

· 论 著 ·

Stat3 通路基因在食管上皮内瘤变和食管癌中的表达及关系*

刘惠民¹, 郭梅艳², 王智红³, 王 蕾¹, 韩起廷¹, 瞿 峰², 王彦华¹, 王秀清^{2△}

(1. 河北工程大学医学院病理教研室, 河北邯郸 056002; 河北工程大学附属医院; 2. 病理科;

3. 乳腺外科, 河北邯郸 056002; 4. 河北省邯郸市中心血站采血科 056002)

摘要:目的 探讨 Stat3 及 Bcl-2、Bax 在食管上皮内瘤变过程中的可能作用。方法 采用免疫组化方法检测食管上皮内瘤变(150 例)和食管鳞癌(100 例)组织中 Stat3、Bcl-2、Bax 在蛋白水平的表达情况。结果 Stat3 蛋白在正常食管黏膜、食管上皮内瘤变、食管癌病例中的阳性表达率分别为 6.67%、60.67%、94.00%, 食管上皮内瘤变和食管癌病例中的 Stat3 蛋白的表达明显高于正常食管黏膜组($P < 0.05$), 且食管癌中 Stat3 蛋白的表达高于食管上皮内瘤变组($P < 0.05$); Stat3 蛋白和 Bcl-2 蛋白的表达均随食管内瘤变级别的增高及食管癌的出现而增高($P < 0.05$), 但 Bax 蛋白的阳性表达率随食管内瘤变级别的增高及食管癌的出现呈降低趋势。Stat3 与 Bcl-2 的表达呈正相关($P < 0.05$), 但 Stat3 与 Bax 的表达不存在相关性($P > 0.05$)。结论 Stat3 及 Bcl-2、Bax 基因在食管鳞癌的发生、发展中均起到一定作用, Stat3 和 Bcl-2 可能在食管癌变发生过程中起重要的协同作用。

关键词:食管内瘤变; 食管癌; Stat3

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)17-1678-02

Expression and relationship of Stat3 pathways in esophageal intraepithelial neoplasia and esophageal carcinoma*

Liu Huimin¹, Guo Meiyang², Wang Zhihong³, Wang Lei¹, Han Qiting¹, Qu Feng²,Wang Yanhua¹, Wang Xiuqing^{2△}

(1. Teaching and Research Section of Pathology, Medical College of Hebei Engineering University,

Handan, Hebei 056002, China; 2. Department of Pathology; 3. Department of Breast Surgery,

Affiliated Hospital, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056002, China;

4. Department of Blood Collection, Handan Municipal Blood Center, Handan, Hebei 056002, China)

Abstract: Objective To explore the possible roles of Stat3 and Bcl-2, Bax in carcinogenesis of esophageal intraepithelial neoplasia. Methods The expression of Stat3, Bcl-2 and Bax at protein level was studied in 150 cases of esophageal intraepithelial neoplasia and 100 cases of esophageal squamous cell carcinoma by immunohistochemical staining. Results The positive expression rate of Stat3 was 6.67%, 60.67%, 94.00% respectively in normal esophageal mucosa, esophageal intraepithelial neoplasia and esophageal carcinoma. The positive expression of Stat3 in the cases of esophageal intraepithelial neoplasia or esophageal carcinoma was all significantly higher than that in normal esophageal mucosa ($P < 0.05$), and the positive expression of Stat3 was significantly higher in esophageal carcinoma than that in esophageal intraepithelial neoplasia ($P < 0.05$). The positive expression of Stat3 and Bcl-2 was increased as the degree of esophageal intraepithelial neoplasia increased and esophageal carcinoma occurred ($P < 0.05$); Bax was descended as the degree of esophageal intraepithelial neoplasia increased and esophageal carcinoma occurred; Stat3 and Bcl-2 were positively related ($P < 0.05$), but Stat3 and Bax were not related ($P > 0.05$). Conclusion In the occurrence and development of esophageal squamous cell carcinoma, Stat3, Bcl-2 and Bax genes play a role, Stat3 and Bcl-2 may become synergistic action during the change in esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: esophageal intraepithelial neoplasia; esophageal carcinoma; Stat3

Stat3 是转录信号转导子与活化子家族(signal transducers and activators of transcription, STAT)的重要成员, 被定义为癌基因^[1], 调控 Bax、Bcl-2、c-fos 等靶基因转录, 影响细胞增殖和分化。既往研究显示, Stat3 在大肠腺瘤癌变过程中起一定作用, 但 Stat3 及其通路相关基因在食管上皮内瘤变和食管癌中的表达及相关性研究未见报道^[2-3]。本研究应用免疫组化方法分析 Stat3 及其相关基因 Bcl-2、Bax 的表达情况, 探讨它们在食管上皮内瘤变过程中的作用及相关性。

1 材料与方

1.1 材料 选取 2004~2009 年河北工程大学附属医院病理科存档蜡块。严格按照病史及病理资料选择食管癌高发区食

管上皮内瘤变病例 150 例(I、II、III 级各 50 例), 食管癌病例 100 例作为研究对象, 将其中 60 例接受食管癌切除术患者食管上、下残端的正常黏膜组织作为对照。由两位高年资病理医师按照 WHO 标准^[4]对全部病例切片进行复查。

1.2 方法 兔抗人 Stat3 多克隆抗体、鼠抗人 Bcl-2、Bax 单克隆抗体及相应二抗试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin biotin peroxidase complex, SABC)法对全部病例进行免疫组化染色, 实验步骤按说明书操作, 将 4 μm 厚的切片常规脱蜡至水, 滴加一抗, 3 种一抗稀释度均为 1:80, 二氨基联苯胺(diamino benzidine, DAB)显色, 复染, 封片。用已知的乳腺癌

* 基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(11276103D-32); 邯郸市科技局计划项目(1123108077-2)。△ 通讯作者, Tel: (0310) 8572132; E-mail: liuhuimin1973@126.com。

阳性切片作为阳性对照,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 Stat3、Bcl-2 及 Bax 蛋白阳性表达均主要定位于细胞质;染色结果根据染色强度和阳性细胞百分比进行半定量的综合计分。在光学显微镜下随机选取 5 个高倍视野计数阳性细胞百分比的平均数,无阳性细胞计 0 分,≤25%计 1 分,26%~50%计 2 分,51%~75%计 3 分,>75%计 4 分;着色强度以多数阳性细胞呈现的染色计分,无着色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分;将阳性细胞百分比和着色强度两者的计分相加,0~2 分为阴性(-),≥3 分为阳性(+).

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件,组间比较采用 χ^2 检验,Fisher 确切概率法及 Spearman's rank 进行统计学处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Stat3 蛋白的表达 Stat3 蛋白阳性反应定位于细胞质,呈棕黄色。Stat3 蛋白在正常食管黏膜、食管上皮内瘤变、食管癌组织中的阳性表达率分别为 6.77%、60.67%和 94.00%,随着食管上皮内瘤变级别的增高及癌的出现,Stat3 蛋白阳性表达率呈逐渐增高趋势。食管上皮内瘤变和食管癌中 Stat3 蛋白的表达率均明显高于正常食管黏膜($P<0.05$),而且食管癌中 Stat3 蛋白的阳性表达率高于食管上皮内瘤变($P<0.05$),见表 1。食管内瘤变不同级别病例中,Stat3 蛋白的表达随食管内瘤变级别的增高而升高($P<0.05$),见表 2。结果见封 2 图 1、2。

2.2 Bcl-2 蛋白的表达 Bcl-2 蛋白阳性反应主要定位于细胞质,呈棕黄色。Bcl-2 蛋白在正常食管黏膜、食管上皮内瘤变、食管癌组织中的阳性表达率分别为 0%、55.33%和 71.00%,Bcl-2 的表达随食管癌的出现而增高($P<0.05$),见表 1。食管内瘤变不同级别病例中,Bcl-2 蛋白的表达随食管内瘤变级别的增高而升高($P<0.05$),见表 2。结果见封 2 图 3、4。

2.3 Bax 蛋白的表达 Bax 蛋白阳性反应主要定位于细胞质,呈棕黄色。Bax 蛋白在正常食管黏膜、食管上皮内瘤变、食管癌组织中的阳性表达率分别为 71.67%、50.67%和 33.00%,Bax 蛋白的表达随食管癌的出现而逐渐降低($P<0.05$),见表 1。食管内瘤变不同级别病例中,Bax 蛋白的阳性表达随食管内瘤变级别的增高而减弱,但相邻组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。结果见封 2 图 5、6。

表 1 Stat3、Bcl-2、Bax 在正常食管黏膜、食管上皮内瘤变和食管癌中的表达[n(%)]

组别	n	Stat3(+)	Bcl-2(+)	Bax(+)
正常食管黏膜	60	4(6.67)	0(0.00)	43(71.67)
食管上皮内瘤变	150	91(60.67)◇	83(55.33)◇	76(50.67)◇
食管癌	100	94(94.00)◇◆	71(71.00)◇◆	33(33.00)◇◆

◇: $P<0.05$,与正常食管黏膜组比较;◆: $P<0.05$,与食管上皮内瘤变组比较。

表 2 Stat3、Bcl-2、Bax 蛋白在食管上皮内瘤变不同级别中的表达[n(%)]

组别	n	Stat3(+)	Bcl-2(+)	Bax(+)
食管上皮内瘤变Ⅰ级	50	14(28.00)	11(22.00)	31(62.00)
Ⅱ级	50	29(58.00)▲	26(52.00)▲	27(54.00)
Ⅲ级	50	44(88.00)*▲	46(92.00)*▲	18(36.00)▲

*: $P<0.05$,与食管上皮内瘤变Ⅰ、Ⅱ级比较;▲: $P<0.05$,与食管上皮内瘤变Ⅰ级比较。

2.4 Stat3 与 Bcl-2 的表达关系 正常食管黏膜组未见 Stat3

和 Bcl-2 同时阳性表达。从正常食管黏膜到食管癌变过程中,Stat3 和 Bcl-2 的共表达率逐渐升高,Stat3 和 Bcl-2 的表达存在正相关关系($r=0.583, P<0.05$),见表 3。

2.5 Stat3 与 Bax 的表达关系 Stat3 和 Bax 的表达做 Spearman 相关性分析,不存在相关关系($r=0.097, P>0.05$),见表 3。

表 3 Stat3 与 Bcl-2、Bax 的相关性

Stat3	Bcl-2 ◆		Bax ◇	
	-	+	-	+
-	105	16	69	52
+	51	138	89	100

◆: $r=0.583, P<0.05$; ◇: $r=0.097, P>0.05$ 。

3 讨论

Stat3 是 STAT 家族的重要成员,Stat3 通路的持续激活可调控 CyclinD 1、Bcl-xl、Bcl-2、c-Myc、Fas 等靶基因转录,导致细胞异常增殖和恶性转化,与肿瘤的发生关系密切。目前研究显示,Stat3 过度表达与食管癌的演进过程有关^[5-8]。另有研究表明,在食管正常黏膜上皮、非典型增生、鳞状细胞癌组织中 Stat3 的磷酸化水平逐渐增高,与早期食管鳞癌的发生有关^[9-10]。本研究发现,Stat3 蛋白的阳性表达率随着食管内瘤变级别的增高和食管癌的出现,呈逐渐增高的趋势,且均高于正常食管黏膜组,表明正常食管黏膜中 Stat3 的激活水平很低,其信号强度远不如食管上皮内瘤变及食管癌组织中明显,说明从食管上皮内瘤变到食管癌发生过程中的不同阶段均伴随有 Stat3 的激活,促使细胞维持高增殖状态,导致恶性转化。研究也显示,Stat3 蛋白在食管上皮内瘤变Ⅲ级和食管癌中无明显差异性($P>0.05$),提示 Stat3 促进了食管内瘤变的形成及其向早期食管癌的转变,是食管癌发生、发展的早期事件。

Stat3 影响肿瘤的发生、发展主要是通过激活其靶基因来实现的,其中包括 Bcl-2 和 Bax。Bcl-2 可以抑制多种组织的细胞凋亡,延长细胞生存,导致细胞增殖和恶变。研究显示,Bcl-2 的过度表达与 Stat3 的表达有关^[11]。本研究中,随着食管内瘤变级别的增高及食管癌变的发生,Bcl-2 蛋白的表达逐渐增高,而且 Stat3 的表达与 Bcl-2 的表达呈正相关($r=0.583, P<0.05$),提示食管癌中的 Stat3 的持续激活,导致 Bcl-2 基因转录激活相应增加,导致细胞数量的相对增多,促进肿瘤的生长。研究还发现,Bcl-2 在食管上皮内瘤变Ⅲ级中的阳性表达率高于其在食管癌中的表达,说明 Stat3 对 Bcl-2 的转录激活作用可能在食管癌发生的早期就已经出现,并随着病变的发展、恶化,其阳性表达率呈降低趋势,由此判断 Bcl-2 在食管癌发生的早期就已经发挥作用。

Bax 可与抗凋亡基因 Bcl-2 形成二聚体,具有抑制 Bcl-2,促进细胞凋亡的作用^[12]。研究显示,Bax 在正常食管黏膜中阳性率为 71.67%,在食管上皮内瘤变中表达率为 50.67%,而在食管癌中阳性率为 33.00%。推测 Bax 表达高的正常食管黏膜细胞凋亡比例大,不致引起细胞异常增殖、肿瘤发生,而食管癌组织中由于 Bax 表达低,细胞凋亡减少,则促进细胞的恶性转化、肿瘤发生。但是,随着食管内瘤变级别的增高及食管癌变的发生,Stat3 的表达与 Bax 的表达未见相关关系($r=0.097, P>0.05$)。提示 Stat3 基因和 Bax 基因可能通过各自不同的机制参与食管鳞癌的发生、发展,这有待进一步研究。

食管癌变的发生是多基因作用的复杂(下转第 1683 页)

Cell Biol, 2003, 23(20):7096-7107.

- [8] Li Z, Liu JY, Zhang JT. 14-3-3sigma, the double-edged sword of human cancers[J]. Am J Transl Res, 2009, 1(4):326-340.
- [9] Rajagopalan S, Sade RS, Townsley FM, et al. Mechanistic differences in the transcriptional activation of p53 by 14-3-3 isoforms[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(3):893-906.
- [10] Muhlmann G, Ofner D, Zitt M, et al. 14-3-3 sigma and p53 expression in gastric cancer and its clinical applications[J]. Dis Markers, 2010, 29(1):21-29.
- [11] Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, et al. Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development[J]. Development, 2002, 129(11):2733-2747.
- [12] Powe DG, Akhtar G, Habashy HO, et al. Investigating AP-2 and YY1 protein expression as a cause of high HER2 gene transcription in breast cancers with discordant HER2 gene amplification[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(6):R90.
- [13] Berlato C, Chan KV, Price AM, et al. Alternative TFAP2A isoforms have distinct activities in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(2):R23.

- [14] Odegaard E, Staff AC, Kaern J, et al. The AP-2gamma transcription factor is upregulated in advanced-stage ovarian carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(3):462-468.
- [15] Khattar NH, Lele SM, Kaetzel CS. Down-regulation of the polymeric immunoglobulin receptor in non-small cell lung carcinoma: correlation with dysregulated expression of the transcription factors USF and AP2[J]. J Biomed Sci, 2005, 12(1):65-77.
- [16] Høi-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, et al. Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24):8521-8530.
- [17] Braeuer RR, Zigler M, Villares GJ, et al. Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(2):83-88.
- [18] Gan L, Zhu DX, Yang LP, et al. Involvement of transcription factor activator protein-2alpha in doxazosin-induced HeLa cell apoptosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(4):465-472.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2011-12-22)

(上接第 1679 页)

过程。Stat3、Bcl-2、Bax 基因在食管鳞癌的发生、发展中均起一定作用,在食管鳞癌发展中 Stat3 和 Bcl-2 起协同作用,对其进行联合检测,有助于食管癌的早期诊断和预防。

参考文献:

- [1] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. STAT3 as an Oncogene[J]. Cell, 1999, 98(3):295-303.
- [2] 刘惠民, 吴文新, 张祥宏, 等. Stat3 和 p38 在散发性大肠管状腺瘤癌变过程中的表达及意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(7):168-169.
- [3] 吴文新, 刘惠民, 张祥宏. Stat3 通路相关基因在散发性大肠管状腺瘤癌变中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(5):388-390.
- [4] 朱雄增. 胃肠道癌前病变和癌的 WHO 诊断新标准[J]. 中华病理学杂志, 2003, 32(2):168-169.
- [5] 贵永贤, 李小环, 赵立群, 等. 食管肿瘤癌变过程中 Stat3 和 Ki67 基因表达变化及意义[J]. 山东医药, 2008, 48(26):29-30.
- [6] 王新华, 李珊珊, 郭燕, 等. 食管鳞癌组织中 STAT3 蛋白的表达及临床意义[J]. 山东医药, 2005, 45(33):13-14.

- [7] 高远, 轩小燕, 张红燕, 等. STAT3 信号蛋白与食管鳞癌上皮间质转化的关系及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(5):447-452.
- [8] 李素梅, 钟雪云, 林琛莅, 等. Stat3、CyclinD1 及 Bcl-2 在食管鳞癌组织芯片中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(4):681-684.
- [9] 贵永贤, 李小环, 赵立群, 等. 食管癌变过程中 Stat3 和 CerbB-2 基因表达的动态观察[J]. 肿瘤基础与临床, 2008, 21(1):1-4.
- [10] 刘俊茹, 王原, 左连富, 等. COX-2、P-Stat3 及 p-Stat5 在食管癌组织中的表达及其意义[J]. 癌症, 2007, 26(5):458-462.
- [11] 张志红, 胡碧丹, 于敏, 等. 瘦素、STAT3、p-STAT3 和 bcl-2 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 肿瘤, 2010, 30(6):529-534.
- [12] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak[J]. Cell Cycle, 2007, 6(24):3043-3047.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-01-08)