

文章编号:1000-5404(2013)14-1489-04

论著

## 生物钟 PER1 基因在口腔鳞癌中的昼夜节律变化及与体内肿瘤生长的关系

赵宁波,杨凯,陈丹,唐洪,赵丹,赵春蓉 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科)

**[摘要]** **目的** 探讨生物钟 PER1 基因在口腔鳞癌中的昼夜节律变化情况和与肿瘤体内生长的关系。**方法** 60 只裸鼠置于 12 h 光照和 12 h 黑暗交替环境中饲养 3 周后,将人类鳞癌 BcaCD885 细胞接种于裸鼠颊部,建立口腔颊鳞癌模型。3 周成瘤后,在 24 h 内按灯亮后 4、10、16、22 h (4 HALO、10 HALO、16 HALO、22 HALO) 的 4 个时间点分别处死 15 只裸鼠,取出肿瘤,称量,常规切片在 HE 染色下计算各时间点肿瘤的有丝分裂指数 (MI);分别用 S-P 免疫组化、Western blot 和 Real-time RT-PCR 检测各时间点癌细胞中 PER1 蛋白和 mRNA 的表达;分别用方差分析和余弦分析检验各指标在 4 个时间点的差异性和是否具有昼夜节律性。**结果** 颊鳞癌细胞 PER1 蛋白、PER1 mRNA、肿瘤 MI 和肿瘤质量在昼夜不同时间点具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),其变化波动具有昼夜节律性特征 ( $P < 0.05$ );肿瘤 MI 和肿瘤质量与 PER1 的表达水平呈反比关系,PER1 mRNA 表达的峰值与肿瘤 MI 和质量的谷值均位于活动相的中期,而 PER1 mRNA 表达的谷值与肿瘤 MI 和质量的峰值均位于休息相中期。**结论** 口腔鳞癌中 PER1 的表达、肿瘤 MI 和质量在昼夜不同时间点的波动具有 24 h 昼夜节律性规律,PER1 在口腔鳞癌中为抑癌基因。

**[关键词]** PER1 基因;昼夜节律;鳞状细胞;癌

**[中图分类号]** R394.2;R730.23;R739.85

**[文献标志码]** A

## Circadian rhythm variations of clock gene PER1 expression in oral squamous cell carcinoma and their relations with tumor growth *in vivo*

Zhao Ningbo, Yang Kai, Chen Dan, Tang Hong, Zhao Dan, Zhao Chunrong (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the circadian rhythm variations of the expression of clock gene PER1 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and their relations with tumor growth *in vivo*. **Methods** Sixty nude mice were raised under 12 h light/12 h dark cycles for 3 weeks. Human OSCC cell line BcaCD885 was inoculated in the cheek of nude mice to establish a nude mice model of OSCC. In 3 weeks after the implantation, 15 mice were sacrificed at 4 time points, including 4 h after light onset (HALO), 10 HALO, 16 HALO and 22 HALO, respectively, during a period of 24 h. Tumor tissues were excised and weighed. HE stained sections were prepared and mitotic index (MI) was calculated. The protein and mRNA expression of PER1 in the tumor cells at the 4 time points were determined by immunohistochemical assay (SP method), Western blot analysis and real-time RT-PCR. The differences of its expression in the 4 time points were assessed by ANOVA, and a cosine analysis method was applied to determine whether the expression of PER1 at protein and mRNA levels obeyed a circadian rhythm. **Results** There were significant differences in PER1 expression at protein and mRNA levels in the OSCC cells, tumor MI, and tumor weight among the 4 time points ( $P < 0.01$ ), and these changes were in a circadian rhythm ( $P < 0.05$ ). Tumor MI and tumor weight were negatively correlated with the expression level of PER1. The peak of PER1 mRNA expression and the valley values of tumor MI and weight appeared at the middle of active phase. However, the valley of PER1 mRNA expression and the peaks of tumor MI and weight occurred at the middle of rest phase. **Conclusion** PER1 expression, tumor MI, and xenografted tumor weight of OSCC cells show circadian rhythm during a period of 24 h. PER1 is an anti-tumor gene in OSCC.

**[Key words]** PER1 gene; circadian rhythm; squamous cells; carcinoma

Corresponding author: Yang Kai, Tel: 86-23-89012907, E-mail: cqfyk@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 杨凯,电话:(023)89012907, E-mail: cqfyk@yahoo.com.cn

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130305.1419.008.htm> (2013-03-05)

包括人类在内的几乎所有真核生物体内的许多生理过程,如活动和休息、激素水平、新陈代谢等都具有昼夜节律性改变规律<sup>[1]</sup>。这种节律性是由生物体内的一个特殊生物钟系统所控制<sup>[2]</sup>。至今发现有9个核心生物钟基因(也称昼夜节律基因)调节体内昼夜节律,包括 PER1、PER2、PER3、CLOCK、CRY1、CRY2、BMAL1、CK1 $\epsilon$  和 TIM<sup>[1-3]</sup>。这些生物钟基因通过自身节律性表达改变调控着正常生物体的昼夜节律,以及正常细胞的增殖、凋亡和新陈代谢等<sup>[4-8]</sup>。近年来研究证明:生物钟 PER1 基因不仅在调节机体正常生理节律、细胞增殖和细胞周期调控中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>,同时 PER1 的表达变化也与癌症的发生、发展密切相关<sup>[4,10-12]</sup>。Gery 等<sup>[4]</sup>研究表明 PER1 基因在结肠癌和前列腺癌中为低表达,具有抑癌作用,而 Sato 等<sup>[13]</sup>研究表明 PER1 基因在肝癌和胰腺癌中为高表达,具有促癌作用。我们前期研究也首次证明 PER1 基因在口腔鳞癌中为低表达<sup>[14]</sup>。目前我们还未查见生物钟基因 PER1 在口腔癌细胞中的表达是否具有昼夜节律特征以及它的表达变化与体内肿瘤生长的关系的相关研究报道。

口腔癌约占全身恶性肿瘤的2%,其中90%为鳞状细胞癌,尽管手术、化疗和放疗取得了一些进步,但口腔癌患者的5年总生存率仍然只有50%~60%<sup>[15]</sup>。因此,探索口腔癌新型有效的治疗方法和防治机理具有重大意义。为此,我们建立口腔颊部鳞状细胞癌裸鼠模型,检测 PER1 基因在口腔颊鳞癌细胞中的昼夜表达节律情况,以及 PER1 的表达改变与口腔颊鳞癌生长的关系,希望从生物钟基因表达改变的角度为探索口腔鳞癌的发生发展以及个体化治疗提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

1.1.1 仪器和试剂 人颊鳞状细胞癌细胞株 BcaCD885(四川大学华西口腔医学院),兔抗 PER1 抗体(Abcam 公司),SP 试剂盒、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(北京中杉公司),Tubulin 抗体(上海碧云天公司),PCR 试剂盒(TaKaRa,日本),冷冻低速离心机(HERMLE,德国,Z233MK-2),显微镜(Olympus,日本, BX51),化学发光仪(Bio-Rad,美国),可见分光光度计(安玛西亚公司,瑞典,UV-GeneQuant),梯度 PCR 仪(Bio-Rad,美国),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国)。

1.1.2 实验动物 无特定病原体(SPF)级别 BALB/c 裸基因(nu)的纯合品系雌性裸鼠60只,5~6周龄,体质量19~20g,购自重庆医科大学实验动物中心。所有实验操作程序经过重庆医科大学实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准。

### 1.2 实验方法

1.2.1 裸鼠 BcaCD885 颊鳞癌模型的建立 60只裸鼠随机分笼饲养,每笼5只,先置于标准化12h光照/12h黑暗环境中饲养3周,垫料、饲料和饮水均经灭菌处理[室温(24±1)℃,空气湿度(60±10)%]。时间以开灯后时间(hours after lights onset,HALO)为参考,0 HALO 为开灯时间,12 HALO 为关灯时间。3周后,取对数生长期 BcaCD885 细胞,经0.25%胰酶消化,冷冻低速离心(4℃,1000 r/min,离心半径3cm)5min后用无菌 PBS 配制成单细胞悬液。将0.2 mL 含有 2×10<sup>6</sup> BcaCD885 细胞的悬液植入裸鼠颊部,继续在标准化12h光照/12h黑暗环境中饲养。3周明显成瘤后,分别于24h内4、10、16和22 HALO 的4个时间点用颈椎脱臼法分别处死15只裸鼠,立即取出肿瘤,称量,然后将每块肿瘤组织均分为3份,1份用4%多聚甲醛固定后石蜡包埋,另2份迅速置于液氮中。

1.2.2 免疫组化检测 将石蜡包埋后的组织行4μm厚切片,采用S-P免疫组化法,按照说明书步骤操作,最后进行DAB显色。以PBS代替一抗作阴性对照,用公司提供的已知 PER1 阳性对照片作阳性对照。细胞内出现棕黄色颗粒为阳性反应。

1.2.3 肿瘤有丝分裂指数(mitotic index,MI)检测 将石蜡包埋后的每块肿瘤组织常规切一张HE染色切片。400倍放大倍数显微镜下,在每张切片中存活肿瘤细胞最多的区域随机选择5个连续视野(每个视野300~400个肿瘤细胞)采集图像。计数每张图像中有丝分裂期的细胞数。MI即为每个视野中有丝分裂期细胞的平均数。

1.2.4 Western blot 检测 肿瘤组织用匀浆器碾碎后,加裂解液裂解细胞,4℃,12000×g离心2min。BCA法测蛋白浓度。每孔上样50μg,进行分离胶6%SDS-PAGE电泳,湿转PVDF膜(PER1:250mA,145min;Tubulin:250mA,50min)。5%脱脂奶粉室温封闭1h。PER1一抗用5%脱脂奶粉稀释,比例为1:200;Tubulin一抗用专门抗体稀释液稀释,比例为1:1000。一抗4℃摇床过夜。二抗稀释比例均为1:5000。二抗室温孵育1h,ECL发光。用凝胶图像分析仪测量条带灰度值,计算PER1和内参条带灰度值比值。实验重复3次。

1.2.5 Real-time RT-PCR 检测 实验步骤:①组织总RNA提取:用RNAiso Plus试剂盒提取液氮保存肿瘤组织的总RNA。用可见分光光度计测定D(260)及D(280)处的光密度值,计算RNA浓度和纯度;②cDNA合成:用PrimeScript RT reagent Kit逆转录试剂盒,合成cDNA,反应体系为20μL,37℃,15min,85℃,5s;③Real-time RT-PCR反应:用Oligo7.0软件设计、合成目的基因PER1和内参基因β-actin的引物,引物序列见表1。反应体系为2×SYBR Prvmix Ex Taq™ II 12.5μL,浓度均为0.4μmol/L的上游引物和下游引物各1μL,DNA模板2μL(相当于100ng),灭菌灭酶蒸馏水8.5μL。反应液总体积为25μL。反应条件均为:95℃预变性1.5min,95℃变性10s,60℃退火延伸30s,扩增40个循环。60℃延伸时采集荧光信号。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算PER1基因的表达。实验重复3次。

### 1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件行方差分析检验昼夜4个时间点PER1表达的差异。用CircWave V1.4软件(荷兰)行余弦分析检验PER1的昼夜节律表达情况。

表1 PER1 和  $\beta$ -actin 的引物序列

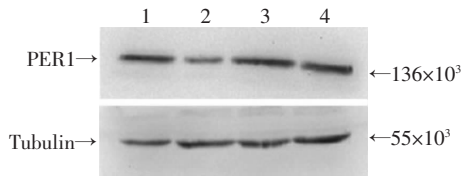
基因	引物序列	产物长度(bp)
PER1	上游: 5'-ACCCTGATGACCCACTCTTCTC-3'	170
	下游: 5'-CTCCTCCATAGCCAAGTCGTA-3'	
$\beta$ -actin	上游: 5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'	169
	下游: 5'-AGAGCGCTACAGGGATAGCACAG-3'	

## 2 结果

### 2.1 PER1 蛋白在口腔鳞癌细胞中的表达和昼夜节律改变

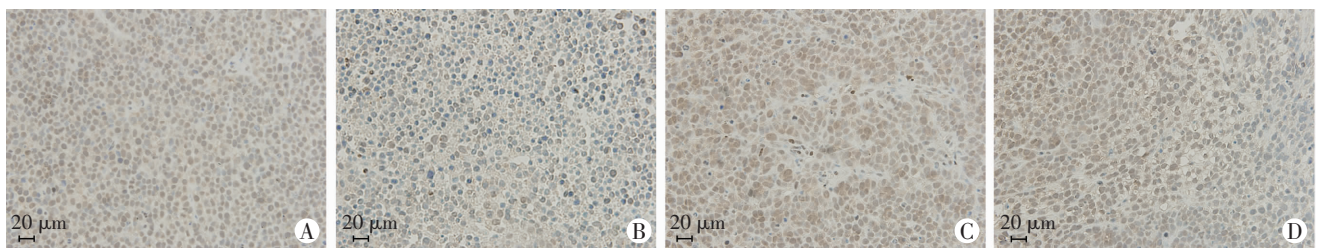
免疫组化结果显示:在昼夜4、10、16、22 HALO 的4个时间点 PER1 蛋白在口腔鳞癌中均有明显表达,PER1 蛋白定位于细胞核和细胞质(图1)。

Western blot 检测结果见图2,在昼夜的4个不同时间点 PER1 蛋白的灰度值比值具有显著性差异( $P < 0.01$ ),见表2。余弦分析表明:口腔鳞癌细胞中 PER1 蛋白表达的昼夜变化波动符合余弦函数规律,具有昼夜节律性( $P < 0.01$ )。余弦拟合曲线见图3A,PER1 蛋白表达量的峰值出现在20.92 HALO(灰度值比值为0.86),谷值出现在8.87 HALO(灰度值比值为0.36)。



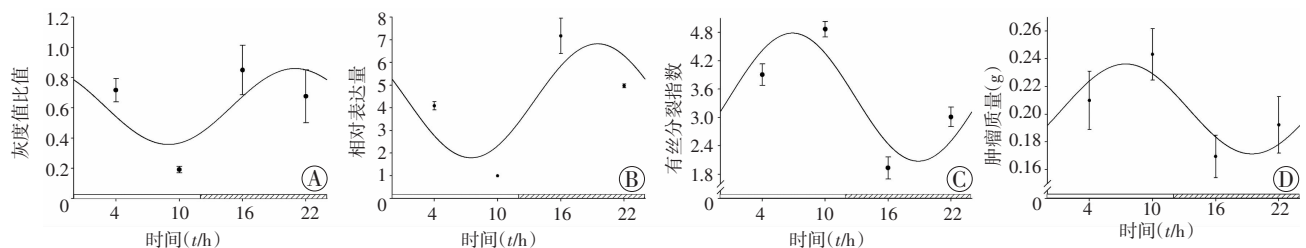
1~4:分别为4、10、16、22 HALO

图2 Western blot 检测4个时间点口腔鳞癌细胞中 PER1 蛋白的表达



A~D: 分别为4、10、16、22 HALO

图1 免疫组化观察昼夜4个不同时间点 PER1 蛋白在口腔鳞癌细胞中的表达 (S-P ×400)



A:PER1 蛋白;B:PER1 mRNA;C:MI;D:肿瘤质量 曲线代表各指标的余弦拟合曲线,4个点代表各指标在4、10、16、22 HALO 时的均值

图3 口腔鳞癌 PER1 蛋白、PER1 mRNA、有丝分裂指数和肿瘤质量昼夜变化的余弦拟合曲线

### 2.2 PER1 mRNA 在口腔鳞癌细胞中的表达和昼夜节律改变

Real-time RT-PCR 检测表明:在昼夜的4个不同时间点 PER1 mRNA 的相对表达量具有显著性差异( $P < 0.01$ ),见表2。余弦分析表明:口腔鳞癌细胞中 PER1 mRNA 表达的昼夜变化波动符合余弦函数规律,具有昼夜节律性( $P < 0.05$ ),余弦拟合曲线见图3B,PER1 mRNA 表达的峰值出现在19.48 HALO(相对表达量为6.82),谷值出现在7.64 HALO(相对表达量为1.79)。

表2 不同时间点口腔鳞癌 PER1 蛋白 mRNA、肿瘤有丝分裂指数(MI)和肿瘤质量的变化 ( $n = 15, \bar{x} \pm s$ )

时间	PER1 蛋白灰度值比值	PER1 mRNA	MI	肿瘤质量(g)
4 HALO	0.72 ± 0.08	4.09 ± 0.18	3.91 ± 0.23	0.21 ± 0.02
10 HALO	0.19 ± 0.02	1.00 ± 0.00	4.87 ± 0.16	0.24 ± 0.02
16 HALO	0.85 ± 0.16	7.17 ± 0.78	1.93 ± 0.24	0.17 ± 0.02
22 HALO	0.68 ± 0.18	4.98 ± 0.09	3.01 ± 0.21	0.19 ± 0.02
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

### 2.3 肿瘤 MI 的昼夜节律改变

在昼夜的4个不同时间点肿瘤 MI 具有显著性差异( $P < 0.01$ ),见表2。余弦分析表明:肿瘤 MI 昼夜变化波动符合余弦函数规律,具有昼夜节律性( $P < 0.01$ )。余弦拟合曲线见图3C,MI 的峰值出现在6.91 HALO(4.78),谷值在18.85 HALO(2.08)。

### 2.4 肿瘤质量的昼夜节律改变

在昼夜4个不同时间点肿瘤质量具有显著性差异( $P < 0.01$ ),见表2。余弦分析表明:肿瘤质量昼夜变化波动具有昼夜节律性( $P < 0.01$ )。余弦拟合曲线见图3D,肿瘤质量的峰值出现在7.51 HALO(0.24 g),谷值在19.18 HALO(0.17 g)。

### 3 讨论

目前研究证明:生物钟 PER1 基因在调节正常机体生理节律中发挥着核心作用,其主要调节机体生理节律、调控细胞周期和促进 DNA 损伤修复等功能<sup>[4]</sup>。Bjarnason 等<sup>[16]</sup>报道正常人口腔颊黏膜细胞中 PER1 mRNA 的表达具有 24 h 昼夜节律性,PER1 mRNA 表达峰值出现于活动相早期(07:58 h),谷值出现于活动相和休息相的转化时期(00:00 h),峰值比谷值高 3.33 倍。近年来也证明:PER1 的表达变化与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[10-14]</sup>。本研究结果显示:PER1 mRNA 和 PER1 蛋白在口腔鳞癌细胞中的表达也具有 24 h 昼夜节律性,PER1 mRNA 表达的峰值出现于活动相中晚期(19.48 HALO),谷值出现于休息相中期(7.64 HALO),峰值比谷值高 3.81 倍。PER1 蛋白表达的峰值出现在活动相中晚期(20.92 HALO),谷值出现在休息相中期(8.87 HALO),峰值比谷值高 2.39 倍。

恶性肿瘤的基本特征是细胞的增殖、生长失调。肿瘤细胞 MI 和肿瘤质量是反映肿瘤细胞分裂、生长的重要指标。本研究显示:口腔鳞癌细胞 MI 和肿瘤质量在昼夜不同时间也具有显著性的差异,且这种差异改变具有昼夜节律性。进一步分析发现:肿瘤细胞 MI 和肿瘤质量与 PER1 的表达呈反比关系,即在 16 HALO 时 PER1 表达最高,而肿瘤 MI 和肿瘤质量最低;在 10 HALO 时 PER1 表达最低,而肿瘤 MI 和肿瘤质量最高。余弦分析也表明:PER1 mRNA 表达的峰值与肿瘤 MI 和肿瘤质量的谷值均位于活动相中期,而 PER1 mRNA 表达的谷值与 MI 和肿瘤质量的峰值均位于休息相中期。虽然鼠类为夜行动物,但目前已证实:从鼠类的活动相和休息相所获得的研究结果可以外推到人类的活动相和休息相<sup>[17]</sup>。本研究结果也提示,PER1 表达增高抑制口腔鳞癌细胞的分裂增殖和生长,在口腔鳞癌中 PER1 应为抑癌基因。Gery 等<sup>[4]</sup>通过对体外结肠癌细胞 HCT116 中 PER1 的研究发现,PER1 的表达水平明显影响细胞周期相关蛋白 wee-1 的生成和 cyclin B1、Cdc2 的表达,PER1 过表达让细胞更易通过 G<sub>2</sub>/M 检查点。因此,目前认为:PER1 是通过调控细胞周期相关蛋白和影响 DNA 损伤修复这两条途径在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要作用<sup>[4,12-13]</sup>,其具体机制有待进一步深入研究。

生物钟系统作为机体的一个特殊系统,发现并研究清楚不同组织和肿瘤中生物钟基因的表达和昼夜节律改变规律,有利于明确肿瘤的发生发展机制,对肿瘤的有效治疗具有重要意义。同时,也为有可能将恢复肿瘤中生物钟基因的表达节律发展成为治疗肿瘤的一

种全新方法。

### 参考文献:

- [1] Zhu Y, Stevens R G, Hoffman A E, *et al.* Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(24): 9315-9322.
- [2] Reddy A B, O'Neill J S. Healthy clocks, healthy body, healthy mind [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(1): 36-44.
- [3] Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy[J]. *J Circadian Rhythms*, 2010, 8: 3.
- [4] Gery S, Komatsu N, Baldijyan L, *et al.* The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells[J]. *Mol Cell*, 2006, 22(3): 375-382.
- [5] Grechez-Cassiau A, Rayet B, Guillaumond F, *et al.* The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 4535-4542.
- [6] Mullenders J, Fabius A W, Madiredjo M, *et al.* A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4798.
- [7] Kosir R, Acimovic J, Golicnik M, *et al.* Determination of reference genes for circadian studies in different tissues and mouse strains [J]. *BMC Mol Biol*, 2010, 11: 60.
- [8] Kang T H, Reardon J T, Kemp M, *et al.* Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(8): 2864-2867.
- [9] Miyazaki K, Nagase T, Mesaki M, *et al.* Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts [J]. *Biochem J*, 2004, 380(Pt 1): 95-103.
- [10] Yu E A, Weaver D R. Disrupting the circadian clock: gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes [J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(5): 479-493.
- [11] Davidson A J, Straume M, Block G D, *et al.* Daily timed meals dissociate circadian rhythms in hepatoma and healthy host liver [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(7): 1623-1627.
- [12] Yang X, Wood P A, Ansell C M, *et al.* The circadian clock gene Per1 suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day [J]. *Chronobiol Int*, 2009, 26(7): 1323-1339.
- [13] Sato F, Nagata C, Liu Y, *et al.* PERIOD1 is an anti-apoptotic factor in human pancreatic and hepatic cancer cells [J]. *J Biochem*, 2009, 146(6): 833-838.
- [14] Chen R, Yang K, Zhao N B, *et al.* Abnormal expression of PER1 circadian-clock gene in oral squamous cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2012, 5: 403-407.
- [15] Kademani D, Bell R B, Bagheri S, *et al.* Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2005, 63(11): 1599-1605.
- [16] Bjarnason G A, Jordan R C, Wood P A, *et al.* Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(5): 1793-1801.
- [17] Innominato P F, Levi F A, Bjarnason G A. Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(9/10): 979-1001.

(收稿:2012-12-17;修回:2013-02-06)

(编辑 张 维)