

胃 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002297

SOX9 蛋白在胃癌组织中的表达及与临床病理特征和预后的关系

张利利¹, 张超贤¹, 靳玉红², 张彩凤¹, 王新菲², 韩 宇¹, 赵英政³(1. 新乡医学院第一附属医院消化内科, 新乡 453003; 2. 新乡医学院第一附属医院内镜科, 新乡 453003;
3. 新乡医学院公共卫生学院, 新乡 453003)

【摘要】目的:探讨 SOX9 在胃癌组织中的表达变化及与患者临床病理特征和预后的关系。**方法:**收集 2012 年 6 月到 2017 年 6 月来新乡医学院第一附属医院接受治疗的 180 例胃癌患者临床病例资料。收集患者术后胃癌组织和癌旁组织, 采用免疫组化染色检测 SOX9 蛋白的表达水平, 并分析 SOX9 蛋白水平与胃癌患者临床病理特征、预后和预后因素的关系。**结果:**免疫组化染色结果显示, SOX9 蛋白胃癌组织和癌旁组织中主要表达于细胞核中。180 例胃癌组织和癌旁组织中 SOX9 蛋白表达阳性分别为 154 例 (85.56%) 和 34 例 (18.89%), 两者 SOX9 蛋白表达阳性比较差异具有统计学意义 ($\chi^2=160.317, P=0.000$)。SOX9 蛋白表达与临床分期、肿瘤分化程度、是否淋巴结转移及浸润侵及肌层等指标均相关 ($\chi^2=6.868, P=0.009$; $\chi^2=9.554, P=0.002$; $\chi^2=30.456, P=0.000$; $\chi^2=29.738, P=0.000$)。SOX9 蛋白表达阳性组患者中位无进展生存期和总生存期明显低于表达阴性患者, 差异有统计学意义 ($\log\text{-rank}=3.193, P=0.015$; $\log\text{-rank}=5.109, P=0.009$)。Cox 比例风险回归模型显示, SOX9 蛋白表达水平是影响患者术后总生存期和无进展生存期的独立风险因素 ($P=0.009, P=0.006$)。**结论:**SOX9 蛋白表达水平与胃癌患者临床病理特征和预后密切相关, 可作为临床胃癌诊断的辅助标记物。

【关键词】SOX9; 胃癌; 临床病理特征; 预后**【中图分类号】**R735.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-05-28

Expression of SOX9 in gastric cancer tissues and its relationship with clinicopathological features and prognosis

Zhang Lili¹, Zhang Chaoxian¹, Jin Yuhong², Zhang Caifeng¹, Wang Xinfei², Han Yu¹, Zhao Yingzheng³

(1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University;

2. Department of Endoscopy, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University;

3. School of Public Health, Xinxiang Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression changes of SOX9 in gastric cancer tissues and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis of patients with gastric cancer. **Methods:** The clinical data of 180 patients with gastric cancer treated in our hospital from June 2014 to June 2017 were collected. The expression of SOX9 protein in the patients' gastric cancer tissues and adjacent normal tissues were detected using immunohistochemical staining. The relationship between SOX9 protein level and clinicopathological features, prognosis and prognostic factors of patients with gastric cancer was analyzed. **Results:** Immunohistochemical staining showed that SOX9 protein was mainly expressed in the nucleus of gastric cancer and adjacent tissues. The expression of SOX9 protein in 180 gastric cancer tissues and adjacent tissues was 154 (85.56%) and 34 (18.89%), respectively. The difference in SOX9 protein expression between the two groups was statistically significant ($\chi^2=160.317, P=0.000$). The expression of SOX9

作者介绍: 张利利, Email: 15836035449@126.com,

研究方向: 消化道肿瘤的发病机制及肝纤维化的发病机制与防治。

通信作者: 赵英政, Email: yingzhengzhao@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81773399)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190925.1351.002.html>

(2019-09-26)

protein was correlated with clinical stage, degree of differentiation, lymph node metastasis and invasion of muscular layer ($\chi^2=6.868, P=0.009$; $\chi^2=9.554, P=0.002$; $\chi^2=30.456, P=0.000$; $\chi^2=29.738, P=0.000$). The median progression-free survival and total survival of patients with positive SOX9 expression were significantly lower than those of patients with negative expres-

sion(log-rank=3.193, $P=0.015$;log-rank=5.109, $P=0.009$). In Cox proportional risk regression model,the expression of SOX9 protein was an independent risk factor affecting the overall survival and progression-free survival($P=0.009$, $P=0.006$). **Conclusion:** The expression level of SOX9 protein is closely related to the clinicopathological characteristics and prognosis of gastric cancer patients, and can be used as an auxiliary marker in the diagnosis of gastric cancer.

[Key words]SOX9;gastric cancer;clinicopathological features;prognosis

胃癌是临床常见的消化道恶性肿瘤类型之一。其发病率和死亡率高,已经成为严重影响人类健康的疾病^[1-2]。在我国,胃癌的发病率和致死率高居第2位,而且发现的胃癌大多数为进展期,诊疗效果较差,5年总生存率仅30%左右^[3]。因此探讨胃癌的发病机制和筛选用于胃癌早期诊断的生物标记物对诊断和治疗胃癌具有重要临床意义。前期研究差异表达分析显示,SOX9蛋白在胃癌及癌旁组织中呈差异表达。SOX9广泛存在于机体中,参与许多生命过程,如心脏和睾丸特定细胞的增殖和分化,肠道和肝脏等器官前体细胞或干细胞的稳态等^[4-5]。近年研究发现SOX9蛋白与肿瘤的发生密切相关,并参与肿瘤的转移和浸润^[6-7]。目前研究显示SOX9蛋白在前列腺癌、胶质母细胞瘤、肝细胞癌、结直肠癌和乳腺癌组织中均异常表达,且在不同肿瘤组织中的表达水平存在差异^[8-10]。SOX9在胃癌组织中表达水平如何变化,与胃癌患者临床病理学及预后是否有关目前尚不完全清楚。本研究旨在探讨这一问题,为临床胃癌诊断和治疗提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 一般资料

选取2014年6月到2017年6月在新乡医学院第一附属医院接受治疗的180例行胃癌根治术的患者作为研究对象。其中男102例,女78例;年龄42~77岁,中位年龄56岁。肿瘤部位:贲门胃底部58例,胃体72例,幽门部60例。肿瘤直径:<5 cm 105例,≥5 cm 75例。分化程度:高分化30例,中分化65例,低分化85例。淋巴结转移:转移103例,未转移77例。TNM分期:I~II期82例,III~IV期98例。未侵犯肌层72例,侵入深肌层108例。本研究受本院伦理委员会许可并监督。所有患者均签署知情同意书。

1.2 纳入标准

所有患者均为胃腺癌;所有患者均未接受过放化疗及生物靶向或者免疫治疗;所有患者病理组织均可进行免疫组织化学检测;患者病理资料和随访资料完整。

1.3 排除标准

接受过放疗、化疗及其他生物治疗的患者;临床资料和随访资料缺失患者;保留肿瘤标本组织染色效果不佳的患者。

1.4 实验试剂和仪器

SOX9小鼠单克隆抗体和HRP标记的羊抗小鼠二抗购自美国Santa Cruz公司;免疫组化染色试剂盒和二氨基联苯胺显色液均购自中国福州迈新生物科技有限公司;组织切片仪购自德国徕卡公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.5 免疫组织化学

胃癌组织和癌旁组织采用石蜡包埋,采用切片机切成8 μm,黏附在载玻片上,将玻片置于烤箱中,68℃处理20 min;然后常规二甲苯脱蜡,每次5 min,紧接着用梯度酒精水化,每个浓度梯度3 min,然后蒸馏水浸洗3次,每次3 min。用3%过氧化氢37℃孵育10 min,PBS洗涤3次,每次5 min;然后将玻片置于0.01 mol/L柠檬酸盐溶液的烧杯中,煮沸,抗原修复15 min,自然冷却20 min,用蒸馏水浸洗3次,每次5 min;用10%山羊血清37℃封闭10 min,甩去封闭液,滴加SOX9小鼠单克隆抗体(1:250),4℃过夜孵育,次日回温至室温,用PBS洗涤3次,每次5 min,滴加100 μL生物素标记的二抗至组织上,37℃孵育1 h,PBS洗涤3次,每次5 min。然后采用DAB显色,苏木素染色3 min后,自来水冲洗,1%盐酸酒精分化,氨水返蓝后脱水透明封片,采用显微镜观察SOX9蛋白的表达。

1.6 免疫组化评定方法

免疫组化由2位资深病理科医生进行判定,采用半定量法(染色阳性细胞数比例与染色强度等级之积)进行分析。在高倍镜选择10个视野,随机选取100个细胞计算阳性细胞的百分比。阳性细胞<10%为0,10%~25%为1,26%~50%为2,51%~75%为3,76%~100%为4。根据染色强度,无着色为0,浅棕色为1,棕色为2,深棕色为3。根据等级之乘积,<6为阴性表达,≥6为阳性表达。

1.7 观察指标

分析胃癌组织和癌旁组织中SOX9蛋白的表达水平,并分析胃癌组织中SOX9蛋白的表达水平与临床病理的关系。同时分析随访资料,分析累计无病生存率和总体生存率。

1.8 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件分析,计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数数据比较采用卡方检验,计量数据比

较采用方差分析,累积生存率和复发率比较采用 log-rank 进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 胃癌组织中 SOX9 蛋白的表达分析

免疫组化结果如图 1 所示,SOX9 蛋白质主要表达于胃癌组织和癌旁组织的细胞核中。180 例胃癌患者 SOX9 蛋白表达阳性 154 例,占 85.56%;阴性 26 例,占 14.44%;癌旁组织 SOX9 蛋白表达阳性 34 例,占 18.89%;阴性 146 例,占 81.11%。胃癌组织和癌旁组织 SOX9 蛋白表达阳性率比较具有统计学意义($\chi^2=160.317, P=0.000$)。

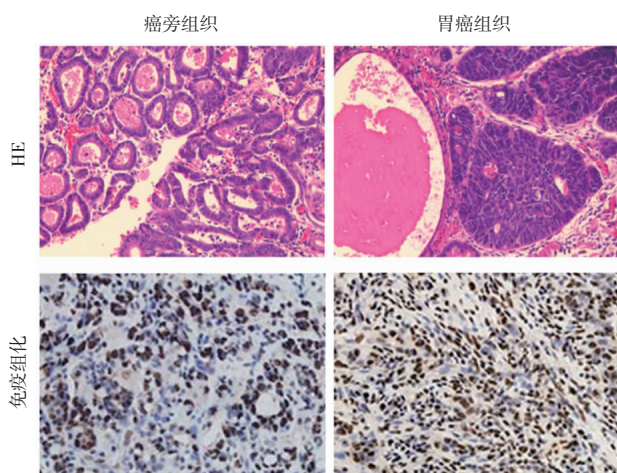


图 1 免疫组化和 HE 染色分析癌旁组织和胃癌组织中 SOX9 蛋白质表达水平 (100 ×)

2.2 胃癌组织中 SOX9 与临床病理特征的关系

临床分期 III~IV 期、肿瘤分化程度低、伴有淋巴结转移以及侵及肌层的患者肿瘤组织 SOX9 蛋白表达明显高于临床分期 I~II 期、肿瘤分化程度高、无淋巴结转移以及无侵及肌层的患者,差异有统计学意义($\chi^2=6.868, P=0.009; \chi^2=9.554, P=0.002; \chi^2=30.456, P=0.000; \chi^2=29.738, P=0.000$)。而患者年龄、性别、肿瘤位置和肿瘤大小对胃癌组织中 SOX9 蛋白表达差异无统计学意义($\chi^2=0.941, P=0.332; \chi^2=0.941, P=0.627; \chi^2=0.224, P=0.612; \chi^2=0.128, P=0.720$) (表 1)。不同分化和不同分期 SOX9 蛋白免疫组化结果如图 2 所示。

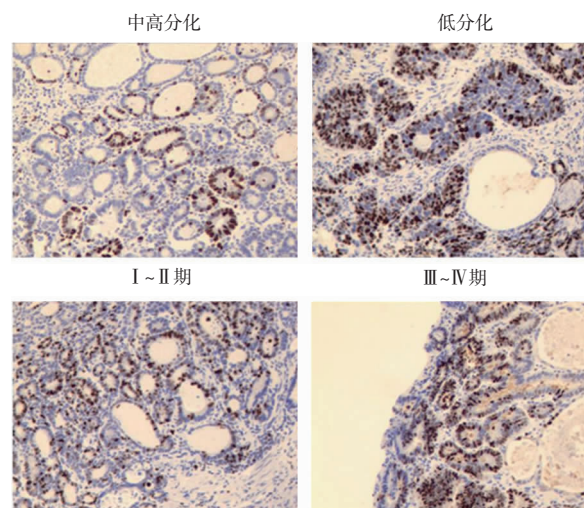


图 2 不同分化程度和不同临床分期胃癌组织中 SOX9 蛋白的表达水平分析

表 1 循环肿瘤细胞水平与患者临床病理特征的关系

病理特征		例数 (n)	阳性例数	阳性比例 (%)	χ^2 值	P 值
性别	男	102	85	83.33	0.941	0.332
	女	78	69	88.46		
年龄 (岁)	<60	89	75	84.27	0.236	0.627
	≥ 60	91	79	86.81		
肿瘤直径 (cm)	<5	105	89	84.76	0.128	0.720
	≥ 5	75	65	86.67		
分化程度	中/高分化	95	74	77.89	9.554	0.002
	低分化	85	80	94.12		
淋巴转移	是	103	101	98.06	30.456	0.000
	否	77	53	68.83		
临床分期	I~II	82	64	78.05	6.868	0.009
	III~IV	98	90	91.84		
肿瘤位置	贲门胃底部	58	48	82.76	0.224	0.612
	胃体	72	56	77.78		
	幽门部	60	50	83.33		
侵及肌层	否	72	49	68.06	29.738	0.000
	是	108	105	97.22		

2.3 随访和生存情况分析

本研究对 180 例患者进行随访,随访时间 12~84 个月,随访率为 100%。SOX 阳性组患者和阴性患者的中位无进展生存期分别为 25(16.4,28.7)个月和 36(27.3,42.9)个月,两者比较差异有统计学意义(log-rank $\chi^2=3.193$, $P=0.015$)。SOX 阳性组患者和阴性患者总生存期分别为 51(43.1,78.7)个月和 89(65.2,102.3)个月,2 组比较差异有统计学意义(log-rank $\chi^2=5.109$, $P=0.009$)。

2.4 影响胃癌生存的危险因素分析

以患者的性别、年龄、肿瘤位置、分化程度、是否淋巴转移、是否 SOX9 表达阳性、TNM 分期和是否侵犯肌层等作为变量建立 Cox 比例风险回归模型,发现肿瘤分化程度、SOX9 表达阳性、TMN 分期、是否淋巴结转移和侵犯肌层等指标与总生存率和无进展生存期均存在相关性($P=0.015$ 、 $P=0.032$ 、 $P=0.018$ 、 $P=0.027$ 、 $P=0.009$ 、 $P=0.009$ 、 $P=0.020$ 、 $P=0.011$ 、 $P=0.031$ 、 $P=0.006$)。此外,SOX9 蛋白表达水平是影响患者术后总生存期和无进展生存期的独立风险因素($P=0.009$ 、 $P=0.006$)(表 2)。

3 讨论

胃癌的主要临床表现为远期生存状况低下、临床治疗效果差。目前关于胃癌发生发展和转移的分子机制尚不完全清楚,因此进一步探讨胃癌的发生、发展、浸润、转移及复发等过程的作用机制,寻找评价胃癌进展和预后的重要辅助标志,为胃癌提供新的治疗靶点,进而达到提早诊断,降低胃癌患者的死亡率。抑癌基因和癌基因的失调对恶性肿瘤细胞的生长、增殖及转移提供了生长的土壤,通过检测这些基因的蛋白水平,有望找到胃癌诊断的标记物 and 治疗的靶点。

SOX9 蛋白是 SOX 基因家族的一员,是一种核转录因子,在生理和病理过程中扮演着重要角色^[11-12]。在生理方面,SOX9 蛋白对软骨形成、性别分化决定、神经胶质、心脏发育等过程发挥重要作用。在病理方面,SOX9 蛋白与骨骼发育异常、椎间盘退变、糖尿病和肿瘤等疾病的发生密切相关^[13-14]。在一些肿瘤中表达异常增加,充当癌性基因的作用,如肺癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌。而在另一些肿瘤中表达异常降低,充当抑癌基因的作用,如黑色素瘤和宫颈癌^[15-16]。SOX9 在肿瘤中的异常表达与低的生存率、不良预后及对某些化疗药物的敏感性降低有关。

本研究对胃癌组织中 SOX9 蛋白的表达水平采用免疫组织化学进行分析发现,180 例患者蛋白表达阳性 154 例,阳性率高达 85.56%,这一结果提示 SOX9 蛋白在胃癌组织中异常高表达,可能与胃癌的发生发展及转移等密切相关。与此同时,Ⅲ~Ⅳ级临床分期、分化程度低、伴有淋巴结转移及浸润至肌层的患者胃癌组织中 SOX9 蛋白表达水平明显高于 I~Ⅱ级分期、中高级分化程度、无淋巴结转移及未浸润深及肌层的患者,这一结果提示 SOX9 蛋白在胃癌组织中的高表达参与了胃癌的发生,同时也参与了胃癌的恶性进展,因此 SOX9 蛋白有望成为胃癌分子靶向治疗的靶点,将为胃癌治疗提供新的途径。

本研究分析了 SOX9 蛋白表达水平与胃癌患者预后的关系,发现 SOX9 高表达胃癌患者无进展生存期和总生存期明显低于 SOX9 低表达患者。此外,Cox 比例风险模型分析显示 SOX9 蛋白表达水平是影响胃癌患者生存的独立因素之一。这一结果提示

表 2 影响结直肠癌患者生存因素的 Cox 比例风险回归分析

临床病理特征	总生存期		无进展生存期	
	RR 值 (95%CI)	P 值	RR 值 (95%CI)	P 值
性别	0.913 (0.791 ~ 1.096)	0.130	0.985 (0.916 ~ 1.018)	0.219
年龄	0.791 (0.614 ~ 23.199)	0.493	0.909 (0.222 ~ 5.082)	0.523
肿瘤直径	2.521 (1.188 ~ 3.028)	0.410	3.071 (0.832 ~ 8.122)	0.445
分化程度	1.434 (0.535 ~ 2.765)	0.016	6.335 (1.313 ~ 7.131)	0.007
淋巴转移	3.034 (0.365 ~ 17.327)	0.032	6.512 (1.765 ~ 12.576)	0.025
临床分期	6.754 (0.828 ~ 39.731)	0.020	5.021 (0.622 ~ 27.936)	0.017
肿瘤位置	0.776 (0.076 ~ 17.082)	0.821	0.714 (0.123 ~ 3.918)	0.131
侵入肌层	5.118 (1.043 ~ 12.445)	0.014	4.912 (1.216 ~ 15.326)	0.021
SOX9	4.139 (1.184 ~ 10.298)	0.009	6.910 (1.014 ~ 12.663)	0.006

胃癌组织中 SOX9 蛋白的表达水平与患者的预后密切相关,可作为胃癌预后诊断的重要分子。

对于 SOX9 分子机制的研究,目前在不同肿瘤组织中表现出不同的角色。如在非小细胞肺癌中,SOX9 通过作用于 Wnt/ β -catenin 信号通路调节肿瘤细胞的上皮间质转化^[17]。在肝癌细胞中,SOX9 可促进肿瘤细胞的增殖和肿瘤细胞的干细胞特性,促进肿瘤的恶化^[18]。SOX9 蛋白在胃癌组织中表达水平明显升高,与患者临床分期、淋巴结转移、分化程度和是否侵及肌层等临床病理特征和预后密切相关,可作为临床评估患者预后的辅助指标。后续工作需进一步分析 SOX9 蛋白对胃癌细胞增殖、细胞迁移及上皮间质转化的影响,以探讨 SOX9 蛋白对胃癌肿瘤发生发展和转移的影响。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, 23(5): 700-713.
- [3] 翟崇宇, 陈俊强. 整合素与胃癌侵袭转移及预后关系的研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2017, 24(9): 1145-1149.
- [4] Chen SY, Lin SJ, Tsai LP, et al. Sex-reversed acampomelic campomelic dysplasia with a homozygous deletion mutation in SOX9 gene[J]. Urology, 2012, 79(4): 908-11.
- [5] Pop R, Zaragoza MV, Gaudette M, et al. A homozygous nonsense mutation in SOX9 in the dominant disorder campomelic dysplasia: a case of mitotic gene conversion[J]. Hum Genet, 2005, 117(1): 43-53.
- [6] Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe[J]. Am J Pathol, 2009, 174(5): 1588-1593.
- [7] Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. Dev Cell, 2008, 14(6): 818-829.
- [8] Bastide P, Darido C, Pannequin J, et al. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium[J]. J Cell Biol, 2007, 178(4): 635-648.
- [9] Matheu A, Collado M, Wise C, et al. Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9[J]. Cancer Res, 2012, 72(5): 1301-1315.
- [10] Jiang SS, Fang WT, Hou YH, et al. Upregulation of SOX9 in lung adenocarcinoma and its involvement in the regulation of cell growth and tumorigenicity[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17): 4363-4373.
- [11] Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators[J]. Dev Bio, 2000, 227(2): 239-255.
- [12] Furumatsu T, Asahara H. Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex[J]. Acta Med Okayama, 2010, 64(6): 351-357.
- [13] Wada Y, Nishimura G, Nagai T, et al. Mutation analysis of SOX9 and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia and acampomelic campomelic dysplasia[J]. Am J Med Genet A, 2009, 149A(12): 2882-2885.
- [14] Zalzman M, Gupta S, Giri RK, et al. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(12): 7253-7258.
- [15] Wang H, Leav I, Ibaragi S, et al. SOX9 is expressed in human fetal prostate epithelium and enhances prostate cancer invasion[J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1625-1630.
- [16] Thomsen MK, Ambrosine L, Wynn S, et al. SOX9 elevation in the prostate promotes proliferation and cooperates with PTEN loss to drive tumor formation[J]. Cancer Res, 2010, 70(3): 979-987.
- [17] Huang JQ, Wei FK, Xu XL, et al. SOX9 drives the epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 143.
- [18] Richtig G, Aigelsreiter A, Schwarzenbacher D, et al. SOX9 is a proliferation and stem cell factor in hepatocellular carcinoma and possess widespread prognostic significance in different cancer types[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0187814.

(责任编辑: 冉明会)