

胃癌中STAT3、p-STAT3和Bcl-x_L的表达及临床意义



张竹青¹, 卢书明², 陈美如², 李春艳², 刘丽娜², 吕 申³

Expressions of STAT3, p-STAT3 and Bcl-x_L in Gastric Carcinoma and Their Clinical Significance

ZHANG Zhuqing¹, LU Shuming², CHEN Meiru², LI Chunyan², LIU Lina², LV Shen³

1. Department of Pathology, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, China;

2. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University;

3. The Central Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University

Abstract: Objective To investigate the expression of signal transducer and activators of transcription 3 (STAT3), p-STAT3 and the downstream transcriptional factor Bcl-x_L and their effects in the tumorigenesis and development of gastric carcinoma (GC). **Methods** The expressions of STAT3, p-STAT3 and Bcl-x_L in 53 cases of GC tissues and 44 cases of normal gastric mucosa tissues were assayed by immunohistochemical staining. The correlation of the expression of STAT3, p-STAT3 and Bcl-x_L in GC with clinicopathological parameters was analyzed. **Results** The positive expressions of STAT3, p-STAT3 and Bcl-x_L in GC were remarkably higher than those in normal gastric mucosa tissues (all $P<0.01$). STAT3 overexpression was correlated with tumor differentiation and lymph node metastasis ($P<0.05$). Expressions of p-STAT3 and Bcl-x_L were correlated with tumor differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis and clinical stage (all $P<0.05$), while they were not correlated with gender, age or tumor size (all $P>0.05$). Furthermore, expressions of p-STAT3 and Bcl-x_L showed linear positive correlation in GC tissues ($r=0.346, P=0.011$). **Conclusion** STAT3 signaling pathway may play an important role in the tumorigenesis and progression of GC. Determination of STAT3 and its target gene Bcl-x_L could be used to indicate the malignancy degree of GC.

Key words: Gastric carcinoma; Signal transducer and activators of transcription 3 (STAT3); Bcl-x_L

摘 要: 目的 检测STAT3、p-STAT3与其下游靶基因产物Bcl-x_L蛋白在胃癌组织中的表达,探讨STAT3及其靶基因产物在胃癌发病机制中的作用。**方法** 采用免疫组织化学SP法检测53例胃癌及44例正常胃黏膜组织中STAT3、p-STAT3及Bcl-x_L蛋白的表达,并分析其与胃癌临床病理特征的关系。**结果** STAT3、p-STAT3及Bcl-x_L蛋白在胃癌组织中的阳性表达率显著高于其在正常胃黏膜组织中的阳性表达率,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。STAT3蛋白的表达与胃癌组织的分化程度及淋巴结转移显著相关($P<0.05$); p-STAT3、Bcl-x_L蛋白的表达与胃癌组织的分化程度、浸润深度、有无淋巴结转移及临床分期均有关(P 均 <0.05);三者与性别、年龄、肿瘤大小无明显相关性(P 均 >0.05)。胃癌组织中的p-STAT3与Bcl-x_L蛋白表达之间呈正相关($r=0.346, P=0.011$)。**结论** STAT3信号转导通路在胃癌的发生、发展过程中起重要作用,检测胃癌组织中STAT3及靶基因Bcl-x_L的表达有助于判断肿瘤的恶性程度及病情进展。

关键词: 胃癌; 信号转导与转录激活因子3; Bcl-x_L

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

0 引言

信号转导和转录激活因子3 (signal transducer and activators of transcription 3, STAT3) 是STATs家族的重要成员之一,在受到生长因子、细胞因

子等细胞外信号刺激后,以活化的磷酸化STAT3形式进入细胞核中,启动相应靶基因的转录,进而发挥其对细胞增殖、凋亡等的调控作用^[1]。研究发现STAT3与多种恶性肿瘤发生发展密切相关,持续活化的STAT3能促进肿瘤细胞增殖及浸润转移^[1-2]。本研究检测胃癌(gastric carcinoma, GC)组织中STAT3及其活化形式即磷酸化的STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 蛋白与靶基因产物Bcl-x_L蛋白的表达,分析其与胃癌临床病理特

收稿日期: 2013-05-16; 修回日期: 2013-10-23
作者单位: 1.116033 辽宁大连, 大连市中心医院病理科; 2.大连医科大学附属第一医院消化内科; 3.大连医科大学附属第二医院中心实验室
作者简介: 张竹青(1978-),女,硕士,主治医师,主要从事胃肠道恶性肿瘤的基础研究

征的关系及其相互之间的相关性，探讨STAT3及其靶基因产物在胃癌发病机制中的作用。

1 资料和方法

1.1 病例资料

收集2010—2011年大连医科大学附属第一医院诊断明确的胃癌手术切除组织标本53例。其中男34例，女19例；年龄37~86岁，中位年龄63岁，<60岁者23例，≥60岁者30例；肿瘤大小<5 cm者28例，≥5cm者25例；肿瘤浸润未达浆膜层者10例，已达浆膜层者43例；高中分化腺癌16例，低分化腺癌18例，黏液细胞癌19例；无淋巴结转移者17例，有淋巴结转移者36例；采用2010年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会（UICC/AJCC）TNM分期标准：Ⅰ~Ⅱ期26例，Ⅲ~Ⅳ期27例。所有病例均经术前和术后病理切片确诊，术前均未接受放疗和化疗。另取因上消化道症状行胃镜检查活检并经病理证实的正常胃黏膜组织44例。所有病理切片均由两位高年资经验丰富的病理医师确诊。

1.2 主要试剂与方法

鼠抗人STAT3多克隆抗体、羊抗人p-STAT3多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司；兔抗人Bcl-x_L多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司；生物素标记的二抗、SP检测试剂盒及DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。采用免疫组织化学SP法染色，所有标本经10%福尔马林固定，石蜡包埋，以4 μm厚连续切片，进行脱蜡水化，3%过氧化氢消除内源性过氧化物酶20 min，PBS冲洗，微波抗原修复10 min，再PBS冲洗，正常山羊血清室温下封闭15 min，滴加一抗（鼠抗人STAT3多克隆抗体、兔抗人Bcl-x_L多克隆抗体工作浓度均为1:500，羊抗人p-STAT3多克隆抗体工作浓度为1:400），4℃冰箱过夜，PBS冲洗后加入生物素标记二抗（工作浓度1:100），37℃孵育30 min，PBS冲洗后滴加辣根过氧化物酶37℃孵育30 min，PBS冲洗，DAB显色，流水冲洗10 min，苏木精对比染色，脱水、透明，中性树胶封片，镜检。用已知阳性表达的组织切片作为阳性对照，用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断

以细胞核或细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。按阳性细胞所占的百分比及着色强度进行结果判定：(1)按着色强度评分：0分为无着色；1分为浅黄色；2分为黄色；3分为棕黄色。(2)按阳性细胞数占同类细胞数的百分比评分：0分为阴性，1分为阳性细胞数≤10%，2分为阳性细胞数10%~50%，3分为阳性细胞数>50%~75%，4

分为阳性细胞数>75%。取两项评分之和作为总积分，0~3分为阴性(-)，3分以上为阳性(+).

1.4 统计学方法

应用SPSS 18.0软件进行数据分析。免疫组织化学结果采用χ²检验、Fisher精确检验，相关性分析采用Spearman相关分析，以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STAT3、p-STAT3及Bcl-x_L蛋白在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达情况

STAT3蛋白主要表达于细胞质，p-STAT3蛋白表达在细胞核和细胞质，以细胞核为主，Bcl-x_L蛋白主要表达于细胞质，见图1。胃癌组织中STAT3、p-STAT3、Bcl-x_L蛋白的阳性表达率分别为83.0%(44/53)、79.2%(42/53)、60.4%(32/53)，高于其在相应正常胃黏膜组织中的阳性表达率22.7%(10/44)、18.2%(8/44)、18.2%(8/44)，差异均有统计学意义（P=0.000）。

2.2 STAT3、p-STAT3、Bcl-x_L蛋白的表达与胃癌临床病理学特征的关系

胃癌组织中STAT3蛋白在低分化组和有淋巴结转移组中表达分别高于高中分化组和无淋巴结转移组，差异均有统计学意义（P<0.05）；随着浸润深度加深及临床分期增高而表达有增高趋势，但组别间差异无统计学意义（P值分别为0.053和0.050）。p-STAT3、Bcl-x_L蛋白在胃癌组织中的表达随着浸润深度加深、分化程度降低、发生淋巴结转移及临床分期增高而表达增高，组别间的差异均有统计学意义（P<0.05）。胃癌患者不同性别、年龄及肿瘤大小各组组间STAT3、p-STAT3、Bcl-x_L蛋白的阳性表达率比较，差异均无统计学意义（P>0.05），见表1。

2.3 胃癌组织中p-STAT3蛋白与Bcl-x_L蛋白表达的相关性分析

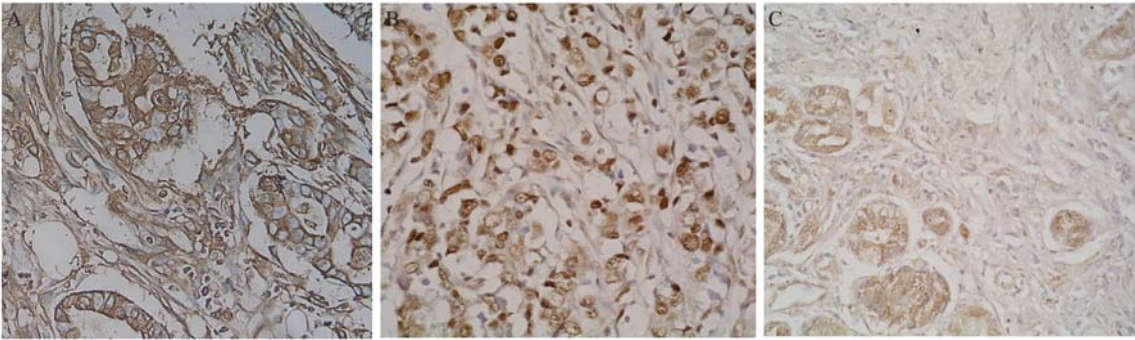
胃癌组织中p-STAT3蛋白表达与Bcl-x_L蛋白的表达呈正相关（r=0.346，P=0.011），见表2。

表2 胃癌组织中p-STAT3与Bcl-x_L蛋白表达的相关性分析
Table2 Correlation between p-STAT3 and Bcl-x_L expressions in gastric carcinoma tissues

p-STAT3	Bcl-x _L		Total(n)	r	P
	+	-			
+	29	13	42	0.346	0.011
-	3	8	11		
Total (n)	32	21	53		

3 讨论

Janus蛋白酪氨酸激酶（Janus activated kinase, JAK）/信号转导和转录激活因子（signal transducer



A:STAT3; B: p-STAT3; C: Bcl-x_L;STAT3: signal transducer and activators of transcription 3; p-STAT3: phosphorylated STAT3

图1 胃癌组织中STAT3、p-STAT3、Bcl-x_L蛋白的阳性表达(SP×400)

Figure1 Positive expressions of STAT3, p-STAT3 and Bcl-x_L in gastric carcinoma (SP×400)

表1 STAT3、p-STAT3、Bcl-x_L蛋白的表达与胃癌患者临床病理特征的关系

Table1 Correlations of STAT3,p-STAT3,Bcl-x_L expressions with clinicopathological features of gastric carcinoma patients

Clinical features	n	STAT3		P	p-STAT3		P	Bcl-x _L		P
		+	%		+	%		+	%	
Gender				1.000			1.000			0.400
Male	34	28	82.4		27	79.4		19	55.9	
Female	19	16	84.2		15	78.9		13	68.4	
Age (years)				0.478			0.501			1.000
<60	23	18	78.3		17	73.9		14	60.8	
≥60	30	26	86.7		25	83.3		18	60.0	
Tumor size(cm)				0.474			0.183			0.779
<5	28	22	78.6		20	71.4		16	57.1	
≥5	25	22	88.0		22	88.0		16	64.0	
Depth of invasion				0.053			0.023			0.039
No invaded serosa	10	6	60.0		5	50.0		3	30.0	
Invaded serosa	43	38	88.4		37	86.0		29	67.4	
Differential degree				0.002			0.001			0.006
Well-moderate	16	9	56.3		8	50.0		5	31.3	
Poor	37	35	94.6		34	91.9		27	73.0	
Lymph node metastasis				0.023			0.000			0.016
No Metastasis	17	11	64.7		8	47.1		6	35.3	
Metastasis	36	33	91.7		34	94.4		26	72.2	
TNM stage				0.050			0.015			0.012
I - II	26	18	76.9		17	65.4		11	42.3	
III-IV	27	26	96.3		25	92.6		21	77.8	

and activators of transcription, STAT) 信号途径是细胞因子信号转导的重要途径, 参与细胞增殖、分化、凋亡、血管生成以及免疫调节等过程^[2]。STAT3是JAK/STAT信号转导通路中的关键信号因子, 在没有特异性刺激时定位于细胞胞质内, 而当细胞受到细胞外信号刺激时, STAT3上的SH2结构域与受体上被磷酸化的酪氨酸残基相结合, 同时自身也被JAKs磷酸化, 即形成活化的p-STAT3, 转运至核内同其他一些转导因子相互作用调控下游靶基因转录, 进而发挥其功能。研究发现在乳腺癌、胰腺癌等恶性肿瘤及细胞株中存在STAT3的组成性激活 (constitutive activation), 且STAT3与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管生成、侵袭转移密切相关, 并可能作为预测肿瘤预后的指标^[3-4]。

Yu等^[5]报道在人胃癌高分化、中分化、低分化和腹水转移型细胞株中都有不同程度的STAT3

组成性激活。Xiong等^[6]也报道p-STAT3蛋白的表达与胃癌的分化程度、TNM分期密切相关, 同时发现p-STAT3阳性表达患者预后更差, p-STAT3可成为预测胃癌预后的分子生物学的标记。本研究发现胃癌组织中STAT3蛋白和p-STAT3蛋白的表达明显高于其在正常胃黏膜组织的表达($P<0.01$), 提示胃癌组织中存在STAT3的异常激活。进一步分析p-STAT3蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系, 发现随着胃癌分化程度降低、浸润深度增加、发生淋巴结转移及TNM分期升高, p-STAT3蛋白的表达显著增加, 表明p-STAT3蛋白的表达与胃癌分化程度、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及TNM分期密切相关 ($P<0.05$), 提示STAT3蛋白激活不仅可能与胃癌的发生有关, 还可能在胃癌的进展中发挥重要作用, 与既往报道一致。Okamoto等^[7]报道STAT3激活既有助于胃癌细胞的生存, 还有助于癌

细胞的运动。STAT3蛋白激活可能是胃癌发生及发展中的一个关键事件^[8]。

STAT3下游靶基因主要有细胞周期调控因子（c-Fos、c-myc、Cyclin D1）与凋亡抑制基因如（survivin、Mcl-1、Bcl-x_L）以及促血管生成因子（VEGF、MMP-2、MMP-9）等^[1]。有报道p-STAT3可能主要通过调节凋亡相关蛋白和增殖相关蛋白如Bcl-x_L和Cyclin D1等来发挥其抑制细胞凋亡和促进细胞增殖的作用^[9]。Bcl-x_L分子量为25kD，是一种凋亡抑制因子，属于Bcl-2基因家族。研究报道Bcl-x_L蛋白在恶性肿瘤如结肠癌中呈过表达，并可判断肿瘤的预后^[10]。Smith等^[11]报道Bcl-x_L蛋白在胃癌组织中表达明显增高，且其蛋白表达与胃癌分化程度及淋巴结转移相关。但也有研究报道Bcl-x_L蛋白在正常胃黏膜组织中的表达显著强于胃癌组织^[12]。本研究发现胃癌组织中Bcl-x_L蛋白的阳性表达率明显高于其在正常胃黏膜组织中的阳性表达率（ $P<0.05$ ），同时发现胃癌分化程度越低、浸润程度越深，Bcl-x_L蛋白表达越强，且有淋巴结转移组阳性率明显高于无淋巴结转移组，TNM分期上Ⅲ~Ⅳ期阳性率明显高于Ⅰ~Ⅱ期，提示Bcl-x_L蛋白高表达可能在胃癌的发生及进展过程中发挥重要作用。但也有研究认为Bcl-x_L蛋白参与胃癌相对早期阶段的发展过程而非胃癌的进展期^[13]，Bcl-x_L蛋白表达与胃癌发生发展的具体关系还需深入研究。

本研究还发现胃癌组织中p-STAT3与Bcl-x_L的表达呈正相关，表明随着STAT3被激活，作为其下游靶基因的Bcl-x_L表达也明显增高，Bcl-x_L的过表达，使胃癌细胞的增殖能力增强，进而促进胃癌的浸润、转移等恶性行为的进展。有报道STAT3激活后诱导Bcl-x_L的表达可增强人类肿瘤细胞的生存及耐药性，沉默STAT3基因可下调Bcl-x_L的表达，而通过siRNA抑制胃癌MGC-803细胞株Bcl-x_L蛋白表达，能够促进胃癌细胞自发性程序性死亡^[14]。研究显示抑制STAT3表达不仅能抑制癌细胞的增殖，而且可诱导抗肿瘤的免疫效应，联合自杀基因治疗可增加抗肿瘤效果，还能提高胃癌细胞对顺铂的敏感度，促进胃癌细胞凋亡^[15]。STAT3信号通路可能成为肿瘤潜在的治疗靶点。

综上所述，STAT3信号转导通路激活在胃癌的发生、发展过程中起重要作用，检测胃癌组织中STAT3及靶基因Bcl-x_L的表达有助于判断肿瘤的恶性程度及病情进展。STAT3激活的具体机制需深入地研究，而通过靶向抑制STAT3及下游靶基因的表达可能对胃癌具有潜在的治疗价值。

参考文献:

[1] Devarajan E, Huang S. STAT3 as a central regulator of tumor metastases[J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(5): 626-33.

[2] Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20059-63.

[3] Yang J, Ye SM, Jiang XF, *et al.* Expression and clinical significance of STAT-3 and Enolase-1 in breast cancer[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2012, 39(12): 1451-5. [杨洁,叶双梅,蒋学锋,等. STAT-3与Enolase-1在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(12): 1451-5.]

[4] Huang C, Huang R, Chang W, *et al.* The expression and clinical significance of pSTAT3, VEGF and VEGF-C in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Neoplasma*, 2012, 59(1): 52-61.

[5] Yu LF, Zhu YB, Qiao MM, *et al.* Constitutive activation and clinical significance of Stat3 in human gastric cancer tissues and cell lines[J]. *Zhong Hua Yi Xue Za Zhi*, 2004, 84(24): 2064-9.[俞丽芬,朱延波,乔敏敏,等. Stat3在人胃癌细胞株和组织中的组成性激活及其临床意义[J]*中华医学杂志*, 2004, 84(24): 2064-9]

[6] Xiong H, Du W, Wang JL, *et al.* Constitutive activation of STAT3 is predictive of poor prognosis in human gastric cancer[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(9): 1037-46.

[7] Okamoto W, Okamoto I, Arao T, *et al.* Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(3): 407-12.

[8] Giraud AS, Menheniott TR, Judd LM. Targeting STAT3 in gastric cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(9): 889-901.

[9] Lee SW, Ahn YY, Kim YS, *et al.* The immunohistochemical expression of STAT3, Bcl-xL, and MMP-2 proteins in colon adenoma and adenocarcinoma[J]. *Gut Liver*, 2012, 6(1): 45-51.

[10] Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, *et al.* Significance of Bcl-xL in human colon carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(19): 3069-73.

[11] Smith L, Berrieman HK, O'Kane SL, *et al.* Immunohistochemical detection of apoptotic markers in gastric cancer[J]. *Oncol Res*, 2006, 15(9): 441-4.

[12] Gryko M, Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, *et al.* Immunohistochemical assessment of apoptosis-associated proteins: p53, Bcl-xL, Bax and Bak in gastric cancer cells in correlation with clinical and pathomorphological factors[J]. *Adv Med Sci*, 2012, 57(1): 77-83.

[13] Lee DS, Kang SB, Baek JT, *et al.* Immunohistochemical expression of bcl-2, bcl-xL, bax, p53 proteins in gastric adenoma and adenocarcinoma[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2005, 45(6): 394-400.

[14] Lei XY, Zhong M, Feng LF, *et al.* Silencing of Bcl-xL expression in human MGC-803 gastric cancer cells by siRNA[J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2005, 37(8): 555-60.

[15] Huang S, Chen M, Shen Y, *et al.* Inhibition of activated Stat3 reverses drug resistance to chemotherapeutic agents in gastric cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(2):198-205.

[编辑: 周永红; 校对: 杨 卉]