

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.17.008

基于免疫组化和癌症基因组图谱数据分析的脾酪氨酸激酶 在宫颈癌中的表达研究 *

王柏翠¹ 周 萌¹ 张孜睿卓² 杨童瑶¹ 迪达儿·赛力克¹ 樊 燕¹ 史永华^{2Δ}

(1 新疆医科大学基础医学院 新疆 乌鲁木齐 830000; 2 新疆医科大基础医学院病理学教研室 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的:探讨 Syk 在宫颈癌中的表达及其临床意义。**方法:**应用免疫组化检测 Syk 在宫颈癌、癌前病变(CIN)和相应的正常宫颈组织中的表达。借助 R2 生物信息平台挖掘 Syk 在 TCGA 数据库 305 例宫颈鳞癌中的 mRNA 表达及其与预后的关系。**结果:**免疫组化结果显示, Syk 在宫颈癌巢分化较好的中心区表达较强, 在分化较低的癌巢周边区表达较弱。Syk 染色主要定位在宫颈癌和正常宫颈组织的细胞质和细胞膜, 正常宫颈组织基底细胞无 Syk 表达, 8 例 CIN 组织细胞核中可见 Syk 表达, 但宫颈癌组织细胞核中未见 Syk 表达。Syk 在宫颈癌、CIN 和正常宫颈组织中的阳性率分别是 76%、54%、40%, 三组间的表达差异具有统计学意义 ($P=0.001$)。Syk 在深度浸润和淋巴结转移中表达较强。数据挖掘结果显示, Syk mRNA 在 305 例不同临床分期的宫颈癌中均表达, Syk mRNA 高表达组 219 例, Syk mRNA 低表达组 73 例, 其中 13 例生存数据缺失, Syk 高表达组的患者预后较差。**结论:** Syk 在宫颈癌中的表达提示 Syk 在宫颈癌中具有致癌蛋白的作用, Syk 在某些 CIN 中的核表达可能与更好的预后相关。

关键词: Syk; 免疫组化; 浸润; 数据挖掘; 预后

中图分类号: R-33; R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)17-3244-05

Expression of Syk Proteins in Carcinoma of the Cervix Based on Immunohistochemistry and Data Analysis from the Cancer Genome Atlas *

WANG Bai-cui¹, ZHOU Meng¹, ZHANG Zi-rui-zhuo², YANG Tong-yao¹, Didaer·sailike¹, FAN Yan¹, SHI Yong-hua^{2Δ}

(1 School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China;

2 Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China)

ABSTRACT Objective: Spleen tyrosine kinase (Syk), a non-receptor cytoplasmic tyrosine enzyme, is widely expressed in hematopoietic cells and epithelial ones. In the current study, expression and significance of Syk in cervical cancer was probed. **Methods:** Syk expression in cervical cancer, precancerous lesions (CIN) and corresponding normal cervical tissues was detected by immunohistochemistry. Data mining of Syk expression and its relationship with prognosis was performed in 305 tissue samples of cervical squamous carcinoma in the TCGA database resort to R2 bioinformatics platform. **Results:** Immunohistochemical results showed that Syk showed stronger staining in the highly differentiated central area than in poorly differentiated periphery of cancer nests. Syk staining was mainly located in the cytoplasm and cell membrane of cervical cancer and normal cervical tissue. There was no Syk expression in basal cells of normal cervical tissue. Syk expression was seen in the nuclei of 8 cases of CIN, but there was no Syk expression in the nuclei of cervical cancer. The positive rates of Syk in cervical cancer, CIN and normal cervical tissues were 76%, 54% and 40%, respectively. The expression difference among the three groups was statistically significant ($P=0.001$). Syk expression was higher in deeper invasion, and in lymph node metastasis group. Result of data mining showed that Syk mRNA expressed at different clinical stage of cervical cancer, Syk mRNA was high expression in 219 cases, low expression in 73 cases, and missing survival data in 13 cases, the patients in Syk high expression had worse prognosis. **Conclusions:** The expression of Syk in cervical cancer suggests that Syk plays the role of carcinogenic protein in cervical cancer. The nuclear expression of Syk in some CIN may be related to better prognosis.

Key words: Syk; Immunohistochemistry; Invasion; Data mining; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)17-3244-05

前言

宫颈癌是仅次于乳腺癌的女性生殖系统常见的恶性肿瘤,

发病率和死亡率居女性癌症第四位, 位居前两位的是乳腺癌、肺癌^[1]。中国是宫颈癌高发国家之一, 群体流行病学调查^[2]显示, 宫颈癌的发生具有明显的地域和民族差异, 我国宫颈癌的分布

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81660427); 新疆维吾尔自治区第十五期大学生创新项目(S202010760041)

作者简介: 王柏翠(1998-), 女, 本科在读, E-mail: 936204331@qq.com

Δ 通讯作者: 史永华, 女, 教授, 研究方向: 宫颈癌分子病理, E-mail: z5826711@126.com

(收稿日期: 2022-02-27 接受日期: 2022-03-23)

主要集中在中西部地区,新疆少数民族是宫颈癌的高发人群,子宫颈癌患病率高达 459-622/10 万,其 5 年生存率仅为 49.2%,远低于全国的 67.6% [3]。

脾酪氨酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk) 是一个 72 kDa 的胞浆非受体蛋白酪氨酸激酶,表达在 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和其他血细胞中。Syk 被认为是各种血液癌症和自身免疫疾病的潜在治疗靶点 [4-6]。作为大量癌基因受体共同的下游效应器, Syk 介导各种跨膜受体的下游信号转导 [4], 发挥着促癌作用。Syk 还表达于非造血细胞如上皮、乳腺和肝细胞 [7,8], 调节细胞黏附和血管发育 [9,10]。但是,对 Syk 在实体瘤中的研究却显示出矛盾的结果 -- 在一些癌细胞中 Syk 发挥着促进肿瘤发生发展的作用,而在另外一些癌细胞中却有着肿瘤抑制作用。据报道, Syk 在头颈部鳞癌中高表达,促进癌细胞增殖、迁移和肿瘤生长 [11];但是, Syk 抑制乳腺癌细胞增殖,显示出肿瘤抑制效应 [12]。本次研究旨在探讨 Syk 在宫颈癌中的表达及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

150 例石蜡包埋的宫颈病变组织,收集相关的临床病理信息包括年龄、临床分期、肿瘤直径、病理分级、浸润深度、淋巴结转移等。临床分期根据国际妇产科联盟 (FIGO) 的标准确定。样本均来自新疆医科大学附属医院肿瘤医院 2016 年 11 月至 2019 年 8 月手术切除标本。150 例样本包括宫颈癌、癌前病变 (CIN) 2-3 和正常宫颈组织各 50 例。50 例宫颈癌年龄范围 26-74 岁 (53.1±10.52)。纳入标准:宫颈鳞癌均经病理确诊;无严重并发症;有完整的病理资料。

1.2 免疫组化

应用免疫组化检测 Syk 在宫颈病变中的表达。按照免疫组化的常规操作进行。2 cm 厚的石蜡宫颈组织切片,脱蜡水化,抗原修复后滴加抗 Syk 兔单克隆抗体 (Priteintech, 22206-1-AP; at 1:300) 4 ℃ 过夜,然后二抗室温孵育 (羊抗兔 IgG; 中国北京中杉金桥公司) 30 分钟, DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。Syk 染色由 2 名本校的病理学专家审阅评价。Syk 染色强度分为:阴性 (-)、弱阳性 (1 分)、阳性 (2 分)、强阳性 (3 分)。Syk 阳性细胞 (包括细胞核染色阳性) 染色百分比评分: 0-4 % (-), 5 % -25 % (1 分), 26 %-50 % (2 分), 51 %-75 % (3 分), or 75 % (4 分)。应用染色强度和百分比的综合评分: 阴性 (0-1 分), + (2-3 分), ++ (4-5 分), +++ (6-7 分)。

1.3 TCGA 数据库分析

本研究借助 R2 生物信息平台 (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/R2/main.cgi>) 分析癌症基因组图谱 (The cancer genome atlas, TCGA) 数据库中 305 例宫颈鳞癌样本中 Syk mRNA 的表达水平及其与生存的关系。

1.4 统计学分析

SPSS 22.0 software (Chicago, IL, USA) 进行统计学分析。应用卡方检验或 Fisher 精确检验进行各组间统计学差异分析。Kaplan-Meier 法和 Logrank 检验分析 Syk 表达与生存的关系。P<0.05 有统计学意义。

2 结果

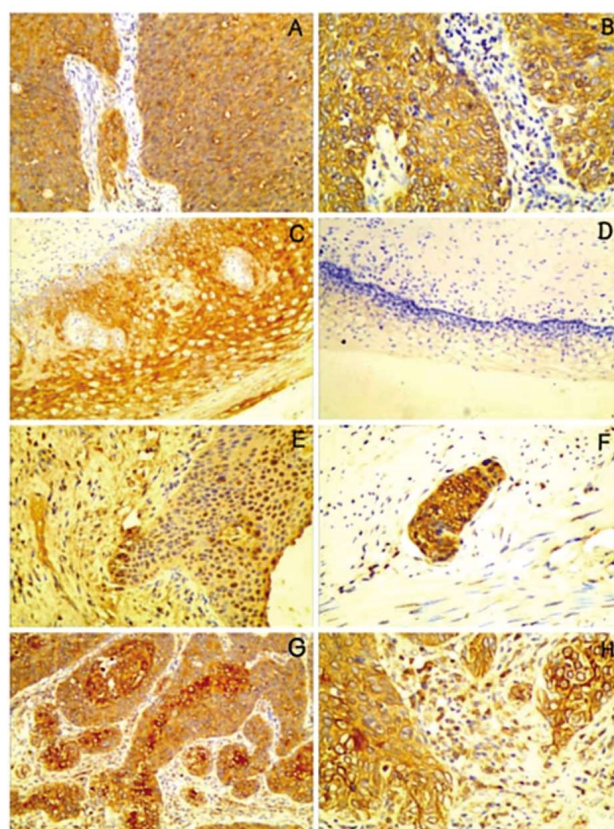


图 1 免疫组化检测 Syk 在宫颈组织中的表达

Fig. 1 The expression of Syk in cervical lesions was detected by immunohistochemistry

A. Syk 表达定位于癌细胞的细胞膜

A. The expression of Syk was partly located in the cancer cell membrane

B. Syk 表达部分定位于癌细胞质

B. The expression of Syk was localized in the cytoplasm of cancer cells

C. Syk 在正常宫颈组织中的表达, 定位于细胞质

C. The expression of Syk in normal cervical tissue was localized in cytoplasm

D. Syk 在正常宫颈组织中的阴性表达

D. The negative expression of Syk in normal cervical tissue

E. Syk 在 CIN 中的表达, 部分定位于细胞核

E. The expression of Syk in CIN was partly located in nucleus

F. Syk 在宫颈鳞癌间质淋巴管中癌栓中的表达, 定位于细胞膜

F. The expression of Syk in stromal lymphatics of cervical squamous cell carcinoma and its localization in cell membrane

G. 在癌巢中央区的癌细胞中, Syk 显示出比癌巢周边区癌细胞更强的表达

G. In cancer cells from the nest in Central District, Syk showed stronger expression than cancer cells from the surrounding area of the nest

H. Syk 表达定位于宫颈间质白细胞

H. Expression of Syk in cervical carcinoma stromal leukocytes

2.1 Syk 蛋白在宫颈病变组织中的定位和表达

免疫组化结果显示, Syk 染色主要定位在宫颈癌和正常宫颈组织的细胞质和细胞膜 (Fig. 1A-1C), 正常宫颈组织基底细胞无 Syk 表达 (Fig. C)。8 例 CIN 组织的细胞核中可见 Syk 染色 (Fig. D), 但宫颈癌组织的细胞核中未见 Syk 表达。Syk 在宫颈癌间质的淋巴管内癌栓中表达 (Fig. E)。在分化相对较高的

癌巢中央区,Syk 显示了较强的染色;在分化相对较低的癌巢周边区,Syk 染色变弱 (Fig. F)。Syk 还表达在宫颈癌间质的白细胞 (Fig. G)。50 例宫颈癌中,38 例 Syk 表达阳性;50 例 CIN 中,27 例 Syk 表达阳性;50 例正常组织中,20 例 Syk 表达阳性 (见表 1)。Syk 在宫颈癌和正常组织中的表达差异具有统计学意义 ($P=0.001$)。

表 1 Syk 蛋白在宫颈病变组织中的表达
Table 1 Expression of Syk protein in cervical lesions

Groups	Amount(n)	Syk		%	χ^2	P
		+	-			
Cervical cancer	50	38	12	*76.0	13.412	0.001
CIN	50	27	23	54.0		
Cervical tissue	50	20	30	40.0		

Note: Compared with cervical tissue, cervical cancer group ($P < 0.05$).

表 2 宫颈癌组织中 Syk 表达与临床病理因素的关系
Table 2 Relationship between expression of Syk and clinicopathologic factors in cervical carcinoma

Clinicopathologic factors	Amount(n)	Syk		%	χ^2	P
		+	-			
Pathological grading						
High differentiation	38	32	6	*84.2	4.127	0.042
Low differentiation	12	6	6	50.0		
Tumor size						
<4.0 cm	20	12	8	60.0	3.331	0.068
≥4.0 cm	30	26	4	86.7		
Depth of infiltration						
≥ 1/2Muscular layer	40	32	8	▲ 80.0	0.829	0.362
<1/2Muscular layer	10	6	4	60.0		
Lymph node metastasis						
Negative	37	26	11	**70.3	1.496	0.221
Positive	13	12	1	92.3		
Clinical staging						
I , II	38	30	8	78.9	0.231	0.631
III, IV	12	8	4	66.7		

Note: High differentiation vs low differentiation ($P < 0.05$), ▲ Infiltrates $\geq 1/2$ Muscular layer vs $<1/2$ Muscular layer, $P < 0.05$; Syk lymph node metastasis Negative vs positive.

2.2 Syk 表达与临床病理因素的关系

应用 Pearson's 卡方检验评 Syk 表达与临床病理因素的关系 (见表 2)。Syk 表达在高中分化组高于低分化组。Syk 表达在深度浸润组中增高。13 例淋巴结转移病例中,有 12 例 Syk 表达阳性,而 37 例无淋巴结转移的病例中,有 26 阳性, Syk 表达在淋巴结转移组中较高,但差异无统计学意义 ($P=0.221$)。

2.3 TCGA 数据库中 Syk 表达分析

选取 TCGA 数据库中宫颈癌病例数最大的数据集中全部 305 例宫颈鳞癌组织样本,对 Syk mRNA 的表达进行了数据挖掘和分析,结果如下: ① Syk mRNA 在宫颈癌所有临床分期中均表达 (图 2); ② Syk mRNA 高表达组 219 例, Syk mRNA 低表达组 73 例, Kaplan-Meier 生存分析提示, Syk 高表达组患者

有更差的预后。305 例样本中 13 样本缺乏生存数据,故分析时忽略,因此用于 kaplan 生存分析的样本数是 292 例 (图 3A)。B. 根据 Syk 表达值分为生存组和死亡组: Syk 的 cutoff 值是 984, 绿色代表死亡,红色代表生存, Syk 高表达者预后差 (图 3B)。

3 讨论

本研究中,我们检测并分析了 Syk 蛋白在宫颈病变中的表达,结果显示 Syk 在宫颈癌中表达最高,在 CIN 中表达次之,在正常宫颈组织中表达最低; Syk 还表达于宫颈癌间质淋巴管内癌栓中。对 Syk 表达与宫颈癌临床病理参数关系的分析结果显示, Syk 的过表达与局部浸润和淋巴结转移有关, 尽管 Syk 与淋巴结转移的统计分析无统计学意义,但是 Syk 在淋巴结转

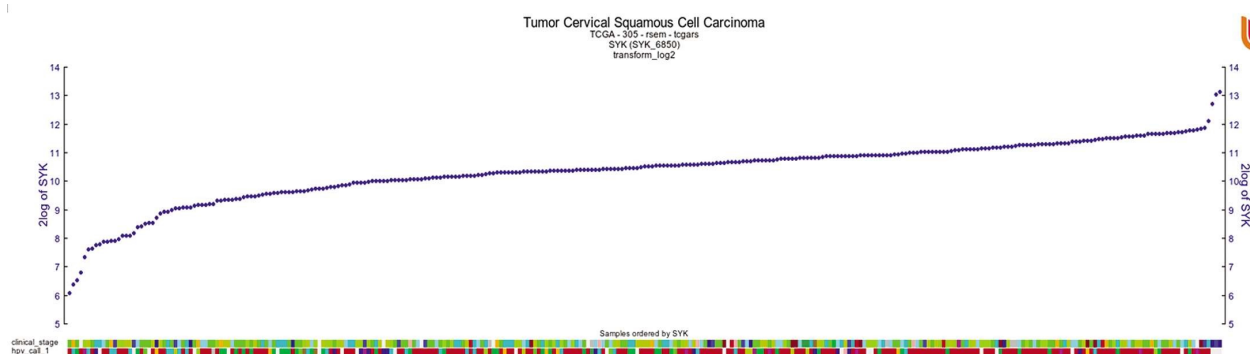


图 2 Syk mRNA 在 305 例宫颈鳞癌中的表达(TCGA 数据分析)

Fig.2 Expression of Syk mRNA in 305 cases of cervical squamous cell carcinoma (TCGA data analysis)

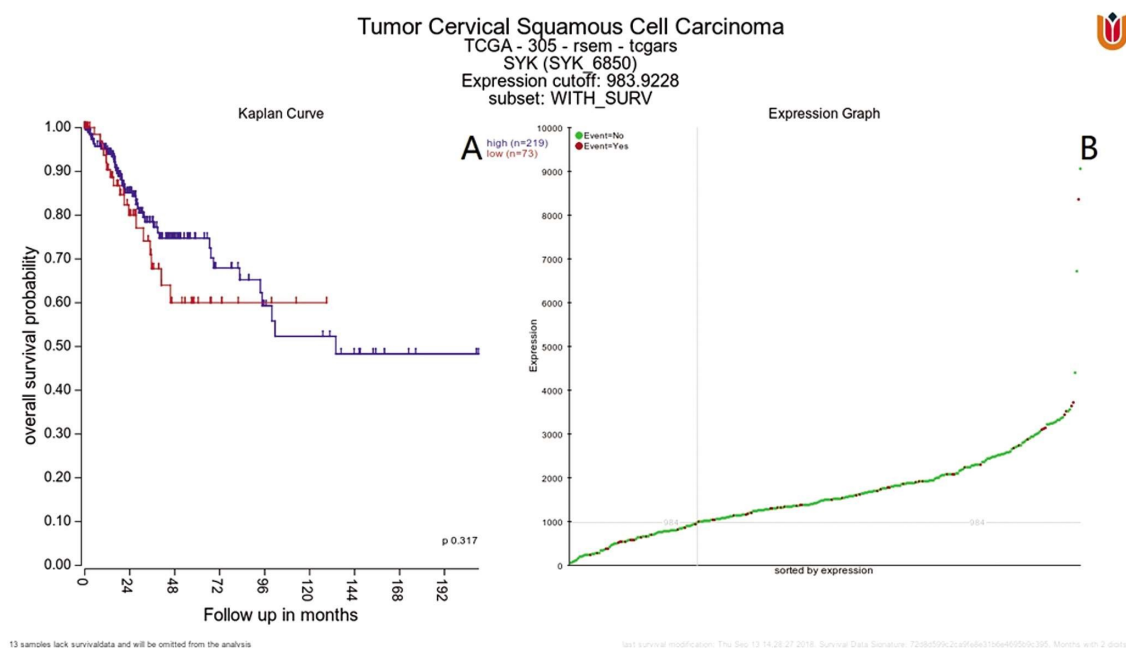


图 3 292 例宫颈癌中 Syk 表达与生存的关系

Fig.3 Relationship between Syk expression and survival in 292 cases of cervical cancer

A. 292 例宫颈鳞癌病例中,Syk 表达与生存的关系 (13 生存数据丢失,但在 TCGA 数据分析时已被忽略):Syk 高表达组病人有更差的预后

A. In 292 cases of cervical squamous cell carcinoma, the relationship between Syk expression and survival

(13 survival data were lost, but were ignored in TCGA data analysis): patients with high SYK expression had worse prognosis

B.根据 Syk 表达值分为生存组和死亡组:Syk 的 cutoff 值是 984,绿色代表死亡,红色代表生存,Syk 高表达者预后差。

B. According to the expression value of Syk, it is divided into survival group and death group: the cutoff value of Syk is 984, green represents death,

red represents survival, and high expression of Syk indicated poor prognosis.

移组中的表达有增高的趋势。

对 TCGA 数据库 305 例宫颈鳞癌样本中 Syk 表达的数据挖掘分析显示: ① Syk mRNA 在宫颈癌所有临床分期中均表达; ② 生存分析提示,Syk 高表达组患者有更差的预后。该数据与本研究的实验结果相一致。本研究中 Syk 在宫颈癌中的异常表达提示宫颈癌中 Syk 具有致癌蛋白的特征。对 Syk 在实体瘤中的研究提示, 在不同类型的癌细胞中,Syk 有促癌和抑癌的双重功能。有文献报道,激活的 Syk 通过 mTOR/S6 信号通路促进口腔鳞癌的恶性进展^[13];另有文献报道了与此矛盾的结果, Syk 甲基化抑制人喉鳞癌的浸润和转移^[14]。甚至在同类型肿瘤如口腔癌中,不同实验室的研究也显示了 Syk 抑癌和促癌的矛盾报道^[13,15]。因此有必要进一步探讨 Syk 抑癌和促癌的两

能。总体说来,Syk 精确指向细胞重要的生存功能,其抑制常导致细胞凋亡^[16],Syk 作为癌细胞中重要的信号分子日益引起了研究者的关注^[17]。

本研究显示,Syk 表达定位于宫颈癌和正常宫颈细胞的胞质,部分定位于细胞膜,正常宫颈基底细胞未见 Syk 表达。文献报道,由于一种非常规穿梭序列,Syk 蛋白在细胞质和细胞核中均有表达,而在受体激活过程中,它可以定位于细胞膜^[18]。这支持本研究中 Syk 表达定位于部分宫颈癌细胞膜的免疫组化实验结果。本研究中,Syk 也在某些 CIN 的细胞核中部分表达,而不在宫颈癌或正常宫颈组织的细胞核中表达,提示随着癌前病变进展为浸润性宫颈癌,Syk 在细胞核中的表达逐渐消失,在细胞膜和细胞质中的表达增加。不同的 Syk 定位是有意义

的,因为核表达与更好的预后相关^[19,20]。

免疫系统与癌症的发展和根除密切相关,在预防和根除癌症方面发挥着关键作用^[21]。此外,在所有细胞中,癌细胞和白细胞的增殖能力最高。尽管免疫系统与癌症高度相关^[22],但造血分子在实体癌中的表达和功能却总是被忽视。本研究结果表明,Syk 蛋白不仅在宫颈癌细胞中表达,而且在宫颈癌的间充质白细胞中也表达。Syk 在间充质免疫分子中的表达可能是免疫逃避的一种形式,其作用是伪装免疫系统中的癌细胞,这需要进行进一步研究。Syk 在间充质白细胞中的表达不是宫颈癌的特异性特征,也适用于其他肿瘤,如胶质瘤、肝癌^[23,24]。

总之,本研究中 Syk 在宫颈癌中的表达增加,Syk 在宫颈癌中具有致癌蛋白的特征。Syk 在某些 CIN 中的核表达可能与更好的预后相关。Syk 在宫颈癌间充质免疫分子中的表达可能是免疫逃避的一种形式。

参考文献(References)

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424
- [2] Zhang SK, Zhao FH, Qiao YL. [Development and achievements regarding the prevention and control of cervical cancer in the last 20 years in China] [J]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2020, 41(6): 809-812
- [3] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. Lancet, 2018, 391(10125): 1023-1075
- [4] Tang C, Zhu G. Classic and Novel Signaling Pathways Involved in Cancer: Targeting the NF-kappaB and Syk Signaling Pathways [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2019, 14(3): 219-225
- [5] Paiva C, Rowland TA, Sreekantham B, et al. SYK inhibition thwarts the BAFF - B-cell receptor crosstalk and thereby antagonizes Mcl-1 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Haematologica, 2017, 102(11): 1890-1900
- [6] Braegelmann C, Hölzel M, Ludbrook V, et al. Spleen tyrosine kinase (SYK) is a potential target for the treatment of cutaneous lupus erythematosus patients[J]. Exp Dermatol, 2016, 25(5): 375-379
- [7] Zhao S, Sun G, Tony PW, et al. Expression and methylation status of the Syk gene in cervical carcinoma [J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(5): 1113-1119
- [8] Ni B, Li S, Liu Y, et al. Prognostic value of spleen tyrosine kinase in human solid tumors[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 3377-3384
- [9] Lu J, Lin WH, Chen SY, et al. Syk tyrosine kinase mediates Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A-induced cell migration in epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(13): 8806-8814
- [10] Luangdilok S, Box C, Patterson L, et al. Syk tyrosine kinase is linked to cell motility and progression in squamous cell carcinomas of the head and neck[J]. Cancer Res, 2007, 67(16): 7907-7916
- [11] Black M, Ghasemi F, Sun RX, et al. Spleen tyrosine kinase expression is correlated with human papillomavirus in head and neck cancer[J]. Oral Oncol, 2020, 101: 104529
- [12] Coopman PJ, Do MT, Barth M, et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells[J]. Nature, 2000, 406(6797): 742-747
- [13] Gao P, Qiao X, Sun H, et al. Activated spleen tyrosine kinase promotes malignant progression of oral squamous cell carcinoma via mTOR/S6 signaling pathway in an ERK1/2-independent manner[J]. Oncotarget, 2017, 8(48): 83900-83912
- [14] Li Z, Cai Z, Tao B, et al. Full-length spleen tyrosine kinase inhibits the invasion and metastasis of human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(12): 15786-15793
- [15] Wang Z, Chen J, Chu W, et al. Expression of full-length spleen tyrosine kinase in the oral squamous cell carcinoma and its relationship with tumor invasion and metastasis [J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2015, 33(5): 519-523
- [16] Wang C, Wang X, Li Y, et al. Design and optimization of orally spleen tyrosine kinase (SYK) inhibitors for treatment of solid tumor [J]. Bioorg Chem, 2020, 95: 103547
- [17] Liu DL, Mamorska-Dyga A. Syk inhibitors in clinical development for hematological malignancies[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1): 145
- [18] Moncayo G, Grzmil M, Smirnova T, et al. SYK inhibition blocks proliferation and migration of glioma cells and modifies the tumor microenvironment[J]. Neuro Oncol, 2018, 20(5): 621-631
- [19] Hong J, Yuan Y, Wang J, et al. Expression of variant isoforms of the tyrosine kinase SYK determines the prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2014, 74(6): 1845-1856
- [20] Prinos P, Garneau D, Lucier JF, et al. Alternative splicing of SYK regulates mitosis and cell survival [J]. Nat Struct Mol Biol, 2011, 18(6): 673-679
- [21] Pulendran B, Davis MM. The science and medicine of human immunology[J]. Science, 2020, 369(6511): eaay4014
- [22] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674
- [23] Fueyo J, Alonso MM, Parker Kerrigan BC, et al. Linking inflammation and cancer: the unexpected SYK world [J]. Neuro Oncol, 2018, 20(5): 582-583
- [24] Torres-Hernandez A, Wang W, Nikiforov Y, et al. Targeting SYK signaling in myeloid cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis[J]. Oncogene, 2019, 38(23): 4512-4526