

干细胞标志物 Oct-4 Sox-2 表达与结肠癌术后复发转移的关系*

李 宁^① 张 力^② 陈小兵^① 马怡晖^③ 罗素霞^① 邓文英^①

摘要 目的:探讨结肠癌组织中 Oct-4、Sox-2 表达情况及其对术后复发转移的预测作用。**方法:**采用免疫组织化学方法检测手术切除的 80 例结肠癌术后标本中 Oct-4、Sox-2 表达情况,并且对两指标的表达同肿瘤分化程度、分期和术后复发转移关系进行分析。采用 RT-PCR 检测 20 例冰冻肿瘤组织及癌旁组织中 Sox-2、Oct-4 表达情况。**结果:**80 例患者中 35 例出现复发转移, Sox-2、Oct-4 在转移组中表达率分别为 48.57% (17/35)、51.43% (18/35),在非转移组中表达率分别为 17.78% (8/45)、13.33% (6/45),差异有统计学意义 ($P=0.001$)。原发病灶分化程度、T 分期和 N 分期同 Oct-4 和 Sox-2 表达无显著性差异。均为阳性表达者其转移发生率高,生存分析显示不同表达状态转移出现时间差异有统计学意义 ($P=0.001$)。RT-PCR 分析显示 20 例肿瘤组织中 Sox-2、Oct-4 阳性表达率分别为 40% (8/20)、45% (9/20),明显高于癌旁正常组织 5% (1/20)。**结论:**肿瘤组织中 Sox-2、Oct-4 表达同结肠癌术后转移相关,两者联合检测有助于评估结肠癌术后复发转移的可能。

关键词 结肠癌 Oct-4 Sox-2 转移 复发

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.09.022

Relationship of Oct-4 and Sox-2 Expression in Colon Carcinoma with Recurrence and Metastasis

Ning LI¹, Li ZHANG², Xiaobing CHEN¹, Yihui MA³, Suxia LUO¹, Wenying DENG¹

Correspondence to: Suxia LUO, E-mail: lining97@126.com

¹Department of Medical Oncology, He'nan Tumor Hospital, Zhengzhou 450000, China

²Department of Medical Oncology, Sun Yat-sen University Center for Cancer Prevention and Therapy, Guangzhou 510000, China

³Department of Pathology, The First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

This work was supported by funds from the Key Project of Henan Provincial Health Department (No.2011020171)

Abstract Objective: The current work aims to investigate the expression of Sox-2 and Oct-4 in colon carcinoma and its relationship with relapse and metastasis. **Methods:** The expression of Oct-4 and Sox-2 was detected in 80 cases of colon cancer tissue by immunohistochemical assay. The correlation of the Oct-4 and Sox-2 expression with histological differentiation, T stage, N stage, and metastasis was analyzed. The level of Oct-4 and Sox-2 expression in the cancer and normal paraneoplastic tissues was evaluated using RT-PCR. **Results:** Metastasis was observed in 35 of all the 80 cases studied. The positive rate of Sox-2 and Oct-4 in the metastasis group was 48.57% (17/35) and 51.43% (18/35), respectively, whereas it was 17.78% (8/45) and 13.33% (6/45) in the non-metastasis group. Significant differences were observed between the two groups ($P = 0.001$). The expression of Oct-4 and Sox-2 was not associated with differentiation, T stage, or N stage of the tumor. The group with positive expression of Oct-4 and Sox-2 showed high metastatic rate. The survival analysis showed that the time of metastasis was significantly different in the groups with various expressions ($P = 0.001$). The positive expression rate of Sox-2 and Oct-4 detected by RT-PCR in colonic carcinoma tissues was 40% (8/20) and 45% (9/20) respectively, higher than that in normal tissues. **Conclusion:** The expression of Sox-2 and Oct-4 in tumor tissue can predict postoperative relapse and metastasis of colon carcinoma.

Keywords Colon carcinoma; Oct-4; Sox-2; Metastasis; Recurrence

近几年来,世界范围内结肠癌的发病率和死亡率逐年上升,虽然针对肿瘤的治疗手段有了许多新进展,但多数肿瘤患者仍无法获得根治,易复发转移。目前飞速发展的肿瘤干细胞理论为肿瘤的治疗带来新希望。该理论认为肿瘤组织中存在有干细胞

特性的细胞,因其具有增殖和更新能力,成为复发转移的根源。通过寻找特异性的干细胞表面标志物,分选肿瘤干细胞,是进一步治愈恶性肿瘤的关键。

1989年就有学者在小鼠成体的各种组织及不同发育阶段的胚胎中检测到一系列因子,并命名为

作者单位:①河南省肿瘤医院内科三区(郑州市 450000);②中山大学附属肿瘤防治中心内科;③郑州大学第一附属医院病理科

*本文课题受河南省卫生厅项目(编号:2011020171)资助

通信作者:罗素霞 lining97@126.com

Oct-4^[1]。该基因定位于人类染色体 6p21.3, 其编码的蛋白是 POU 转录因子家族成员之一。Oct-4 是全能干细胞标记物, 参与胚胎发育过程中多向性分化的调节^[2]。胚胎干细胞另一个重要的转录因子, Sox-2 在维持胚胎干细胞干性方面也发挥重要的作用。目前还有一些研究发现 Sox-2 在低分化的肿瘤细胞中高表达^[3]。但是, 在结肠癌组织中 Oct-4、Sox-2 表达情况同结肠癌术后的复发转移关系目前尚不清楚。

因此, 本研究旨在分析结肠癌组织中 Oct-4、Sox-2 基因的表达情况, 探讨干细胞标志物表达情况同结肠癌术后复发转移的关系, 为结肠癌干细胞研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究资料

随机选取 2008 年 1 月至 2008 年 12 月间在河南省肿瘤医院确诊的 III 期结肠癌根治术后患者 80 例, 其中 20 例患者保存新鲜冰冻肿瘤组织。男性 38 例, 女性 42 例; >60 岁患者 21 例, ≤60 岁 59 例, 中位年龄 52 岁。术前未行全身化疗, 术前检查及术中探查均未发现远处转移。术后分期: III A 期 33 例、III B 期 18 例、III C 期 29 例。术后行辅助 FOLFOX6 方案化疗 10~12 个周期, 中位化疗周期数为 10.5 个周期。患者治疗结束后每 3 个月复查血清 CEA (清晨空腹抽血), 胸、腹部 CT 等。CT 提示肺、肝、吻合口或局部淋巴结转移时, 可再行局部穿刺、MRI、PET-CT 等检查证实, 以 CT 检查时间或病理证实时间为复发转移发生时间。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 合成 剪取约 100 mg 肿瘤组织及癌旁正常组织分别放入 1 mL PBS 中, 使用组织研磨器形成细胞悬液, 过滤离心后取沉淀, 加入一定量 Trizol (Invitrogen 公司), 按常规提取总 RNA, 采用核酸蛋白检测仪检测总 RNA 浓度及纯度, 样品的 A_{260}/A_{280} 须在 1.7~2.0 之间。采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 使用逆转录系统试剂盒获取 cDNA。

1.2.2 引物设计 用 Primer 5.0 引物设计软件, 跨外显子设计 Sox-2 与 Oct-4 基因上下游引物^[4-5](表 1)。

1.2.3 RT-PCR 反应体系为 25 μ L, 分别含 cDNA 模板 2 μ L, 上下游引物 (10 pmol/ μ L) 各 0.5 μ L, DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 10 μ L 扩增产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪紫外透射观察结果。

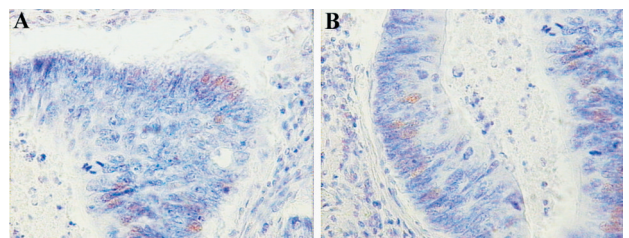
表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列	产物长度/bp
Oct-4	上游 5'-AGGAGTCGGGGTGGAGAGC-3'	267
	下游 5'-TCAAAGCGGCAGATGGTTCG-3'	
Sox-2	上游 5'-TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA-3'	75
	下游 5'-CTGGGGCTCAAACCTTCTCTC-3'	
β -actin	上游 5'-CCAGAGCAAGAGAGGCATCC-3'	437
	下游 5'-CCGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3'	

1.2.4 免疫组织化学染色 采用 S-P 免疫组化方法, 严格按照试剂盒说明书检测 Oct-4、Sox-2 (一抗: Santa Cruz 公司) 在肿瘤组织中的表达。

免疫组化评价标准: 由有经验的病理科医师单盲阅片, 在 10 \times 40 倍显微镜下观察记数, 每张切片随机选择 5 个视野, 每个视野记数 200 个细胞。Sox-2、Oct-4 抗原阳性反应为位于细胞核内的棕黄色颗粒, 阳性表达程度判断: 阳性细胞数 \geq 10% 为阳性表达, <10% 为阴性表达 (图 1)。



A: Oct-4 阳性; B: Sox-2 阳性

图 1 Oct-4、Sox-2 在结肠癌组织中表达 (S-P \times 400)

Figure 1 Expression of Oct-4 and Sox-2 in colon cancer

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件包进行数据整理和统计分析。比较 Oct-4、Sox-2 蛋白表达水平与转移关系时采用 χ^2 检验; 比较表达情况对远处转移出现时间影响时采用 Kaplan-Meier 生存分析法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 可评价患者临床特征

所有患者均可评价 Sox-2、Oct-4 染色情况。随访率 100%, 中位随访时间 2.5 年。以复发转移是否发生将患者分为转移组和非转移组。共有 35 例 (43.75%) 患者确诊复发转移, 其中 10 例局部吻合口复发, 11 例为单个脏器转移, 14 例为多发脏器转移。

2.2 Sox-2 在结肠癌组织中表达情况

在转移组中 17 例 (48.57%) Sox-2 阳性表达, 而非转移组中 8 例 (17.78%) 阳性表达, 两组差异有统计学意义 (P=0.001)。同时, 虽然原发病灶不同分化程度、不同 T 分期和 N 分期中 Sox-2 表达存在差异, 但

差异无统计学意义(表2)。

表2 组织中 Sox-2、Oct-4 表达同临床特征间关系

Table 2 Relationship of Sox-2 and Oct-4 expression with clinical characteristics

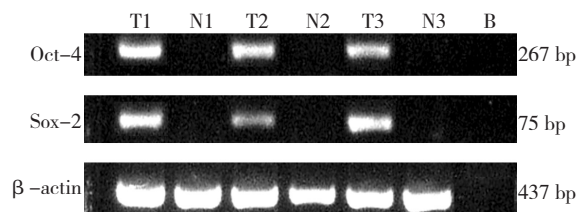
临床特征	例数	Sox-2 表达		Oct-4 表达	
		例数	P	例数	P
分化程度					
高/中分化型	33	12	0.408	7	0.151
低/未分化型	47	13		17	
T分期					
T1/T2	43	13	0.832	14	0.592
T3/T4	37	12		10	
阳性淋巴结数/枚					
<4	41	16	0.124	16	0.071
≥4	39	9		8	
转移					
有	35	17	0.001	18	0.001
无	45	8		6	

2.3 Oct-4在结肠癌组织中表达情况

在转移组中18例(51.43%)患者Oct-4阳性表达,而非转移组中6例(13.33%)患者阳性表达,两组差异有统计学意义($P=0.001$)。同时,虽然原发病灶不同分化程度、不同T分期和N分期中Oct-4表达存在差异,但差异无统计学意义(表2)。

2.4 Sox-2、Oct-4在新鲜冰冻组织中表达

采用RT-PCR方法检测结肠癌及癌旁组织,发现癌组织中有8例患者检测出Sox-2表达,9例患者检测出Oct-4表达,阳性表达率分别为40%、45%,其中4例患者均表达Sox-2和Oct-4阳性。癌旁组织中各有1例患者检测出阳性表达,Sox-2和Oct-4阳性表达率为5%(图2)。



T:肿瘤组织;N:癌旁组织;B:空白对照

图2 RT-PCR检测Oct-4、Sox-2在结肠癌组织及癌旁组织中的表达

Figure 2 Expression of Oct-4 and Sox-2 in colon cancer and normal paraneoplastic tissues

2.5 Sox-2、Oct-4表达同术后转移关系

入组80例结肠癌患者,Oct-4及Sox-2均为阳性表达的患者为10例,其中发生远处转移为8例,任一

指标为阳性表达为29例,远处转移19例,均为阴性表达为41例,其中远处转移1例。不同表达状态同远处转移差异有统计学意义($P=0.001$)。Oct-4及Sox-2均阳性表达者转移发生率明显高于均阴性表达者(图3)。

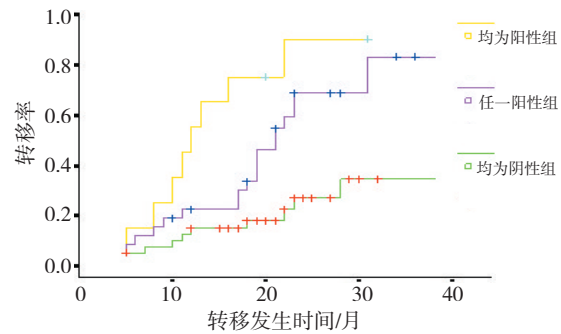


图3 Oct-4、Sox-2阳性表达和阴性表达患者转移出现时间比较(以转移为截点)

Figure 3 Comparison of metastasis between patients with Oct-4 and Sox-2 expression and those without Oct-4 and Sox-2 expression ($P=0.001$) (metastasis was censored)

3 讨论

目前,胚胎发育及维系胚胎干细胞特性的相关基因研究取得较大进展,Oct-4、Sox-2基因的发现和深入研究为干细胞理论的发展作出了巨大贡献。作为干细胞标志物之一的Oct-4不仅调控正常细胞分化,而且在一些上皮性恶性肿瘤如口腔癌、膀胱癌、胰腺癌中呈高表达。其表达水平同上皮性恶性肿瘤的发生、转移、复发、耐药及预后密切相关,阳性表达者进展快、易于转移复发,治疗效果差^[6-8]。干细胞标志物的另一个指标Sox-2在器官发生及胚胎发育成其他组织时也发挥重要作用,并且在多种恶性肿瘤中如胃癌^[9]、前列腺癌^[10]组织中检测到Sox-2高表达。这些高表达均与肿瘤的高侵袭性、高复发转移率相关。

两种转录因子并不是孤立的发挥作用,二者之间相互影响,相互作用。Sox-2可以同Oct-4结合为异二聚体,调节某些基因如Nanog、Utf1、Fbx15等的转录^[11-12]。如果选择性的下调其中任一因子表达将导致胚胎干细胞分化,失去多能干细胞的特性,而过表达Oct-4和Sox-2的成体细胞能够恢复多能干细胞的特性^[13]。在冰冻乳腺癌标本中,虽然研究例数不是很多(18例),但是Sox-2高表达的患者同样有Oct-4的高表达^[14]。在使用siRNA沉默Sox-2基因后有多种干细胞转录因子及潜在多能性标记物表达下调,包括Wnt传导通路也会表达下调^[15]。因此,Sox-2和Oct-4表达对肿瘤细胞的生长、增殖具有重要的

意义。

本研究中,80例结肠癌有25例出现 Sox-2 蛋白阳性表达,24例 Oct-4 阳性表达,其阳性表达细胞多呈点状聚集,少有灶状聚集,说明即使 Sox-2、Oct-4 阳性表达,也只是少部分细胞表达,与肿瘤干细胞只占肿瘤组织的很少一部分理论是吻合的。对20例新鲜组织标本的分析发现,检测 Sox-2、Oct-4 的 mRNA 均发现肿瘤组织的表达要明显高于癌旁组织,由于例数所限,无法分析其和远处转移发生的关系。但是也应看到仍有很少部分的癌旁正常组织表达 Sox-2、Oct-4,提示正常细胞发生恶性转变的可能。同样证实肿瘤可能来源于成体干细胞恶性转变的假说。对肿瘤组织两指标的联合检测发现,均为阳性表达的患者转移发生时间最早,明显高于均为阴性患者。两项指标的高表达属于不良预后因素,提示肿瘤复发转移的风险较高。两者联合检测对于预测结肠癌患者术后复发转移风险具有一定的临床应用价值。

肿瘤的发生发展、复发转移是非常复杂的过程,众多基因、蛋白、信号传导通路参与其中。目前,随着肿瘤干细胞理论不断的完善和发展,虽然仍然缺乏高特异性的生物学标记,但是利用干细胞理论,靶向治疗肿瘤干细胞的研究已经处于基础实验阶段。因此,以干细胞理论为基础,解决肿瘤复发、转移将成为可能。

参考文献

- 1 张楠,连鹏,时永香,等.Oct-4/Sox-2 协同调控下游基因表达的分子机制[J].生物物理学报,2007,23(6):420-426.
- 2 王海威,王家东.Oct-4 蛋白在甲状腺肿瘤中的表达及意义[J].J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg(China), 2010, 24(15):682-685.
- 3 Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors[J]. Nat Genet, 2008, 40(5): 499-507.
- 4 曹婧,樊青霞,索振河,靛玉红对膀胱癌 ScaBer 细胞株增殖的影响及机制[J].山东医药,2008,48(14):61-62.
- 5 曹浩哲,冀静,郑鹏生.Oct4 基因在宫颈癌中的表达及其意义[J].西安交通大学学报(医学版),2010,31(1):17-21.
- 6 宋娟,严宁,张汉东,等.口腔鳞癌组织中干细胞转录因子 Oct-4 的表达及意义[J].临床口腔医学杂志,2010,26(7):390-393.
- 7 侯轶,赵晓昆,蒋宏毅,等.膀胱移行细胞癌组织中 PSCA 和 Oct-4 表达及其意义[J].实用肿瘤杂志,2010,25(5):531-533.
- 8 Attasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, et al. Oct-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer[J]. Int J Cancer, 2007, 120(7): 1598-1602.
- 9 Li XL, Eishi YB, Bai YQ, et al. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma[J]. Int J Oncol, 2004, 24(2): 257-263.

- 10 Sattler HP, Lensch R, Rohde V, et al. Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer[J]. Prostate, 2000, 45(3): 207-215.
- 11 Jung M, Peterson H, Chavez L, et al. A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells[J]. PloS One, 2010, 5(5): e10709.
- 12 Yamaguchi S, Kurimoto K, Yabuta Y, et al. Conditional knock-down of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells[J]. Development, 2009, 136(23): 4011-4020.
- 13 Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. Nature, 2008, 451(7175): 141-146.
- 14 Lengerke C, Fehm T, Kurth R, et al. Expression of the embryonic stem cell marker SOX-2 in early-stage breast carcinoma[J]. BMC cancer, 2011, 11: 42.
- 15 Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cell[J]. Stem Cells, 2008, 26(8): 1931-1938.

(2011-10-15 收稿)

(2011-12-20 修回)

(本文编辑:贾树明)