

## SERPINA 3 在舌鳞状细胞癌组织中表达及临床意义

王圣娣<sup>1</sup> 熊 莉<sup>1</sup> 郭 艳<sup>2</sup>

( 1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院 湖北理工学院附属医院 口腔科 湖北 黄石 435000; 2. 中国医科大学第四医院 口腔科 辽宁 沈阳 110000)

**【摘要】**目的: 探讨 SERPINA 3 在舌鳞状细胞癌组织中表达及临床意义。方法: 选取 2010 年 3 月~2012 年 4 月在我院口腔科择期行手术治疗的 63 例舌鳞状细胞癌(TSCC) 患者的肿瘤组织, 同期留取 45 例因舌外伤或舌部良性病变行手术切除的正常舌黏膜组织作为对照组, 分别利用免疫组化法和实时荧光定量 PCR 技术检测 TSCC 和对照组组织中 SERPINA 3 蛋白和基因表达, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 利用 Cox 比例风险回归模型分析 TSCC 患者生存的影响因素。结果: TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白阳性表达率高于对照组, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 15.429, P = 0.000$ ); TSCC 组织中 SERPINA 3 mRNA 相对表达量高于对照组, 差异有统计学意义( $t = 44.711, P = 0.000$ ); TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白和基因表达与分化程度、TNM 分期和颈淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ); Kaplan-Meier 生存分析结果显示 SERPINA 3 蛋白阳性表达组患者 5 年总体生存率和平均生存时间均高于阴性表达组, Log-Rank 检验差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.830, P = 0.028$ ); Cox 比例风险回归模型分析结果显示, SERPINA 3 蛋白阳性表达、TNM 分期 III~IV 期、发生颈淋巴结转移是 TSCC 患者预后的独立影响因素。结论: TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白和基因呈高表达, 且与分化程度、TNM 分期和颈淋巴结转移有关, 是影响患者预后的因素之一。

**【关键词】**舌鳞状细胞癌; SERPINA 3; 表达; 预后

**【中图分类号】**R 739.8 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.021

## Expression and clinical implications of SERPINA 3 gene in squamous cell carcinoma of tongue

WANG Shengdi, XIONG Li, GUO Yan

Department of Stomatology, Huangshi City Central Hospital of East Hubei Medical Group, Huangshi 435000, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the expression and clinical implications of SERPINA 3 gene in squamous cell carcinoma of tongue (TSCC). **Methods:** Sixty-three cases of TSCC undergoing elective surgery in our department were included from March 2010 to April 2012, and normal tongue mucosal tissues were obtained in another 45 patients undergone surgery in the corresponding period due to tongue trauma or tongue benign lesions (control group). Immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative PCR were performed to detect the expression of SERPINA 3 protein and gene in the samples of TSCC and the controls. Kaplan-Meier method was used to assess the survival, and Cox proportional hazards regression model was used to analyze the factors affecting the survival of patients with TSCC. **Results:** The positive expression rate of SERPINA 3 was higher in TSCC patients than that in the control group ( $\chi^2 = 15.429, P = 0.000$ ), and the relative expression level of SERPINA 3 mRNA was also higher in TSCC patients than that of the controls ( $t = 44.711, P = 0.000$ ). Expression of SERPINA 3 protein and gene was related to the degree of differentiation, TNM stage and cervical lymph node metastasis in patients of TSCC ( $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed that the overall 5-year survival rate and mean survival year were higher in SERPINA 3 positive expression group were higher than those in the negative expression group, and difference was significant by Log-rank test ( $\chi^2 = 4.830, P = 0.028$ ). Cox proportional hazards regression model analysis showed that SERPINA 3 protein positive expression, TNM stage in III-IV, cervical lymph node metastasis were independent factor for estimating the prognosis in patients with TSCC. **Conclusion:** SERPINA 3 protein and gene are highly expressed in patients of TSCC, and associated with the degree of differentiation, TNM stage and cervical lymph node metastasis, which can be important factors affecting the prognosis of such patients.

**【Key words】** squamous cell carcinoma; tongue; SERPINA 3; expression; prognosis

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(2013021094)

收稿日期: 2018-01-01

作者简介: 王圣娣(1979-), 女, 主治医师, (电话) 18062900335, (电子信箱) 402767260@qq.com;

熊 莉, 女, 主任医师, (电子信箱) 974252372@qq.com, 通信作者。

舌鳞状细胞癌(简称舌癌,tongue squamous cell carcinoma,TSCC)作为口腔科常见的恶性肿瘤,发病率呈不断上升趋势<sup>[1]</sup>,由于该肿瘤生长快、侵袭力强,多数患者临床确诊时已发生转移,是导致患者预后不佳的主要因素<sup>[2]</sup>,近年来虽然临床诊疗手段不断进步,但患者5年生存率提高有限<sup>[3]</sup>。研究发现<sup>[4]</sup>,TSCC发生进展涉及多个癌基因或抑癌基因。但其具体发生机制尚未完全清楚。因此,深入探讨TSCC发生的分子机制对改善患者预后具有重要意义。丝氨酸蛋白酶抑制因子A类3(serpin peptidase inhibitor clade A member 3,SERPINA 3)作为丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族重要成员,是一种急性炎症反应蛋白,在炎症反应及细胞增殖、凋亡、黏附等过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>,与多种恶性肿瘤发生及进展关系密切<sup>[6]</sup>。本研究拟检测TSCC组织中SERPINA 3蛋白表达,探讨其与临床病理特征之间的关系及对预后的影响,以期对TSCC机制研究提供基础资料。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2010年3月~2012年4月在黄石中心医院口腔科择期行手术治疗的63例TSCC患者,均经术后病理学检查确诊,术前均未行放疗治疗。其中,男性38例,女性25例,年龄41~76岁,平均年龄(53.7±10.2)岁,分化程度:低分化7例,中分化36例,高分化20例;TNM分期:I期12例,II期23例,III期17例,IV期11例;发生颈淋巴结转移39例。同期留取45例因舌外伤或舌部良性疾病行手术切除的正常舌黏膜组织作为对照,其中男性25例,女性20例,年龄38~75岁,平均年龄(52.5±9.8)岁,两组患者性别、年龄差异无统计学意义( $P>0.05$ ),均衡可比。所有入选对象均由同一医院同一组医师完成手术操作。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者均行知情同意。

1.2 主要试剂和设备 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,兔抗人SERPINA 3多克隆抗体购自美国Abcam公司,总RNA提取试剂盒(Trizol法)购自美国Invitrogen公司,反转录和PCR试剂盒购自美国Promega公司,SERPINA 3和内参引物均由上海生工生物公司设计合成,实时荧光定量PCR仪购自德国AJ公司。

### 1.3 方法

1.3.1 免疫组化法检测TSCC和对照组的组织中SERPINA 3蛋白表达 分别将TSCC和对照组的组织用甲醛固定,石蜡包埋,切片,厚度约3 μm,脱蜡,梯度乙醇至水,置于10 mmol/L柠檬酸盐缓冲液

(pH 6.0)中,95℃水浴20 min,加入0.3%过氧化氢15 min,以阻断内源性过氧化物酶,PBS冲洗3次,用1%山羊血清于室温下封闭60 min,将一抗兔抗人SERPINA 3多克隆抗体(1:1000稀释)加入,4℃过夜孵育,加入二抗,37℃孵育60 min,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片,以PBS代替一抗作为对照。结果判定:SERPINA 3主要表达于细胞质,以胞质中出现黄色或棕黄色染色为阳性。随机取5个高倍视野,以染色强度和阳性细胞比例综合评价<sup>[7]</sup> ①染色强度:0分,无染色;1分,淡黄色;2分,黄色;3分,棕黄色;②阳性细胞比例:0分,<5%;1分,5%~25%;2分,26%~50%;3分,51%~75%;4分,≥75%;③根据染色强度和阳性细胞比例得分之和进行判定:0~7分,阴性(-),2~7分,阳性(+)。所有切片均由2位病理科具有主任医师职称的医师单独双盲完成,并取得一致结果。

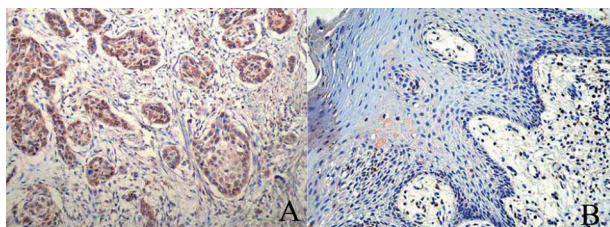
1.3.2 实时荧光定量PCR技术检测TSCC和对照组组织中SERPINA 3基因表达 取TSCC或对照组组织,研磨后加入细胞裂解液,提取细胞中总RNA,并用紫外分光光度计检测纯度。用反转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA,以cDNA为模板,用PCR试剂盒对目的基因进行扩增。SERPINA 3基因序列:上游为5'-AAGAGGTAGAGGATAGGG-3',下游为5'-ATACTATAAACACTCTCCTCT-3';GAPDH基因:上游为5'-AAGATCATCAGCAATGCCTCC-3',下游为5'-TGGACTGTGTCATGAGTCCTT-3'。PCR反应条件:95℃ 5 min,92℃ 30 s,92℃ 30 s,60℃ 30 s,75℃ 30 s,连续进行38次循环,每个样品设3个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TSCC和对照组组织中SERPINA 3 mRNA相对表达量。

1.3.3 病例随访 对所有患者治疗后进行随访,随访形式包括电话、门诊,随访中失访3例,随访截止至2017年4月30日。

1.4 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差表示,计数资料采用率值表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验,生存分析采用Kaplan-Meier法,利用Cox比例风险回归模型分析TSCC患者生存的影响因素, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组SERPINA 3的蛋白表达 TSCC组织中SERPINA 3蛋白阳性表达率为71.43%(45/63),对照组则为33.33%(15/45),差异有统计学意义( $\chi^2=15.429$ , $P=0.000$ ),见图1。



A.SERPINA 3 蛋白在 TSCC 组织中呈高表达; B.SERPINA 3 蛋白在对照组组织中呈低表达 SP×200。

图1 两组 SERPINA 3 蛋白表达

2.2 两组 SERPINA 3 的基因表达 TSCC 组织中 SERPINA 3 mRNA 相对表达量为  $2.08 \pm 0.12$ , 对照组则为  $1.16 \pm 0.08$ , 差异有统计学意义 ( $t = 44.711, P = 0.000$ )。

2.3 TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白和基因表达与临床病理特征之间的关系 TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白和基因表达均与性别和年龄无关 ( $P > 0.05$ ), 而与分化程度、TNM 分期和颈淋巴结转移有关 ( $P < 0.05$ ) ,见表 1。

表 1 TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白和基因表达与临床病理特征之间的关系

指标	n	SERPINA 3 蛋白		$\chi^2$	P	SERPINA 3 表达量	t	P
		-	+					
性别								
男性	38	9( 23.68)	29( 76.32)	1.121	0.290	$2.12 \pm 0.14$	1.790	0.078
女性	25	9( 36.00)	16( 64.00)					
年龄/岁								
$\geq 54$	39	10( 25.64)	29( 74.36)	0.431	0.512	$2.05 \pm 0.11$	1.686	0.097
$< 54$	24	8( 33.33)	16( 66.67)					
分化程度								
中低分化	43	8( 18.60)	35( 81.40)	6.593	0.010	$2.29 \pm 0.11$	13.487	0.000
高分化	20	10( 50.00)	10( 50.00)					
TNM 分期								
I ~ II 期	35	14( 40.00)	21( 60.00)	5.040	0.025	$2.02 \pm 0.07$	9.106	0.000
III ~ IV 期	28	4( 14.29)	24( 85.71)					
颈淋巴结转移								
是	39	7( 17.95)	32( 82.05)	5.661	0.017	$2.34 \pm 0.13$	12.403	0.000
否	24	11( 45.83)	13( 54.17)					

2.4 TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白表达对预后的影响 Kaplan-Meier 生存分析结果显示 ,SERPINA 3 蛋白阳性表达组患者 5 年总体生存率为 34.88% ,中位生存时间 36.30 个月 ,阴性表达组则分别为 64.71% 和 51.24 个月 ,Log-Rank 检验差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.830, P = 0.028$ ) ,见图 2。

2.5 TSCC 患者预后影响因素分析 Cox 比例风险回归模型分析结果显示 ,SERPINA 3 蛋白阳性表达、TNM 分期 III ~ IV 期、发生颈淋巴结转移是 TSCC 患者预后的独立影响因素 ,见表 2。

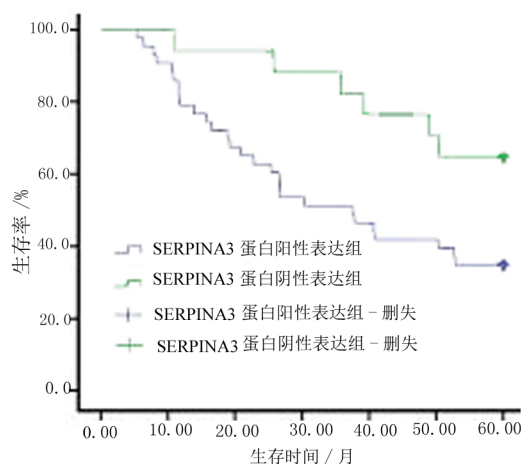


图2 TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白表达对预后的影响

表2 TSCC 患者预后影响因素的 Cox 比例风险回归模型

变量	$\beta$	SE	Wald $\chi^2$	P	HR( 95%CI)
SERPINA 3 蛋白	0.379	0.135	6.986	0.009	1.465( 1.102~1.944)
TNM 分期	1.045	0.419	30.919	0.000	2.851( 1.978~4.110)
颈淋巴结转移	0.679	0.308	12.719	0.000	1.979( 1.361~2.867)

### 3 讨论

TSCC 作为一种侵袭力强、生长迅速、恶性程度高的恶性肿瘤,可导致舌肌运动受限,对患者言语、吞咽、进食等功能造成影响<sup>[8]</sup>,而且该肿瘤早期转移率较高<sup>[9]</sup>,多数患者预后不良。目前,TSCC 发病机制尚未完全清楚,因此,深入探讨影响该肿瘤侵袭、转移的机制对改善患者预后具有重要意义。SERPINA 3 基因位于人染色体 14q32.1,是一种炎症反应相蛋白,在机体发生炎症反应时表达增加具有抗炎功能<sup>[10]</sup>,但一旦出现 SERPINA 3 基因大量异常表达时,可抑制细胞凋亡、减少细胞间黏附,而参与了恶性肿瘤发生及进展过程<sup>[11]</sup>。已有研究表明,其在子宫内膜癌<sup>[12]</sup>、结肠直肠癌<sup>[13]</sup>、肝癌<sup>[14]</sup>等多种恶性肿瘤组织中表达上调。本研究结果显示,TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白阳性表达率和基因表达量均高于对照组,说明 SERPINA 3 在 TSCC 组织中呈高表达,可能参与了 TSCC 发病过程。

本研究结果显示,TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白和基因表达均与分化程度、TNM 分期和颈淋巴结转移有关,中低分化、III~IV 期和发生颈淋巴结转移患者组织中表达量增加,表明 SERPINA 3 可能参与了 TSCC 进展过程,与肿瘤恶性进展及转移过程有关。有研究指出<sup>[15]</sup>,SERPINA 3 高表达与黑色素瘤患者高病死率有关。本研究结果显示,SERPINA 3 蛋白阳性表达组患者 5 年总体生存率和平均生存时间均低于阴性表达组,说明 SERPINA 3 蛋白高表达影响患者预后,Cox 比例风险回归模型分析结果进一步显示,SERPINA 3 蛋白阳性表达是 TSCC 患者预后的独立影响因素,因此,SERPINA 3 蛋白阳性表达可能是患者预后不良的标志。

综上所述,TSCC 组织中 SERPINA 3 蛋白和基因呈高表达,且与分化程度、TNM 分期和颈淋巴结转移有关,是影响患者预后的因素之一,有望成为预测患者预后的生物学标志物。

### 【参考文献】

[1] SUN W ,QIU Z ,TAN W *et al.* The influence of marital status on survival in patients with oral tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget* ,2017 ,8( 47) : 82092-82102.

[2] ALMANGUSH A ,HEIKKINEN I ,MAKITIE AA *et al.* Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Cancer* ,2017 ,117( 6) : 856-866.

[3] CHANG EI ,YU P ,SKORACKI RJ *et al.* Comprehensive analysis of functional outcomes and survival after microvascular reconstruction of glossectomy defects [J]. *Ann Surg Oncol* ,2015 ,22( 9) : 3061-3069.

[4] MURPHY J ,BERMAN DR ,EDWARDS SP *et al.* Squamous cell carcinoma of the tongue during pregnancy: A case report and review of the literature [J]. *J Oral Maxillofac Surg* ,2016 ,74( 12) : 2557-2566.

[5] 贾洪燕. SERPINA 3 与子宫内膜癌关系的研究进展 [J]. *医学综述* ,2015 ,21( 19) : 3509-3511.

[6] YANG GD ,YANG XM ,LU H *et al.* SERPINA 3 promotes endometrial cancer cells growth by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol* ,2014 ,7( 4) : 1348-1358.

[7] 张志刚,倪锋,党建功,等. CXC 趋化因子受体 4 在肾透明细胞癌中的表达及临床意义 [J]. *中华泌尿外科杂志* ,2017 ,38( 2) : 88-91.

[8] 朱零,施歌,陈行素,等. 游离皮瓣修复舌癌术后缺损的感觉功能恢复的研究进展 [J]. *口腔医学* ,2017 ,37( 9) : 858-860.

[9] OMURA K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Oncol* ,2014 ,19( 3) : 423-430.

[10] CHELBI ST ,WILSON ML ,VEILLARD AC *et al.* Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA 3 expression and its association with placental diseases [J]. *Hum Mol Genet* ,2012 ,21( 9) : 1968-1978.

[11] KOTULA E ,BERTHAULT N ,AGRARIO C *et al.* DNA-PKcs plays role in cancer metastasis through regulation of secreted proteins involved in migration and invasion [J]. *Cell Cycle* ,2015 ,14( 12) : 1961-1972.

[12] 杨广东,任渊,张蓉. SERPINA 3 在子宫内膜癌中表达上调的临床意义及功能研究 [J]. *中国癌症杂志* ,2014 ,24( 4) : 284-291.

[13] DIMBERG J ,STRÖM K ,LÖFGREN S *et al.* Expression of the serine protease inhibitor serpinA 3 in human colorectal adenocarcinomas [J]. *Oncol Lett* ,2011 ,2( 3) : 413-418.

[14] SANTAMARIA M ,PARDO-SAGANTA A ,ALVAREZ-ASIAIN L *et al.* Nuclear  $\alpha$ 1-antichymotrypsin promotes chromatin condensation and inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Gastroenterology* ,2013 ,144( 4) : 818-828.

[15] ZHOU J ,CHENG Y ,TANG L *et al.* Up-regulation of SERPINA 3 correlates with high mortality of melanoma patients and increased migration and invasion of cancer cells [J]. *Oncotarget* ,2017 ,8( 12) : 18712-18725.