

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.011

4NQO 诱导大鼠舌黏膜癌变过程中波形蛋白的表达研究*

邓婷婷, 谭红, 毛亮, 聂敏海[△]

(西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室/心血管医学研究所心肌电生理实验室, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究舌黏膜癌变过程各阶段中波形蛋白的表达, 探讨其在舌鳞状细胞癌(TSCC)发生、发展中的意义。

方法 采用 4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)饮水法诱导大鼠 TSCC 的发生, 收集发生过程中正常舌黏膜、上皮单纯增生、轻度上皮异常增生、中度上皮异常增生、重度上皮异常增生及 TSCC 组织标本共 56 例。采用免疫组织化学法检测波形蛋白的表达情况, 并采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测各组织的波形蛋白 mRNA 表达量。**结果** 免疫组织化学中, 随着大鼠舌黏膜异常增生程度的增加, 波形蛋白表达阳性率明显上升, 各组间差异有统计学意义($\chi^2=10.685, P<0.05$)。病变各组与正常舌黏膜组比较, mRNA 表达差异均具有统计学意义($P<0.05$); 轻度、中重度上皮异常增生组、鳞癌组与上皮单纯增生组进行比较, 鳞癌组差异有统计学意义($P<0.05$)。上皮单纯增生、轻度、中重度上皮异常增生组、鳞癌组波形蛋白 mRNA 表达量分别是正常舌黏膜组的 1.22、1.28、1.29、1.42 倍。**结论** 在 4NQO 诱导大鼠舌黏膜癌变过程中, 波形蛋白随病变程度的增加表达增高, 这与肿瘤的侵袭密切相关, 有可能作为舌黏膜上皮癌变的预测指标。

[关键词] 波形蛋白; mRNA; 舌鳞状细胞癌; 实时荧光定量 PCR; 4-硝基喹啉-1-氧化物

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)16-2194-04

Study on the expression of vimentin during the rat tongue carcinogenesis induced by 4NQO*

Deng Tingting, Tan Hong, Mao Liang, Nie Minhai[△]

(Laboratory of Oral and Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, Institute of Cardiovascular Medicine/
Laboratory of Cardiac Electrophysiology, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of vimentin in the tongue mucosa carcinogenesis and to explore its significance

in the invasion and metastasis of tongue squamous cell carcinoma. **Methods** The occurrence of tongue squamous cell carcinoma in rat was induced by means of 4NQO water solution, and 56 cases in total were collected in the cancerous process, including normal tongue mucosa, epithelial hyperplasia, mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia and the tongue tissue specimen of squamous cell carcinoma. The immunohistochemistry was used to evaluate protein expression and real-time fluorescent quantitative PCR method was used to obtain the expression quantity of mRNA. **Results** In immunohistochemistry, with the increase of degree of rat tongue mucosa dysplasia, the positive rate of vimentin expression increases obviously. The difference between groups was statistically significant ($\chi^2=10.685, P<0.05$). Lesion groups compared with normal group, their mRNA expression differences all hold statistical significance ($P<0.05$); Mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia and squamous cell carcinoma groups were compared with epithelial hyperplasia group. The difference between squamous cell carcinoma group and epithelial hyperplasia group was statistically significant ($P<0.05$). mRNA expression of epithelial hyperplasia, mild dysplasia, moderate dysplasia and severe dysplasia were respectively 1.22 times, 1.28 times, 1.29 times and 1.42 times of that of the normal group. **Conclusion** During rat tongue carcinogenesis induced by 4NQO, the expression of vimentin was increased with the increase of the degree of pathological change, which is closely related to the invasion of tumor and could be regarded as a predictor of tongue squamous cell carcinoma.

[Key words] vimentin; mRNA; tongue squamous cell carcinoma; real-time PCR; 4NQO

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)约占我国口腔颌面部恶性肿瘤的 32.3%, 侵袭力强, 恶性程度高, 严重威胁着人类健康。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指具有极性的上皮细胞向具有运动能力的间充质细胞转换并获得迁移和侵袭能力的过程, 是一种细胞在发育过程中的正常程序, 如胚胎发生、组织重构和癌症等疾病的发生^[1]。近年来的研究认为, EMT 在肿瘤细胞浸润和转移过程中扮演了重要角色, 上皮经历 EMT 后发生一系列生物学改变, 包括细胞极性消失、细胞间连接丧失、细胞游走或散在分布、上皮标志物缺失而间充质标志物重新表达等^[2]。波形蛋白(vimentin)主要表达于间充质细胞, 多种上皮源性肿瘤中

均可出现波形蛋白的异常表达, 波形蛋白阳性提示肿瘤发生了 EMT, 可作为上皮源性肿瘤的预测指标。多年来, 尽管学者对 TSCC 的发生、发展机制进行了广泛研究, 发现在 TSCC 细胞中波形蛋白高表达, 但未对癌变过程中各阶段的变化进行连续研究, 为探究 TSCC 发生过程中波形蛋白的变化, 本实验建立大鼠 TSCC 模型, 采用免疫组织化学及实时荧光定量(RT-PCR)检测波形蛋白在癌变各阶段的表达变化, 探讨波形蛋白在 TSCC 发生、发展过程中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 材料 4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO, 美国 Sigma 公司), RNA 提取试剂盒(TIANGEN 生化科技有限公司), 逆转录试

* 基金项目: 泸州市政府—泸州医学院联合专项资金科技计划项目(2013LZLY-J32); 四川省应用基础研究计划项目(2003JY0126)。作者简介: 邓婷婷(1989—), 在读硕士, 主要从事口腔黏膜专业研究。△ 通讯作者, Tel: (0830)3109289; E-mail: nieminhai@126.com。

剂(日本 TOYOBO 公司), QuantiFast[®] SYBR[®] Green PCR Kit (德国 QIAGEN 公司), 兔抗鼠 vimentin [EPR3776] 多克隆抗体 (abcam 公司), 免疫组织化学染色试剂盒 (SP-0023)、DAB 试剂盒 (博奥森生物技术有限公司)。在屏障环境下建立封闭群 SD 大鼠的 TSCC 模型。将质量分数为 0.004% 的 4NQO 水溶液, 作为饮水给予 64 只 SD 大鼠自行饮用, 分成 A、B、C、D、E 实验组, F 组为对照组, 每周观察大鼠口腔黏膜的变化, 并在第 10 周(A)、14 周(B)、18 周(C)、22 周(D)、24 周(E、F) 分 5 批处死, 采集口腔黏膜标本, 从中分为两部分, 一部分于液氮中速冻后转移至 -80 °C 冷冻备用, 另一部分固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 24 h 内石蜡包埋, 切片, HE 染色, 由两位有经验的病理科医生共同读片确定病变性质和病理分级, 病理分级参考 2005 年 WHO 标准分为上皮单纯增生, 轻、中、重度上皮异常增生和鳞癌 5 个等级。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 按试剂盒说明操作。兔抗鼠波形蛋白多克隆抗体 (1 : 250), 用微波炉处理修复波形蛋白抗原。免疫组织化学结果采用半定量评估法。阳性细胞数记分: 高倍镜 (×400) 下随机选取 5 个区域, 计数每 100 个细胞中阳性细胞的百分数, 将 5 个视野的百分数取平均值作为判定结果。计数阳性判断标准: 波形蛋白表达以细胞质或细胞膜出现黄色或棕褐色颗粒为阳性。组织染色强度记分: 无染色记 0 分, 淡黄色记 1 分, 棕黄色记 2 分, 棕褐色记 3 分; 阳性细胞数比例记分: 阳性细胞数小于 10% (0 分); 11% ~ 25% (1 分); 26% ~ 49% (2 分); ≥50% (3 分); 每张切片细胞染色总分为染色强度记分与阳性细胞数得分之和。总分分值结果判断: 阴性 0 ~ 1 分; 弱阳性 (+) 2 分; 中阳性 (++) 3 ~ 4 分; 强阳性 (+++) 5 ~ 6 分。

1.2.2 RT-PCR 检测 按试剂盒说明操作。总 RNA 的提取

和逆转录, 扩增波形蛋白 RNA, 并做 3 个复孔, 按程序进行反应。扩增条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 孵浴 15 s, 60 °C 孵浴 15 s, 72 °C 孵浴 30 s, 44 个循环, 72 °C 孵浴 10 min。取 PCR 产物 5 μL 加 1 uL 6×DNA Loading Buffer 混匀点样, 进行电泳。用 RT-PCR 分别检测各组织标本中波形蛋白基因和 β-actin 基因的 CT 值。然后依据原理公式计算 2^{-ΔΔCT} 值求得各个病变组组织中波形蛋白 mRNA 相对于正常组组织中波形蛋白 mRNA 的表达量 (公式: ΔCT = CT 波形蛋白 - CT β-actin, ΔΔCT = Average ΔCT 各病变组 - Average ΔCT 正常组)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析, 不同病理分级舌黏膜组织中表达的组间比较, 采用等级资料的非参数秩和检验 (Kruskal-wallis), 各实验组和对照组间数据的比较采用秩和检验分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 法矫正检验水准 α' = 0.007 (α' = α/n, n 为两两比较的次数)。检验水准 α = 0.05, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠舌黏膜的变化情况 第 8 周大鼠舌黏膜开始发生变化, 出现白色粗糙斑点或斑片。随着饮用 4NQO 水溶液时间的延长, 逐渐出现舌体充血糜烂面, 乳头状瘤或溃疡。至 22 周, 超过 1/3 大鼠在舌根部及舌中部侧缘形成溃疡或新生物, 见图 1。

2.2 大鼠组织病理学变化 随着饮用致癌药物的增加, 大鼠舌黏膜上皮异常增生程度呈逐渐加重趋势, 见表 1、图 2。

2.3 大鼠舌黏膜中波形蛋白免疫组织化学表达情况 在正常舌黏膜上皮中是没有染色的, 而波形蛋白主要表达在黏膜下结缔组织的间质细胞的细胞质中, 而在 TSCC 组织中, 波形蛋白阳性染色定位于肿瘤细胞的细胞质, 特别在肿瘤浸润区域波形蛋白表达尤为显著 (χ² = 10.685, P < 0.05), 见表 2、图 3。

表 1 大鼠舌黏膜病变组织病理学诊断 [n (%)]

病理分级	实验组饮用 4NQO 时间					F 组 (24 周)	合计
	A 组(10 周)	B 组(14 周)	C 组(18 周)	D 组(22 周)	E 组(24 周)		
正常舌黏膜	2(22.22)	2(18.19)	1(11.11)	1(9.09)	0(0.00)	6(100)	12
上皮单纯增生	4(44.44)	3(27.27)	3(33.33)	1(9.09)	0(0.00)	0(0.00)	11
轻度上皮异常增生	3(33.33)	2(18.19)	4(44.44)	2(18.19)	2(20.00)	0(0.00)	13
中度上皮异常增生	0(0.00)	1(9.09)	1(11.11)	1(9.09)	1(10.00)	0(0.00)	4
重度上皮异常增生	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(20.00)	0(0.00)	2
TSCC	0(0.00)	2(18.19)	1(11.11)	6(54.55)	5(50.00)	0(0.00)	14
合计	9	11	9	11	10	6	56

表 2 不同病变阶段波形蛋白的表达

病理分级	总例数 (n)	波形蛋白的表达				阳性率 [n (%)]	χ ²	P
		-	+	++	+++			
正常舌黏膜	12	8	4	0	0	4(33.33)		
上皮单纯增生	11	7	1	2	1	4(36.36)		
轻度上皮异常增生	13	7	2	3	1	6(46.15)	10.685	0.030
中、重度上皮异常增生	6	1	0	2	3	5(83.33)		
TSCC	14	5	3	4	2	9(64.29)		

表3 不同病变阶段波形蛋白 mRNA 相对表达结果

病理分级	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Z^a	P^a	Z^b	P^b
正常舌黏膜	-0.280[-0.325, -0.196]	1.00	—	—	—	—
上皮单纯增生	-0.560[-0.660, -0.470]	1.22	-3.636	<0.05*	—	—
轻度上皮异常增生	-0.630[-0.666, -0.580]	1.28	-4.140	<0.05*	-1.596	>0.05
中、重度上皮异常增生	-0.644[-0.685, -0.590]	1.29	-3.380	0.05*	-1.664	>0.05
TSSC	-0.784[-0.803, -0.745]	1.42	-4.326	<0.05*	-3.561	<0.05*

^a:各组与正常舌黏膜组比较;^b:各组与上皮单纯增生组比较;* :以 $\alpha' = \alpha/7 = 0.007$ 为差异有统计学意义。

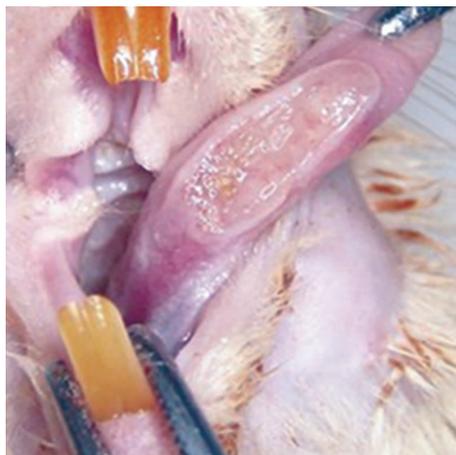


图1 实验组大鼠 TSSC 大体观察

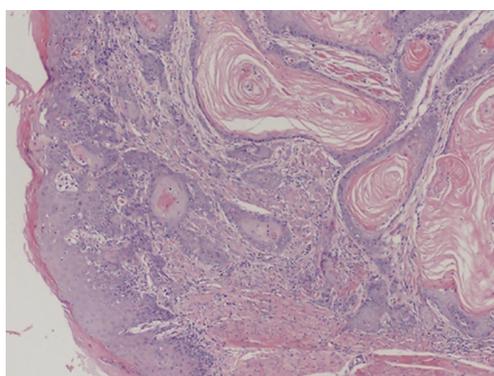
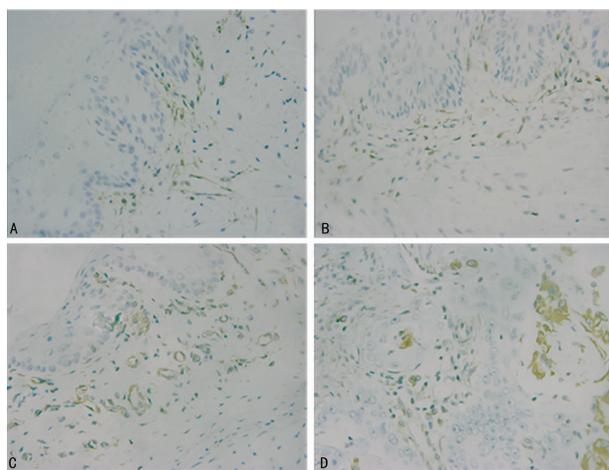


图2 大鼠 TSSC(HE, ×200)

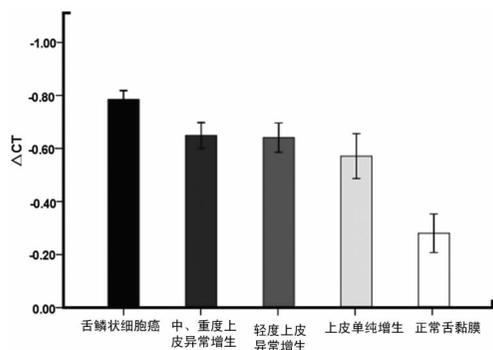
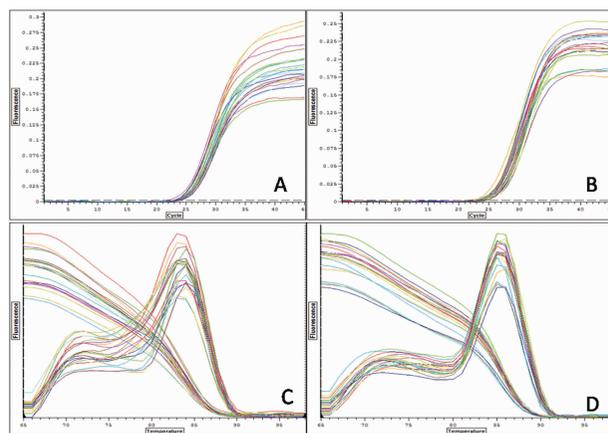


A:正常黏膜组;B:轻度上皮异常增生;C:中度上皮异常增生;D:TSSC。

图3 各组大鼠舌黏膜波形蛋白免疫组织化学结果(×400)

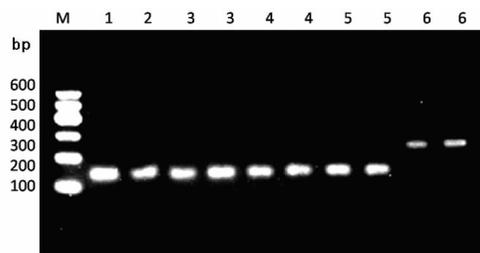
2.4 大鼠舌黏膜中波形蛋白 mRNA 的表达情况 结果显示:与对照组比较,各组波形蛋白 mRNA 相对表达量均较高,与上

皮单纯增生组比 TSSC 组的波形蛋白 mRNA 相对表达量较高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3、图4~6。取正常组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为1,其余各病变组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为1.22、1.28、1.29、1.42。即上皮单纯增生组、轻、中、重度上皮异常增生组、鳞癌组织中波形蛋白 mRNA 表达量分别是正常组中表达量的1.22、1.28、1.29、1.42倍。

图4 大鼠不同病理阶段波形蛋白 mRNA ΔCT 值结果比较

A、B:β-actin、波形蛋白扩增曲线图;C、D:β-actin、波形蛋白溶解曲线图。

图5 大鼠舌黏膜样品中波形蛋白 mRNA 的表达情况



M:标准分子量参照物 Marker(600 bp);1:正常组;2:上皮单纯增生;3:轻度上皮异常增生;4:中重度上皮异常增生;5:TSSC;6:鳞癌组 β-actin。

图6 波形蛋白 mRNA RT-PCR 产物凝胶电泳条带

3 讨 论

TSCC 作为口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,高侵袭、高转移、高复发的特点使其生存率一直无法提高,对 TSCC 病例进行调查发现,患者死亡的主要原因是局部复发和区域转移^[3]。4NQO 还原酶在其致癌过程中起着关键作用,肿瘤相对更易发生于 4NQO 还原酶含量高的区域,从而使得此类模型病变器官具有明显的靶向性^[4]。常见的含有活化 4NQO 酶的动物中,大鼠舌背黏膜含量最高^[5],这是本研究选用大鼠的重要依据之一。因此,本实验采用 4NQO 饮水法诱导 SD 大鼠 TSCC 发生,发现 10 周后全身状况开始变差,病理结果显示有 53.33% 舌黏膜呈上皮过度角化,33.33% 上皮呈轻度异常增生。随着饮用致癌药物的增加,大鼠舌黏膜上皮异常增生程度呈逐渐加重趋势。这与人类 TSCC 发生、发展过程相似,且与 Sakaki 等^[6]用 4NQO 饮水法建立大鼠 TSCC 模型的表现一致。整个实验中仅收集到 2 个重度上皮异常增生的样本,推测可能是向癌变过渡的时间段十分短暂,也可能是不同大鼠在同样时间段摄入的 4NQO 量不同,或者不同大鼠的自身抗癌能力存在差异。实验全过程中意外死亡实验组大鼠 8 只,分析死因推测为全身衰竭、打架斗殴、乙醚麻醉过深等。

在肿瘤侵袭转移发生的过程,某些上皮细胞在其周围间质的相互作用过程中,逐渐获得了一些间质细胞的特有性状。黏附分子波形蛋白、N-钙黏素是间质细胞标志物,他们表达的增高,标志 EMT 过程的发生。波形蛋白是细胞骨架蛋白之一,参与形成细胞骨架,是中间丝的一种。主要分布在间叶组织细胞,如肌细胞、成纤维细胞及淋巴细胞等,在正常上皮中几乎不表达,但在细胞发生恶变的情况下,波形蛋白可表达在上皮源性的肿瘤细胞的胞质内,赋予了上皮源性细胞成纤维细胞样的特征,使细胞更易于迁移和运动^[7-8]。有研究表明,上皮来源的肿瘤如乳腺癌、肝癌、肾上腺癌、胃癌、直肠癌、宫颈癌等,波形蛋白的表达上调与肿瘤的侵袭、转移及发生 EMT 密切相关^[9-10]。张俊君等^[11]研究发现,在直肠癌组织中 N-钙黏素和波形蛋白的表达明显高于正常直肠黏膜组织,推断其高表达均可提示上皮来源肿瘤发生 EMT,进而发生肿瘤转移。本实验观察了 4NQO 诱导大鼠舌癌变过程中波形蛋白的表达变化,由于中、重度上皮异常增生样本量过少,所得数据不具有代表性,不能单独成为一组,因此在统计数据时将中、重度上皮异常增生归为一个组。免疫组织化学结果表明,波形蛋白几乎不表达于正常上皮组织,而随着病变程度的增加,蛋白表达量增加,可在 TSCC 细胞中出现阳性表达,提示了蛋白的表达量与肿瘤的侵袭密切相关。RT-PCR 结果表明,各阶段病变组织与正常组织相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),发现随着舌黏膜癌变病理分级的增加,组织中波形蛋白 mRNA 的表达量呈逐渐增加趋势,说明波形蛋白参与了舌黏膜癌变的侵袭过程。蛋白表达与 mRNA 表达的一致性,提示了波形蛋白的上调有可能作为 TSCC 过程中 EMT 的有效证据。Chaw 等^[12]对不同病理分级进行免疫组织化学发现波形蛋白随病变程度的增加而呈上调趋势,波形蛋白 mRNA 在 OSCC 中的表达量是正常的 3.7 倍。本实验与之有相似结论。但本实验发现轻度上皮异常增生、中重度上皮异常增生、TSCC 3 个病理阶段互相比较差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能与癌变过程时间短暂,侵袭速度快有关,也可能与获得的中重度上皮异常增生组

织的样本量较少密切相关。有关口腔癌组织或者细胞株中波形蛋白的表达时有报道,但癌变过程中病理分级的研究很少且病理组织很难取得,故本实验采用大鼠造模,研究癌变过程中的波形蛋白的表达情况,为探索 EMT 在口腔鳞癌侵袭转移中的作用机制及临床预防和治疗肿瘤提供了新思路。

参考文献

- [1] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6):442-454.
- [2] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2):75-90.
- [3] Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 1999[J]. *CA Cancer J Clin*, 1999, 49(1):8-31.
- [4] 陈万涛. 4-硝基喹啉-1-氧化物诱发大鼠舌黏膜鳞癌模型和分子发病机制研究进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2010, 3(7):387-390.
- [5] Tanaka T, Makita H, Kawabata K, et al. 1,4-phenylenebis(methylene) selenocyanate exerts exceptional chemopreventive activity in rat tongue carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(17):3644-3648.
- [6] Sakaki T, Tamura I, Kadota H, et al. Changing expression of E- and P-cadherin during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide[J]. *J Oral Pathol Med*, 2003, 32(9):530-537.
- [7] Lang SH, Hyde C, Reid IN, et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma[J]. *Prostate*, 2002, 52(4):253-263.
- [8] Singh S, Sadacharan S, Su S, et al. Overexpression of vimentin; role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9):2306-2311.
- [9] Paccione RJ, Miyazaki H, Patel V, et al. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(9):2894-2903.
- [10] Gilles C, Polette M, Mestdagt M, et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10):2658-2664.
- [11] 张俊君, 郭轶. N-cadherin 和 vimentin 在直肠癌中的表达及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2014, 43(8):935-936, 940.
- [12] Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers——E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin in oral squamous cell carcinogenesis and transformation[J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(10):997-1006.