

Sox2、Pten、Stat3、Vegf 在皮肤恶性黑色素瘤中表达的相关性研究

端木颖,朱喆辰,汤由之,王 鸣,姚 刚,章宏伟,侯祚琼*

(南京医科大学第一附属医院整形烧伤科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探索 SOX 区域 Y 相关高迁移率族蛋白基因 2(sry-related high-mobility box-2,Sox2)、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,Pten)、信号转导子与转录激活子 3(signal transducers and activators of transcription,Stat3)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,Vegf)基因在皮肤恶性黑色素瘤(cutaneous malignant melanoma,CMM)中表达的联系。方法:采用免疫组织化学染色方法检测 27 例 CMM 蜡块中 Sox2、Pten、Stat3 和 Vegf 的表达。SPSS17.0 软件处理实验数据,采用 Spearman 相关分析。结果:在 CMM 中,Sox2、Stat3 和 Vegf 的表达两两之间呈正相关;Sox2、Pten、Stat3 的表达两两之间呈正相关;Pten 与 Vegf 之间的表达无相关性。结论:在 CMM 的发生及演变中,Sox2、Stat3 和 Vegf 之间或 Pten、Sox2、Stat3 之间可能存在单向信号调控或环状调控通路,可能在 CMM 的发生中存在作用。

[关键词] 皮肤恶性黑色素瘤;Sox2;Pten;Stat3;Vegf

[中图分类号] R739.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)11-1395-03

doi:10.7655/NYDXBNS20171104

近年来,我国恶性黑色素瘤发病率快速增长,每年新发病例约 2 万例^[1]。皮肤恶性黑色素瘤(cutaneous malignant melanoma,CMM)是恶性黑色素瘤中最常见的类型,侵袭性高,5 年生存率较低。CMM 的发生、发展同其他肿瘤类似,是细胞 DNA 多重损伤的一个复杂过程。有研究表明,SOX 区域 Y 相关高迁移率族蛋白基因 2(sry-related high-mobility box-2, Sox2)^[2]、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,Pten)^[6]、信号转导子与转录激活子 3 (signal transducers and activators of transcription, Stat3)^[3-5]、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,Vegf)^[6-7,10] 基因在恶性肿瘤的生长、增殖、侵袭、转移中有重要作用。在 CMM 中均能检测到这 4 个基因的表达,但 4 个基因之间有无内在联系,是否相互影响尚无文献报道。本文通过免疫组化检测 Sox2、Pten、Stat3、Vegf 在 CMM 中的蛋白表达,并对其蛋白的相对表达量进行 Spearman 分析,初步探讨这 4 个基因在 CMM 中可能存在的联系。

1 材料和方法

1.1 材料

选取南京医科大学第一附属医院病理科

2012—2015 年手术切除的 27 例 CMM 标本,样品用 10%福尔马林固定,进行常规病理石蜡切片制作,切片厚度 4 μm 。

实验所需试剂:兔抗人 SOX2 单克隆抗体(bs-0523R,北京博奥森生物技术有限公司);兔抗人 PTEN 单克隆抗体(IPW1525)、兔抗人 STAT3 单克隆抗体(IPW0866,南京派为生物技术有限公司);兔抗人 VEGF 单克隆抗体(11232-2-AP,Proteintech 中国分公司);DAB 显色试剂盒、免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法检测各标本中 Sox2、Pten、Stat3、Vegf 的表达

标本常规脱蜡、水化;PBS 冲洗,3% H_2O_2 (80%甲醇)滴加在切片上,室温静置 10 min;抗原修复;PBS 冲洗;滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min。滴加一抗 50 μL ,室温静置 1 h 或 4 $^\circ\text{C}$ 过夜或 37 $^\circ\text{C}$ 1 h。PBS 冲洗;滴加二抗 40~50 μL ,室温静置,或 37 $^\circ\text{C}$ 1 h;PBS 冲洗,DAB 显色 5~10 min,在显微镜下掌握染色程度;PBS 冲洗;苏木精复染,盐酸酒精分化;自来水冲洗 10~15 min;脱水、透明、封片、镜检。

已知染色阳性的组织切片作阳性对照,阴性对照以 PBS 代替一抗孵育组织切片。

1.2.2 结果判定

Sox2 蛋白阳性标准:细胞核呈棕黄色;Pten 蛋

[基金项目] 国家自然科学基金(81472081)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: houzuojiong@163.com

白阳性标准:细胞核或细胞浆呈棕黄色;Stat3 蛋白阳性标准:细胞浆呈棕黄色;Vegf 蛋白阳性标准:细胞质着色^[8-9]。实验结果判定:随机选 5 个高倍镜视野,每个视野计数 100 个细胞。①根据阳性细胞面积计分,呈阴性的视野记 0 分,阳性细胞面积/总面积 $\leq 25\%$ 记 1 分, $26\% \sim 50\%$ 记 2 分, $51\% \sim 75\%$ 记 3 分, $\geq 75\%$ 记 4 分;②根据着色强弱分级,视野不着色记 0 分,着色弱记 1 分,着色中等记 2 分,着色强记 3 分。每个标本的两项指标分数乘积为最终计分^[8-9]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件处理实验数据,采用 Spearman 相关分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在 CMM 中,Sox2、Pten、Stat3、Vegf 的表达计分如表 1 所示,各行数据不符合正态性分布,故采用 Spearmen 相关分析进行相关性检验,Sox2、Stat3、Vegf 两两之间存在相关性;Sox2、Pten、Stat3 的表达两两之间存在相关性;Pten 与 Vegf 之间的表达无明显相关。各组之间相关系数均为正值(表 2),判定各组数据间的相关性为正相关。

表 1 Sox2、Pten、Stat3、Vegf 蛋白在 CMM 中表达结果不同计分的例数 (n)

指标	0分	1分	2分	3分	4分	6分	8分	9分	12分
Sox2	0	0	0	1	0	5	4	5	12
Pten	0	0	1	0	1	9	11	4	1
Stat3	0	0	0	1	0	4	4	7	11
Vegf	0	1	1	3	0	4	1	5	12

表 2 Sox2、Pten、Stat3、Vegf 相关性分析的 r 值

指标	Sox2	Pten	Stat3	Vegf
Sox2	1.000			
Pten	0.392*	1.000		
Stat3	0.765**	0.534**	1.000	
Vegf	0.680**	0.143	0.433*	1.000

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

CMM 是发生于皮肤黑色素细胞的高度恶性肿瘤,临床常见部位为足跖、手指皮肤及指(趾)甲下,少见的也可发生于内脏器官。其发病机制尚未完全明确,近年来 Sox2、Pten、Stat3、Vegf 基因在肿瘤发病中的作用是研究热点。文献报道这些基因在恶性黑色素瘤中也存在异常表达。Weina 等^[2]发现,恶性黑

色素瘤细胞中 Sox2 基因过度表达。Wang 等^[10]在胃癌细胞系中研究发现 Pten 是 Sox2 的下游靶基因。但就上述基因在恶性黑色素瘤中表达的联系和相互作用鲜有报道。本研究结果显示在 CMM 中 Sox2 与 Pten 表达呈正相关,推测 CMM 中也存在类似的调控关系,共同参与 CMM 发生。

Pten、Stat3 的作用在多种恶性肿瘤中也有研究,两者之间存在相关性^[3-4,6]。本研究表明 CMM 中 Pten 和 Stat3 的表达在统计学上呈正相关,表明两者在 CMM 中也可能存在类似的相互关系。

有报道证实 Stat3 与 Vegf 的同时过表达会导致多种肿瘤的发生、浸润和转移^[5,7]。Yin 等^[11]研究发现 Stat3 蛋白的激活可以促进肿瘤免疫逃逸,抑制 Stat3 蛋白的表达,从而抑制小鼠恶性黑色素瘤细胞的增殖。Stat3 的激活产物还可促进与肿瘤发生相关目的基因的转录^[12]。有研究发现 Pten 蛋白能破坏 Stat3 的信号转导,阻止 Stat3 的磷酸化,减弱其致肿瘤效应^[13]。推测 Stat3 与 Pten 之间也可能存在某种关联。本研究结果也显示两者之间存在正相关,具体如何调控有待进一步研究。

Roh 等^[14]发现不同 CMM 患者 Pten 启动子甲基化程度不同,其临床症状及预后差异有统计学意义,认为 Pten 启动子的甲基化程度是黑色素瘤预后的一个相对独立的负性预测因素。郑江红等^[15]研究发现,Vegf 表达在转染野生型 Pten 基因的黑色素瘤细胞中明显减少,而在转染反义 Pten 基因的细胞中无明显变化,两组细胞表现不同的侵袭性,推测 Pten 影响了 Vegf 的表达,改变了 CMM 细胞的侵袭力,Pten 蛋白的去磷酸化可能在此过程中起到了关键作用。本研究发现 CMM 中 Pten 和 Vegf 表达无相关性,两者之间可能并不存在直接的调控关系,或者是其他基因的存在对调控起到了干扰作用。

人类 Sox2 启动子上游区域包含多个 Stat3 结合序列,Sox2 的诱导依赖于 Stat3 的表达,敲除 Sox2 又能抑制磷酸化的 Stat3 蛋白(p-Stat3)对 Vegf 表达的上调,抑制 Stat3 的激活,Stat3、Sox2 这两个转录因子中的任一个都能促进另一个转录因子的持续激活,推动细胞自我更新。由肿瘤细胞或支持细胞产生的 Vegf 能激活肿瘤细胞中的 Stat3 蛋白,驱动 Sox2 对转录的持续影响,促进肿瘤细胞的自我更新^[16]。提示 Sox2、Vegf、Stat3 之间存在着环状调控路径。本研究结果表明在 CMM 中,Sox2、Vegf、Stat3 两两之间呈正相关,说明 CMM 中也可能存在这种环状调控路径,或是简单的单向调控通路。

在恶性黑色素瘤中,Sox2、Pten、Stat3 和 Vegf 之间可能存在调控与被调控关系,或者环状调控网络。因本研究样本量有限,后续实验将扩大样本量来进一步验证本文结果,研究基因间的信号通路转导过程,从而阐明这些基因与 CMM 发生和发展的关系。

[参考文献]

[1] CSCO 黑色素瘤专家委员会. 中国黑色素瘤诊治指南(2011 版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(2): 159-171

[2] Weina K, Wu H, Knappe N, et al. TGF- β induces SOX2 expression in a time-dependent manner in human melanoma cells[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2016, 29(4): 453-458

[3] Lee J, Kang WK, Park JO, et al. Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 predicts poor clinical outcome in gastric adenocarcinoma[J]. AP-MIS, 2009, 117(8): 598-606

[4] Yoon YK, Kim HP, Han SW, et al. KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach[J]. Mol Carcinog, 2010, 49(4): 353-362

[5] Wang H, Byfield G, Jiang Y, et al. VEGF-mediated STAT3 activation inhibits retinal vascularization by down-regulating local erythropoietin expression[J]. Am J Pathol, 2012, 180(3): 1243-1253

[6] Jin CH, Wang AH, Chen JM, et al. Relationship between expression and prognostic ability of PTEN, STAT3 and VEGF-C in colorectal cancer[J]. Exp Ther Med, 2012, 4(4): 633-639

[7] 刘阳云, 刘庚勋, 李正贤, 等. STAT3 与 VEGF 在鼻咽癌中的表达及意义[J]. 临床军医杂志, 2014, 42(3): 268-270

[8] 姜洋, 金晓明, 屠康. 平均阳性染色面积百分比法分析免疫组化结果初探[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(3): 650-653

[9] 田君才, 杜国亮, 张桂霞. 人工免疫组化判定结果与灰度值相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(1): 112-113

[10] Wang S, Tie J, Wang R, et al. SOX2, a predictor of survival in gastric cancer, inhibits cell proliferation and metastasis by regulating PTEN[J]. Cancer Lett, 2015, 358(2): 210-219

[11] Yin D, Li Y, Guo B, et al. Plasmid-based Stat3 siRNA delivered by functional graphene oxide suppresses mouse malignant melanoma cell growth[J]. Oncol Res, 2016, 23(5): 229-236

[12] Sellier H, Rébillard A, Guette C, et al. How should we define STAT3 as an oncogene and as a potential target for therapy?[J]. JAKSTAT, 2013, 2(3): e24716

[13] Baek SH, Lee JH, Ko JH, et al. Ginkgetin blocks constitutive STAT3 activation and induces apoptosis through induction of SHP-1 and PTEN tyrosine phosphatases[J]. Phytother Res, 2016, 30(4): 567-576

[14] Roh MR, Gupta S, Park KH, et al. Promoter methylation of PTEN is a significant prognostic factor in melanoma survival[J]. J Invest Dermatol, 2016, 136(5): 1002-1011

[15] 郑江红, 林子豪, 吴宏, 等. PTEN 基因对人恶性黑色素瘤细胞克隆株 VEGF 的影响[J]. 中国美容医学, 2002, 11(6): 510-512

[16] Zhao D, Pan C, Sun J, et al. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to up-regulate Myc and Sox2[J]. Oncogene, 2015, 34(24): 3107-3119

[收稿日期] 2017-02-07

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, $(2\sim6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$,30~40 km。