

· 论 著 ·

## 钾离子通道 Kv3.4 在大鼠颊黏膜癌变中的表达研究\*

宋成成, 周俊蛟, 伍宝琴, 聂敏海<sup>△</sup>

(泸州医学院附属口腔医院口腔内科/泸州医学院口颌面修复重建和再生实验室 646000)

**摘要:**目的 检测 Kv3.4 蛋白和 Kv3.4 mRNA 在大鼠颊黏膜癌变过程中的表达水平。方法 采用免疫组织化学(SP)法及 RT-PCR 技术检测 4NQO 诱导的 58 只 SD 大鼠颊黏膜癌变各阶段组织中 Kv3.4 蛋白和 Kv3.4 mRNA 的表达。结果 随上皮异常增生程度的增加, Kv3.4 蛋白和 Kv3.4 mRNA 表达逐渐增加, 在口腔鳞状细胞癌中呈强阳性表达。结论 在大鼠颊黏膜癌变过程中, Kv3.4 蛋白和 Kv3.4 mRNA 呈现出相似的一致性增高的趋势。

**关键词:** Kv3.4; 口腔鳞状细胞癌; 免疫组织化学; RT-PCR

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)15-1837-03

## The study of the potassium ion channel Kv3.4 in buccal mucosa carcinogenesis of rat\*

Song Chengcheng, Zhou Junjiao, Wu Baoqin, Nie Minhai<sup>△</sup>

(Department of Oral Medicine, the Affiliated Stomatological Hospital of Luzhou Medical College/

Lab of Orofacial Reconstruction and Regeneration, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of the Kv3.4 protein and Kv3.4 mRNA in various stages of oral carcinogenesis. **Methods** The expression of Kv3.4 protein and Kv3.4 mRNA were detected by immunohistochemistry(SP method) and RT-PCR technique respectively in the oral carcinogenesis of SD rat which were induced by 4NQO. **Results** With the aggravation of the epithelial dysplasia, Kv3.4 protein and Kv3.4 mRNA expression increased gradually. They were strongly positive in oral squamous cell carcinoma. **Conclusion** The expression of Kv3.4 protein and Kv3.4 mRNA levels increased consistently with the aggravation of the epithelial dysplasia.

**Key words:** Kv3.4; oral squamous cell carcinoma; immunohistochemistry; RT-PCR

癌的发生、发展和细胞的增殖与凋亡密切相关, 而细胞的增殖与凋亡与细胞微环境关系密切, 钾离子通道几乎分布于所有生物的细胞膜上, 在微环境中发挥了极大的作用<sup>[1-3]</sup>。电压门控钾离子通道 Kv3.4 是分布最广的一类离子通道, 研究发现 Kv3.4 与包括口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)在内的人体多部位肿瘤有关<sup>[4-9]</sup>, 本实验采用免疫组织化学(SP)法和 RT-PCR 技术检测 Kv3.4 在 SD 大鼠颊黏膜癌变各阶段组织中的表达情况, 旨在探讨 Kv3.4 在 SD 大鼠口腔黏膜癌变发生、发展中的意义, 为 OSCC 的诊疗提供新的理论基础, 现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 采用泸州医学院医学实验动物中心提供的 7 周龄雄性 SD 大鼠 58 只, 分为实验组 48 只, 对照组 10 只。两组大鼠常规饲料喂养, 实验组饮用 4-亚基硝氧喹啉(4-nitroquinoline-1-oxide, 4NQO)溶液(40 ppm)诱导癌变, 分别于第 9、12、18、22 周分批处死, 对照组饮灭菌水, 第 22 周处死, 分别取口腔颊黏膜组织。组织分为两部分, 一部分液氮速冻, -80℃低温冰箱冷藏备用; 另一部分用 4% 中性甲醛固定。有经验的病理医师对切片进行 HE 染色确定诊断, 根据诊断结果进行分组: 正常黏膜组 16 例; 轻、中、重度上皮异常增生组分别为 11、12 及 10 例; OSCC 组 9 例。

**1.2 主要试剂** 兔抗鼠 Kv3.4 抗体(Bioworld 公司, 美国),

SP-9000 免疫组织化学试剂盒及 DAB 显色试剂盒(中杉金桥, 北京), RNA 提取试剂盒及 PCR 反应试剂盒(天根生化, 北京), 逆转录试剂盒(Invitrogen, 上海)。

## 1.3 方 法

**1.3.1 SP 法染色** SP 法按试剂盒说明书进行染色。用口腔扁平苔藓切片作为阳性对照, 磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照。以细胞膜或细胞质出现棕黄色染色颗粒为阳性, 在显微镜下( $\times 200$ )每个切片选择 5 个视野进行观察, 按染色强度分为无着色(0 分), 弱染色(1 分), 染色清楚(2 分), 强染色(3 分)。阳性细胞数的判定: 阳性细胞数小于 10%(0 分), 11%~25%(1 分), 26%~49%(2 分), 大于或等于 50%(3 分)。评分标准参照文献[4]进行判定; 染色结果综合染色强度和阳性细胞数进行半定量分析后进行分级评分。按照积分为, 阴性(-): 0~1 分; 弱阳性(+): 2 分; 中度阳性(++): 3~4 分; 强阳性(+++): 5~6 分。

**1.3.2 RT-PCR 技术** 采用 Trizol 试剂一步法提取组织总 RNA 逆转录后进行 PCR 检测。引物设计: Kv3.4(F: 5'-TCC ATT ACC ACC TTC TGC C-3'; R: 5'-CCA CTC AAT CCC - ACC TCC-3'), 扩增长度 284 bp;  $\beta$ -actin(F: 5'-GTT CAA CGG CAC AGT CAA-3'; R: 5'-GGC TAA GCA GTT GGT GGT-3'), 扩增长度 310 bp。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳, 用凝胶成像分析系统以 Kv3.4 和  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值作为

\* 基金项目: 四川省教育厅基金资助项目(08zb089)。作者简介: 宋成成(1985-), 医师, 硕士, 现在都江堰市人民医院工作, 主要从事口腔黏膜病的防治研究。△ 通讯作者, Tel: 18982772207; E-mail: nieminhai@126.com。

Kv3.4 mRNA 的相对表达水平。实验重复 5 次取平均值。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,病理分级组间表达差异分别采用非参数检验中的多样本秩和检验 (Kruskal-Wallis Test) 和两样本秩和检验 (Mann-Whitney Test) 进行分析。总体比较采用  $\chi^2$  趋势检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 Kv3.4 蛋白表达检测** Kv3.4 蛋白在正常颊黏膜中少量

表达,而在颊癌组织中呈明显过度表达(图 1~8)。经趋势检验在正常口腔黏膜,上皮异常增生,OSCC 组织中 Kv3.4 呈逐渐升高的趋势。两两比较发现,正常黏膜组与异常增生组表达差异有统计学意义 ( $Z = -2.716, P = 0.007$ ),正常黏膜组与 OSCC 组差异有统计学意义 ( $Z = -3.394, P < 0.001$ ),异常增生组与 OSCC 组差异有统计学意义 ( $Z = -2.728, P = 0.006$ )。轻、中、重度上皮异常增生各组中 Kv3.4 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

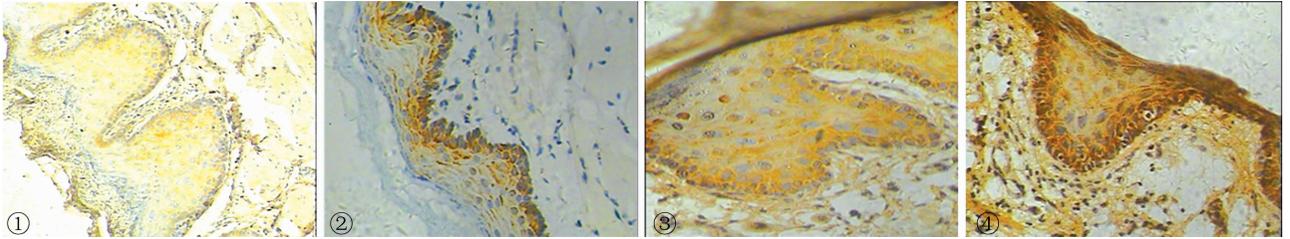


图 1 Kv3.4 在正常颊黏膜中的表达 (×200); 图 2 Kv3.4 在轻度上皮异常增生中的表达 (×200); 图 3 Kv3.4 在中度上皮异常增生中的表达 (×200); 图 4 Kv3.4 在重度上皮异常增生中的表达 (×200)

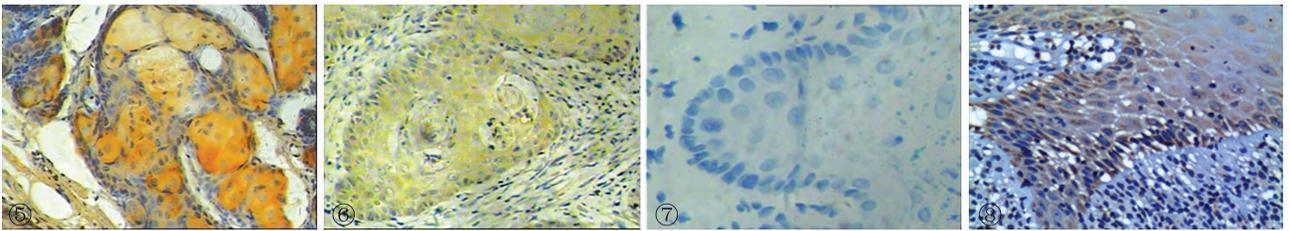


图 5 Kv3.4 在腺泡中的表达 (×200); 图 6 Kv3.4 在颊癌中的表达 (×200); 图 7 Kv3.4 阴性对照 (×200); 图 8 Kv3.4 阳性对照 (×200)

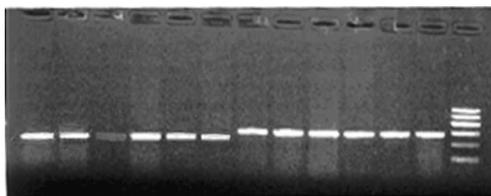
表 1 Kv3.4 蛋白在 SD 大鼠正常黏膜组织和癌变各阶段组织中的表达比较 (n)

组别	n	Kv3.4 的表达				$\chi^2$ 趋势
		-	+	++	+++	
正常黏膜组	16	6	6	3	1	16.202
轻度上皮异常增生组	11	1	3	5	2	
中度上皮异常增生组	12	1	3	4	4	
重度上皮异常增生组	10	1	1	3	5	
OSCC 组	9	0	0	1	8	

比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );异常增生组与 OSCC 组相比,差异有统计学意义 ( $t = 12.7116, P < 0.05$ );正常黏膜组与 OSCC 组比,差异有统计学意义 ( $t = 36.1893, P < 0.05$ )。轻、中、重度异常增生之间两两比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),但经趋势检验组间 Kv3.4 mRNA 增多的趋势,结果见表 2。

表 2 正常黏膜组、异常增生组、OSCC 组 Kv3.4 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Kv3.4 表达水平
正常黏膜组	16	0.562 ± 0.023
轻度上皮异常增生组	11	0.683 ± 0.059
中度上皮异常增生组	12	0.704 ± 0.043
重度上皮异常增生组	10	0.716 ± 0.033
OSCC 组	9	0.865 ± 0.013



A1 A2 A3 A4 A5 A6 B1 B2 B3 B4 B5 B6 M1

A1、A2:OSCC 组 Kv3.4; A3、A4、A5、A6:正常黏膜、重、中、轻度上皮异常增生 Kv3.4; B1、B2:OSCC 组  $\beta$ -actin; B3、B4、B5、B6:正常黏膜、重、中、轻度上皮异常增生  $\beta$ -actin; M1:标准分子量参照物 Marker (600 bp)。

**图 9 Kv3.4 mRNA 分组半定量 RT-PCR 产物凝胶电泳条带**

**2.2 Kv3.4 mRNA 表达检测** 正常黏膜组与异常增生组相

**3 讨论**

OSCC 多是由口腔黏膜癌前病变发展而来,癌前病变的发生、发展又与口腔上皮细胞所在微环境密切相关,参与细胞内液浓度调节和动作电位极化/复极化的离子通道对微环境的影响极为显著,其中,钾离子通道中的电压门控通道 Kv3.4 是所有通道中研究最广的一种<sup>[9-11]</sup>。

电压门控钾离子通道 Kv3.4 是分布最广的一类离子通道,研究发现 Kv3.4 与人体多部位肿瘤有关。Menendez 等<sup>[12]</sup>对

头颈部鳞状细胞癌的研究中发现 Kv3.4 蛋白和 Kv3.4 mRNA 在咽喉癌和鼻咽癌的组织中高表达,同时在喉黏膜异常增生和癌前病变组织中观测到了 Kv3.4 mRNA 的阳性表达,但在癌旁组织中未发现 Kv3.4 蛋白的阳性表达。伍宝琴等<sup>[13]</sup>发现, Kv3.4 蛋白在正常口腔黏膜、口腔扁平苔藓、OSCC 中的表达逐渐升高,推测 Kv3.4 可能是导致口腔黏膜上皮细胞异常增殖的因素。而 Chang 等<sup>[4]</sup>对 OSCC 细胞系的研究中发现,在 OSCC 细胞中存在 Kv3.4 mRNA 的增高。本实验结果显示,在大鼠颊黏膜组织中 Kv3.4 的阳性染色颗粒主要分布在上皮细胞的细胞膜、细胞质,极少量表达于细胞核,并且随着颊黏膜上皮异常增生程度的增加而表达增多。这与上述其他学者的研究结果基本一致。因此,笔者推测 Kv3.4 mRNA 表达增高可能是促进鳞状细胞癌恶性演变的基因改变之一。

本实验研究了 Kv3.4 在大鼠口腔黏膜癌变过程各阶段组织中的表达, Kv3.4 通道蛋白和 Kv3.4 mRNA 在表达上具有一致性,都随颊黏膜异常增生程度增高而呈现一种动态进行性增强的趋势。mRNA 增高可能源于 DNA 损伤后的修复过程, DNA 损伤有多种形式如点突变、缺失、插入、倒位、转位、双链断裂等,同样与其对应的修复方式也有多种如直接修复、SOS 修复、重组修复、适应性修复、链断裂修复、链交联修复等<sup>[14]</sup>。从 DNA 转录为 mRNA 再翻译为蛋白质是一连续的动态过程,其中的任何过程的细微差异都可能引起蛋白质的表现不同,进而导致表型不同。在本实验中 Kv3.4 蛋白和 Kv3.4 mRNA 呈现出相似的一致性增高的趋势,可以推论在本实验的 SD 大鼠口腔黏膜癌变模型中 DNA 产生了某种损伤或损伤后的修复,直接引起 Kv3.4 mRNA 增高,进而在翻译过程中使 Kv3.4 蛋白水平产生变化,也正是因为 Kv3.4 蛋白水平的变化在本实验模型体内发生了相应的不同程度的生物学性状的变化,表现为临床上即为不同类型的上皮异常增生。故而笔者猜想在颊黏膜异常增生到 OSCC 的演变过程中,钾离子通道 Kv3.4 可能促进或直接引导了 OSCC 的发生、发展,继而推测如果对钾离子通道 Kv3.4 的功能进行干预,可能会抑制病变进展,甚至进而阻断 OSCC 的发生。

#### 参考文献:

[1] Littleton JT, Ganetzky B. Ion channels and synaptic organization: analysis of the drosophila genome[J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 35-43.

[2] Jentsch TJ, Hubner CA, Fuhrmann JC. Ion channels: function unravelled by dysfunction[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(11): 1039-1047.

[3] Le Guennec JY, Ouadid-Ahidouch H, Soriani O, et al. Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer re-

search[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2007, 2(3): 189-202.

- [4] Chang KW, Yuan TC, Fang KP, et al. The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2003, 32(10): 606-611.
- [5] Ritter DM, Ho C, O'Leary ME, et al. Modulation of Kv3.4 channel N-type inactivation by protein kinase C shapes the action potential in dorsal root ganglion neurons[J]. *J Physiol*, 2012, 590(1): 145-161.
- [6] 艾军辉, 李晓明. PTCH 蛋白在宫颈癌中的表达[J]. *辽宁医学院学报*, 2012, 33(2): 100-104.
- [7] Marsh D, Suchak K, Moutasim KA et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients[J]. *J Pathol*, 2011, 223(4): 470-481.
- [8] Chang KW, Yuan TC, Fang KP, et al. The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol*, 2003, 32(10): 606-611.
- [9] Ousingsawat J, Spitzner M, Puntheeranurak S, et al. Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(3): 824-831.
- [10] Yang SB, Major F, Tietze LF, et al. Block of delayed-rectifier potassium channels by reduced haloperidol and related compounds in mouse cortical neurons. [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315(1): 352-362.
- [11] Leblanc N. Kv3.4, a key signalling molecule controlling the cell cycle and proliferation of human arterial smooth muscle cells. [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(3): 351-352.
- [12] Menendez ST, Rodrigo JP, Allonca E, et al. Expression and clinical significance of the Kv3.4 potassium channel subunit in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas[J]. *J Pathol*, 2010, 221(4): 402-410.
- [13] 伍宝琴, 缪克红. 口腔鳞状细胞癌组织中 HERG1、Kv3.4 钾离子通道蛋白的表达 [J]. *泸州医学院学报*, 2013, 21(1): 15-17.
- [14] 朱守民. DNA 损伤修复基本方式的研究进展[J]. *国外医学: 分子生物学分册*, 2003, 25(5): 270-272.

(收稿日期: 2013-10-12 修回日期: 2013-12-22)

## 2014 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者, 本刊一律接受网上投稿, 不再接受纸质和电子邮箱投稿! 请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话: 023-63604477。

来稿须将审稿费 50 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部, 编辑部若未收到审稿费, 稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!