

· 基础研究 ·

信号转导抑制因子-3 与磷酸化信号转导转录活化因子-3 在喉癌组织中的表达及与临床病理因素的关系

李 军, 李晓明, 路秀英, 邸 斌, 陶振峰, 宋 琦

(解放军白求恩国际和平医院耳鼻咽喉头颈外科全军耳鼻咽喉病中心, 河北 石家庄 050082)

摘要: 目的 研究细胞因子信号转导抑制因子-3 (suppressor of cytokine signaling-3, SOCS-3) 在喉鳞状细胞癌 (LSCC) 组织中的表达, 并进一步探讨 SOCS-3 与磷酸化信号转导转录活化因子-3 (phosphorylation signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3) 的相关性及与喉癌临床病理因素的关系。方法 收集 2005 年 2 月 ~ 2009 年 2 月在白求恩国际和平医院耳鼻咽喉头颈外科接受手术的 LSCC 石蜡标本 40 例, 并选取 11 例正常喉黏膜组织作为对照。采用免疫组化染色法检测 SOCS-3、p-STAT3 蛋白的表达情况。结果 ① LSCC 组织中 SOCS-3 蛋白表达明显低于正常喉黏膜组织, 两者之间差异具有统计学意义 ($P = 0.000$); p-STAT3 蛋白在正常喉黏膜组织中的表达小于喉癌组织 ($P = 0.000$); ② LSCC 组织中 SOCS-3 与 p-STAT3 蛋白之间存在显著负相关 ($r = -0.459$, $P = 0.003$); ③ SOCS-3 表达与患者年龄 ($P = 0.223$)、性别 ($P = 0.849$)、肿瘤 T 分级 ($P = 0.193$) 无相关性, 而与肿瘤病理分期 ($P = 0.000$), 淋巴结转移 ($P = 0.000$) 有关。结论 ① 在喉正常黏膜组织中 SOCS-3 均呈阳性表达, 而在 LSCC 组织中部分呈阳性表达; 并与 p-STAT3 蛋白的表达情况呈负相关。提示 SOCS-3 可能在喉癌生长的过程通过抑制 JAK/STAT3 信号转导通路的持续活化从而抑制喉癌细胞增长, 促进细胞凋亡; ② SOCS-3 的表达与患者年龄、性别、肿瘤 T 分级无相关性, 而与喉癌病理分期及颈部淋巴结转移有关。

关键词: 信号转导抑制因子-3; 喉癌, 鳞状细胞; 磷酸化信号转导转录活化因子-3; 相关性
中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2012)03-0165-05

Expression of SOCS-3 and p-STAT3 in laryngeal squamous cell carcinoma and the correlation with clinicopathological parameters

LI Jun, LI Xiao-ming, Lu Xiu-Ying, et al.

(Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC), and to study the correlation between the expression of SOCS-3 and signal transducer and activator of trans p-STAT3, and that between the expression of SOCS-3 with clinicopathological factors of LSCC. **Methods** Immunohistochemical staining (S-P method) was used for detecting the expression of SOCS-3, p-STAT3 in 40 specimens of surgically resected LSCC and 11 of paracancerous normal laryngeal tissue. **Results** ① The expression of SOCS-3 in LSCC was significantly lower than that in normal laryngeal tissue ($P = 0.000$). The expression of p-STAT3 in normal laryngeal tissues was significantly lower than that in LSCC ($P = 0.000$). ② Significant negative correlation was observed between the expression of SOCS-3 and that of p-STAT3 ($r = -0.459$, $P = 0.003$). ③ The expression of SOCS-3 was significantly related with the pathologic grading and lymphatic metastasis, but not with the age, gender, and clinical stage of the patients. **Conclusion** The SOCS-3 protein is omni-expressed in all normal laryngeal tissues, but less expressed in LSCC. The expression of SOCS-3 is negatively correlated to that of p-STAT3, which suggests that SOCS-3 plays an important role in inhibiting cell

proliferation and promoting cell apoptosis in LSCC. The expression of SOCS-3 protein is not related to patients' age, gender, T-stage and tumor position, but related to cell differentiation level and lymphatic metastasis.

Key words: Suppressor of cytokine signaling-3; Laryngeal neoplasm, Squamous cell; Phosphorylation signal transducer and activator of transcription-3; Correlation

细胞因子信号转导抑制因子-3 (suppressor of cytokine signaling-3, SOCS-3) 是 SOCS 家族中重要成员。SOCS 在调节细胞的生长、分化等方面发挥重要作用。SOCS 主要通过抑制 JAK/STAT 信号传导通路发挥生物学作用。目前研究表明 SOCS-3 的基因沉默或表达下调与多种肿瘤的发生密切相关。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2005 年 2 月 ~ 2009 年 2 月在白求恩国际和平医院耳鼻咽喉头颈外科接受手术治疗的喉鳞状细胞癌 LSCC 患者 40 例, 所有病例临床资料完整。其中男 37 例, 女 3 例; 年龄 36 ~ 80 岁, 平均年龄 58 岁。根据 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 喉癌分类方案进行临床分类: 声门上型 15 例, 声门型 25 例; 临床分期: I 期 7 例、II 期 12 例、III 期 17 例、IV 期 4 例; 病理学分级: 鳞癌 I 级 13 例, 鳞癌 II 级 14 例、鳞癌 III 级 13 例; 病理证实颈部淋巴结转移 11 例, 无转移 29 例。所有病例术前均未进行化、放疗。另选取经病理证实为正常黏膜组织 11 例作为对照。所有标本均离体后 2 h 内放入 10% 中性福尔马林中固定 24 h, 石蜡包埋, 常规病理 HE 染色, 请病理科医生确定病理性质和病理学分级。

1.2 免疫组化法

使用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶 (SP) 染色法测定喉癌组织及癌旁正常喉黏膜中 SOCS-3, 磷酸化信号转导转录活化因子-3 (phosphorylation signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3) 的表达。用 PBS 缓冲液代替一抗作为标本染色的阴性对照。光学显微镜下观察, 细胞中出现淡黄至棕褐色颗粒为阳性细胞, 细胞显色强度与背景无明显差别者为阴性细胞。蛋白表达阳性标准: 切片中有阳性细胞且阳性细胞数 > 10%。用彩色显微病理图像分析系统 (美国 IPP 分析软

件) 计量分析已做过的免疫组化染色的切片中 SOCS-3 和 p-STAT3 的相对含量, 将切片置于光学显微镜下成像, 高分辨摄像机 CCD 摄像, 经计算机图像处理测定阳性表达的积分光密度值 (integral optical density, IOD), 随机选择 5 个高倍镜视野计算其平均值, 作为该切片的代表值。IOD 用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。

1.3 统计学处理

所有数据经 Microsoft Excel 软件整理, 应用美国 SPSS15.0 统计软件进行分析。分别采用 χ^2 检验、t 检验、直线相关等统计学方法。以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SOCS-3、p-STAT3 在 LSCC 组织和正常喉黏膜组织的表达情况

40 例喉癌组织中 11 例 SOCS-3 蛋白呈阳性表达, 11 例癌旁正常黏膜组织中 SOCS-3 蛋白均呈阳性表达 (图 1A), 见表 1。通过 SP 染色法在高倍镜下可见 SOCS-3。阳性染色部位主要位于正常黏膜细胞核, 极少部分染色于喉癌细胞核和细胞浆, 大多呈弥漫性分布, 部分为局灶性, 少数呈散在分布 (图 1B)。

表 1 SOCS-3 的 IOD 值在两种组织中的比较

组别	例数	阳性例数 (%)	IOD ($\times 10^3$)
LSCC 黏膜	40	11 (27.50)	11.490 \pm 3.17*
正常喉黏膜	11	11 (100)	15.570 \pm 1.49

注: * $P = 0.00$

p-STAT3 蛋白在喉癌组织中有 34 例呈阳性表达, 主要位于细胞核内 (图 1C)。癌旁正常黏膜细胞中 p-STAT3 蛋白均为阴性表达, 见表 2。

表 2 p-STAT3 的 IOD 值在两种组织中的比较

组别	例数	阳性例数 (%)	IOD ($\times 10^3$)
LSCC 黏膜	40	34 (72)	12.698 \pm 2.67*
正常喉黏膜	11	0 (0)	8.077 \pm 1.51

注: * $P = 0.00$

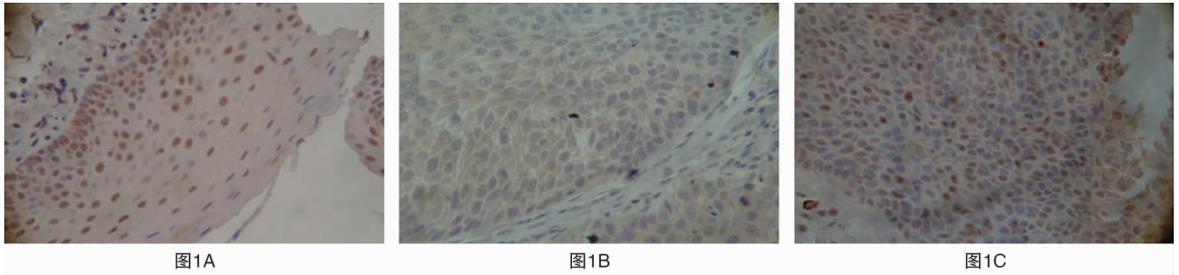


图1A 正常喉黏膜 SOCS-3 阳性表达 (SP × 400) 图1B 喉鳞状细胞癌 SOCS-3 阴性表达 (SP × 400) 图1C 喉鳞状细胞癌 p-STAT3 阳性表达 (SP × 400)

2.2 LSCC 组织中 SOCS-3 与 p-STAT3 之间的关系

直线相关分析得出 SOCS-3 和 p-STAT3 在 LSCC 组织中表达呈负相关 ($r = -0.459$, $P = 0.003$, 回归方程 $Y = 17.824 - 0.499X$)。

2.3 SOCS-3、p-STAT3 在 LSCC 组织中表达与临床因素的关系

SOCS-3 和 p-STAT3 的表达与患者年龄、性别及临床 T 分级等因素无关 ($P > 0.05$), 与喉癌的病理分期及有无颈部淋巴结转移密切相关, 在低分化鳞状细胞癌及颈部淋巴结转移病理阳性病例中 SOCS-3 的表达显著降低, 而 p-STAT3 的阳性表达显著增高 ($P < 0.01$), 见表 3, 4。

表 3 SOCS-3 与喉癌临床病理特征的关系

临床病理因素	例数	IOD(× 10 ³)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄				
≤60 岁	20	12.108 ± 3.15		
>60 岁	20	10.873 ± 3.15	-1.240	0.223
性别				
男	37	11.490 ± 3.17		
女	3	11.831 ± 1.42	-0.191	0.849
肿瘤病理分期				
G1、2	27	12.164 ± 3.16		
G3、4	13	9.920 ± 2.70	-4.007	0.000*
肿瘤 T 分级				
T1、2	19	12.182 ± 3.44		
T3、4	21	10.865 ± 2.84	-1.325	0.193
淋巴结转移				
有	11	9.193 ± 1.81		
无	29	12.362 ± 3.16	-3.953	0.000*

注: * $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义

表 4 p-STAT3 与喉癌临床病理特征的关系

临床病理因素	例数	IOD(× 10 ³)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄				
≤60 岁	20	12.441 ± 3.11		
>60 岁	20	12.754 ± 2.59	0.345	0.732
性别				
男	37	12.801 ± 2.79		
女	3	10.098 ± 2.33	1.623	0.113

续上表

临床病理因素	例数	IOD($\times 10^3$)	<i>t</i>	<i>P</i>
肿瘤病理分期				
G1、2	27	11.488 \pm 2.68	-4.301	0.000*
G3、4	13	14.903 \pm 1.39		
肿瘤 T 分级				
T1、2	19	12.173 \pm 3.157	-0.901	0.373
T3、4	21	12.982 \pm 2.51		
淋巴结转移				
有	11	14.937 \pm 1.65	3.707	0.001*
无	29	11.710 \pm 2.68		

注: * $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义

3 讨论

JAK/STAT3 信号转导通路是信号转导中的重要因子之一。已证实 JAK/STAT 信号转导通路的持续激活与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关。王俊阁^[1]及罗惠秀^[2]各自的研究表明 JAK/STAT 信号转导通路中 STAT3、p-STAT3 蛋白的过度表达与喉鳞状细胞癌及鼻-鼻窦鳞癌的发生、发展有关。

当细胞因子和(或)生长激素结合到细胞膜受体上,活化 JAK 蛋白,激活的 JAK 使受体内段的酪氨酸发生磷酸化,募集含有 SH2 结构域的 STAT3 转录因子,并使之磷酸化后而活化成为 p-STAT3, p-STAT3 形成二聚体,并转入细胞核内,诱导其他下游靶基因的转录^[3,4]。JAK/STAT 通路在发挥其信号转导作用的同时也启动了该途径的负反馈抑制环路。从而使 JAK/STAT 通路的活动得到平衡与控制^[5]。SOCS 家族是 JAK/STAT3 信号转导通路的主要负反馈抑制蛋白家族,通过抑制 JAK/STAT 信号传导在调节细胞的生长、分化等方面发挥重要作用。并且 SOCS 家族恶性肿瘤疾病进程中的作用已引起人们的关注。

SOCS-3 是 SOCS 家族中的重要成员。目前研究表明 SOCS-3 的缺失与人体多种肿瘤的形成有关。He 等^[6]在人肺癌中研究表明 SOCS-3 蛋白在肺癌细胞中表达缺失。Ying 等^[7]证实 SOCS-3 的低表达与肺癌复发关系密切。Weber 等^[8]报道 94 例头颈鳞状细胞癌中仅有 10 例 SOCS-3 蛋白表达呈阳性。进一步使用野生型

SOCS-3 构建的内核糖体进入位点,转染 CAL-27 细胞后发现转染后细胞数量有了显著降低。Cui 等^[9]发现在肝癌细胞中通过溶瘤细胞腺病毒转入的 SOCS-3 可以抑制 STAT3 的磷酸化,并导致肿瘤细胞死亡。而 Bellezza 等^[10]研究发现 SOCS-3 表达于前列腺癌组织,但不表达或弱表达于前列腺良性病变,特异性 siRNA 下调 SOCS-3 表达后可以抑制肿瘤细胞增殖并增加凋亡率。Evans 等^[11]也发现其表达于乳腺癌和前列腺癌细胞系。现有的研究表明,SOCS-3 蛋白在不同类型的恶性肿瘤中表达存在差异,在不同肿瘤发生发展过程中所起的作用并不完全相同。

笔者用免疫组化的方法检测喉癌和正常喉黏膜组织中 SOCS-3 蛋白的表达情况,发现在正常喉黏膜组织中全部呈阳性表达,而在喉鳞状细胞癌中 SOCS-3 蛋白的表达显著下降。这与 Biao 等^[6]在人肺癌及 Weber 等^[8]在头颈鳞状细胞癌中所报道一致。

与王俊阁^[1]的研究相同,本实验也证实了 p-STAT3 蛋白在喉癌组中表达显著高于癌旁正常黏膜组。并且与 SOCS-3 的表达具有显著负相关($r = -0.459$, $P = 0.003$)。

对 40 例 LSCC 患者中病理学分级的对比研究发现 G1、2 期喉癌组织中 SOCS-3 蛋白表达高于 G3、4 期,两者比较差异具有显著统计学意义($P = 0.000$);表明随着喉癌细胞分化程度的降低,病理学恶性度的增加,SOCS-3 蛋白的表达显著下调。这提示笔者 SOCS-3 蛋白表达的缺失与 LSCC 肿瘤细胞的分化有关,但还需要对涉及的信号转导通路进一步研究。

本实验研究也显示在 LSCC 中淋巴结转移阴性组与淋巴结转移阳性组中 SOCS-3 蛋白的表达差异具有统计学意义 ($P = 0.000$), 淋巴结转移阳性组 SOCS-3 蛋白表达显著小于无淋巴结转移组。表明 SOCS-3 的失活会导致肿瘤细胞的迁移和侵袭, 引起淋巴结转移。

通过笔者研究可以证实 SOCS-3 蛋白是 JAK/STAT 信号转导通路的重要调控因子。SOCS-3 蛋白的表达缺失在 LSCC 的发生、发展以及浸润转移中起着一定的作用。因此, 笔者认为 SOCS-3 蛋白的失表达与喉癌的发生有关, 并且可能在喉癌的淋巴结转移中发挥重要作用。

参考文献:

[1] 王俊阁, 李晓明, 陈英会, 等. 信号转导和转录激活因子 3 在喉癌组织的表达及临床意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 21(3): 113 - 115.

[2] 罗惠秀, 孙洁, 薛卫国, 等. STAT3 在鼻-鼻窦鳞癌组织的表达及意义 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2009, 15(6): 419 - 422.

[3] Darnell JE, Jr., Kerr IM, and Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. Science, 1994, 264(5164): 1415 - 1421.

[4] Ihle JN. Janus kinases in cytokine signalling [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996, 351(1336): 159 - 166.

[5] Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling [J]. Nature, 1997, 387(6636): 917 - 921.

[6] He B, You L, Uematsu K, et al. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(24): 14133 - 14138.

[7] Ying M, Li D, Yang L, et al. Loss of SOCS3 expression is associated with an increased risk of recurrent disease in breast carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(10): 1617 - 1626.

[8] Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, et al. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition [J]. Oncogene, 2005, 24(44): 6699 - 6708.

[9] Cui Q, Jiang W, Wang Y, et al. Transfer of suppressor of cytokine signaling 3 by an oncolytic adenovirus induces potential antitumor activities in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2008, 47(1): 1005 - 1012.

[10] Bellezza I, Neuwirt H, Nemes C, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 antagonizes cAMP effects on proliferation and apoptosis and is expressed in human prostate cancer [J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 2199 - 21208.

[11] Evans MK, Yu CR, Lohani A, et al. Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals [J]. Oncogene, 2007, 26(13): 1941 - 1948.

(修回日期: 2012-03-15)

· 消息 ·

2012 年系列学术会议通知

中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院、中山大学耳鼻咽喉科学研究所拟于 2012 年 8 月份召开系列学术会议, 会议将邀请多位国内外知名专家授课, 并安排有手术和解剖演示。欢迎全国同道参加!

《临床听力学理论与实践讲坛》时间: 2012 年 8 月 3 ~ 5 日, 地点: 佛山市保利洲际酒店。

《耳科颞骨解剖学习班》限招 16 人, 时间: 2012 年 8 月 7 ~ 9 日, 地点: 中山大学附属第一医院 3 号楼。注册费: 2000 元/人, 伙食费: 130 元/天/人, 交通费自理。

《耳科新进展及颞骨解剖学习班》注册后可继续参加接下的两个会议:

《喉手术演示: 颈部、颈面颅底解剖演示》时间: 2012 年 8 月 9 ~ 10 日; 地点: 中山大学附属第一医院门诊楼 17 楼学术厅; 注册费(含以下学术论坛的注册费): 800 元/人; 伙食费: 130 元/天/人, 交通费自理。

《2012 中山耳鼻咽喉科学学术论坛》时间: 2012 年 8 月 10 ~ 12 日; 地点: 广州市先烈南路华泰宾馆五楼。

会议联系人: 张伟红; 秘书处地址: 广州市中山二路 58 号中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院; 电话: (020) 87332200 - 8484, 87333733; 邮编: 510080; 传真: (020) 87333733; 电子邮件: zsuenth@yahoo.com.cn。