

[文章编号 1000-1182(2004)04-0334-03

## 口腔鳞状细胞癌 Fas 基因表达与 细胞凋亡关系的研究

王建广<sup>1</sup>, 黄洪章<sup>1</sup>, 潘朝斌<sup>1</sup>, 侯劲松<sup>2</sup>, 李劲松<sup>1</sup>, 程斌<sup>3</sup>

(1. 中山大学附属第二医院 口腔颌面外科; 2. 中山大学光华口腔医院 口腔颌面外科;  
3. 中山大学光华口腔医院 口腔内科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 探讨 Fas 基因 mRNA 及蛋白表达水平与人口腔鳞状细胞癌细胞凋亡的关系。方法 应用 Northern 杂交、双参数流式术 (TUNEL 法) 检测人口腔鳞状细胞癌中 Fas mRNA 及蛋白的表达, 鳞癌细胞的细胞周期与凋亡水平。结果 5 例正常口腔黏膜标本中均有 Fas mRNA 及蛋白的表达。在口腔鳞癌组织中, Fas mRNA 及蛋白的表达与口腔鳞癌组织病理学分级有关 ( $P < 0.005$ ), 与口腔鳞癌组织分化程度和凋亡指数呈正相关。结论 口腔鳞癌中 Fas 基因的表达与组织病理学分级及细胞凋亡之间关系密切。

[关键词] Fas 基因; 鳞状细胞癌; 凋亡

[中图分类号] R 782 [文献标识码] A

**Study on the Relationship between Fas Expression and Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma** WANG Jian-guang<sup>1</sup>, HUANG Hong-zhang<sup>1</sup>, PAN Chao-bin<sup>1</sup>, HOU Jin-song<sup>2</sup>, LI Jin-song<sup>1</sup>, CHENG Bin<sup>3</sup>. (1. Dept. of Oral and Cranio-Maxillofacial Surgery, the Second Affiliated Hospital; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua College of Stomatology; 3. Dept. of Oral Medicine, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of Fas mRNA and protein expression and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma. **Methods** Northern blot and flow cytometry (TUNEL method) were used to detect the expression of Fas mRNA and Fas protein, cell cycle and apoptotic level in oral squamous cell carcinoma. The relationship between Fas gene expression and OSCC apoptosis was analyzed statistically. **Results** Fas mRNA and protein could be detected in all five normal oral mucosa specimens. There was positive correlation between expression of Fas mRNA/protein and cell differentiation as well as apoptosis in OSCC ( $P < 0.005$ ). **Conclusion** The expression of Fas gene was highly correlated with the differentiation and apoptosis in OSCC.

[Key words] Fas gene; squamous cell carcinoma; apoptosis

细胞凋亡 (apoptosis) 是一种受细胞外环境和细胞内遗传物质调控的细胞自杀性死亡方式, 又称程序性细胞死亡, 是细胞自然衰老、死亡的一种形式<sup>1,2</sup>。Fas 作为死亡因子受体已被确定, 其在细胞凋亡调控中所起的作用日益受到重视。本研究应用 Northern 杂交技术和流式双参数检测技术检测 Fas 基因在人口腔鳞癌及正常口腔黏膜组织的表达, 探讨 Fas 基因与人口腔鳞癌细胞凋亡的关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 活检组织标本来源

49 例口腔鳞状细胞癌组织标本取自中山大学附

属第二医院口腔颌面外科手术切除的口腔鳞癌新鲜肿瘤组织, 且均经组织病理学检查证实。患者术前未接受放疗、化疗或其他治疗。其中男 31 例, 女 18 例, 患者年龄 26 ~ 89 岁, 平均 59.5 岁。按照发病部位, 舌癌 23 例, 口底癌 6 例, 牙龈癌 6 例, 硬腭癌 4 例, 颊癌 3 例, 唇癌 1 例, 口腔癌颈部转移灶 6 例。按照组织病理学分级标准, 高度分化鳞癌 17 例, 中度分化鳞癌 24 例, 低度分化鳞癌 8 例。5 例对照组正常口腔黏膜组织标本取自中山大学附属第二医院口腔颌面外科行外伤治疗及正颌治疗患者的正常口腔黏膜, 患者无烟酒嗜好, 无口腔黏膜病变。肿瘤组织及正常口腔黏膜切取后立即于 -196 液氮中深冷冻 30 min, 然后于 -80 冰箱中保存。

#### 1.2 主要试剂

地高辛标记和检测试剂盒, 细胞凋亡原位检测试剂盒均购自宝灵曼公司。鼠抗人 Fas 单克隆抗体 (Eymed 公司, 美国), FITC 标记的绵羊抗鼠抗体 IgG

[收稿日期 2004-02-04; 修回日期 2004-05-08]

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (980121); 中山大学科研基金资助项目 (99-B002000007)

[作者简介] 王建广 (1969-), 男, 河南人, 副教授, 博士

[通讯作者] 潘朝斌, Tel: 13902284035

(华美生物公司), Fas cDNA 探针(北京原平生物公司)。

### 1.3 Northern 杂交检测

按异硫氰酸胍一步法进行组织总 RNA 的制备。Fas cDNA 探针的地高辛标记(随机引物法)按试剂盒说明进行。按照 Reed 和 Mann 方法及地高辛标记和检测试剂盒说明进行 Northern 杂交检测 Fas mRNA 在人正常口腔黏膜及人口腔鳞癌组织中的表达。

### 1.4 流式双参数检测

1.4.1 Fas 表达与细胞 DNA 含量双参数流式细胞术检测 在 1.5 ml EP 管中,将制备的单细胞悬液用 70% 乙醇固定,4℃ 保存, PBS 漂洗后离心沉淀(300 g)10 min,去除固定液。用含 1% 牛血清白蛋白及 0.1% Triton X-100 的 PBS 封闭,加抗 Fas 单克隆抗体(1:150)于 4℃ 过夜。PBS 漂洗后加 FITC 标记的绵羊抗鼠抗体 IgG(1:100),避光反应 1 h, PBS 漂洗 3 次。RNase (1 g/L)37℃ 消化细胞 30 min,碘化丙啶染色 30 min,流式细胞仪检测双荧光强度。实验对照组不加一抗,余同上述步骤。

1.4.2 口腔鳞癌细胞的双参数流式术检测(TUNEL 法) 在 1.5 ml EP 管中将制备的单细胞悬液用含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 于 4℃ 漂洗 2 次,每个样本中加入 100 μl 新鲜配制的 4% 多聚甲醛(溶于 PBS, pH7.4),悬浮细胞,室温下固定 1 h。300 g 离心 10 min,去除固定液,每管加入 200 μl PBS,漂洗细胞 2 次,300 g 离心 10 min,去除 PBS。每管中加入 100 μl 0.1% triton X-100/0.1% 柠檬酸钠,冰浴放置 2 min,以提高细胞穿透性。加 200 μl PBS,漂洗细胞 2 次, PBS 洗涤后加碘化丙啶(10 g/L)染色进行流式双参数荧光分析。

### 1.5 统计学分析

计数资料的比较用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 Fas mRNA 在人口腔正常黏膜和人口腔鳞状细胞癌中表达

5 例正常口腔黏膜标本中,均可观察到明显的 Fas mRNA 杂交条带。在口腔鳞癌组织中, Fas mRNA 的表达与口腔鳞癌组织病理学分级有关( $P < 0.01$ ) (表 1,图 1),与口腔鳞癌患者年龄、性别、发病部位、TNM 分期等无明显关系。

### 2.2 Fas 蛋白表达与 DNA 含量分析

5 例正常口腔黏膜中, Fas 蛋白阳性表达率较高,自 85% 至 92% 不等,平均 89.2%。Fas 蛋白的表达出现在细胞周期的各个时期,各细胞周期的表达无明显

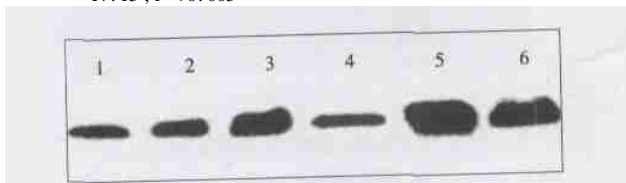
差别。在口腔鳞癌组织标本中, Fas 蛋白的阳性表达率则有不同程度的下降。Fas 蛋白的阳性表达率与口腔鳞癌的组织病理学分级有关。17 例高度分化鳞癌组织中, 15 例出现 Fas 蛋白的阳性表达,阳性细胞百分率自 43.7% 至 65.4% 不等,平均 56.6%; 24 例中度分化口腔鳞癌组织中, 8 例出现 Fas 蛋白的阳性表达,阳性细胞百分率自 35.4% 至 57.6% 不等,平均 40.2%; 8 例低度分化口腔鳞癌组织中, 1 例出现 Fas 蛋白阳性表达,阳性细胞百分率为 20.7%。

表 1 Fas mRNA 阳性表达与口腔鳞癌病理学分级的关系

Tab 1 The relationship between Fas mRNA expression and pathological grade of OSCC

口腔鳞癌组织病理学分级	病例数	Fas mRNA 表达		
		阴性	阳性	百分比(%)
高度分化	17	1	16	94.1
中度分化	24	15	9	37.5
低度分化	8	7	1	12.5
合计	49	23	26	53.0

$\chi^2 = 17.15, P < 0.005$



1, 2, 3, 4: 口腔鳞癌组织 5, 6: 正常口腔黏膜

图 1 正常口腔黏膜及口腔鳞癌组织 Fas mRNA Northern blot 结果

Fig 1 The result of Fas mRNA Northern blot in normal oral mucosa and OSCC

### 2.3 凋亡细胞 DNA 断片与 DNA 含量流式双参数检测

5 例正常口腔黏膜中,均有 FITC 荧光显示的 TdT 标记阳性细胞出现,阳性率自 0.5% 至 3.2% 不等,平均 1.95%; 而在 49 例口腔鳞癌, TdT 标记阳性率自 0.24% 至 4.2% 不等(图 2),凋亡细胞百分率与 Fas 蛋白的阳性表达呈正相关。Fas mRNA 的表达与口腔鳞癌组织病理学分级呈正相关。分化程度高者,凋亡指数较高;分化程度低者,凋亡指数较低。

## 3 讨论

肿瘤的发生不仅由于细胞的增殖,而且还有细胞死亡减少的共同参与,即细胞增殖与死亡的动态平衡失调所致<sup>1</sup>。细胞坏死与凋亡是细胞死亡的两种基本形式,凋亡在肿瘤发生与治疗中的重要作用已为人们了解。凋亡的发生机制尚未完全阐明。

1989 年,德国的 Trauth、日本的 Yonehara 两个科

研小组分别从小鼠中分离出对人体细胞系有溶细胞作用的抗体,他们把被抗体识别的细胞表面蛋白分别称为 Apo-1 (apoptosis first antigen) 和 Fas (fatty acid synthase)。1992年, Oehm 等克隆出 Apo-1 cDNA 并对 Apo-1 加以纯化,证明 Apo-1 和 Fas 是同一种物质。1993年第5次 CD 分类国际会议将之定为活化抗原类的 CD95<sup>3</sup>。通过鉴定 Fas 蛋白的结构证明它属于肿瘤坏死因子和神经生长因子受体家族。Fas 为非特异性抗原分子,广泛存在于各种组织和器官,如肾上腺、肾脏、肝脏、心脏、肺、部分胸腺细胞、激活的 T 和 B 淋巴细胞等。通过 Fas-Fas L 介导的细胞凋亡可以维持组织的自身稳定调节<sup>4,5</sup>。

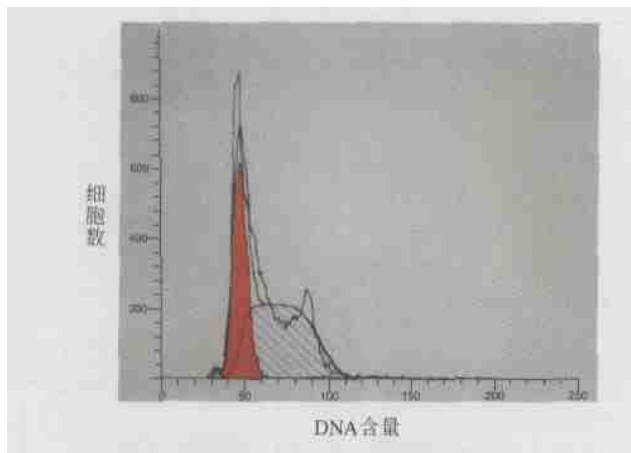


图2 流式细胞术检测口腔鳞癌细胞凋亡

Fig 2 The result of OSCC apoptosis detected by flow cytometry

人 Fas 基因定位于 10 号染色体 q23 区,包含 9 个外显子,8 个内含子,基因长度约 25 kb。Fas cDNA 长度为 2 534 kb。Fas 又叫死亡受体,是肿瘤坏死因子受体家族成员。Fas 蛋白由 319 个氨基酸残基组成,相对分子质量为  $4.5 \times 10^4$  的跨膜糖蛋白,包括胞浆区、跨膜区和胞外区 3 部分。Fas 蛋白是一个细胞凋亡信号受体。它与 Fas/Apo-1 抗体或配体结合后,其胞浆区经特殊胞内蛋白介导,直接激活凋亡基因产物,可以诱导 Fas 蛋白所在细胞的凋亡。Fas 蛋白胞浆区含 80 个左右对于凋亡是必不可少的氨基酸序列,称为死亡区,具有传导细胞凋亡信号的作用<sup>6~8</sup>。Fas 抗原的天然配体 Fas L 是 1994 年 Suda 等利用亲和层析技术从鼠细胞毒性 T 淋巴细胞中纯化的,两者的结合可导致细胞凋亡。Fas 和 Fas L 在免疫系统的表达相对较高,在免疫系统的调节功能中发挥着重要作用。有关 Fas 基因在细胞凋亡调控中的作用,已成为当前细胞凋亡研究领域的重点之一<sup>9,10</sup>。

Fas 基因在人口腔黏膜上皮细胞及口腔鳞癌细胞中表达的研究较少,因而笔者对 Fas 基因在口腔鳞癌组织中的表达进行了研究。Northern 杂交结果显示,5 例正常口腔黏膜组织中均可见到明显的 Fas

mRNA 杂交条带。在口腔鳞癌组织中,Fas mRNA 的表达与口腔鳞癌患者性别、年龄、发病部位、TNM 分期无明显关系,但与口腔鳞癌组织病理学分级有关,分化程度高者,其表达水平也高。流式双参数检测结果显示,5 例正常口腔黏膜中,均有 Fas 蛋白的表达,Fas 蛋白阴性表达率较高,平均 89.2%。Fas 蛋白的表达出现在细胞周期的各个时期。口腔鳞癌组织中,Fas 蛋白的阳性表达率有不同程度的下降,Fas 蛋白的阳性表达率与口腔鳞癌的组织病理学分级有关,肿瘤分化程度低者,其蛋白表达水平亦低。与正常口腔黏膜相比,差别有显著性。TUNEL 法检测细胞凋亡与 DNA 含量结果发现,凋亡细胞百分率与 Fas 蛋白的阳性表达呈正相关,与患者性别、年龄、发病部位无关。上述结果揭示,随着肿瘤恶性程度的提高,Fas 抗原的表达越容易缺失。口腔鳞癌组织中 Fas 的低水平表达一方面可能抑制自身的凋亡,同时对肿瘤的生长有着促进作用。在 Fas 蛋白表达低下的情况下,组织细胞可能难以进行正常的凋亡作用,从而破坏了细胞增殖与凋亡的动态平衡,这可能是口腔鳞癌形成和发展的原因之一。

#### [参考文献]

- 1] Marie JS, Ebin FG. Apoptosis, basic concepts and potential significance in human cancer J. Arch Pathol Lab Med, 1998, 122(4): 310-319.
- 2] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics J. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.
- 3] Reyher KM, Strater J, Kittstein W, et al. Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis J. Cancer Res, 1998, 58(3): 526-534.
- 4] Fenton RG, Hixon JA, Wright PW, et al. Inhibition of Fas expression and Fas mediated apoptosis by oncogene Ras J. Cancer Res, 1998, 58(15): 3391-3400.
- 5] Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide J. Science, 1990, 250 (23): 1149-1151.
- 6] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor J. Science, 1995, 267(10): 1449-1456.
- 7] Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen J. J Biol Chem, 1993, 268(15): 10932-10937.
- 8] Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, et al. A novel protein that interacts with the death domain of Fas contains a sequence motif related to the death domain J. J Biol Chem, 1995, 270(14): 7795-7798.
- 9] Catherine G, Yasuo T, Christoph B, et al. Upregulation of Fas ligand and down regulation of Fas expression in human Esophageal cancer J. Cancer Res, 1998, 58(10): 2057-2062.
- 10] Pizer ES, Lax SF, Kihajda FP, et al. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma J. Cancer, 1998, 83(3): 528-537.

(本文编辑 汤亚玲)