

文章编号 1006-8147(2019)03-0275-04

论 著

SRSF2、HMGA2 和 Caspase-3 在卵巢高级别浆液性癌及其前驱病变中的表达及意义

汪红燕, 宋文静

(天津医科大学基础医学院病理学教研室, 天津 300070)

摘要 目的: 观察富含丝氨酸/精氨酸剪接因子 2(SRSF2)、HMGA2 和 Caspase-3 在卵巢高级别浆液性癌(HGSOC)及其前驱病变中的表达并探讨其意义。方法: 收集输卵管分泌型上皮细胞过度生长(SCOUT)20例、P53 印记 13 例、浆液性输卵管上皮内癌(STIC)18 例、输卵管高级别浆液性癌 37 例和 HGSOC 48 例, 应用免疫组化技术检测 SRSF2、HMGA2 和 Caspase-3 在 5 组中的表达, 分析 3 个指标间及其与临床病理参数间的关系。结果: 在 5 组中 SRSF2 和 Caspase-3 呈递减性表达, HMGA2 呈递增性表达(P 均 <0.05)。3 个指标在 STIC、输卵管高级别浆液性癌和 HGSOC 中的表达无显著差异(P 均 >0.05)。在 HGSOC 及其前驱病变中, SRSF2 与 Caspase-3 的表达呈正相关, SRSF2 与 HMGA2、Caspase-3 与 HMGA2 的表达均呈负相关(r 分别为 0.618、-0.329 和 -0.373, P 均 <0.05)。3 个指标的表达与肿瘤 FIGO 分期、肿瘤大小及年龄无关。结论: SRSF2 和 HMGA2 蛋白异常表达可能协同参与调控 HGSOC 肿瘤细胞凋亡。

关键词 高级别浆液性癌; SRSF2; HMGA2; Caspase-3; 凋亡

中图分类号 R365

文献标志码 A

Expression and significance of SRSF2、HMGA2 and Caspase-3 in high grade serous ovarian carcinoma and precursor lesions

WANG Hong-yan, SONG Wen-jing

(Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To examine the expression of SRSF2, HMGA2 and Caspase-3 in high grade serous ovarian carcinoma and precursor lesions, and to discuss their relevant meanings. **Methods:** The expressions of SRSF2, HMGA2 and Caspase-3 in the tissue including high grade serous ovarian carcinoma (HGSOC, 48 cases), fallopian tube high grade serous fallopian tube carcinoma (37 cases), serous tubal intraepithelial carcinoma-STIC (18 cases), P53 signature (13 cases) and secretory cell outgrowths (SCOUT, 20 cases) were detected using immunohistochemical method. Relations between the three markers as well as relations between markers and clinical pathological parameters were analyzed. **Results:** (1) The expressions of SRSF2 and Caspase-3 in the SCOUT, P53 signature, STIC, ovarian/fallopian tube high grade serous carcinoma showed a decreasing trend, while the expressions of HMGA2 showed an increasing trend. The differences were statistically significant ($P<0.05$). There were no significant differences in expressions of the three markers between STIC, fallopian tube high grade serous carcinoma and HGSOC. (2) In HGSOC and its precursor lesion, positive correlation between the expression of SRSF2 and Caspase-3, and negative correlations between SRSF2 and HMGA2, Caspase-3 and HMGA2 were obtained (They values 0.618, -0.329 and -0.373 respectively, $P<0.05$); There was no correlation between the expressions of the three markers and FIGO stage, tumor size and age. **Conclusion:** The abnormal expressions of SRSF2 and HMGA2 may be involved in regulating apoptosis pathway synergistically in HGSOC.

Key words high grade serous carcinoma; SRSF2; HMGA2; Caspase-3; apoptosis

高级别浆液性癌占卵巢癌死亡率的 70%~80%, 近 5 年来总体生存状况并无明显改善^[1-2]。根据卵巢癌二元论发病模式, 卵巢高级别浆液性癌(high grade serous ovarian cancer, HGSOC) 主要遵循输卵管分泌型上皮细胞过度生长(secretory cell outgrowths, SCOUT)—P53 印记—浆液性输卵管上皮内癌(serous tubal intraepithelial carcinoma, STIC)—癌的谱系改变。P53 印记因输卵管粘膜分泌细胞

在 DNA 受损背景下发生, 细胞学形态无明显异常, 免疫组化染色显示 12 个以上连续的 P53 蛋白呈强阳性表达的分泌细胞群, 并具有较低的增殖指数($Ki67<30\%$)^[3]。可变剪接指真核生物在剪接过程中一种前体 mRNA 通过连接不同剪接位点产生多种成熟 mRNA 的过程。全基因组研究显示可变剪接事件与肿瘤细胞周期控制、细胞骨架组织、迁移和细胞粘着等有关^[4], 其调控异常可导致肿瘤发生^[5]。SR (serine/arginine-rich, SR) 蛋白为富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子, 是参与调控可变剪接的一类重要剪接

作者简介 汪红燕(1982-), 女, 硕士在读, 研究方向: 女性生殖系统肿瘤; 通信作者: 宋文静, E-mail: songwenjing2004@aliyun.com。

因子富含丝氨酸/精氨酸剪接因子 2 (serine / arginine-rich splicing factor, SRSF2) 是该家族中唯一仅定位于细胞核的蛋白, 其所致异常可变剪接事件多集中在肿瘤发生及细胞凋亡相关通路, 功能有明显的器官特异性^[6-7], 但在 HGSOC 中的具体作用机制尚不清楚。Caspase-3 在 HGSOC 低表达, 与卵巢癌细胞凋亡密切相关。HMGA2 可通过影响细胞上皮间质转化、干细胞自我更新、细胞增殖和 DNA 修复等过程发挥致癌作用^[8], 文献报道 HMGA2 在 HGSOC 高表达。本研究通过检测 SRSF2、HMGA2 和 Caspase3 在 HGSOC 及其前驱病变中的表达, 探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 经研究对象或其家属知情同意, 收集 2013 年 1 月-2018 年 5 月存档于天津医科大学总医院病理科 HGSOC 48 例(患者中位年龄 56 岁)、输卵管高级别浆液性癌 37 例(患者中位年龄 59 岁)、STIC 18 例(患者中位年龄 61 岁)、具有 P53 印记的病例 13 例(患者中位年龄 57 岁)和具有 SCOUT 的病例 20 例(患者中位年龄 55 岁), 其中癌组织共 103 例。所有标本经 10% 中性缓冲福尔马林液固定、常规石蜡包埋, 严格参照《女性生殖器官肿瘤 WHO 分类》(2014 年第 4 版) 相关诊断标准重新阅片, 选取典型病变区域做 4 μ m 厚连续切片。

1.1.2 主要试剂 兔抗人多克隆抗体 SRSF2(ab-28428) 购自美国 Abcam 公司, 稀释浓度 1:700; 兔抗人多克隆抗体 HMGA2(ab-52039) 购自美国 Abcam 公司, 稀释浓度 1:100; 兔抗人多克隆抗体 Caspase-3(bs-0081R) 购自北京博奥森生物技术有限公司, 稀释浓度 1:800; PV-6000 通用型两步法免疫组化检测试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 检测方法

1.2.1 免疫组织化学法 采用免疫组化 PV 两步法。石蜡切片常规脱蜡水化, 蒸馏水冲洗, 按照抗体说明书行适当抗原修复, 冷却至室温后, 参照 PV-6000 通用型两步法免疫组织化学染色说明书进行试验操作。每批次染色均按照免疫组化染色质量控制标准设立相应阳性对照、阴性对照, 以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.2.2 免疫组化半定量标准参照文献对结果判定^[6, 9-10] SRSF2 和 HMGA2 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性信号, Caspase-3 表达于细胞核和线粒体。选 10 个有代表性的高倍视野(400 \times)进行判断, 每高倍视野计数 100 个细胞。核表达抗体染色强度判

断: 无着色为阴性评 0 分, 浅棕色为弱阳性评 1 分, 棕黄色为中度阳性评 2 分, 棕褐色为强阳性评 3 分。染色细胞百分比评分: 具有相应染色强度的细胞所占的百分比, 评为 0~1 分。染色强度与染色细胞百分比乘积即为免疫组化染色评分, 0 分为(-), 0~1 分为(+), 1~1.5 分为(++), 大于等于 1.5 分为(+++), 大于等于 1.5 分为高表达。Caspase3 染色结果评判: Caspase-3 表达于细胞核和线粒体见清晰棕色颗粒着色为阳性细胞, 染色强度分级标准以阳性细胞所占百分比分 4 级: < 5% 为(-), 5%~25% 为(+), 26%~49% 为(++), \geq 50% 为(+++), +++ 者为高表达。

1.3 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 各组间表达率差异比较采用 χ^2 检验, 相关性分析采用 Spearman 秩相关。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

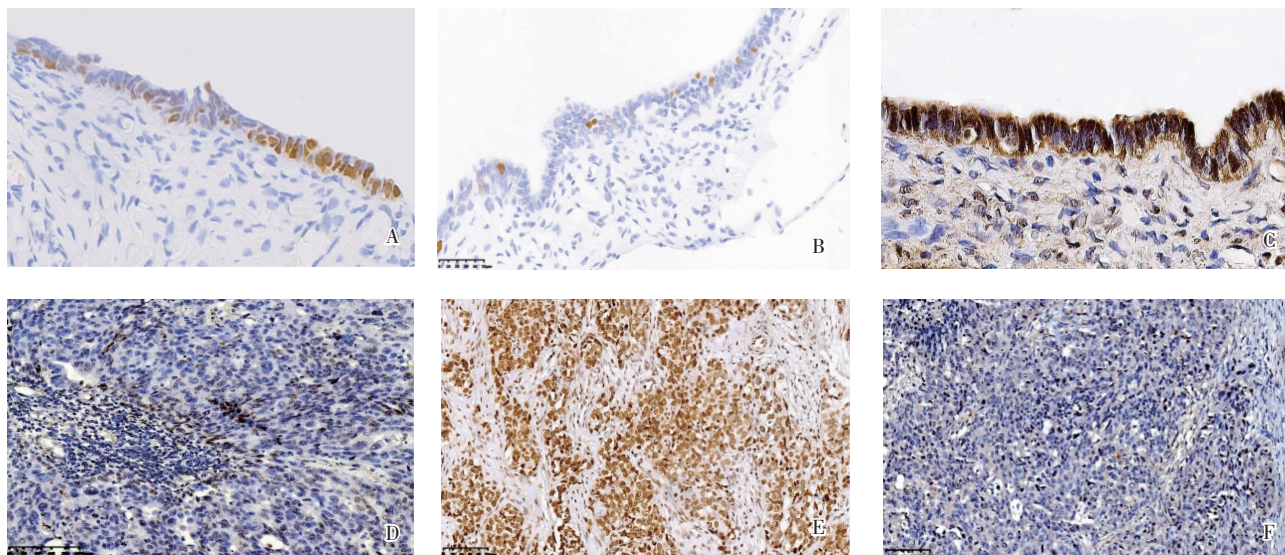
2.1 5 组中各指标表达比较 在 SCOUT、P53 印记、STIC、输卵管/卵巢高级别浆液性癌中 SRSF2 和 Caspase-3 的表达呈递减趋势, HMGA2 的表达呈递增趋势($P<0.05$)。在 SCOUT、P53 印记、STIC、输卵管高级别浆液性癌、HGSOC 中 SRSF2 阳性率分别为 80%、76.9%、33.3%、35.1% 和 37.5%, HMGA2 阳性率分别为 20%、30.8%、55.6%、73.0% 和 79.2%, Caspase-3 阳性率分别为 85.0%、76.9%、38.9%、48.7% 和 45.8%。SRSF2 在癌组织中高表达率为 1.9%, HMGA2 在癌组织中的高表达率为 40.8%, Caspase-3 在 SCOUT、P53 印记和癌中的高表达率分别 35%, 7.7% 和 5.8%。STIC、输卵管高级别浆液性癌和 HGSOC 3 组比较, 3 个指标的表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。STIC 与 SCOUT、STIC 与 P53 印记比较, SRSF2 与 Caspase-3 的表达差异有统计学意义。STIC 与 SCOUT 比较 HMGA2 的表达差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 SRSF2、HMGA2 和 Caspase-3 在 HGSOC 及其前驱病变中的表达(例)

Tab 1 The expression of SRSF2, HMGA2 and Caspase-3 in HGSOC and precursor lesions(case)

组别	n	SRSF2(+)			HMGA2(+)			Caspase-3(+)		
		n1	χ^2	P	n2	χ^2	P	n3	χ^2	P
A	48	18			38			22		
B	37	13	0.114	0.944 ^a	27	0.448	0.799 ^a	18	0.486	0.792 ^a
C	18	6			10			7		
D	13	10	5.743	0.017 ^b	4	1.873	0.171 ^b	10	4.409	0.036 ^b
E	20	16	8.464	0.004 ^c	4	5.147	0.023 ^c	17	8.657	0.003 ^c

A、B、C、D、E 依次表示 HGSOC、输卵管高级别浆液性癌、STIC、P53 印记和 SCOUT; a. HGSOC、输卵管高级别浆液性癌、STIC 3 组间比较; b. P53 印记与 STIC 比较; c. SCOUT 与 STIC 比较



A、B、C 依次为 SRSF2、HMGA2 和 Caspase-3 在 SCOUT 中的表达(IHC,200 \times);D、E、F 依次为 SRSF2、HMGA2 和 Caspase-3 在 HGSOC 中的表达(IHC,200 \times)

图1 SRSF2、HMGA2 和 Caspase-3 在 SCOUT 和卵巢高级别浆液性癌中的表达

Fig 1 The expression of SRSF2, HMGA2 and Caspase-3 in SCOUT and HGSOC

2.2 相关性分析 在 HGSOC 及其前驱病变中 SRSF2 与 Caspase-3 表达呈正相关, SRSF2 与 HMGA2、Caspase-3 与 HMGA2 表达均呈负相关(r 分别为 0.618、-0.329 和 -0.373, P 均 <0.05)。3 个指标的表达与 FIGO 分期、肿瘤大小及年龄不相关。

3 讨论

SRSF2 不但可与前体 mRNA 结合, 调控组成性剪接和可变剪接, 还能调控基因转录、基因组稳定性。其突变或调控异常与多种遗传性疾病、血液系统疾病和肿瘤密切相关^[11-12]。现有文献显示铂类药物通过 SRSF2 诱导卵巢癌细胞 Caspase-8 和 Caspase-9 的选择性剪接, 促进细胞凋亡, SRSF2 突变可抑制凋亡致铂类耐药^[13-14], 但在 HGSOC 发生发展的不同阶段 SRSF2 和 HMGA2 与凋亡相关蛋白的表达情况尚未见报道。本研究旨在临床样本层面观察 SRSF2、HMGA2 和 Caspase-3 在 HGSOC 及其前驱病变中的表达并探讨可能机制。

本研究发现从 SCOUT 到 P53 印记阶段, 凋亡相关蛋白 Caspase-3 阳性表达率无显著差异, 但表达强度降低, 可能与 P53 印记组织发生 TP53 基因突变, 失去了野生型 P53 诱导细胞凋亡的功能有关^[15]。TP53 基因突变是高级别浆液性癌的普遍早期事件, 从 P53 印记到癌阶段具有相似的 P53 突变状态^[16], 但从 P53 印记到 HGSOC、SRSF2 和 Caspase-3 阳性表达率均有下降趋势且呈正相关, 提示 SRSF2 可能参与 HGSOC 的发生发展, SRSF2 的降低表达可能抑制细胞凋亡。

文献报道 HMGA2 除调节细胞生长、上皮间质转化等功能, 还可通过 ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase (ATR)-Chk1 途径抑制肿瘤细胞凋亡^[17]。HMGA2 在 HGSOC 高表达, 笔者的数据与文献基本一致^[18]。而 SRSF2 异常表达能激活 ART-Chk1 途径^[19], 本研究在 HGSOC 中 SRSF2 表达降低, HMGA2 呈强阳性表达, 笔者推测, SRSF2 和 HMGA2 的异常表达可能协同调控 HGSOC 肿瘤细胞凋亡。

子宫外盆腔高级别浆液性癌的输卵管远端起源学说已被学术界广泛接受^[20], 作为盆腔浆液性癌的组成部分, HGSOC 为继发病。为更直观地观察所研究蛋白从高级别浆液性癌前驱病变到浸润癌的表达变化以及肿瘤生长环境对本研究的影响, 我们设立输卵管高级别浆液性癌这一分组。不同于传统意义上的原位癌, STIC 实质为早期癌, 肿瘤细胞间连接松散, 浸润并非肿瘤播散的必要条件, 有证据表明, 仅有 STIC 的患者腹腔冲洗液可见到肿瘤细胞^[21]。STIC 与 HGSOC 具有相同的形态、基因学改变及表型^[22], 由此反映出的二者间的克隆性可能是 3 个蛋白在 STIC 和 HGSOC 中表达无显著差异的合理解释之一; 同时显示从输卵管到卵巢肿瘤生长环境的变化对本组研究蛋白的表达可能无影响。因样本量少、个别 HGSOC 前驱病变组织范围较小等不足, 本研究结论有一定局限性。

综上, 笔者推测在 HGSOC 中, SRSF2 的表达降低可能抑制 HGSOC 肿瘤细胞凋亡, SRSF2 和

HMGA2 可能协同参与调控 HGSOc 肿瘤细胞凋亡。更深入更系统性的机制研究有助于丰富肿瘤研究思路,对卵巢癌诊断及靶向治疗提供新的切入点。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(2):115
- [2] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(4):271
- [3] Lee Y, Miron A, Drapkin R, et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube[J]. J Pathol, 2007,211(1):26
- [4] Sebestyén E, Zawisza M, Eyraas E. Detection of recurrent alternative splicing switches in tumor samples reveals novel signatures of cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(3):1345
- [5] Latorre E, Harries L W. Splicing regulatory factors, ageing and age-related disease[J]. Ageing Res Rev, 2017,(36): 165
- [6] Luo C, Cheng Y, Liu Y, et al. SRSF2 Regulates Alternative Splicing to Drive Hepatocellular Carcinoma Development [J]. Cancer Res, 2017, 77(5):1168
- [7] Kędzierska H, Poplawski P, Hoser G, et al. Decreased expression of SRSF2 splicing factor inhibits apoptotic pathways in renal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2016,17(10):1598
- [8] Tan E J, Kahata K, Idås O, et al. The high mobility group A2 protein epigenetically silences the Cdh1 gene during epithelial -to -mesenchymal transition[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(1): 162
- [9] Mahajan A, Liu Z, Gellert L, et al. HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma [J]. Mod Pathol, 2010, 23(5): 673
- [10] 银铎,刘彤,陆景明. caspase3 表达及其与卵巢上皮性肿瘤组织细胞凋亡和增殖的关系[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(6):622
- [11] Lee J M, Nobumori C, Tu Y, et al. Modulation of LMNA splicing as a strategy to treat prelamina A diseases[J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1592
- [12] Hahn C N, Venugopal P, Scott H S, et al. Splice factor mutations and alternative splicing as drivers of hematopoietic malignancy[J]. Immunol Rev, 2015, 263(1): 257
- [13] Iborra S, Hirschfeld M, Jaeger M, et al. Alterations in expression pattern of splicing factors in epithelial ovarian cancer and its clinical impact[J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23(6): 990
- [14] Milena S N, Monica S, Alessandra D A, et al. SRSF2 mutations in epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Break News, 2017, 5(3): 25
- [15] Aubrey B J, Kelly G L, Janic A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53 -mediated tumour suppression?[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 104
- [16] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma[J]. Nature, 2011, 474(7353): 609
- [17] Natarajan S, Hombach-Klonisch S, Dröge P, et al. HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-CHK1 signaling complex in human cancer cells[J]. Neoplasia, 2013, 15(3): 263
- [18] Wu J, Wei J J. HMGA2 and high-grade serous ovarian carcinoma[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(10): 1155
- [19] Chen L, Chen J Y, Huang Y J, et al. The augmented R-Loop is a unifying mechanism for myelodysplastic syndromes induced by high-risk splicing factor mutations[J]. Mol Cell, 2018, 69(3): 412
- [20] Karnezis A N, Cho K R, Gilks C B, et al. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(1): 65
- [21] Haldar K, Crawford R. The role of peritoneal cytology at risk - reducing salpingo-oophorectomy(RRSO) in women at increased risk of familial ovarian/tubal cancer: Is the evidence strong enough?[J]. Gynecol Oncol, 2013,128(1): 148
- [22] Labidi -Galy S I, Papp E, Hallberg D, et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1093

(2018-09-25 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅