

## SOX2 在口腔鳞癌中的表达及其与 EMT 的相关性

徐飞 王珊 孟琰 施磊 强冬霞 赵尔杨\*

(哈尔滨医科大学第一临床医学院·口腔医学院口腔病理科 黑龙江 哈尔滨 150001)

**[摘要]** **目的:**探讨 SOX2 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达水平及其与 E-cad 和 Vim 的相互关系。**方法:**采用免疫组化 SP 法检测 50 例 OSCC 与 13 例正常口腔上皮中 SOX2、E-cad 和 Vim 的表达信号。采用 SPSS19.0 软件包进行计数资料方差分析和 spearman 等级相关分析。**结果:**在正常口腔上皮中,SOX2 不表达;在 OSCC 中,SOX2 的表达随着组织分型的降低而升高( $P < 0.05$ )。在正常口腔上皮中,E-cad 强阳性表达;在 OSCC 中,E-cad 的表达随着组织分型的降低而降低( $P < 0.05$ )。在正常口腔上皮中 Vim 不表达;在 OSCC 中,Vim 的表达随着组织分型的降低而升高( $P < 0.05$ )。在 OSCC 中,SOX2 和 E-cad 的表达呈负性相关( $P < 0.05$ );SOX2 和 Vim 的表达呈正性相关( $P < 0.05$ );E-cad 和 Vim 的表达呈负性相关( $P < 0.05$ )。**结论:**SOX2 表达水平与 OSCC 的分化程度密切相关,同时与上皮间充质转化标记物 E-cad 和 Vim 分别存在负性与正性相关。

**[关键词]** SOX2 上皮间充质转化 鳞状细胞癌

**[中图分类号]** R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2017)11—1209—04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.11.019

**Expression of SOX2 in OSCC and Its Correlation with EMT.** XU Fei, WANG Shan, MENG Yan, SHI Lei, QIANG Dong-xia, ZHAO Er-yang\*. *Department of Oral Pathology, College of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China.*

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of SOX2 in OSCC and to evaluate its relationship with the expression of E-cad and Vim. **Methods:** The expressions of SOX2, E-cad, and Vim in 50 patients with oral squamous cell carcinoma and 13 specimens of oral pericancerous epithelium were detected by immunohistochemical staining method. Statistical analysis was performed with SPSS 19.0 software package. **Results:** The expression of SOX2 in oral epithelium was negative and the expression of SOX2 increased with the decrease of tissue type in OSCC ( $P < 0.05$ ). The expression of E-cad in oral epithelium was positive and the expression of E-cad decreased with the decrease of tissue type in OSCC ( $P < 0.05$ ). The expression of Vim in oral epithelium was negative and the expression of Vim increased with the decrease of tissue type in OSCC ( $P < 0.05$ ). In OSCC, the expressions of SOX2 and E-cad were negatively correlated ( $P < 0.05$ ), the expressions of SOX2 and Vim were positively correlated ( $P < 0.05$ ), and the expressions of E-cad and Vim were negatively correlated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Various expressions of SOX2 were found in different histological grade while the expression enhanced with the degrading of the differentiation degree, and there were negative correlations between SOX2 and epithelial mesenchymal transformation marker E-cad, and positive correlations between SOX2 and the marker Vim.

**[Key words]** SOX2 Epithelial-mesenchymal transition Squamous cell carcinoma

口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,五年生存率仅约为 50%,主要原因是 OSCC 早期易出现浸润及转移<sup>[1]</sup>。最近许多研究发现,上皮间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)和肿瘤干细胞(Cancer stem-like cells, CSCs)在肿

瘤的浸润转移中起重要作用。EMT 的主要特征是上皮细胞失去上皮特性,转而获得间质细胞特性,使细胞获得更强的浸润和转移能力。CSCs 通过不均一分裂,使肿瘤不断分化,促进其增殖和浸润能力。

有研究证实 CSCs 标记物 SOX2 和 EMT 现象与 OSCC 的浸润相关,但是 SOX2 和 EMT 之间的相互关系在 OSCC 中研究较少。因此本实验采用免疫组织化学技术检测 OSCC 中 SOX2 和上皮标记物 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)与间质标

**作者简介** 徐飞(1987~),男,哈尔滨人,硕士,医师,主要从事口腔病理学研究工作。

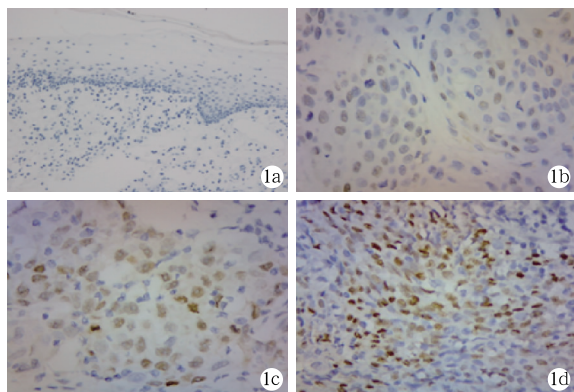
\* 通讯作者 赵尔杨,电话:0451—85553979

记物波形蛋白(Vimentin, Vim)的表达情况,并探讨三者之间的相关性。

## 1 材料与方法

1.1 临床病理资料 收集哈尔滨医科大学口腔医学院 2010~2012 年诊断为 OSCC 的典型病例 50 例,选取 13 例正常口腔上皮作为对照组。患者年龄 44~88 岁,中位年龄 66 岁。WHO 的 OSCC 组织分型:高分化鳞癌 21 例,中分化鳞癌 16 例,低分化鳞癌 13 例。所有患者术前均未接受任何治疗。所有标本获取前均获得患者知情同意,并通过医院伦理委员会批准。HE 染色后,经 2 名病理科医生复片,选择 OSCC 病理特征典型的组织块,切取 4  $\mu\text{m}$  白片备用。

1.2 主要试剂与检测方法 兔抗人 SOX2 单克隆抗体,产品编号:ZA-0571,形式:即用型,二抗为羊抗兔试剂盒;鼠抗人 E-cad 单克隆抗体,产品编号:ZM-0092,形式:即用型,二抗为羊抗鼠试剂盒;鼠抗人 Vim 单克隆抗体,产品编号:ZM-0260,形式:即用型,二抗为羊抗鼠试剂盒;SP 免疫组织化学试剂盒及所有试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验采用 SP 法对标本进行免疫组织化学染色,实验步骤按说明书进行,EDTA 缓冲液微波高温抗原修复,DAB 显色,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。用 PBS 取代一抗做阴性对照。



1a: SOX2 在口腔上皮中阴性表达(SP,  $\times 100$ ); 1b: SOX2 在高分化鳞癌中阳性表达(SP,  $\times 400$ ); 1c: SOX2 在中分化鳞癌中阳性表达(SP,  $\times 400$ ); 1d: SOX2 在低分化鳞癌中阳性表达(SP,  $\times 400$ )

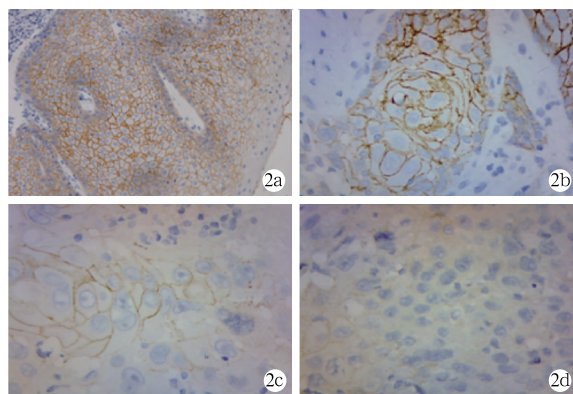
图 1 SOX2 在口腔上皮及 OSCC 中的表达

Fig. 1 The expression of SOX2 in oral epithelium and OSCC.

1.3 结果判定和分析 以试剂公司提供的阳性对照片为阳性标准,光学显微镜检查显色反应。采用半定量分析法判定染色阴性阳性,在光学显微镜下,每个标本随机选择 5 个高倍视野( $\times 400$ ),记录每个视野中阳性细胞数的百分比和染色强弱后取平均数。阳性细胞数比例评分标准:0 分为阳性细胞数

$< 5\%$ ; 1 分为阳性细胞数占  $5\% \sim 25\%$ ; 2 分为阳性细胞数  $25\% \sim 50\%$ ; 3 分为阳性细胞数  $50\% \sim 75\%$ ; 4 分为阳性细胞数大于  $75\%$ 。染色强度评分标准:0 分为无染色;1 分为染色弱;2 分为中等强度染色;3 分为强染色。总评分为阳性细胞数比例评分与染色强度评分的乘积,乘积所得大于 3 为阳性。

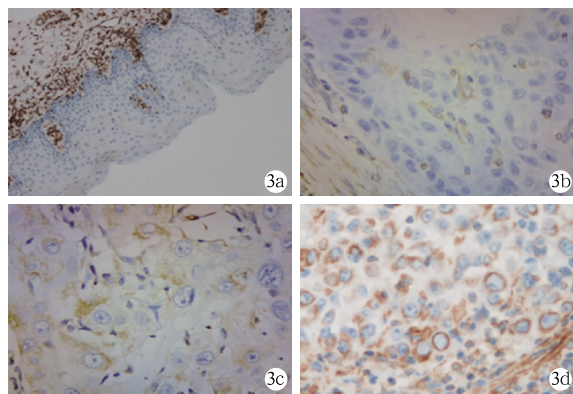
1.4 统计学处理 使用 SPSS19.0 软件包进行数据分析,计数资料采用方差分析和 spearman 等级相关分析, $P < 0.05$  为差异具有意义。



2a: E-cad 在口腔上皮表达强阳性(SP,  $\times 100$ ); 2b: E-cad 在高分化鳞癌中表达阳性(SP,  $\times 400$ ); 2c: E-cad 在中分化鳞癌中表达阳性(SP,  $\times 400$ ); 2d: E-cad 在低分化鳞癌中表达阳性(SP,  $\times 400$ )

图 2 E-cad 在口腔上皮及 OSCC 中的表达

Fig. 2 The expression of E-cad in oral epithelium and OSCC.



3a: Vim 在口腔上皮表达阴性(SP,  $\times 100$ ); 3b: Vim 在高分化鳞癌中表达阳性(SP,  $\times 400$ ); 3c: Vim 在中分化鳞癌中表达阳性(SP,  $\times 400$ ); 3d: Vim 在低分化鳞癌中表达阳性(SP,  $\times 400$ )

图 3 Vim 在口腔上皮及 OSCC 中的表达

Fig. 3 The expression of Vim in oral epithelium and OSCC.

## 2 结果

2.1 SOX2 在 OSCC 及正常口腔上皮中的表达 SOX2 在口腔上皮中几乎不表达(图 1a)。在高分化鳞癌中,阳性表达略高于口腔上皮,可见 SOX2 着色于细胞核上(图 1b);在中分化鳞癌中,信号主要分布于细胞核上,偶尔见于细胞浆上(图 1c);在低分

化鳞癌中,以强阳性表达为主,信号主要分布于细胞核上,偶尔见于细胞浆上(图 1d)。SOX2 表达水平呈增强趋势,其表达差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 E-cad 在 OSCC 及正常口腔上皮中的表达**  
在正常口腔黏膜上皮中,E-cad 连续、均匀的表达于上皮细胞的细胞膜上,基底层、棘层、颗粒层均有表达并且随着向表层的移行,E-cad 染色逐渐变淡,角化层无阳性染色(图 2a)。在高分化鳞癌中,E-cad 的染色强度低于口腔上皮(图 2b);在中分化鳞癌中,E-cad 的阳性强度继续减弱(图 2c);在低分化鳞癌中,E-cad 的表达几乎为失阳性(图 2d)。

**2.3 Vim 在 OSCC 及正常口腔上皮中的表达**  
Vim 在正常口腔黏膜上皮细胞中是没有染色的,其主要表达于黏膜下方的结缔组织的间质细胞的细胞浆中(图 3a)。在高分化鳞癌中,Vim 弱表达于肿瘤细胞浆中(图 3b);在中分化鳞癌中,Vim 阳性表达于细胞浆中(图 3c);在低分化鳞癌中,Vim 强阳性表达于细胞浆中(图 3d)。

表 1 SOX2 和 E-cad 表达的 spearman 相关分析

Table 1 Spearman correlation analysis of the expression of SOX2 and E-cad

SOX2	E-cad		<i>r</i>	<i>P</i>
	阳性表达	阴性表达		
阳性表达	11	17	-0.887	<0.01
阴性表达	22	0		

表 2 SOX2 和 Vim 表达的 spearman 相关分析

Table 2 Spearman correlation analysis of the expression of SOX2 and Vim

SOX2	Vim		<i>r</i>	<i>P</i>
	阳性表达	阴性表达		
阳性表达	26	2	0.952	<0.01
阴性表达	1	21		

表 3 E-cad 和 Vim 表达的 spearman 相关分析

Table 3 Spearman correlation analysis of the expression of E-cad and Vim

E-cad	Vim		<i>r</i>	<i>P</i>
	阳性表达	阴性表达		
阳性表达	10	23	-0.897	<0.01
阴性表达	17	0		

**2.4 SOX2、E-cad 和 Vim 表达的关系** 采用 spearman 等级相关分析,在 OSCC 不同组织分型中,SOX2 和 E-cad 的表达负性相关( $r = -0.887, P < 0.05$ );SOX2 和 Vim 的表达正性相关( $r = 0.952, P < 0.05$ );E-cad 和 Vim 的表达负性相关

( $r = -0.897, P < 0.05$ ),见表 1~表 3。

### 3 讨论

OSCC 是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤约占口腔恶性肿瘤的 90%<sup>[2]</sup>。虽然肿瘤整体治疗水平显著提高,但是 OSCC 的五年生存率大约为 50%<sup>[3]</sup>,主要原因是 OSCC 具有早期浸润和转移的特点,使治疗过程滞后于疾病发展过程,导致治疗效果不佳。因此,研究其浸润转移机制具有重要意义。

干细胞转录因子 SOX2 参与许多正常生理发育过程,如:参与性别决定、促进神经系统发育、血细胞生成、软骨形成等多种早期胚胎发育过程,并且可以保持细胞的多潜能性,是维持干细胞特性的重要基因<sup>[4]</sup>。越来越多的研究显示 SOX2 与恶性肿瘤存在关联,参与肿瘤恶变过程,包括皮肤鳞状细胞癌,胃癌,胶质瘤,结直肠癌,肺癌和乳腺癌<sup>[5~7]</sup>。随着对 EMT 的不断研究,人们发现 SOX2 参与 EMT 过程当中,已在乳腺癌、甲状腺癌、结肠癌等肿瘤中被证实与其 EMT 相关<sup>[8~11]</sup>。SOX2 作为 EMT 的促进因子,在其中发挥了一定作用。Nadja 等研究表明:SOX2 在口腔癌中的表达是一种普遍现象,检测 SOX2 的扩增情况对于 OSCC 的早期诊断及提高治愈率方面具有重要作用<sup>[12]</sup>。He 等揭示 SOX2 的扩增表达与 OSCC 的病理分级有关<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,SOX2 在正常口腔上皮组织中不表达,而在不同组织分级的 OSCC 中均有表达,且随着组织分级水平降低,SOX2 的表达呈上升趋势。因此可以看出,SOX2 和 OSCC 的分化相关。本实验结果和 Nadja 与 He 的结果类似。

E-cad 和 Vim 是 EMT 进程中 2 个重要的分子标志物,在正常口腔黏膜中,E-cad 标记在上皮细胞的细胞膜上;Vim 标记在间质细胞的细胞浆内。当上皮细胞发生恶变时,E-cad 在上皮细胞的表达逐渐消失;Vim 逐渐在恶变上皮细胞中表达,这些现象说明上皮细胞恶变存在向间充质转化趋势。本文结果显示与正常组织相比,E-cad 在肿瘤组织中的表达下降,而 Vim 在肿瘤组织中的表达增加( $P < 0.05$ ),提示在口腔正常细胞转变为肿瘤细胞的过程中,上皮细胞间黏附性下降从而获得了间质细胞的形态和特点。根据文献查阅,这种现象的发生很可能是通过以下机制实现的。E-cad 表达异常主要包括了 CDH1 基因突变、E-cad 转录水平下调、基因启动子甲基化及  $\beta$ -catenin 酪氨酸磷酸化等。本实验结果显示,E-cad 和 Vim 的表达在正常口腔上皮和 OSCC 中存在差异。正常口腔上

皮中, E-cad 强阳性表达, 而随着 OSCC 分化水平降低, E-cad 表达呈下降趋势, 有些甚至失表达; Vim 在正常口腔上皮组织中, 表达于上皮下方的间充质细胞中, 不表达在上皮细胞内, 而随着 OSCC 分化水平降低, Vim 在 OSCC 上皮细胞中逐渐出现阳性表达, 且呈上升趋势。本实验结果与 Aguiar 发现, 随着 OSCC 的分化水平降低, 其 E-cad 的表达水平越低<sup>[14]</sup>的结果类似。

有研究显示肿瘤细胞发生 EMT 和 CSCs 的形成与肿瘤微环境的刺激密不可分, 同时两者之间存在许多类似的特征。微环境在刺激 EMT 发生的同时也会伴随 CSCs 数量与性质的变化。以上两种现象的发生与基因变异和肿瘤细胞表观遗传不稳定现象紧密相连, 同时肿瘤微环境充当两者相互“对话”的平台。本文结果显示 CSCs 标记物 SOX2 与 E-cad 和 Vim 分别存在负相关与正相关在很大程度上说明 EMT 与 CSCs 极有可能是伴随发生的。Li 等研究发现 SOX2 是可以 WNT/ $\beta$ -catenin 信号途径影响乳腺癌细胞的 EMT 过程, 并验证此过程中 E-cad 由于 EMT 的发生出现下降表达, 同时伴有 Vim 的升高<sup>[15]</sup>。但这种现象是否会在 OSCC 中发生还需进一步的实验验证。综上所述, SOX2 的表达水平特点反应了其 OSCC 分化程度具有密切关系, 同时与上皮间充质转化标记物 E-cad 和 Vim 分别存在负性相关与正性相关, 揭示 OSCC 在演进过程中癌细胞干性的增强伴随上皮间充质转化的发生。

## 参考文献

- [1] 陈震, 郭燕. E-cadherin 和 Vimentin 在 OSCC 上皮-间质转化中的作用及表达[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(8) : 857-860
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1) : 11-30
- [3] 张杨安, 关为群. 口腔鳞状细胞癌组织中 Periostin 的表达及其在上皮间质转化中的作用[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(3) : 262-265
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4) : 663-676
- [5] Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma [J]. Nature, 2014, 511(7508) : 246-250
- [6] Neumann J, Bahr F, Horst D, et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer [J]. BMC Cancer, 2011, 11(4) : 1-7
- [7] Drilon A, Rekhtman N, Ladanyi M. Squamous-cell carcinomas of the lung: Emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(10) : e418-e426
- [8] Herreros-Villanueva M, Zhang J S, Koenig A, et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells [J]. Oncogenesis, 2013, 2(8) : e61
- [9] Leis O, Eguiara A. Sox2 expression in breast and activation in breast cancer stem cells [J]. Oncogene, 2012, 31(11) : 1354-1365
- [10] Piva M, Domenici G, Iriando O, et al. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells [J]. EMBO molecular medicine, 2014, 6(1) : 66-79
- [11] Ye X, Wu F, Wu C, et al.  $\beta$ -Catenin, a Sox2 binding partner, regulates the DNA binding and transcriptional activity of Sox2 in breast cancer cells [J]. Cellular signaling, 2014, 26(3) : 492-501
- [12] Kokalj Vokac N, Cizmarevic B. An evaluation of SOX2 and hTERT gene amplifications as screening markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas [J]. Mol Cytogenet, 2014, 7(1) : 1-8
- [13] He KF, Zhang L, Huang CF, et al. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(2) : 838632
- [14] Aguiar Junior FCA, Kowalski LP, Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence [J]. Oral Oncol, 2007, 43(6) : 593-601
- [15] Xuefei Li, Yingxi Xu. SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/ $\beta$ -catenin signal network [J]. Cancer letters, 2013, 336(2) : 379-389

[收稿日期: 2017-06-13]

(本文编辑 李四群)