

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.032

人细胞分裂控制蛋白 4 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义

乐 飞, 罗文政[△], 唐亿华, 陈 雯

(江西省肿瘤医院头颈二科, 南昌 330000)

摘要:目的 检测人细胞分裂控制蛋白 4(hCDC4)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达情况,分析其与临床病理参数之间的相关性。方法 收集 52 例手术切除的 OSCC 组织及 12 例正常组织,运用免疫组织化学技术检测 hCDC4 表达情况,分析 hCDC4 蛋白表达与临床病理参数之间的相关性。应用 hCDC4-siRNA 瞬时转染 OSCC 细胞系 Tca8113,MTT 及蛋白免疫印迹(Western blot)检测细胞增殖能力及 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白表达变化。结果 hCDC4 蛋白在正常组织中的表达显著高于对应的 OSCC 组织(83.3% vs. 25.0%, $P < 0.05$);hCDC4 蛋白低表达与较大肿瘤直径(≥ 4 cm)和高临床分期(III+IV)显著相关($P < 0.05$);敲低 Tca8113 细胞中 hCDC4 表达,导致细胞增殖能力显著增强($P < 0.05$)以及 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白蓄积。结论 hCDC4 表达缺失导致 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白蓄积可能是促进肿瘤进展的重要因素。

关键词:人细胞分裂控制蛋白 4;c-Myc;Cyclin E;口腔鳞状细胞癌;临床意义

中图分类号:R739.85

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)31-4216-03

Evaluation of hCDC4 expression and its correlation with the clinicopathological significance in oral squamous cell carcinoma

Le Fei, Luo Wenzheng[△], Tang Yihua, Chen Wen

(Department of Pathology, Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang, Jiangxi 330000, China)

Abstract: Objective To investigate human cell division control protein 4(hCDC4) expression and its correlation with the clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma(OSCC). **Methods** We freshly collected 52 samples of surgically resected OSCC tissues and 12 samples of normal tissues. hCDC4 expression in the samples was detected by immunohistochemical staining. The correlation between hCDC4 protein expression and clinicopathological feature was analysed. OSCC cells and Tca8113 were transfected with hCDC4-siRNA, cell proliferation and c-Myc and Cyclin E protein expression were determined by using MTT and Western blot. **Results** The hCDC4 protein expression in normal tissues was significantly up-regulated compared to those in OSCC tissues (83.3% vs. 25.0%, $P < 0.05$). Clinicopathological analysis revealed that reduced hCDC4 expression was associated with large tumor size (≥ 4 cm) and high clinic stage (III+IV) ($P < 0.05$). hCDC4 knockdown by siRNA led to increased cell proliferation and c-Myc and Cyclin E protein accumulation in Tca8113 cells. **Conclusion** Loss of hCDC4 may promote tumor progression by resulting in c-Myc and Cyclin E protein accumulation in OSCC.

Key words: human cell division control protein 4; c-Myc; Cyclin E; oral squamous cell carcinoma; clinicopathological feature

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)口腔颌面部最常见的恶性肿瘤^[1]。OSCC 的发生涉及众多基因表达变化,包括癌基因过度激活和(或)抑癌基因失活^[2]。人细胞分裂控制蛋白 4(human cell division control protein 4, hCDC4)又称 F 盒 WD 重复域蛋白 7(F-box and WD repeat domain containing 7, Fbxw7)属于 Skp1-Cul1-F-box(SCF)类泛素连接酶 E3 复合体中特异性识别底物的关键因子,靶向降解 c-Myc、Cyclin E、Notch 和 c-Jun 等多种癌蛋白,是一种广泛的抑癌因子^[3-5]。hCDC 在多种人类肿瘤中表达缺失且与不良预后相关,其参与肿瘤细胞增殖、凋亡和耐药等一系列生物学行为^[6-10]。本研究初步探讨 hCDC4 在 OSCC 中的表达及临床意义,为 OSCC 治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 52 例 OSCC 来源于本院 2007~2011 年的手术切除标本,所有患者术前均未行放、化疗及其他抗肿瘤治疗,所有组织标本经术后病理学证实。OSCC 组男 28 例,女 24 例,年龄 21~77 岁,平均(49.2±5.3)岁;有淋巴结转移 13 例,无淋巴结转移 39 例;I+II 期 34 例,III+IV 期 18 例;12 例正常组织来源于因黏膜白斑行活检阴性患者的非白斑组织,男 7 例,女 5 例,年龄 27~69 岁,平均(50.2±7.1)岁。两组患者性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 根据免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)说明书操作:石蜡包埋组织,对石蜡块进行 4 μ m 连续切片,切片至于 37 $^{\circ}$ C 烤箱 2 h,之后经二甲苯脱蜡和乙醇梯度水化,再进行热抗原修复,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,10%山羊血清室温封闭,将 1:100 比例稀释的鼠抗人 hCDC4 单克隆抗体(Ab74054, Abcam, USA)加于标。滴加生物素标记的山羊抗兔二抗工作液,滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉卵白素工作液。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,盐酸乙醇分化和稀氨水反蓝。乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜下观察、成像系统拍照,统计分析实验结果。用染色强度联合阳性细胞百分比进行评分,染色强度分为 4 等级:阴性=0 分;弱阳性=1 分;中度=2 分;强阳性=3 分;阳性细胞百分比分为 5 等级: $\leq 5\%$ =0 分;6%~25%=1 分;26%~50%=2 分;51%~75%=3 分; $> 75\%$ =4 分,染色强度和阳性细胞百分比评分相乘大于或等于 1 分则认为 hCDC4 蛋白阳性表达^[11]。

1.2.2 细胞培养 OSCC 细胞系(中国科学院生物化学与细胞生物研究所)培养于含 10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 细胞培养箱中饱和湿度下培养。稳定传代 2~3 代

后,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 RNA 干扰 hCDC4-siRNA(正义链 5'-GGA GUA UGG UCA UCA CAA Att-3';反义链 5'-UUU GUG AUG ACC AUA CUC Cuu-3')及其阴性对照由上海吉玛制药技术有限公司合成。实验分组:hCDC4 干扰组(实验组),加入化学合成的 hCDC4-siRNA, Oligofectamine 和培养液;阴性对照组(control 组),加入无义序列 siRNA (NT-siRNA), Oligofectamine 和培养液。按照 Oligofectamine Reagent(Invitrogen, USA)说明书操作:转染前用含 10% FBS 的无抗菌药物 DMEM 培养基将细胞接种于 6 孔板中,培养至细胞融合度约 30%~50%。370 μ L DMEM 培养基加入终浓度 20 μ M hCDC4-siRNA 或 NT-siRNA 10 μ L 匀混成 A 液;22 μ L DMEM 培养基加入 8 μ L 转染试剂混匀成 B 液,室温孵育 5~10 min。将上述 A 和 B 液混合,室温孵育 15~20 min 后加入到细胞中,并补充基础 DMEM 培养基至总体积 2 mL,细胞培养箱孵育 4 h 后加入含 30% FBS 的 DMEM 培养基 1 mL。

1.2.4 Western blot 检测 兔抗人 c-Myc 和鼠抗人 Cyclin E 单克隆抗体购自美国 CST 公司,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。取转染 48~72 h 的 Tca8113 细胞,弃培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次后加入 RIPA 细胞裂解液缓冲液裂解 15~20 min,用细胞刮刀收集裂解液并转移至 EP 管,14 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,BCA 法测定总蛋白浓度。加入等体积 2 \times 上样缓冲液煮沸 5 min,使用 12% 聚丙烯酰胺凝胶 110 V 湿转 1.5 h。5%脱脂奶粉室温封闭 10 min,分别加入 1:1 000 稀释的 hCDC4,c-Myc(Cell signaling, USA)和 Cyclin E 抗体(Cell signaling,USA)以及 1:10 000 稀释的 β -actin 抗体(Santa Cruz, USA),室温孵育 2 h 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗 5 min \times 3 次,分别加入适当(1:1 000~1:5 000)浓度的羊抗鼠或驴抗兔二抗,室温孵育 2 h。TBST 漂洗 5 min \times 3 次。ECL 液显色,暗室胶片曝光,全自动 X 光洗片机洗片。

1.2.5 MTT 检测 离心、收集转染 hCDC4-siRNA 和 NT-siRNA 的 Tca8113 细胞,用适量 DMEM 培养基调整细胞密度至 2 \times 10⁵ 个/mL 并重悬,以 5 \times 10³ 个细胞每孔接种于 96 孔板。左上孔设为空白孔,用于设备调零,实验组和对照组各设 6 个复孔。每孔加入 20 μ L 配置好的 MTT 溶液(5 mg/mL),置入细胞培养箱避光孵育 4 h,之后弃培养基,每孔加 150 μ L DMSO,摇床震荡 10~15 min 至颗粒溶解。酶标仪上测定各孔 570 nm 的吸光度(A)值。细胞增殖率=各时间段 A 值/初始 A 值(0 h)。

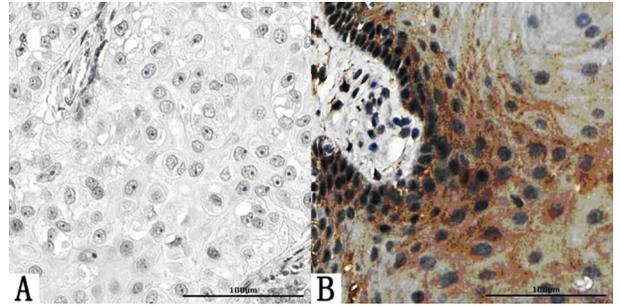
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 ANOVA 分析;计数资料采用率表示,组间采用 χ^2 检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 OSCC 及正常组织中 hCDC4 的表达 应用免疫组织化学技术检测 52 例 OSCC 组织和 12 例正常组织中 hCDC4 表达,阳性染色为黄色或棕色,hCDC4 表达主要定位在细胞质、细胞膜及细胞核(图 1)。hCDC4 在正常组织中的阳性表达率 [83.3%(10/12)]显著高于 OSCC 组织 [25.0%(13/52)],差异有统计学意义($\chi^2=11.988, P<0.05$)。

2.2 hCDC4 表达与临床病理参数的相关性 hCDC4 蛋白表达与临床病理参数的相关性分析结果见表 1。hCDC4 蛋白在 OSCC 组织中低表达与较大肿瘤体积和高临床分期显著相关 ($P<0.05$)。

2.3 hCDC4 对 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白表达的影响 选择 hCDC4 表达相对较高的 Tca8113 细胞瞬时转染 hCDC4-siRNA 72 h 后,Western blot 检测发现 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白明显增加,见图 2。



A:OSCC 组织;B:正常组织。

图 1 hCDC 蛋白在 OSCC 组织及正常组织中的表达 (SP, $\times 400$, 标尺:100 μ m)

表 1 hCDC4 蛋白表达水平与 OSCC 临床病理参数的关系

特征	n	hCDC4 表达情况			P
		阴性(n)	阳性(n)	χ^2	
年龄(岁)					
<40	17	12	5	0.145	0.703
≥ 40	35	27	8		
性别					
男	28	20	8	0.413	0.521
女	24	19	5		
肿瘤大小(cm)					
<4	32	21	11	3.900	0.048
≥ 4	20	18	2		
淋巴结转移					
有	13	9	4	2.034	0.853
无	39	30	9		
临床分期					
I+II	34	22	12	4.078	0.043
III+IV	18	17	1		

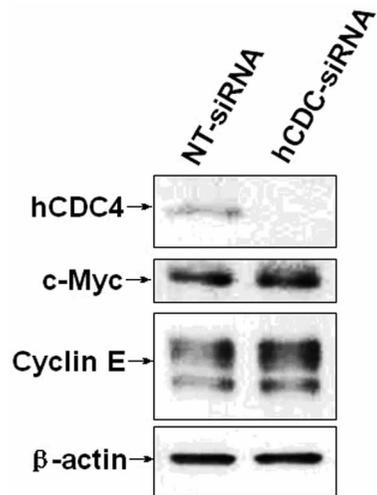
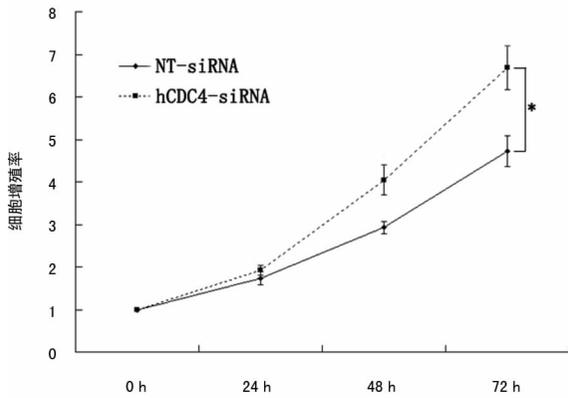


图 2 hCDC4 对 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白表达的影响

2.4 hCDC4 对细胞增殖的影响 Tca8113 细胞瞬时转染 hCDC4-siRNA 后,MTT 法检测 24、48 和 72 h 细胞增殖能力变化,结果显示降低 hCDC4 表达能显著增强 Tca8113 细胞增殖能力 ($P<0.05$),见图 3。



*: $P < 0.05$, 与 NT-siRNA 比较。

图 3 hCDC4 对细胞增殖的影响

3 讨论

近年来随着肿瘤领域相关研究的深入,越来越多的分子作为肿瘤侵袭、转移和预后标志物引起人们的关注,hCDC4 作为一种广泛的抑癌基因,多种恶性肿瘤中已经被证实存在 hCDC4 的表达下调或缺失,其低表达与肿瘤恶性临床病理特征相关^[6-9]。Tu 等^[10]发现,Fbxw7 低表达与胃癌淋巴结转移、肿瘤大小和不良预后相关,而且 Fbxw7 低表达合并 p53 突变的胃癌患者具有不同的预后不良。另外 6% 的前列腺癌中存在 Fbxw7 基因位点修饰,Fbxw7 亚型差异表达与前列腺癌高分期和复发呈负相关^[11-12]。另外 1 个团队也证实 Fbxw7 突变导致的 Cyclin E 高表达在胰腺癌发展中发挥决定性作用^[13]。本研究发现,hCDC4 在 OSCC 组织中阳性表达率显著低于正常组织,进一步统计学分析发现在较大肿瘤体积(>4 cm)和高临床分期(III+IV)的 OSCC 组织中 hCDC4 显著低表达,提示 hCDC4 在 OSCC 中作为抑癌因子发挥功能,并可能成为潜在治疗靶点和预后指标。导致 hCDC4 在肿瘤组织中低表达的原因目前主要归因于基因突变,报道称大约 6% 的肿瘤组织中存在 hCDC4 突变,同时研究表明 p53 在转录水平直接调控 hCDC4 表达,而超过 50% 的 OSCC 组织中存在 p53 突变或缺失,以上两种机制可能导致了 OSCC 组织中 hCDC4 低表达^[14-15]。

泛素蛋白酶体系统是蛋白降解的关键通路,靶蛋白的泛素化是由功能连续的 3 个酶介导的,泛素化底物被 26S 蛋白酶体选择性的识别和降解^[16]。hCDC4 是 SCF 类泛素连接酶 E3 复合体中底物识别关键因子,靶向降解一系列癌蛋白,越来越多的研究表明 hCDC4 缺失引起的癌蛋白蓄积是导致肿瘤进展的重要原因^[17]。hCDC4 的靶蛋白包括一系列细胞周期调控因子,如 c-Myc、Cyclin E 和 c-Jun 等,在乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌和肝细胞癌中敲低 hCDC4 表达促进肿瘤细胞增殖以及 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白异常蓄积^[6-10]。

综上所述,本研究应用 hCDC4 siRNA 瞬时转染 Tca8113 细胞,结果发现细胞增殖能力显著增强以及 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白蓄积,提示在 OSCC 中 hCDC4 可能通过介导 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白泛素化降解调控肿瘤细胞增殖。由于 hCDC4 靶向降解多种癌蛋白,其功能涉及多种肿瘤恶性生物学行为,因此 hCDC4 在 OSCC 中确切的功能及精确的分子机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 金成日,金彬,玄云泽. Ki-67 和 Bcl-2 在延边地区口腔鳞状细胞癌患者中的表达及其意义[J]. 重庆医学,2012,41(31):3316-3318.
[2] 吕晓智,陈万涛,张陈平. 胶原类基因 mRNA 在口腔鳞癌

组织中的表达[J]. 南方医科大学学报,2011,31(7):1197-1199.

[3] Tu K,Zheng X,Yin G,et al. Evaluation of Fbxw7 expression and its correlation with expression of SREBP-1 in a mouse model of NAFLD[J]. Mol Med Report,2012,6(3):525-530.
[4] Cheng Y,Li G. Role of the ubiquitin ligase Fbw7 in cancer progression[J]. Cancer Metastasis Rev,2012,31(1-2):75-87.
[5] Luan Y,Wang P. FBW7-mediated ubiquitination and degradation of KLF5[J]. World J Biol Chem,2014,5(2):216-223.
[6] 邱卫芳. 宫颈癌组织中 FBW7 和 c-Myc 的表达及相关性分析[J]. 海南医学院学报,2014,20(1):34-37.
[7] Ibusuki M,Yamamoto Y,Shinriki S,et al. Reduced expression of ubiquitin ligase FBXW7 mRNA is associated with poor prognosis in breast cancer patients[J]. Cancer Sci,2011,102(2):439-445.
[8] Iwatsuki M,Mimori K,Ishii H,et al. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene,in colorectal cancer;clinical significance[J]. Int J Cancer,2010,126(8):1828-1837.
[9] 罗文,杨杰,廉超,等. 尾型同源盒基因 2 沉默对人胃癌耐顺铂细胞 SGC7901/DDP 多药耐药性的逆转[J]. 中华消化外科杂志,2014,13(1):55-61.
[10] Tu K,Zheng X,Zan X,et al. Evaluation of Fbxw7 expression and its correlation with the expression of c-Myc,cyclin E and p53 in human hepatocellular carcinoma [J]. Hepatol Res,2012,42(9):904-910.
[11] 周振宇,涂康生,张竞,等. Fbxw7 在肝癌中的表达及与肝癌细胞增殖相关性研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(12):1303-1306.
[12] Liu Y,Ren S,Castellanos-Martin A,et al. Multiple novel alternative splicing forms of FBXW7 α have a translational modulatory function and show specific alteration in human cancer[J]. PLoS One,2012,7(11):e49453.
[13] Calhoun ES,Jones JB,Ashfaq R,et al. BRAF and FBXW7 (CDC4,FBW7,AGO,SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer:potential therapeutic targets[J]. Am J Pathol,2003,163(4):1255-1260.
[14] Mao JH,Perez-Losada J,Wu D,et al. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent,haploinsufficient tumour suppressor gene [J]. Nature,2004,432(7018):775-779.
[15] Silva Júnior Jde A,Camisasca DR,Bernardo V,et al. The Significance of p53 Immunoexpression with Different Clones (DO-7 and PAb-240) in Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec,2013,75(2):82-90.
[16] 朱丽,谈介凡,周丽艳. 环指蛋白 6 对胰岛素受体底物 1 泛素化作用的研究[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(11):1382-1383,1386.
[17] Tu K,Zheng X,Zhou Z,et al. Recombinant human adenovirus-p53 injection induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines mediated by p53-Fbxw7 pathway, which controls c-Myc and cyclin E[J]. PLoS One,2013,8(7):e68574.