

干细胞标志物 SALL4 在宫颈癌中的表达研究*

张 铭¹, 张一鸣^{1△}, 左 伟¹, 钱 晖², 许文荣²(1. 南京医科大学附属常州市妇幼保健院, 江苏常州 213003; 2. 江苏大学
基础医学与医学技术学院, 江苏镇江 212013)

摘要:目的 研究 SALL4 基因在宫颈癌组织中的表达情况及其临床意义。方法 利用 RT-PCR 和免疫组化方法检测 56 例宫颈癌组织和 35 例正常宫颈组织中 SALL4 的表达, 并分析 SALL4 在宫颈癌中的表达与临床病理特征的关系。结果 宫颈癌组织中 SALL4 mRNA 表达水平(2.56±0.22)高于正常宫颈组织(0.38±0.03), 二者比较差异有统计学意义($t=58.1, P<0.01$); SALL4 蛋白在宫颈癌组织中阳性表达率(80.4%, 45/56)高于宫颈正常组织(11.4%, 4/35), 二者比较差异有统计学意义($\chi^2=41.177, P<0.01$)。宫颈癌组织中 SALL4 的阳性表达与肿瘤分化状态相关, 中、高分化组低于低分化组($\chi^2=4.226, P=0.039$), 与年龄、国际妇产科学联盟(FIGO)分期、肿瘤大小、病理类型、淋巴结是否转移无关($\chi^2=0.004, 3.403, 1.223, 0.827, 0.011, P>0.05$)。结论 SALL4 在宫颈癌组织中高表达, 与宫颈癌的分化相关, SALL4 的表达可能对宫颈癌的发生发展有重要作用。

关键词: SALL4 基因; 宫颈肿瘤; 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.011

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)03-0285-03

Study on expression of stem cell marker SALL4 gene in cervical cancer*

Zhang Ming¹, Zhang Yiming^{1△}, Zuo Wei², Qian Hui², Xu Wenrong²

(1. Affiliated Changzhou Women and Children Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China; 2. School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212003, China)

Abstract: Objective To research the expression and clinical significance of SALL4 gene in cervical cancer. Methods The expression of SALL4 in 56 samples of cervical cancer and 35 samples of normal cervical tissues was detected by immunohistochemistry and RT-PCR, and its relationship with the clinicopathological characteristics of cervical cancer was analyzed. Results The expression of SALL4 mRNA was 2.56±0.22 in cervical cancer tissues, which was significantly higher than 0.38±0.03 in the normal cervical tissues, the difference between them had statistical significance($t=58.1, P<0.01$); the positive expression rate of SALL4 protein was 80.4%(45/56) in cervical cancer, which was significantly higher than 11.4%(4/35) in the normal cervical tissues($\chi^2=41.177, P<0.01$). The positive expression of SALL4 in the cervical cancer tissues was correlated with the differentiation status of tumor, which in the middle and high differentiation groups was lower than that in the low differentiation group($\chi^2=4.226, P=0.039$), but had no correlation with age, International Federation of Gynecology and Obstetrics(FIGO) stage, tumor size, pathological type and lymph node metastasis($P>0.05$). Conclusion SALL4 is highly expressed in the cervical cancer tissues and correlated with the tumor differentiation, which might play an important role in the occurrence and development of cervical cancer.

Key words: SALL4 gene; cervical cancer; immunohistochemistry

干细胞是一类具有自我更新能力、无限增殖能力以及多向分化潜能的原始细胞, 在肿瘤形成、生长、浸润、转移和复发中起着关键性的作用^[1-2]。SALL4 是胚胎干细胞的特异标记物, 在人类多种肿瘤中均有表达。本研究从基因和蛋白的角度检测了 56 例宫颈癌组织和 35 例正常宫颈组织中 SALL4 的表达, 探讨该基因与宫颈癌的关系及其意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 56 例宫颈癌组织(鳞癌 46 例, 腺癌 10 例)取自 2010 年 3 月至 2012 年 12 月常州市妇幼保健院妇科接受手术的宫颈癌患者, 年龄 21~68 岁, 平均年龄 46.5 岁, 35 例正常宫颈组织标本取自同期该院宫颈科和妇科患者, 作为对照组, 年龄 22~66 岁, 平均年龄 46.3 岁, 所有病例均经病理检查确诊, 且术前未接受任何治疗(本研究遵循的程序符合该院人体试验委员会所制定的伦理学标准, 得到该委员会批准, 并与

患者签署临床研究知情同意书)。

1.2 主要试剂 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司, SALL4 抗体购自 Abcam 公司, 二抗购自上海碧云天公司, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 取 50~100 mg 宫颈组织, 用 Trizol 提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。引物由上海生工公司合成, SALL4 产物长度为 142 bp, 上游引物为 5'-TCG ATG GCC AAC TTC CTT C-3', 下游引物为 5'-GAG CGG ACT CAC ACT GGA GA-3', β -actin 产物长度为 265 bp, 上游引物为 5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3', 下游引物为 5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3'。反应体系为 25 μ L, 分别含 cDNA 1 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, 正、反向引物各 0.5 μ L, TagDNA 聚合酶 0.2 μ L。PCR 循环条件

为:94 ℃ 5 min,94 ℃ 变性 30 s,SALL4(62 ℃)/ β -actin(56 ℃)退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环,72 ℃ 5 min,将 RT-PCR 扩增产物进行电泳分析。

1.3.2 免疫组织化学 按抗体说明书进行抗原修复,SP 法进行免疫组化染色,一抗为兔抗人 SALL4 抗体(1:800),二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3 000),DAB 酶底物显色,苏木精复染,常规脱水、透明、干燥、封片,显微镜下观察结果。阴性对照用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。SALL4 的相对表达量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,SALL4 在免疫组化中的阳性率比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

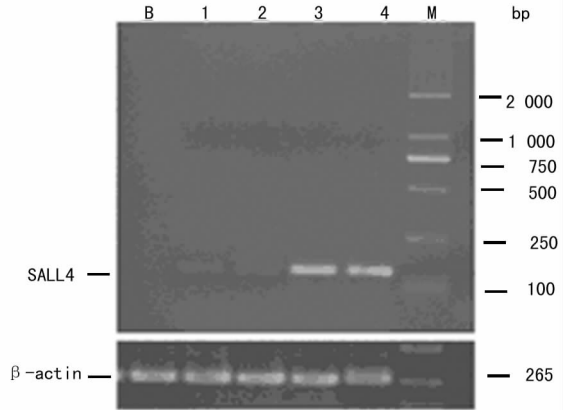
2 结果

2.1 SALL4 mRNA 在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达

RT-PCR 结果显示 SALL4 条带位于 142 bp 处,内参 β -actin 条带位于 265 bp 处,见图 1,灰度扫描结果表明,宫颈癌组织 SALL4 mRNA(2.56 ± 0.22)表达高于正常宫颈组织(0.38 ± 0.03),二者比较差异有统计学意义($t=58.1, P < 0.01$)。

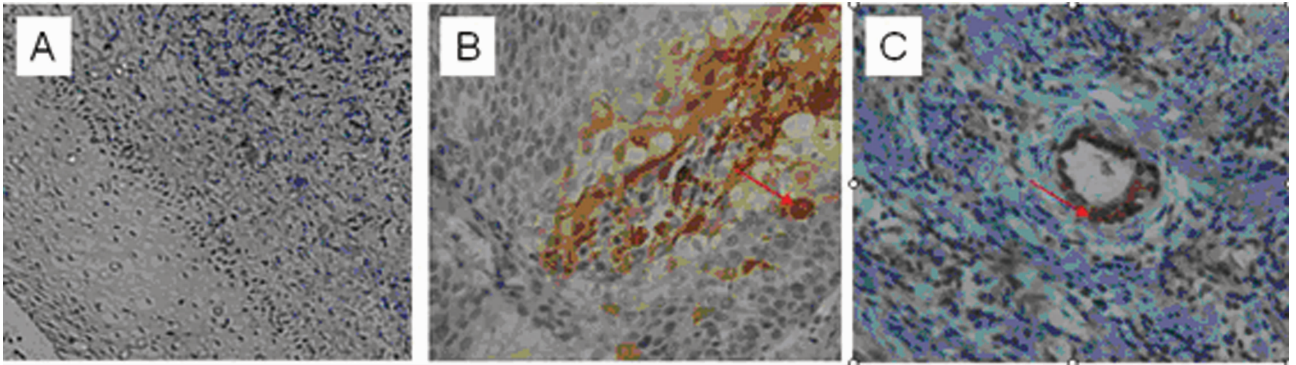
2.2 免疫组化结果 免疫组织化学染色结果显示,SALL4 蛋白在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达阳性率分别为

80.4%(45/56)、11.4%(4/35),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=41.177, P < 0.01$),在宫颈癌组织 SALL4 蛋白核浆均有表达,主要定位于细胞核,呈现棕黄色,弥漫性分布,见图 2。



1,2:正常宫颈组织;3,4:宫颈癌组织;B:空白对照;M:DNA marker DL-2000。

图 1 RT-PCR 检测 SALL4 mRNA 表达的琼脂糖电泳结果



A:正常宫颈组织;B:宫颈鳞癌组织;C:宫颈腺癌组织,箭头所指为 SALL4 阳性细胞。

图 2 免疫组化检测 SALL4 蛋白在宫颈癌和正常宫颈组织中的表达($\times 400$)

2.3 宫颈癌组织中 SALL4 的表达与临床病理参数的关系

免疫组化检测结果表明,SALL4 的阳性表达与肿瘤分化程度相关,中、高分化组低于低分化组($\chi^2=4.226, P=0.039$),与年龄、FIGO 分期、肿瘤大小、病理类型、淋巴结是否转移无关($\chi^2=0.004, 3.403, 1.223, 0.827, 0.011, P > 0.05$),见表 1。

表 1 宫颈癌组织中 SALL4 的表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	n	SALL4 阳性 [n(%)]	χ^2	P
年龄(岁)			0.004	0.952
≤46	25	20(80.0)		
>46	31	25(80.6)		
FIGO 分期			3.403	0.065
I 期	22	15(68.2)		
II 期	34	30(88.2)		
肿瘤大小(cm)			1.223	0.269
<4	38	29(76.3)		
≥4	18	16(88.9)		
病理类型			0.827	0.363

续表 1 宫颈癌组织中 SALL4 的表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	n	SALL4 阳性 [n(%)]	χ^2	P
鳞癌	46	38(82.6)		
腺癌	10	7(70.0)		
分化程度			4.226	0.039
中、高分化	36	26(72.2)		
低分化	20	19(95.0)		
淋巴结转移			0.011	0.915
有	16	13(81.3)		
无	40	32(80.0)		

3 讨论

宫颈癌的发病机制尚未完全阐明,其在病因上是多因素、在病理上是多环节、在细胞生物方面是多信号途径、多基因参与的结果^[3]。癌基因和抑癌基因是肿瘤发生机制研究中的重大发现,SALL4 基因是 2002 年由 AL-Baradie 等研究 DRRS 综合征(duane radial ray syndrome, DRRS)家系遗传时发现的原

癌基因,由 4 个外显子和 16 个内含子组成。SALL4 基因编码的蛋白质属于 C2H2 型锌指转录子,定位于细胞核内^[4-5]。近年来研究发现,SALL4 基因是维持胚胎干细胞功能的重要调控基因,其通过 Pous1f1 调节胚胎干细胞和早期胚胎的发育,在维持胚胎干细胞的多能性和自我更新中具有重要作用^[6]。多项研究表明,SALL4 的表达与遗传性疾病、白血病及一些肿瘤疾病的发生发展有密切关系^[7-8]。

本研究通过 RT-PCR 检测 56 例宫颈癌和 35 正常宫颈组织中 SALL4 的表达,发现宫颈癌组织 SALL4 mRNA 表达高于正常宫颈组织($P < 0.01$),免疫组化结果在蛋白质水平上证实了这一点,宫颈癌组织中 SALL4 基因高表达,提示宫颈癌组织中可能含有表达 SALL4 的宫颈癌干细胞,肿瘤干细胞假说认为只有小部分肿瘤细胞可以产生肿瘤并维持肿瘤生长及异质性,是肿瘤发生、发展、转移和复发的根源^[9-10],作为胚胎干细胞的标志物,SALL4 在肿瘤组织中的高表达表明宫颈细胞的癌变过程可能与胚胎基因的激活密切相关,也有研究者认为这是干细胞致癌的一种证据^[11],SALL4 与宫颈癌的发生密切相关。本研究根据免疫组化结果进一步分析了宫颈癌组织中 SALL4 的表达与临床病理资料间的关系,发现 SALL4 的阳性表达与宫颈癌的分化状态相关,低分化阳性率高于中、高分化($P < 0.05$),但与宫颈癌患者的年龄、肿瘤大小、宫颈癌的病理类型、临床分期及有否淋巴结转移无关,说明 SALL4 不仅参与了宫颈癌的发生,还可能与宫颈癌的预后关系密切。

综上所述,胚胎干细胞的标志物 SALL4 在宫颈癌组织中表达增加,提示宫颈癌中可能存在肿瘤干细胞,宫颈癌的发生可能与肿瘤干细胞关系密切,进一步分析发现 SALL4 的阳性表达与宫颈癌的分化状态相关,表明 SALL4 可能在宫颈癌的发生发展过程中有重要作用。

参考文献:

- [1] Melton C, Judson RL, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2010, 463(7281): 621-626.
- [2] Iwasaki H, Suda T. Cancer stem cells and their niche[J].
- [3] Surbatovic M, Jovanovic K, Radakovic S, et al. Pathophysiological aspects of severe acute pancreatitis-associated lung injury[J]. *Srp Arh Celok Lek*, 2005, 133(1/2): 76-81.
- [4] Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases[J]. *Respir Physiol*, 2001, 128(1): 3-6.
- [5] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149(3 Pt 1): 818-824.
- [6] Milberg JA, Davis KP, Steinberg KP, et al. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993[J]. *JAMA*, 1995, 273(4): 306-309.
- [7] Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, et al. Identification of

Cancer Sci, 2009, 100(7): 1166-1172.

- [3] Naucler P, Ryd W, Tornberg S, et al. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 101(2): 88-99.
- [4] Al-Baradie R, Yamada K, St Hilaire C, et al. Duane radial ray syndrome(Okhiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family[J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(5): 1195-1199.
- [5] Yang J, Gao C, Chai L, et al. A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10766.
- [6] Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, et al. SALL4 is essential for Cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical stages in breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4): 933-939.
- [7] Liu A, Cheng L, Du J, et al. Diagnostic utility of novel stem cell markers SALL4, OCT4, NANOG, SOX2, UTF1 and TCL1 in primary mediastinal germ cell tumors[J]. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(5): 697-706.
- [8] Yang J, Chai L, Gao C, et al. SALL4 is a key regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells[J]. *Blood*, 2008, 112(3): 805-813.
- [9] Vlashi E, Kim K, Lagadec C, et al. In vivo imaging, tracking, and targeting of Cancer stem cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(5): 350-359.
- [10] Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? [J]. *Nat Med*, 2009, 15(9): 1010-1012.
- [11] Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, et al. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 361-370.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-11-22)

(上接第 284 页)

patients with acute lung injury: predictors of mortality[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152(6 Pt 1): 1818-1824.

- [4] acute pancreatitis to end-organ injury: mechanisms of acute lung injury[J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2007, 8(1): 107-120.
- [5] Phua J, Badia JR, Adhikari NK, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time: A systematic review[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(3): 220-227.
- [6] 李革, 申容硕, 姜惟龙, 等. 实验性胰腺炎大鼠血 ET 和 PGI2 水平的改变及川芎嗪治疗的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2000, 6(3): 186.
- [7] 李红红, 周晓, 杨荣源. 川芎嗪对急性胰腺炎患者血小板活化因子的影响[J]. *湖南中医药导报*, 2002, 8(11): 656.
- [8] 夏腊梅, 伍杰雄. 川芎嗪对心肌细胞核钙转运功能异常的保护[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2002, 7(2): 124.
- [9] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18): 1334-1349.

(收稿日期: 2013-10-09 修回日期: 2013-12-10)