

Stat3 及 Bcl-2 在口腔黏膜癌前病变癌变中 mRNA 表达的相关性研究

钱 棱,吴国英*,袁 俊,胡 明,李留炆,杨 静

(南京医科大学口腔医学研究所,南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓黏膜科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测 Stat3 及 Bcl-2 在口腔黏膜癌前病变及癌变组织中 mRNA 的表达及其相关性。方法:用 RT-PCR 技术分别检测正常口腔黏膜、单纯性增生黏膜、异常增生黏膜和口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC)组织中 Stat3 和 Bcl-2 的 mRNA 表达水平和相对含量。结果:在正常口腔黏膜、单纯性增生黏膜、异常增生黏膜和 OSCC 中 Stat3 和 Bcl-2 mRNA 的阳性率和半定量(Stat3/GAPDH,Bcl-2/GAPDH)测定值均逐渐上升,且 Stat3 和 Bcl-2 mRNA 的相对表达量呈线性正相关。结论:Stat3 和 Bcl-2 与口腔黏膜癌变的发生发展过程有一定的联系。

[关键词] Stat3; Bcl-2; RT-PCR; 癌前病变; 口腔黏膜

[中图分类号] R739.85

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-871-04

The mRNA expression of Stat3 and Bcl-2 in process of malignant change of oral mucosa

QIAN Ling, WU Guo-ying*, YUAN Jun, HU Ming, LI Liu-yang, YANG Jing

(The Research Institute of Stomatology of NJMU; Department of Operative Dentistry, Endodontics and Mucosa, the Affiliated Stomatological Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To research the mRNA expressions of Stat3 and Bcl-2 in process of malignant change of oral premalignant lesions. **Methods:** The mRNA expressions of Stat3 and Bcl-2 were detected in normal oral mucosa, simple hyperplasia epithelia, dysplasia epithelia and oral squamous cell carcinoma (OSCC) by RT-PCR. **Results:** The positive rate of Stat3 and Bcl-2 and the semi-quantitative value (Stat3/GAPDH, Bcl-2/GAPDH) increased stepwise from normal mucosa, hyperplasia epithelia, dysplasia epithelia to OSCC. The expression of Stat3 was linear positively correlated to that of Bcl-2. **Conclusion:** There is some relation among Stat3, Bcl-2 and the process of malignant change of oral premalignant lesions.

[Key words] Stat3; Bcl-2; RT-PCR; premalignant lesions; oral mucosa

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 871-874]

口腔黏膜癌前病变的癌变发生是一个多阶段、多基因、多步骤的过程,原癌基因的异常表达和结构改变以及抑癌基因的失活与突变均可使细胞发生癌变。因此,找到口腔黏膜癌前病变的癌变相关基因并了解其表达形式,就可以早期发现,早期诊断,早期治疗,提高患者生存率。本实验通过逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测在几种不同状态口腔组织中信号转导和转录活化因子(signal transducers and activators of transcription, Stat3)及 B 细胞

淋巴瘤/白血病-2(B-cell leukemia/lymphoma 2, Bcl-2)mRNA 阳性表达率及半定量(Stat3 或 Bcl-2 与甘油醛-3-磷酸脱氢酶即 GAPDH 的比值)的值来揭示这两种基因 mRNA 表达与组织癌变的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

所有标本均由南京医科大学附属口腔医院提供。癌前病变和鳞癌诊断标准为:1994 年瑞典会议及 1997 年 WHO 关于口腔黏膜癌前损害及口腔肿瘤的诊断及分类标准。经病理确诊后选出新鲜标本,有单纯增生 7 例[口腔扁平苔藓(OLP)3 例,口腔白斑(OLK)4 例],其中男 5 例,女 2 例,年龄在 40~65 岁,平均 55 岁;异常增生 16 例(OLP 7 例,

[基金项目] 江苏省教育厅自然科学基金(03KJD32-0148)

*通讯作者, E-mail: wuguoying888@163.com

OLK 9例),其中男10例,女6例,年龄38-73岁,平均58岁;口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)18例,其中男10例,女8例,年龄37-77岁,平均54岁;正常口腔黏膜11例(口腔囊肿切除术、阻生齿拔除术、骨纤维异常增生症切除术的相应正常黏膜),其中男6例,女5例,年龄10-62岁,平均47岁。所有标本临床资料完备,无糖尿病、尿毒症、高血压、心脏病等疾病,无其他口腔黏膜病,无头颈部放疗史,就诊前1个月内未使用任何药物治疗。并经统计分析得各组患者的性别、年龄均无显著性差异($P > 0.05$)。

所有标本在获取前均获患者知情并同意。所取标本迅速(10 min内)放入无水乙醇(RNase)的离心管中并置液氮中保存待测。

RNA抽提试剂(Invitrogen公司,美国);逆转录试剂盒(TaKaRa Biotechnology公司,日本);PCR扩增仪(Bio-Rad公司,美国);凝胶成像装置(上海松下公司);紫外分光光度计是美国UNICO UV-2102 C型。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取

从液氮中取出组织标本,加液氮在匀浆器中研碎,用Trizol试剂盒按说明书操作逐步抽提组织总RNA。提取的总RNA溶于RNase-free水,-80℃冻存待用。

1.2.2 总RNA的鉴定

总RNA的纯度鉴定:从所提取的各样品的RNA中各吸取1 μ l,稀释至100 μ l后,利用紫外分光光度计分别测定其在260 nm和280 nm处的吸光光度值。计算 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值,纯RNA样本比值在1.8~2.0之间。 < 1.8 表明存在蛋白质污染; > 2.0 表明存在异硫氰酸胍等污染。

总RNA的完整性鉴定:取5 μ l RNA用1%甲醛变性琼脂糖凝胶进行电泳检测,判断RNA的完整性。通常以28S和18S处条带强度比判断,2:1为无RNA降解,如比值降低、逆转或条带模糊表明RNA降解。

1.2.3 引物设计

参照Stat3、Bcl-2和GADPH在人GenBank中mRNA序列分别设计引物,由上海生工生物公司合成,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。Stat3(上游引物):5'-TTGCCAGTTGTGCTGATC-3',Stat3(下游引物):5'-AGAACCCAGAAGGAGAAGC-3',扩增产物长度317 bp;Bcl-2(上游引物):5'-AACTC-GAGTGACAAGCCCGTAG-3',Bcl-2(下游引物):5'-

GTACCACCAGTTGGTTGTCTTTGA-3',扩增产物长度133 bp;GADPH(上游引物):5'-ACGGATTTGGTCG-TATTGGG-3',GADPH(下游引物):5'-TCATTTTG-GAGGGATCTCGC-3',扩增产物长度236 bp。

1.2.4 逆转录反应

按逆转录操作说明进行逆转录反应合成cDNA,反应条件为30℃反应15 min,42℃反应20 min,95℃反应5 min。

1.2.5 PCR扩增

根据PCR扩增试剂盒说明配制反应液进行扩增。PCR循环为:94℃预变性1 min,94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共40个循环;72℃延伸10 min。将Stat3或Bcl-2引物与内参基因GADPH引物同管扩增。用去离子水代替提取的总RNA作为阴性对照,结果阴性。

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳

取10 μ l PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果并扫描,用凝胶成像分析系统对扩增产物的电泳条带进行灰度测定。PCR产物的含量以积光密度值(IOD)表示, $IOD = \text{平均光密度} \times \text{发光面积}$ 。目的基因(Stat3或Bcl-2)mRNA的半定量测定值即相对含量以同一标本目的基因与内参GADPH的PCR产物含量的比值表示。如无扩增条带,IOD值为0。每组结果使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.3 统计学方法

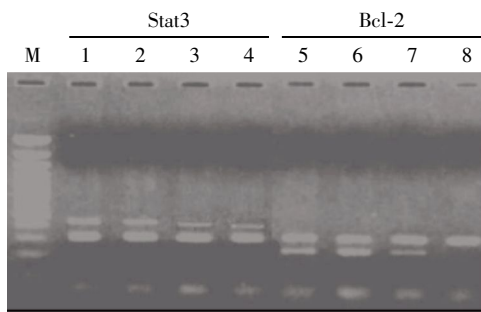
利用SPSS11.5软件处理数据,计数资料计算阳性率描述,采用 χ^2 (chi-square)检验进行分析;计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述;多组均数的比较用方差分析(ANOVA);相关性分析采用Pearson相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Stat3 RT-PCR检测结果

Stat3产物经琼脂糖凝胶电泳后可见明显的目的条带(图1),经统计分析Stat3 mRNA在正常口腔黏膜、单纯性增生黏膜、异常增生黏膜和OSCC中的阳性表达率和相对表达量均逐渐增高(表1)。其中Stat3 mRNA阳性表达率除正常口腔黏膜及单纯性增生黏膜分别与OSCC有显著性差异外($P < 0.05$),其余各组均无显著性差异($P > 0.05$)。

Stat3 mRNA相对表达量除正常口腔黏膜与单纯性增生黏膜无显著性差异外($P > 0.05$),其余各组间均有显著性差异($P < 0.05$)。



M: Marker; 1~4 分别为口腔鳞癌、异常增生、单纯增生、正常口腔黏膜; 5~8 分别为异常增生、口腔鳞癌、单纯增生、正常口腔黏膜。

图 1 Stat3 及 Bcl-2 的 mRNA 的表达

Figure 1 The mRNA expressions of Stat3 and Bcl-2

2.2 Bcl-2 RT-PCR 的检测结果

Bcl-2 mRNA 的检测结果见图 1 及表 2。其中 Bcl-2 mRNA 阳性表达率除正常口腔黏膜分别与单纯性增生黏膜和 OSCC 有显著性差异外 ($P < 0.05$), 其余各组均无显著性差异 ($P > 0.05$)。而 Bcl-2 mRNA 相对表达量各组间均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 正常口腔黏膜、单纯性增生黏膜、异常增生黏膜和 OSCC 中 Stat3 与 Bcl-2 mRNA 表达的相互关系

Stat3 与 Bcl-2 mRNA 相对表达量的相互关系: Pearson 相关系数 $r = 0.88, P < 0.05$, 呈线性正相关 (图 2)。

表 1 Stat3 mRNA 的阳性表达率和相对表达量 (Stat3/GADPH)

Table 1 The positive rate and the mRNA semiquantitative value (Stat3/GADPH) of Stat3 in each groups

病理诊断	总例数	阳性例数	阳性率(%)	mRNA 相对表达量
正常口腔黏膜	11	2	18.2*	0.29 ± 0.057**
单纯性增生黏膜	7	2	28.6*	0.31 ± 0.014**
异常增生黏膜	16	8	50.0	0.69 ± 0.067*
口腔鳞状细胞癌	18	14	77.8	0.78 ± 0.027*

与口腔鳞状细胞癌组织相比, * $P < 0.05$; 与异常增生黏膜组织相比, # $P < 0.05$ 。

表 2 Bcl-2 mRNA 的阳性表达率和相对表达量 (Bcl-2/GADPH)

Table 2 The positive rate and the mRNA semiquantitative value (Bcl-2/GADPH) of Bcl-2 in each groups

病理诊断	总例数	阳性例数	阳性率(%)	mRNA 相对表达量
正常口腔黏膜	11	0	0*	0* ^Δ
单纯性增生黏膜	7	0	28.6*	0.33 ± 0.014**
异常增生黏膜	16	6	37.5	0.47 ± 0.069 ^Δ
口腔鳞状细胞癌	18	12	66.7	0.81 ± 0.035 ^Δ

与口腔鳞状细胞癌组织相比, * $P < 0.05$; 与异常增生黏膜组织相比, # $P < 0.05$; 与单纯性增生黏膜组织相比, ^Δ $P < 0.05$ 。

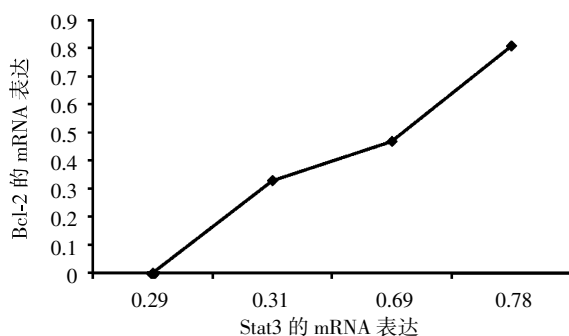


图 2 Stat3 与 Bcl-2 的 mRNA 相对表达量的相互关系

Figure 2 The relationship between Stat3 and Bcl-2 mRNA expression

3 讨论

Stat3 广泛表达于不同类型的细胞和组织中, 并参与细胞的生长、分化、增殖、恶性转化和凋亡^[1-2]。生理情况下, Stat3 的表达是一个瞬时过程, 一般呈微弱表达, 而 Stat3 的持续高表达就可能与细胞的

恶性转化过程相关^[3-4]。大量研究表明, Stat3 与多种肿瘤的发生发展有着密切的联系^[5-7]。本试验对口腔正常黏膜、单纯性增生黏膜、异常增生黏膜及 OSCC 中 Stat3 mRNA 的阳性表达率及相对量进行检测, 结果表明 Stat3 mRNA 在上述 4 种不同状态组织中均有表达, 且在鳞癌组织中的表达显著增高, 由此可以看出 Stat3 mRNA 在口腔正常组织中就已经开始行使信号传导及转录功能, 在 OSCC 组织中的功能就更活跃。

Bcl-2 基因是最为人们重视的细胞凋亡基因之一, 它通过抑制细胞凋亡而延长细胞的生存时间, 是细胞凋亡的潜在抑制剂。因此, 它的激活和过度表达能抑制细胞的凋亡, 影响细胞增殖和凋亡的平衡, 从而参与多种肿瘤的发生过程^[8-10]。有研究表明在单纯性增生向异常增生, 最终演变成鳞癌的过程中检测到了 Bcl-2 的表达, 且表达逐渐增强^[11-12]。这与本研究的结果相符, 说明了 Bcl-2 mRNA 在口腔

黏膜癌前病变发生发展中发挥着一定作用,且随着癌变的发生,Bcl-2 mRNA的转录及信号传导功能更加活跃。

本研究表明 Stat3 和 Bcl-2 mRNA 相对量的表达呈线性正相关,说明这两种基因在口腔黏膜癌前病变发生上存在着一定联系。有研究表明 Stat3 通过上调 Bcl-2 的表达,从而抑制细胞凋亡,导致肿瘤的形成^[13]。Stat3 信号传导途径可调节 Bcl-2 表达,活化的 Stat3 通过上调 Bcl-2 的表达,显示其抗凋亡效应^[14-15]。

口腔黏膜癌前病变发生癌变是一个多阶段、多基因、多步骤的过程。通过研究 Stat3 及 Bcl-2 mRNA 在组织不同状态下的表达量可以发现,Stat3 及 Bcl-2 在上述过程的发生发展上起着一定的作用。因此对 Stat3 及 Bcl-2 mRNA 的信号转导及转录机制进行进一步探讨,将为口腔黏膜癌前病变癌变提供诊断依据。

[参考文献]

[1] Ryu K,Choy E,Yang C,et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) Pathway in osteosarcoma cells and overexpression of phosphorylated-Stat3 correlates with poor prognosis [J]. J Orthop Res, 2010,28(7):971-978

[2] Vivian WYL,Elaine YLW,Yeung H,et al. STAT3 activation contributes directly to Epstein-Barr virus-mediated in vasiveness of nasopharyngeal cancer cells in vitro [J]. In t J Cancer,2009,125(8):1884-1893

[3] Shah NG,Trivedi TI,Tankshali RA,et al . Stat3 expression in oral squamous cell carcinoma;association with clinicopathological parameters and survival[J]. Int J Biol Markers,2006,21(3):175-183

[4] 洪珍珍,唐瞻贵,李金茂,等. Stat3 在口腔疣状癌和鳞癌中的表达[J]. 口腔医学研究,2008,24(1):40-42

[5] 肖仁栋,涂远荣,陈剑锋,等. Stat3 及其磷酸化在食管鳞癌组织中的表达及其意义 [J]. 中华实验外科杂志,

2011,28(9):1519-1522

[6] Grandis JR,Drenning SD,Zeng Q,et al. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97(8):4227-4232

[7] 宋宁静,王晓楠,吴正升,等. Stat3 在皮肤黑素瘤组织中的表达及意义 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(8):1179-1182

[8] Noutmi T,Chiba H,Itoh M,et al. Bcl-xL confers multi-drug resistance in several squamous cell carcinoma cell lines[J]. Oral Oncol,2002,38(1):41-48

[9] Bentz BG,Chandra R,Hains GK,et al. Nitric oxide and apoptosis during human head and neck squamous cell carcinoma development [J]. Am J Otolaryngol,2002,23(1):4-11

[10] Triantafyllou K,Kitsanta P,Karamanolis DG,et al. Epithelial cell turnover,p53 and bcl-2 protein expression during oncogenesis of early and advanced gastric cancer in a Western population[J]. Dig Liver Dis,2008,40(1):39-45

[11] 吴国英,冯振卿,彭 韬. 端粒酶逆转录酶与 Bcl-2 在口腔黏膜癌变过程中的表达及意义 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2006,26(6):450-452

[12] 李留炆,吴国英,杨筱荣,等. Stat3、Bcl-2 及 cyclinD1 在口腔黏膜癌前病变癌变中表达的相关性研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(9):1360-1368

[13] 赵 敏,刘瑞吉,王新允. 肺癌组织芯片中 Stat3、Bcl-2 和 VEGF 表达与临床病理的关系 [J]. 中国误诊学杂志,2007,7(6):1179-1182

[14] Choi JH,Ahn MJ,Park CK,et al. Phospho-Stat3 expression and correlation with VEGF,P53 and Bcl-2 in gastric carcinoma using tissue microarray [J]. APMS, 2006,114(9):619-625

[15] Greten FR,Weber CK,Greten TF,et al. Stat3 and NFkappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis[J]. Gastroenterology,2002,123(6):2052-2063

[收稿日期] 2012-01-21