

• 论 著 •

磷酸化 STAT3 检测对肺腺癌所致恶性胸腔积液的诊断价值

田伊卿¹, 朱立强^{2△}, 方先勇²

(1. 江苏大学检验医学系, 江苏镇江 212013; 2. 徐州医学院附属医院细胞室, 江苏徐州 221002)

摘要:目的 探讨磷酸化信号转导与转录激活因子 3(pSTAT3)蛋白表达对肺腺癌所致恶性胸腔积液的诊断价值。方法 应用液基细胞学技术,对临床送检的 47 例胸腔积液进行检测,同时每例均利用薄层细胞涂片行免疫细胞化学染色,检测 pSTAT3 蛋白的表达。结果 40 例胸腔积液标本经临床及医学影像学资料和(或)组织学检查证实为肺腺癌所致恶性胸腔积液,7 例为良性胸腔积液。pSTAT3 在肺腺癌所致恶性胸腔积液中的阳性表达率为 80.0%(32/40),高于良性组的 0.0%(0/7),差异有统计学意义($P<0.05$)。pSTAT3 免疫细胞化学染色联合液基细胞学检查可使恶性胸腔积液的检出率达 80.0%(32/40),高于单独使用液基细胞学检查的检出率[32.5%(13/40)],二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 肺腺癌所致恶性胸腔积液中 pSTAT3 蛋白的表达明显增高,pSTAT3 可作为肺腺癌所致恶性胸腔积液诊断的一个新的生物标记物,pSTAT3 可能在胸腔积液的发生、发展中发挥重要作用。

关键词:肺腺癌; 胸腔积液; 免疫细胞化学; 磷酸化信号转导与转录激活因子 3

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0449-03

The significance of pSTAT3 test in the diagnosis of malignant pleural effusion induced by adenocarcinoma of lung

Tian Yiqing¹, Zhu Liqiang^{2△}, Fang Xianyong²

(1. Department of Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China;

2. Department of Cytopathology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value and clinical significance of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3(pSTAT3) in malignant pleural effusion(MPE) caused by lung adenocarcinoma. **Methods** 47 pleural effusion samples were collected and detected by using liquid-based cytologic test (LCT). Furthermore, the expression of pSTAT3 was detected by using the method of immunocytochemistry in all of the specimens. **Results** Among the 47 cases of pleural effusion, 40 cases of MPE were caused by lung adenocarcinoma and 7 cases were benign pleural effusion, which were confirmed by clinical manifestation, biopsy and imaging data. The positive expression rate of pSTAT3 was 80.0%(32/40) in MPE caused by lung adenocarcinoma, significantly higher than benign group($P<0.05$). 13 cases of MPE caused by lung adenocarcinoma and 7 cases of benign pleural effusion were diagnosed with liquid-based cytologic test alone. The other 27 cases were undetermined and needed to be differentiate between adenocarcinoma and atypical mesothelial cells. However, 32 cases of lung adenocarcinoma and 7 cases could be clearly diagnosed if liquid-based cytologic test was used combined with immunocytochemistry detection of pSTAT3 expression. Only 8 cases were undetermined. Diagnosis of grey area was significantly narrowed. There was significant statistical significance between the two methods($P<0.05$). **Conclusion** High expression of pSTAT3 is related to the MPE caused by lung adenocarcinoma. Detection of pSTAT3 expression can be used as a new method in the diagnosis of MPE caused by lung adenocarcinoma. pSTAT3 may play an important role in the development of the MPE.

Key words: adenocarcinoma of lung; pleural effusion; immunocytochemistry; phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3

肺癌已经成为世界范围内癌症中的头号杀手^[1],其中非小细胞肺癌(NSCLC)占有肺癌的 85%^[2]。在 NSCLC 中,腺癌的发病比较隐匿,症状无特异性,病理活检比较困难且易转移,而且临床确诊时多已发展为疾病晚期,浸润胸膜,形成恶性胸腔积液,预后很差。信号转导和转录激活因子 3(STAT3)是一种存在于细胞质,并与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的双功能蛋白,STAT3 信号通路与细胞增殖、分化、凋亡密切相关,STAT3 过度激活将导致细胞的异常增殖,促进肿瘤的形成、发展^[3]。Yeh 等^[4]发现在肺腺癌细胞中,激活的 STAT3 可能通过上调 VEGF 的表达而参与恶性肿瘤细胞浸润胸膜及恶性胸腔积液的形成。磷酸化 STAT3(pSTAT3)能否成为诊断肺腺癌所致恶性胸腔积液一种新的肿瘤标志物,目前国内外还鲜有报道。本研究应用免疫细胞化学法检测了 pSTAT3 在肺腺癌

所致恶性胸腔积液及良性胸腔积液脱落细胞中的表达,旨在探讨 pSTAT3 对肺腺癌所致恶性胸腔积液的诊断价值,同时为临床寻找新的治疗肺腺癌所致恶性胸腔积液靶点提供理论基础和实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取徐州医学院附属医院 2014 年 3~5 月呼吸科门诊及住院并送检胸腔积液的患者 47 例。根据来源患者的支气管镜活检、肺穿刺活检结果或结合患者病史、影像学及其他临床资料做出最后诊断。其中肺腺癌转移所致恶性胸腔积液者 40 例,男 19 例、女 21 例,年龄 19~88 岁,中位年龄 56 岁;良性胸腔积液者 7 例(心功能不全所致胸腔积液 4 例,肺结核所致胸腔积液 3 例),男 5 例、女 2 例,年龄 22~78 岁,中位年龄 71 岁。

1.2 仪器与试剂 一抗为兔抗人 pSTAT3(Tyr705)抗体,购自美国 CST 公司;SP 法免疫细胞化学检测通用型二抗(PV-9000)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;使用美国 SurePath™ PrepStain 全自动液基薄层细胞制片染片机(BD TriPath)及配套耗材。

1.3 方法

1.3.1 BD TriPath 制片 将标本转移至 50 mL 离心管内,600×g 转速离心 10 min,弃上清,加入 30 mL Cytosol™固定液,震荡后静置 30 min,600×g 离心 10 min,弃上清并充分震荡,加入 10 mL Tris 缓冲液,震荡后全部转移至 12 mL 离心管内,600×g 离心 10 min,弃上清并充分震荡(15±5)s。将离心管架及载玻片架放入 PrepStain™制片系统制备液基涂片 2 张,1 张用于巴氏染色,供液基细胞学诊断使用。1 张供免疫细胞化学染色使用。

1.3.2 免疫细胞化学染色 将液基涂片采用 SP 法行免疫细胞化学染色。PBS 液冲洗后,3%过氧化氢室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。滴加试剂 A(蓝色液体)室温孵育 10~15 min,倾去,勿洗。滴加 pSTAT3 抗体(按 1:150 稀释),阴性对照加 PBS 缓冲液,4℃冰箱过夜。滴加生物素标记二抗工作液(试剂 B),室温孵育 10~15 mL。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液(试剂 C),室温孵育 10~15 mL,以上步骤中均用 PBS 洗 3 次,每次 3 min。DAB 显色,自来水冲洗,脱水、透明、封片。

1.3.3 免疫细胞化学结果评估 每张切片在光镜下共计数约 100 个肿瘤细胞,pSTAT3 阳性的细胞数/总的肿瘤细胞数大于或等于 10%则为阳性^[5]。

1.4 统计学处理 用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pSTAT3 在肺腺癌所致恶性胸腔积液和良性胸腔积液中的表达 pSTAT3 阳性信号主要位于细胞核中,少数定位于细胞质中,见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。pSTAT3 在肺腺癌所致恶性和良性胸腔积液中表达的阳性率分别为 80.0%(32/40)和 0.0%(0/7),差异有统计学意义($\chi^2=25.6, P<0.01$)。

2.2 液基细胞学结合 pSTAT3 检测用于诊断 根据支气管镜活检、肺穿刺活检或结合病史、影像学及其他临床资料,47 例胸腔积液中 40 例为腺癌转移所致的恶性胸腔积液,7 例为良性胸腔积液。单独液基细胞学明确诊断腺癌 13 例、阴性 7 例,27 例未能明确诊断,需要对腺癌和非典型间皮细胞进行鉴别,检出率为 32.5%(13/40),诊断灰区为 57.4%(27/47)。47 例胸腔积液中,液基细胞学结合免疫细胞化学检测可明确诊断腺癌细胞 32 例,其中阴性 7 例、8 例未能明确诊断。与单独使用液基细胞学检测比较,检出率提高为 80.0%(32/40),差异有统计学意义($\chi^2=19.3, P<0.01$),诊断灰区缩小为 17.0%(8/47)。

3 讨论

恶性胸腔积液是 NSCLC 患者预后不良的指标之一。大部分恶性胸腔积液是由肺腺癌浸润转移至胸膜腔而产生的。STAT3 是 STAT 家族的重要成员,STAT3 在某些细胞外信号(如 JAK 蛋白酪氨酸激酶、生长因子及干扰素等)的作用下,通过其酪氨酸基团的 705 位点被磷酸化而激活为 pSTAT3,随之通过其 SH2 功能区的相互作用形成同源或异源二聚体。二聚体进入细胞核后,可识别特异性的 DNA 片段并与之结合,发挥其转录调控作用,调节靶基因转录。Yeh 等^[4,6]通过动物实

验发现 pSTAT3 阳性肺腺癌细胞系种植于裸鼠后,较 pSTAT3 阴性细胞系更容易产生胸腔积液,VEGF 蛋白表达、毛细血管密度及血管通透性均显著提高,因此推测 pSTAT3 参与了肺腺癌所致胸腔积液的形成,这个发现为恶性胸腔积液的治疗提供了新的靶点。NSCLC 组织中 STAT3 的表达阳性率明显高于癌旁组织中的表达,其中低分化组中 STAT3 表达水平高于高分化组,有淋巴结转移组中 STAT3 表达水平高于无淋巴结转移组^[7]。现针对 STAT3 信号途径中上游酪氨酸激酶如 JAKSrc EGFR 的抑制剂已经研制成功,部分已进入临床各期试验^[7],但 STAT3 信号通路与 NSCLC 远处转移潜能的临床系统研究尚未见报道。本研究采用全自动液基细胞学制片仪制备细胞涂片,SP 法检测恶性胸腔积液 pSTAT3 的表达情况,结果显示,pSTAT3 在肺腺癌所致恶性胸腔积液中的阳性率为 80.0%,明显高于组织中的阳性率 52.5%~69.7%^[8-9],提示 pSTAT3 可能在肺腺癌所致胸腔积液的发生发展中起重要作用。因此,检测胸腔积液中 pSTAT3 的表达可能成为指导肺腺癌及其所致恶性胸腔积液分子靶向治疗的依据^[10]。

文献^[7,11]报道,pSTAT3 在肺癌组织中的阳性表达主要位于细胞核。但在本实验中,部分腺癌细胞 pSTAT3 蛋白的阳性表达不仅位于细胞核上,在细胞质内也有不同程度的表达,这与杨光等^[12]报道一致。可能的原因是 STAT3 持续的在细胞质内活化且活化后的 pSTAT3 转入细胞核有一个时间和空间上的过程,因此部分活化的 pSTAT3 可能会存留于细胞质内,致使细胞质的染色呈不同程度的阳性反应。

非典型间皮细胞与腺癌细胞难以鉴别是导致细胞学诊断检出率低的重要原因,一方面是由于在慢性炎症、放疗、化疗及肿瘤的刺激下间皮细胞呈现一定的异型性,核略增大,核仁明显,染色质稍浓,可呈假腺腔样、梅花状或桑葚状排列^[13];另一方面是由于腺癌细胞在积液中无组织及器官构架的束缚而自由漂浮和增生甚至经几代繁殖,失去了原来在组织中的形态特征,当胸腔积液内的癌细胞异型性不明显或数量较少时,仅凭光镜腺癌细胞与反应性间皮细胞几乎无法鉴别^[14-15]。本研究在利用液基细胞学制片的基础上进行 pSTAT3 蛋白的检测较传统方法具有较大优势,首先液基细胞学较传统细胞学具有收集病变细胞丰富、固定及时、细胞形态保存完好、分布均匀、结构清晰等优点^[16],而且利用液基薄片检测 pSTAT3 蛋白,阳性表达明确,背景清晰,非特异性染色少。将免疫细胞化学的结果与液基细胞学相结合,可为细胞学诊断提供客观的指标,使检出率明显提高。虽然临床病理对肺腺癌细胞的常规诊断标志主要是癌胚抗原(CEA)、甲状腺转录因子 1(TTF-1)、天门冬氨酸蛋白酶(NapsinA)等,但 pSTAT3 蛋白的表达不仅对常规液基细胞学的诊断也具有辅助的作用,还对临床的治疗具有重要的意义,因此值得临床大力推广。

总之,pSTAT3 参与了肺腺癌所致恶性胸腔积液的产生过程,检测胸腔积液 pSTAT3 的表达,不仅可以提高脱落细胞学检查的检出率,还可能成为指导肺腺癌及其所致恶性胸腔积液分子靶向治疗的依据,从而改善患者的预后。

参考文献

- [1] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung Cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship[J]. Mayo Clin Proc, 2009, 83(5): 584-594.
- [2] Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer(下转第 453 页)

一方面可能与我国医疗卫生资源分布不均有关,另一方面也可能与人们对 AMI 危害性认识不足有关。hs-cTnT 水平与症状发作到抵达医院急诊科就诊的时间密切相关,本次研究剔除了胸痛发作时间超过 6 h 的患者。本研究还发现,伴高血压或糖尿病患者发生 AMI 的概率明显高于不伴有高血压或糖尿病的患者,老年人是高血压、糖尿病的高发人群,故更应该对老年人群 AMI 的发生采取预防措施。

hs-cTnT 水平与年龄有一定的相关性,针对大于 65 岁的老年胸痛患者,建议 hs-cTnT 诊断 AMI 的阈值设定为 32 ng/L,可提高诊断的准确性。本研究存在一定的局限性:(1)没有观察老年胸痛患者 hs-cTnT 的动态变化,最近 AMI 诊断指南建议通过动态监测 hs-cTnT 水平的变化诊断 AMI^[16];(2)无急性胸痛症状老年人群 hs-cTnT 水平情况还需进一步研究;(3)研究只采用了罗氏 hs-cTnT 检测试剂,若要将本研究结果推广到其他厂家的试剂还需要额外的研究。

参考文献

[1] Gupta S, de Lemos JA. Use and misuse of cardiac troponins in clinical practice[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2007, 50(2): 151-165.

[2] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 16, 60(16): 1581-1598.

[3] Keller T, Zeller T, Peetz D, et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2009, 361(9): 868-877.

[4] Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays[J]. N Engl J Med, 2009, 361(9): 858-867.

[5] Clerico A, Giannoni A, Prontera C, et al. High-sensitivity troponin: a new tool for pathophysiological investigation and clinical practice[J]. Adv Clin Chem, 2009, 49(1): 1-30.

[6] Morrow DA. Clinical application of sensitive troponin assays[J]. N Engl J Med, 2009, 361(9): 913-915.

[7] Eggers KM, Lind L, Venge P, et al. Will the universal definition of

myocardial infarction criteria result in an overdiagnosis of myocardial infarction? [J]. Am J Cardiol, 2009, 103(5): 588-591.

[8] Zethelius B, Johnston N, Venge P. Troponin I as a predictor of coronary heart disease and mortality in 70-year-old men: a community-based cohort study[J]. Circulation, 2006, 113(8): 1071-1078.

[9] Olivieri F, Galeazzi R, Giavarina D, et al. Aged-related increase of high sensitive Troponin T and its implication in acute myocardial infarction diagnosis of elderly patients[J]. Mech Ageing Dev, 2012, 133(5): 300-305.

[10] Chenevier-Gobeaux C, Meune C, Freund Y, et al. Influence of age and renal function on high-sensitivity cardiac troponin T diagnostic accuracy for the diagnosis of acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2013, 111(12): 1701-1707.

[11] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach[J]. Biometrics, 1988, 44(3): 837-845.

[12] Pinto de Carvalho L, McCullough PA, Gao F, et al. Renal function and anaemia in acute myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2013, 168(2): 1397-1401.

[13] Cheitlin MD. Cardiovascular physiology-changes with aging[J]. Am J Geriatr Cardiol, 2003, 12(1): 9-13.

[14] Eggers KM, Lind L, Ahlstrom H, et al. Prevalence and pathophysiological mechanisms of elevated cardiac troponin I levels in a population-based sample of elderly subjects[J]. Eur Heart J, 2008, 29(18): 2252-2258.

[15] Collinson PO, Heung YM, Gaze D, et al. Influence of population selection on the 99th percentile reference value for cardiac troponin assays[J]. Clin Chem, 2012, 58(1): 219-225.

[16] Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care[J]. Eur Heart J, 2012, 33(18): 2252-2257.

(收稿日期: 2014-11-06)

(上接第 450 页)

[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(3): 355-367.

[3] 汪鑫平, 梅金红. 人脑星形细胞瘤 STAT3 和 Survivin 的表达及其意义[J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(4): 355-357.

[4] Yeh HH, Lai WW, Chen HH, et al. Autocrine IL-6-induced Stat3 activation contributes to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and malignant pleural effusion[J]. Oncogene, 2006, 25(31): 4300-4309.

[5] 朱立强, 柳红. 浸润性乳腺癌术前 FNA 近似分子分型的临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(7): 745-748.

[6] Yeh HH, Chang WT, Lu KC, et al. Upregulation of tissue factor by activated Stat3 contributes to malignant pleural effusion generation via enhancing tumor metastasis and vascular permeability in lung adenocarcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75287.

[7] 张明珠, 陈刚. 肺癌侵袭与转移相关信号传导通路的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(9): 1429-1430.

[8] 李远航. 非小细胞肺癌组织中 STAT3 和磷酸化 STAT3 蛋白表达及临床意义[J]. 中外妇儿健康, 2011, 19(6): 92-94.

[9] 冉凤明, 魏万里, 胡红艳, 等. STAT3、p-STAT3、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达与肺癌侵袭和转移的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(14): 2570-2572.

[10] Cortas T, Eisenberg R, Fu P, et al. Activation state EGFR and

STAT-3 as prognostic markers in resected non-small cell lung Cancer[J]. Lung Cancer, 2007, 55(3): 349-355.

[11] Afify AM, Stern R, Michael CW. Differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions: the role of hyaluronic acid and CIN4 localization[J]. Diagn Cytopathol, 2005, 32(3): 145-150.

[12] 杨光, 裴正军, 张放, 等. 激活和抑制 Stat3 信号途径对胰腺癌细胞侵袭能力的影响[J]. 肿瘤, 2009, 29(7): 645-649.

[13] 何远春, 李俊, 陈振东. 1466 例浆膜腔积液细胞学分析[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(7): 1222-1224.

[14] Lee JH, Chang JH. Diagnostic utility of serum and pleural fluid carcinoembryonic antigen, neuron-specific enolase, and cytokeratin 19 fragments in patients with effusion from primary lung cancer[J]. Chest, 2005, 128(4): 2298-2303.

[15] Afify AM, Stern R, Michael CW. Differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions: the role of hyaluronic acid and CD44 localization[J]. Diagn Cytopathol, 2005, 32(3): 145-150.

[16] 卢珊珊, 曹箭, 潘秦镜, 等. 痰液基薄层技术在肺癌诊断中的价值及影响因素分析[J]. 中国医刊, 2010, 45(1): 44-46.

(收稿日期: 2014-11-28)