有统计学意义 ( $D_2 t = 6.57 P = 0.0002, D_3 t = 5.58$

$P = 0.0005$ ,  $D4 t = 7.75 P < 0.0001$ ,  $D5 t = 12.25 P < 0.0001$ ,  $D6 t = 11.42 P < 0.0001$ ,  $D7 t = 11.83 P < 0.0001$ 。经过 8 d 培养后,对照组细胞活力是 SKOV3 下调组细胞的 2.25 倍 ( $D8 t = 9.41 P <$

$0.0001$ ;图 1B)。流式细胞仪进行细胞周期检测,SKOV3 在敲降了 SPAG5 后 G2/M 期细胞从对照组的 17.85% 增加到 SPAG5 下调组的 32.29%,细胞发生了明显的 G2/M 期阻滞(图 1C)。



A: Lipofectamine RNAi Max transient transfected siSPAG5 (siRNA targeted SPAG5 mRNA) to SKOV3 and Western Blot showed SPAG5 protein expression down-regulated significantly. B: SKOV3 transient knockdown SPAG5 cell viability was detected by MTT Assay for 8 days. SPAG5 down expression inhibited cell growth significantly from the second day.  $n = 5$ . C: SKOV3 transient knockdown SPAG5 cell cycle was detected by flow cytometry. SPAG5 knockdown in SKOV3 cell led to obvious G2/M arrest.  $n = 1$

图1 卵巢腺癌细胞SKOV3中敲降SPAG5抑制细胞分裂增殖

Fig.1 Transient knockdown of SPAG5 in ovarian adenocarcinoma cell SKOV3 inhibited cell mitosis and proliferation

### 2.2 卵巢高级别浆液性癌患者原发肿瘤组织 SPAG5免疫组织化学染色

实验纳入中山大学肿瘤防治中心 2002-2014 年间初治卵巢 HGSC 患者 110 例,其中包括术前行新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy, NACT)患者 13 例。患者均经过规范治疗:全面分期手术或

初次肿瘤细胞减灭术后辅助化疗,有指征者 NACT 后行中间性肿瘤细胞减灭术,化疗方案均为 TC(紫杉醇+卡铂)方案。以疾病进展或死亡为观察终点,随访时间为 2 年至 14 年,患者年龄为 22 岁至 85 岁,平均年龄 51.77 岁,中位年龄 50 岁。其中 FIGO I 期患者 18 例,II 期患者 16 例,III 期

表1 卵巢高级别浆液性癌患者SPAG5表达水平与临床病理指标的关系

Table 1 Correlation between SPAG5 protein expression and clinical features in ovarian high grade serous carcinoma patients

Clinical feature		SPAG5				$\chi^2$	P
		Low/n	(%)	High/N	(%)		
NACT	No	49	44.5	48	43.6	1.09	0.24
	Yes	4	3.6	9	8.2		
Age	$\leq 50$	25	22.7	31	28.2	0.32	0.57
	$> 50$	28	25.5	26	23.6		
Histology grade	2	10	9.2	14	12.8	0.29	0.49
	3	43	39.4	42	38.5		
FIGO stage	I, II	12	11.0	21	19.3	1.83	0.15
	III, IV	40	36.7	36	33.0		
Lymph node	Negative	40	36.4	37	33.6	1.00	0.30
	Positive	13	11.8	20	18.2		
Distant metastasis	Negative	48	43.6	50	45.5	0.03	0.76
	Positive	5	4.5	7	6.4		

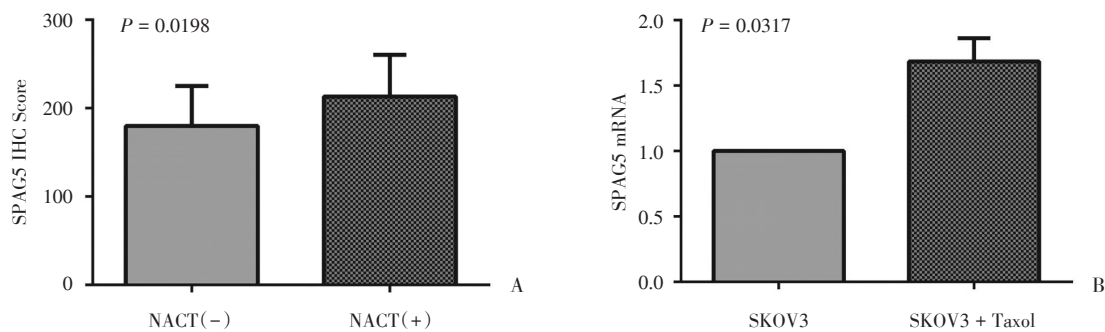
n = 110

表2 手术初治卵巢高级别浆液性癌患者SPAG5表达水平与临床病理指标的关系

Table 2 Correlation between SPAG5 protein expression and clinical features in ovarian high grade serous carcinoma patients first treated with operation

Clinical feature		SPAG5				$\chi^2$	P
		Low/n	(%)	High/N	(%)		
Age	$\leq 50$	24	24.7	27	27.8	0.26	0.54
	$> 50$	25	25.8	21	21.6		
Histology grade	2	9	9.4	14	14.6	1.15	0.24
	3	40	41.7	33	34.4		
FIGO stage	I, II	12	12.5	20	20.8	2.30	0.14
	III, IV	36	37.5	28	29.2		
Lymph node	Negative	39	40.2	33	34.0	0.98	0.13
	Positive	10	10.3	15	15.5		
Distant metastasis	Negative	44	45.4	46	47.4	0.57	0.44
	Positive	5	5.2	2	2.1		

n = 97



A: IHC staining of SPAG5 in Ovarian HGSC patients' tumor tissues showed elevated SPAG5 protein expression after NACT. NACT(+) n = 13, NACT(-) n = 97. B: SPAG5 mRNA expression was elevated after Taxol treatment compared to negative control in Ovarian adenocarcinoma cell SKOV3. n = 2.

图2 紫杉醇化疗后卵巢癌细胞中SPAG5表达升高

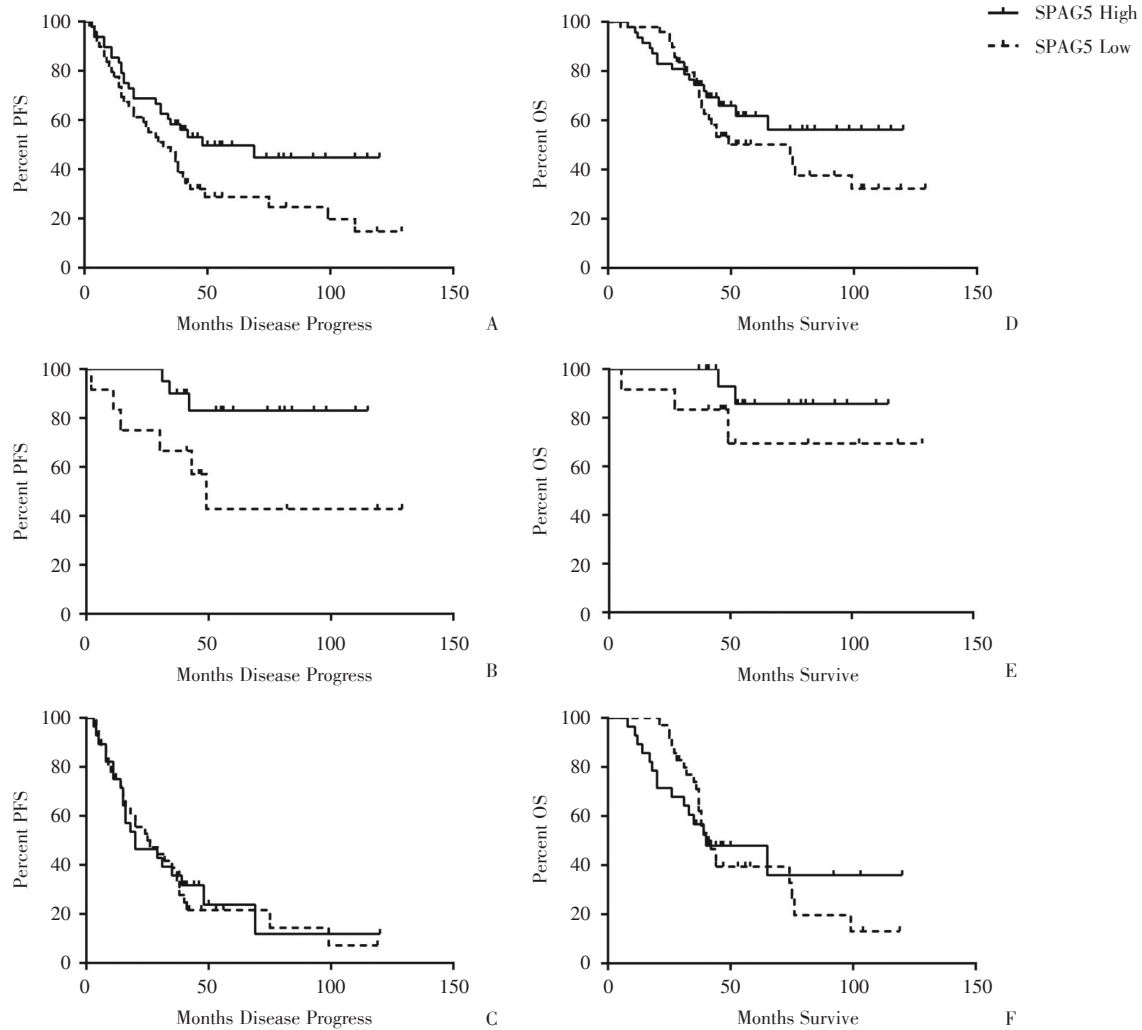
Fig.2 SPAG5 expression in EOC cells elevated after Taxol treatment

57例,Ⅳ期7例。制成组织芯片后全部患者原发部位肿瘤组织中SPAG5蛋白经免疫组化染色并评分,以研究人群评分中位数183为界值,将患者分为SPAG5高表达组与低表达组,两组患者年龄、FIGO分期、肿瘤组织学分级、淋巴结转移状态、远处转移状态及是否进行NACT无差异(表1)。在术

前未行NACT的患者中,各临床指标同样没有差异(表2)。

### 2.3 化疗后卵巢高级别浆液性癌肿瘤组织中SPAG5表达升高

初步分析组织中SPAG5染色发现,卵巢HGSC患者经NACT后切除标本中的SPAG5表达明显



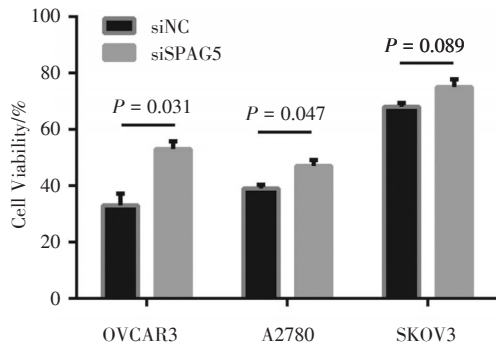
A: Survival analysis of all ovarian HGSC patients enrolled, SPAG5 low expression group had poorer PFS (Log-rank (Mantel-Cox) test  $P = 0.033$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test  $P = 0.081$ ,  $n = 97$ ). B: Survival analysis of early stage (FIGO I, II) ovarian HGSC patients enrolled, SPAG5 low expression group had poorer PFS (Log-rank (Mantel-Cox) test  $P = 0.028$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test  $P = 0.029$ ,  $n = 32$ ). C: Survival analysis of advanced stage (FIGO III, IV) ovarian HGSC patients enrolled, PFS showed no difference between SPAG5 low and high expression group (Log-rank (Mantel-Cox) test  $P = 0.840$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test  $P = 0.962$ ,  $n = 65$ ). D: Survival analysis of all ovarian HGSC patients enrolled, SPAG5 low expression group had poorer OS, but showed no significant difference between SPAG5 low and high expression group (Log-rank (Mantel-Cox) test  $P = 0.242$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test  $P = 0.551$ ,  $n = 97$ ). E: Survival analysis of early stage (FIGO I, II) ovarian HGSC patients enrolled, SPAG5 low expression group had poorer OS, but showed no significant difference between SPAG5 low and high expression group (Log-rank (Mantel-Cox) test  $P = 0.224$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test  $P = 0.149$ ,  $n = 32$ ). F: Survival analysis of advanced stage (FIGO III, IV) ovarian HGSC patients enrolled, OS showed no difference between SPAG5 low and high expression group (Log-rank (Mantel-Cox) test  $P = 0.929$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test  $P = 0.364$ ,  $n = 65$ ).

图3 在未经NACT的卵巢HGSC患者原发肿瘤组织中SPAG5蛋白表达水平与早期卵巢HGSC患者预后差相关  
Fig.3 SPAG5 expression in ovarian high grade serous carcinoma patients' tumor tissues correlated with the prognosis of early stage patients without NACT

高于初治手术切除标本(图2A)。体外实验中,卵巢腺癌细胞株 SKOV3 经  $0.5 \mu\text{mol/L}$  紫杉醇处理 1 d 后, qPCR 检测细胞中的 SPAG5 mRNA 表达水平, 紫杉醇处理后 SKOV3 细胞中的 SPAG5 mRNA 表达是空白对照的 1.69 倍 ( $t = 5.48, P = 0.0317$ ; 图 2B)。

#### 2.4 卵巢高级别浆液性癌原发肿瘤组织中 SPAG5 表达水平影响疾病早期患者预后

对肿瘤组织中 SPAG5 蛋白进行免疫组织化学染色后, 将患者分为 SPAG5 蛋白高表达组与低



SPAG5 knockdown in ovarian adenocarcinoma cells OVCAR3 A2780 and SKOV3 followed by  $0.5 \mu\text{mol/L}$  Taxol treatment, MTT Assay showed cell viabilities were all increased after SPAG5 down-regulation in these cell lines.  $n = 2$ .

图4 SPAG5低表达降低卵巢腺癌细胞对紫杉醇敏感性  
Fig.4 SPAG5 low expression decreased drug-sensitivity of ovarian adenocarcinoma cells to Taxol

表达组。为排除 NACT 可能对肿瘤中异质性细胞蛋白表达产生的影响, 本次实验选择未行 NACT 患者组织中 SPAG5 蛋白表达水平进行分析, 经过绘制生存曲线后发现, SPAG5 低表达组患者的疾病无进展生存 (Progress Free Survival, PFS) 较高表达组患者差, 差异有统计学意义, Log-rank (Mantel-Cox) test  $P = 0.033$  (图 3A)。两组患者的总生存 (Overall Survival, OS) 也有同样的趋势, 但差异没有统计学意义 (图 3D)。

将疾病早期患者 (FIGO I, II 期) 与疾病进展期患者 (FIGO III, IV 期) 分层分析后可见, 在疾病早期患者中, SPAG5 低表达组患者的 PFS 明显低于高表达组, Log-rank (Mantel-Cox) test,  $P = 0.028$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test,  $P = 0.029$  (图 3B)。但在疾病进展期的患者中, 两组患者的 PFS 无差别 (图 3C)。患者的 OS 也有同样的趋势, 疾病早期患者中 SPAG5 低表达组患者的 OS 低于高表达组, 然而差异没有统计学意义 (图 3E), 与此同时

疾病进展期的患者中无差异 (图 3F)。

#### 2.5 瞬时敲降 SPAG5 降低卵巢腺癌细胞株对紫杉醇敏感性

通过瞬时转染针对 SPAG5 mRNA 序列的 siRNA (siSPAG5), 分别在 OVCAR3、A2780、SKOV3 三个细胞株中敲降 SPAG5 表达, 同时瞬转随机序列 siRNA (siNC) 作为阴性对照, 转染后细胞经  $0.5 \mu\text{mol/L}$  紫杉醇处理 1 d, MTT 检测细胞活力 (处理后 OD490/处理前 OD490)。细胞在敲降 SPAG5 表达后, 对紫杉醇处理的抵抗能力均增强, 其中 OVCAR3 siSPAG5 后细胞抑制率从 77.1% 下降到 47.2% ( $t = 5.55, P = 0.031$ ), A2780 siSPAG5 后细胞抑制率从 61.3% 下降到 53.5% ( $t = 4.44, P = 0.047$ ), SKOV3 siSPAG5 后细胞抑制率从 32.6% 下降到 24.3%, 差异无统计学意义 ( $t = 3.13, P = 0.089$ ; 图 4)。

### 3 讨论

SPAG5 也称之为 Astrin (associated with astral microtubule arrays assembled in vitro), 作为一个纺锤体结合蛋白, 在有丝分裂或减数分裂过程中结合于纺锤体的微管结构及着丝粒<sup>[7-8]</sup>, 另外也可结合于精子尾部的微管结构<sup>[15]</sup>。SPAG5 从有丝分裂 S 期开始, 通过 C-末端序列结合于纺锤体, 直至细胞分裂完成, 此过程中 SPAG5 可与 GSK3beta、Plk1、Aurora-A 等细胞分裂相关蛋白分子发生相互作用, 也可介导 SNM1A、CLASP1、SKAP 及 EB1 等蛋白与纺锤体的结合, 达到对有丝分裂精确调控的作用<sup>[5-6, 16-20]</sup>。也有研究发现, SPAG5 可以通过激活 mTORC1 抑制细胞凋亡<sup>[21]</sup>, 综合以上研究结果, SPAG5 目前多被认为发挥促进肿瘤细胞生长的作用。

本实验中, 研究者通过瞬时敲降卵巢腺癌细胞 SKOV3 中的 SPAG5 表达, 并绘制生长曲线后发现, 敲降 SPAG5 后 SKOV3 细胞生长受到明显抑制, 与细胞周期出现显著 G2/M 期阻滞有关。关于 SPAG5 的其他前期研究中已显示, 细胞在敲降 SPAG5 后无法形成正常的双极染色体, 进而无法正常分裂, 这与本实验结果相符, 即在卵巢腺癌细胞中 SPAG5 也发挥调控有丝分裂正常进行的作用。

为进一步研究 SPAG5 蛋白表达与卵巢 HGSC 患者预后的关系, 我们对 110 例卵巢 HGSC 患者原

发肿瘤组织中 SPAG5 进行染色,评分后显示, NACT 后行手术切除的标本中, SPAG5 表达较初治即行手术切除的组织标本中明显升高。体外实验通过在培养基中加入 0.5  $\mu\text{mol/L}$  紫杉醇,模拟治疗中患者紫杉醇血药浓度<sup>[22-23]</sup>,处理后 SKOV3 细胞中 SPAG5 蛋白表达也明显升高,与 NACT 后肿瘤组织中 SPAG5 表达升高的发生相一致。这一方面可能与紫杉醇所致细胞微管结构固定,细胞中蛋白质合成后无法分裂,纺锤体相关结合蛋白积聚有关,但另一方面,这是否与异质性的卵巢腺癌细胞群经过紫杉醇作用后导致细胞中蛋白表达谱及蛋白功能的改变相关,却尚未有相关研究。因此,在患者预后分析中,我们排除了接受过 NACT 的 13 例患者。

生存分析显示, SPAG5 高表达组患者的 PFS 明显优于 SPAG5 低表达组,进一步将患者按疾病早期(FIGO I, II 期)与疾病进展期(FIGO III, IV 期)分层分析后,在疾病早期患者中 SPAG5 表达差异两组间 PFS 的差异更为显著,但疾病进展期的患者中 SPAG5 表达差异两组间的 PFS 生存曲线重合,即 SPAG5 高表达仅与早期卵巢 HGSC 患者 PFS 差有关,而对进展期卵巢 HGSC 患者 PFS 无影响。在 SPAG5 与患者 OS 的分析中, SPAG5 表达差异对患者 OS 的影响并不显著,但也可以看到与患者 PFS 相同的趋势。这个结果似乎与 SPAG5 对肿瘤细胞增殖的促进作用相矛盾。为证实 SPAG5 在患者中表达情况对肿瘤生物学行为的影响,我们进行了体外实验。在敲降 SPAG5 表达的卵巢腺癌细胞株 OVCAR3 和 A2780 中,也同样能观察到细胞对紫杉醇抵抗能力的增强,在 SKOV3 细胞中 SPAG5 敲降后紫杉醇对细胞活力抑制率差异无统计学意义,可能与 SKOV3 本身对紫杉醇抵抗能力较 OVCAR3 及 A2780 强有关, SPAG5 对 SKOV3 紫杉醇耐药的影响相对较小。值得一提的是,这个结论与本课题组前期在宫颈癌中的研究结果相一致,并且在宫颈癌中研究者发现,在不同的 SPAG5 表达背景下,细胞对不同浓度的紫杉醇的敏感性是有差异的。从而我们认为, SPAG5 在卵巢 HGSC 患者的疾病进展中发挥着更为复杂的调控作用,这其中不仅涉及 SPAG5 对细胞有丝分裂的调控,更重要的是 SPAG5 对紫杉醇药物作用的影响<sup>[13]</sup>。综上所述,在早期卵巢 HGSC 患者中,肿瘤组织中 SPAG5 的表达降低,通过增加卵巢腺癌细胞

对紫杉醇的耐药能力,利于患者疾病进展,增加患者肿瘤的复发,最终影响患者预后,然而 SPAG5 在卵巢 HGSC 中发挥的具体调控作用及机制尚无相关研究。

SPAG5 参与调节细胞有丝分裂,在 SKOV3 细胞中敲降 SPAG5 使细胞周期发生 G2/M 期阻滞,然而在细胞周期受到抑制后,这些细胞并非全部进入凋亡程序,生存下来细胞得以依赖非 SPAG5 相关的细胞有丝分裂调控而继续生存。SPAG5 敲降后细胞对紫杉醇敏感性下降,这可能与紫杉醇在微管结构中的作用位点,及 SPAG5 所介导的蛋白间相互作用有关。在 SPAG5 表达降低,即不依赖 SPAG5 功能的细胞中,可能由于紫杉醇不能再通过 SPAG5 相关机制作用于细胞,从而与微管间的作用机制发生改变,总体上降低了细胞对药物敏感性。在进展期卵巢 HGSC 肿瘤组织中,多倍体细胞的大量出现证明,细胞的有丝分裂调控更为紊乱,然而分裂更为活跃的低分化卵巢 HGSC 肿瘤组织中并没有发现 SPAG5 的显著高表达,这与紫杉醇处理后细胞中 SPAG5 的积聚形成明显对比,由此我们认为,卵巢 HGSC 细胞中 SPAG5 的调控地位明显下降, SPAG5 的表达水平不再影响患者肿瘤对紫杉醇的敏感性以及患者的预后。这其中的作用机制,是本课题组下一步研究重点。

本研究结果显示,卵巢 HGSC 患者辅助化疗的选择应更为个体化,综合考虑肿瘤分期及相关标志物的表达情况。对于早期卵巢 HGSC 患者,如在原发肿瘤病灶中检测到 SPAG5 的低表达,可考虑避免在一线化疗中使用紫杉类药物。本研究结果尚未能为进展期卵巢 HGSC 患者提供化疗方案个体化选择的理论依据,但相信随着 SPAG5 对卵巢腺癌细胞紫杉醇敏感性机制研究的深入,对紫杉醇耐药机制将会有更清晰的认识,相关信号通路的精细调控也将使卵巢 HGSC 患者的化疗更有针对性,更为精确有效,使卵巢 HGSC 患者能获得更长的疾病无进展生存期,提高患者生存及生活质量。

#### 参考文献:

- [1] Desai A, Xu J, Aysola K, et al. Epithelial ovarian cancer: an overview [J]. World J Transl Med, 2014, 3 (1): 1-8.
- [2] 杨念念, 严亚琼, 郑荣寿, 等. 中国 2009 年卵巢癌发

- 病与死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2013, 22(8): 617-621.
- Yang NN, Yan YQ, Zheng RS, et al. An analysis of incidence and mortality for ovarian cancer in China, 2009 [J]. Chin Cancer, 2013, 22(8): 617-621.
- [3] Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, et al. Ovarian cancer [J]. Lancet, 2014, 384(9951): 1376-1388.
- [4] Kumar A, Hoskins PJ, Tinker AV. Dose-dense paclitaxel in advanced ovarian cancer [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2015, 27(1): 40-47.
- [5] Thein KH, Kleylein-Sohn J, Nigg EA, et al. Astrin is required for the maintenance of sister chromatid cohesion and centrosome integrity [J]. J Cell Biol, 2007, 178(3): 345-354.
- [6] Chiu SC, Chen JM, Wei TY, et al. The mitosis-regulating and protein-protein interaction activities of astrin are controlled by aurora-A-induced phosphorylation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(5): C466-C478.
- [7] Cheng TS, Hsiao YL, Lin CC, et al. hNinein is required for targeting spindle-associated protein Astrin to the centrosome during the S and G2 phases [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(8): 1710-1721.
- [8] Mack GJ, Compton DA. Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14434-14439.
- [9] Buechler S. Low expression of a few genes indicates good prognosis in estrogen receptor positive breast cancer [J]. BMC Cancer, 2009, 9: 243.
- [10] Valk K, Vooder T, Kolde R, et al. Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers [J]. Oncology, 2010, 79(3-4): 283-292.
- [11] Abdel-Fatah TM, Agarwal D, Liu DX, et al. SPAG5 as a prognostic biomarker and chemotherapy sensitivity predictor in breast cancer: a retrospective, integrated genomic, transcriptomic, and protein analysis [J]. Lancet Oncol, 2016, 17(7): 1004-1018.
- [12] Xie S, Ogden A, Aneja R, et al. Microtubule-binding proteins as promising biomarkers of paclitaxel sensitivity in cancer chemotherapy [J]. Med Res Rev, 2016, 36(2): 300-312.
- [13] Yuan LJ, Li JD, Zhang L, et al. SPAG5 upregulation predicts poor prognosis in cervical cancer patients and alters sensitivity to taxol treatment via the mTOR signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1247.
- [14] Malpica A, Deavers MT, Lu K, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system [J]. Am J Surg Pathol, 2004, 28(4): 496-504.
- [15] Shao X, Xue J, van der Hoorn FA. Testicular protein Spag5 has similarity to mitotic spindle protein deepst and binds outer dense fiber protein Odf1 [J]. Mol Reprod Dev, 2001, 59(4): 410-416.
- [16] Cheng TS, Hsiao YL, Lin CC, et al. Glycogen synthase kinase 3beta interacts with and phosphorylates the spindle-associated protein astrin [J]. J Biol Chem, 2008, 283(4): 2454-2464.
- [17] Yuan J, Li M, Wei L, et al. Astrin regulates meiotic spindle organization, spindle pole tethering and cell cycle progression in mouse oocytes [J]. Cell Cycle, 2009, 8(20): 3384-3395.
- [18] Liu L, Akhter S, Bae JB, et al. SNM1B/Apollo interacts with astrin and is required for the prophase cell cycle checkpoint [J]. Cell Cycle, 2009, 8(4): 628-638.
- [19] Manning AL, Bakhom SF, Maffini S, et al. CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity [J]. EMBO J, 2010, 29(20): 3531-3543.
- [20] Tamura N, Simon JE, Nayak A, et al. A proteomic study of mitotic phase-specific interactors of EB1 reveals a role for SXIP-mediated protein interactions in anaphase onset [J]. Biol Open, 2015, 4(2): 155-169.
- [21] Thedieck K, Holzwarth B, Prentzell MT, et al. Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells [J]. Cell, 2013, 154(4): 859-874.
- [22] Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol [J]. Cancer Res, 1987, 47(9): 2486-2493.
- [23] Ohtsu T, Sasaki Y, Tamura T, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel: a 3-hour infusion versus a 24-hour infusion [J]. Clin Cancer Res, 1995, 1(6): 599-606.

(编辑 徐杰)