

· 临床论著 ·

肿瘤抑制蛋白 FBW7 在口腔鳞状细胞癌中表达的研究

刘兴光 蒋盼 旷世佳 喻佩 张雁 汪华

【摘要】 目的 检查肿瘤抑制蛋白 FBW7 在鳞状细胞癌(OSCC)中的表达,初步探究 FBW7 表达与 OSCC 细胞克隆形成能力的关系。方法 收集 19 例 OSCC 患者的癌巢组织及对应癌旁组织,应用免疫组化染色与 Real time RT-PCR 技术检测 FBW7 在癌巢及对应癌旁组织中的表达情况。Western blot 和 Real time RT-PCR 技术比较口腔鳞状细胞癌细胞系 KV、CTST-1、CTST-2 以及正常颊黏膜上皮细胞中 FBW7 蛋白和 mRNA 表达水平,分析 FBW7 表达与口腔鳞状细胞癌细胞系克隆形成能力的关系。结果 免疫组化和 Real time RT-PCR 结果显示,FBW7 蛋白及 mRNA 在对应癌旁组织中的表达水平明显高于癌巢组织($P < 0.05$),Western blot 及 Real time RT-PCR 结果显示,FBW7 蛋白和 mRNA 在口腔鳞状细胞系中的表达水平明显低于正常口腔黏膜上皮细胞($P < 0.05$)。克隆形成实验结果表明,FBW7 表达较高的舌癌细胞株的克隆形成数目较少,克隆形成能力较弱。结论 FBW7 在口腔鳞状细胞癌组织和细胞系中表达显著降低,与口腔癌细胞系的克隆形成能力呈负相关。

【关键词】 口腔肿瘤; 克隆细胞; FBW7

Negative correlation of FBW7 expression with colony formation capability in oral squamous cell carcinoma

LIU Xing-guang*, JIANG Pan, KUANG Shi-jia, YU Pei, ZHANG Yan, WANG Hua.* Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: ZHANG Yan, Email: yanyanzhiro@yahoo.com.cn; WANG Hua, Email: wang63jp@yahoo.cn

【Abstract】 Objective To analyze the expression of FBW7 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to preliminarily investigate the correlation of FBW7 (F-box and WD repeat domain-containing 7, FBW7) expression and colony formation capability of OSCC. **Methods** 19 cancerous tissues and adjacent noncancerous tissues were collected from those patients who had been diagnosed the primary OSCC during their surgeries. The expression levels of FBW7 protein and mRNA were examined using immunohistochemistry and real time RT-PCR to determine the prognostic significance. The correlation between FBW7 expression and colony formation capability in OSCC cell lines were investigated *in vitro*. **Results** We found that FBW7 expression was significantly higher in adjacent noncancerous tissues than that in the cancerous tissues though immunohistochemistry and real time RT-PCR ($P < 0.05$). Similarly, the expression of FBW7 protein and mRNA was also higher in normal epithelial cells than that in OSCC cell lines ($P < 0.05$). There was a negative correlation between the expression of FBW7 mRNA and colony formation capability in the soft agar colony formation assay ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of FBW7 in OSCC tissue and cell lines is downregulated. The expressions of FBW7 mRNA have a negative relation with the colony formation capability of OSCC cell lines.

【Key words】 Oral carcinoma; Colon cells; FBW7

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OS-

CC)是一类严重危害人类生命健康的疾病。目前,OSCC 在全球范围内被称为第六大癌症,在头颈部癌症中占据 24% 的比例^[1]。针对口腔鳞状细胞癌的治疗,外科手术、放射治疗和化学药物治疗这三大传统治疗方式也进入了瓶颈期,近年来,对于 OSCC 患者的生存率及生存质量的提高并未见明显改善^[2]。三大传统治疗方式在抑制病灶发展的过程中,也对患者自身功能及形态造成较大的影响^[3-5]。生物治疗作为第四种

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.11.113

作者单位:510055 广州,中山大学光华口腔医学院附属口腔医院口腔颌面外科广东省口腔医学重点实验室(刘兴光、蒋盼、旷世佳、汪华);中山大学生命科学院肿瘤与干细胞研究室(喻佩、张雁);广州一代医药科技有限公司(汪华)

通讯作者:张雁,Email:yanyanzhiro@yahoo.com.cn;汪华,Email:wang63jp@yahoo.cn

治疗手段,已应用于临床,并日益受到重视^[6]。

基因疗法是生物治疗的一个重要分支,是将可用于治疗的目的基因,在体外克隆扩增并回输体内,从而使目的基因在体内有效表达,增强患者自体抗肿瘤的作用,提高患者的抗肿瘤免疫力^[7]。FBW7(F-box and WD repeat domain-containing 7)是SCF型泛素连接酶的靶蛋白识别组分,其介导的蛋白酶体途径可以降解多种原癌蛋白,如cyclin E、c-myc、c-jun、MCL1和Notch等^[8-11]。因此,FBW7的基因突变或者其蛋白表达的降低可导致多种肿瘤的发生^[12]。目前已知FBW7缺失与结肠癌、胃癌、神经胶质瘤和乳腺癌等恶性肿瘤的预后不良有重要关系^[13-15]。然而,在OSCC中,FBW7的表达情况及相关研究仍未有报道。本研究旨在探讨FBW7在OSCC中的表达及与OSCC患者预后的相关性,以期为OSCC的治疗提供新思路。

材料与amp;方法

一、材料

手术中采集口腔鳞癌患者癌巢组织和对应癌旁组织(对应癌旁组织标本取材距癌巢组织2 cm以上)各19例,其中舌癌10例,颊黏膜癌3例,牙龈癌3例,口底癌2例,腭癌1例。手术标本均来自于中山大学附属光华口腔医院口腔颌面外科(2008年8月至2010年8月),相关标本都为具有完整临床资料的病例。其中男13例,女6例,年龄37~72岁,治疗方法为单纯的手术切除,未进行放射治疗及化学治疗,所有病例均经病理确诊。总RNA提取Trizol试剂盒购于Invitrogen公司,反转录ReverTra Ace- α -试剂盒购自日本TOYOBO公司,LightCycler SYBR试剂盒购自roche公司,FBW7引物由华大生物有限公司合成,FBW7上游引物:5'-CTAAGGTGCTGAAAGGACAT-3',下游引物:5'-TATGCTCCACTAACAACCCTCTG-3'。鼠抗人FBW7单克隆抗体购自Abcam,免疫组化工作浓度为1:100,ChemMate™ EnVision抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒购自Dako公司,一抗抗体稀释液购自CST公司,蛋白酶抑制剂购自Roche公司人舌癌细胞株KV、CTST-1及CTST-2由本实验室保存,其他试剂:胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司,RIPA裂解液,DMEM/F12(DF)培养基由本实验室配制。

二、实验方法

1. 细胞培养:人舌癌细胞系KV、CTST-1、CTST-2和正常颊黏膜组织原代上皮细胞培养于含100 ml/L胎牛血清的DF培养基中,培养条件为37℃、5% CO₂、饱和湿度。选取稳定对数生长期的细胞行进一步实验。

2. 免疫组织化学染色:OSCC癌巢及对应癌旁组

织标本经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,厚度为4 μ m。置于60℃烘箱烤片30 min,置于二甲苯脱蜡,乙醇中行梯度脱水,3%的H₂O₂/甲醇溶液封闭内源性过氧化物,柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复,滴加非免疫山羊血清室温封闭30 min。加入1:100倍稀释的FBW7一抗,一抗稀释液做阴性对照,4℃孵育过夜。滴加50~100 μ l的ChemMate™ EnVision二抗,室温下孵育1 h,滴加DAB工作液显色2 min左右,苏木素复染,自来水冲洗10 min返蓝,乙醇中梯度脱水,中性树脂封片后在光镜下观察。染色强度联合阳性细胞百分比进行评分,即染色强度(-, \pm , +, ++, +++)与阳性细胞的百分率(0~100%)进行打分^[16]。计算染色得分=染色强度(0,0.5,1,2,3) \times (0~100)。得分 \leq 100定为低表达,得分 $>$ 100定为高表达。全部打分统计由两名研究生在不知道组织诊断结果的情况下进行。

3. Real time RT-PCR:按Invitrogen Trizol试剂盒说明步骤提取口腔鳞癌癌巢及对应癌旁组织总RNA,提取舌癌细胞系KV、CTST-1、CTST-2的总RNA,使用ReverTra Ace- α -反转录试剂盒,合成cDNA,置于-20℃冰箱中保存。RT-qPCR反应体系:模板cDNA 1 μ l,上游引物0.2 μ l,下游引物0.2 μ l,dH₂O 3.6 μ l,2 \times LightCycler SYBR 480 5 μ l,反应条件:95℃ 10 min;扩增95℃ 10 s,58℃ 5 s,72℃ 20 s,共40个循环;溶解曲线95℃ 5 s,65℃ 1 min,97℃;冷却40℃ 30 s。分析溶解曲线和扩增曲线,计算2^{- Δ Ct}, Δ Ct值=样品的Ct均值-内参照的Ct均值。

4. Western blot 免疫印迹:将蛋白裂解液(RAPI)按体积5:1的比例加入到上述收集的细胞中,提取总蛋白(保存于-80℃)。加入5 \times 上样缓冲液,100℃加热5 min变性。将蛋白质样品充分混匀,滴加到事先准备好的浓缩胶空隙中。按浓缩胶80 V,分离胶180 V进行恒压电泳。半干条件下转膜至PVDF膜(GE Healthcare),恒压20 V,30 min。用含有5%脱脂奶粉的1 \times TBST封闭1 h,加入FBW7一抗(1:500)及G3PDH一抗,4℃孵育过夜。二抗室温下杂交1 h,ECL显影曝光,拍照。图片用GE公司Image Quant TL 7.0 Image Analysis Software软件来获取并处理。

5. 软琼脂克隆形成实验:微波溶解1.33%的琼脂1 ml后迅速与1 ml相同体积的2 \times DF(+20% FBS)混合,铺于6孔板,4℃,30 min使其充分凝固;微波溶解0.67%的琼脂0.5 ml后迅速与相同体积0.5 ml的含有细胞(CTST-1、CTST-2、颊黏膜正常上皮细胞)的2 \times DF(+20% FBS)混合,细胞密度为10 000个/孔,铺于6孔板上层,室温静置使其充分凝固。37℃,5% CO₂

条件下培养2周,每3 d在上层琼脂上加1次培养基。用结晶紫染色,肉眼下计数细胞克隆。

三、统计学分析

所有实验均经过最少3次重复实验,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,FBW7在癌巢及对应癌旁组织中的表达比较,FBW7表达与患者预后关系的实验数据结果用SPSS 16.0统计软件分析,计算平均值和标准误差,用 t 检验结果,相关性分析采用单变量线性分析。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

一、FBW7在OSCC癌巢及对应癌旁组织中的表达

为了确切了解FBW7在OSCC患者组织中的表达情况,本研究对19例OSCC患者的癌巢及对应癌旁组织标本进行了免疫染色检测。实验发现,一抗稀释液对应的阴性对照组的标本都没有特异性染色,见图1。但在癌巢和对应癌旁标本中都有不同程度的染色。FBW7主要表达于细胞质中,胞核也可见有表达。在对应癌旁组织中,FBW7的表达较高;在26%(5/19)的癌巢组织中染色比较浅,74%(14/19)的癌巢组织中,FBW7表现为高表达。统计发现,FBW7在OSCC癌巢中的表达比癌旁组织低($t = 1.734, P < 0.05$)。

同时,我们对此19例OSCC患者进行随访分析,随访时间为2008~2012年,随访率为63%(12/19),其中,2例患者死亡,1例患者出现肿瘤复发。遂对患者的肿瘤标本进行比较,发现预后差的患者肿瘤标本低表达FBW7。见图2。

对5例新鲜的OSCC癌巢和对应癌旁组织提取总RNA,通过反转录获得cDNA,进行Real time RT-PCR,实验结果发现(图3),牙龈癌癌巢与对应癌旁组织中FBW7 mRNA的表达无明显统计学差异($t = 0.765, P > 0.05$),2例舌癌组织,颊黏膜癌组织及口底癌组织中FBW7 mRNA的表达显著低于对应癌旁组织($t = 2.401, P < 0.05$)。

二、FBW7在OSCC细胞与正常上皮细胞中的表达

对舌癌KV,CTST-1,CTST-2细胞系及颊黏膜正常组织培养的原代上皮细胞提取总蛋白,并用Western blot的方法比较了FBW7在这些细胞中表达的情况。颊黏膜上皮细胞中FBW7呈现高表达,舌癌细胞系CTST-2中FBW7呈现低表达,舌癌细胞系CTST-1及KV中FBW7则表达极低。见图4。

对舌癌KV、CTST-1、CTST-2细胞系,颊黏膜正常组织培养的上皮细胞以及牙龈正常组织培养的上皮细胞提取总RNA,通过反转录获得cDNA,进行Real time RT-PCR,结果如图5所示,FBW7基因在颊黏膜正常上

皮细胞中表达 $[(3.10 \pm 0.45) \times 10^{-4}]$ 显著高于舌癌细胞系KV $[(1.65 \pm 0.23) \times 10^{-4}]$ ($t = 4.646, P < 0.01$)和CTST-1 $[(8.69 \pm 1.2) \times 10^{-5}]$ ($t = 4.998, P < 0.01$),显著高于舌癌细胞系CTST-2 $[(1.94 \pm 0.34) \times 10^{-4}]$ ($t = 2.419, P < 0.05$)。

三、FBW7在细胞系中的表达与克隆形成实验的关系

根据前期Real time RT-PCR结果已知FBW7在颊黏膜正常上皮细胞中的表达高于CTST-1及CTST-2细胞系,而在CTST-2细胞系中表达高于CTST-1。通过软琼脂克隆形成实验,研究FBW7的表达与细胞克隆形成能力之间的关系。结果如图6所示,克隆形成数为:CTST-1 248 ± 7.5 ,CTST-2 90 ± 4.9 ,正常上皮细胞 34 ± 3.7 ,比较得知,FBW7表达较低的CTST-1细胞系中,克隆形成数明显高于FBW7表达较高的CTST-2细胞系($t = 1.676, P < 0.05$)及正常上皮细胞($t = 2.096, P < 0.05$)。

讨 论

肿瘤抑制蛋白FBW7作为SCF型泛素连接酶的靶蛋白识别组分,泛素连接酶对蛋白质的降解异常涉及许多肿瘤的病理生成^[17]。FBW7基因突变导致癌基因对降解敏感降低,而肿瘤抑制因子的降解异常加快,从而最终引发肿瘤的发生与发展^[12]。而已知的与OSCC发生具有相关性的cyclin E、c-myc、c-jun和MCL1等基因均由FBW7介导的泛素连接酶体系完成降解和调控,而FBW7也被认为是一类抑癌因子。Agrawal等^[18]对120例头颈部鳞状细胞癌患者进行突变基因筛查发现:有6例标本中出现FBW7基因突变。我们的研究显示FBW7的表达在OSCC组织和细胞的基因和蛋白表达显著减低,建议FBW7在OSCC的病理进程中具有重要的作用。本研究中牙龈癌癌巢的FBW7 mRNA表达低于其对应癌旁组织,但是两者比较无统计学差异,结合病理组织学诊断该牙龈癌的分化程度较高,FBW7的表达水平是否和发生部位或分化程度有关有待进一步研究。

最近的研究发现将FBW7基因转染至肿瘤细胞中,肿瘤细胞的生长受到了明显的抑制,而细胞凋亡增加,这表明了FBW7具有抗肿瘤作用^[19]。在血液系统肿瘤,胆管肿瘤,直肠癌和胃癌等肿瘤中,FBW7的突变较为常见,并且发现FBW7的突变或缺失与肿瘤患者的预后有着密切的关系^[20-21]。Xu等^[20]发现miR-223作为FBW7的上游基因调控FBW7的表达。Kurashige等^[21]研究发现,在食管癌患者中,高表达miR-223,从而使FBW7功能受到抑制的患者,预后效果较差。本

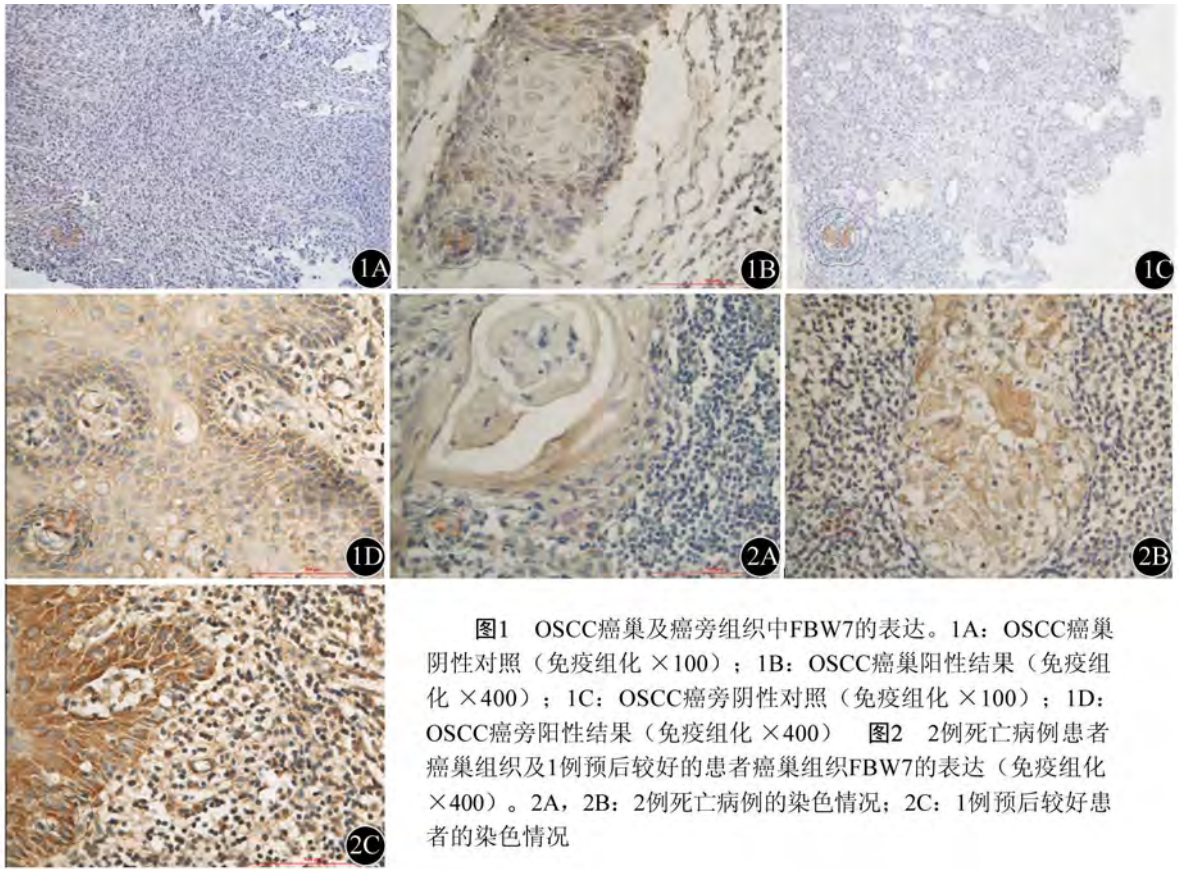


图1 OSCC癌巢及癌旁组织中FBW7的表达。1A: OSCC癌巢阴性对照(免疫组化×100); 1B: OSCC癌巢阳性结果(免疫组化×400); 1C: OSCC癌旁阴性对照(免疫组化×100); 1D: OSCC癌旁阳性结果(免疫组化×400) 图2 2例死亡病例患者癌巢组织及1例预后较好的患者癌巢组织FBW7的表达(免疫组化×400)。2A, 2B: 2例死亡病例的染色情况; 2C: 1例预后较好患者的染色情况

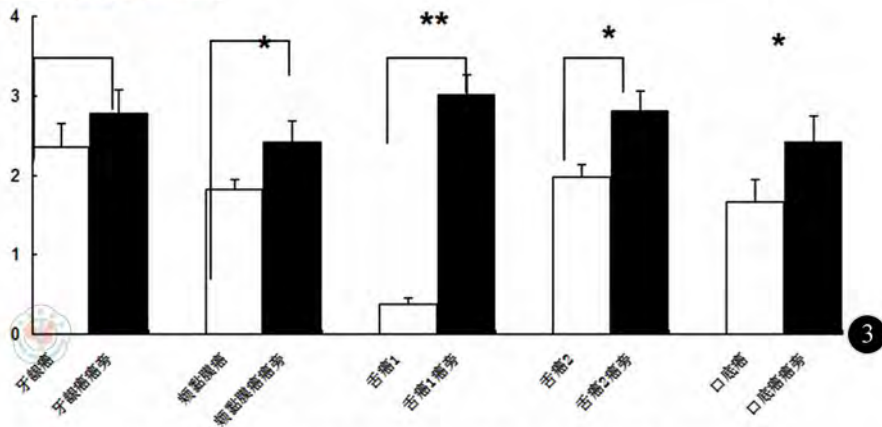


图3 FBW7 mRNA在口腔鳞癌癌巢及癌旁中的表达 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

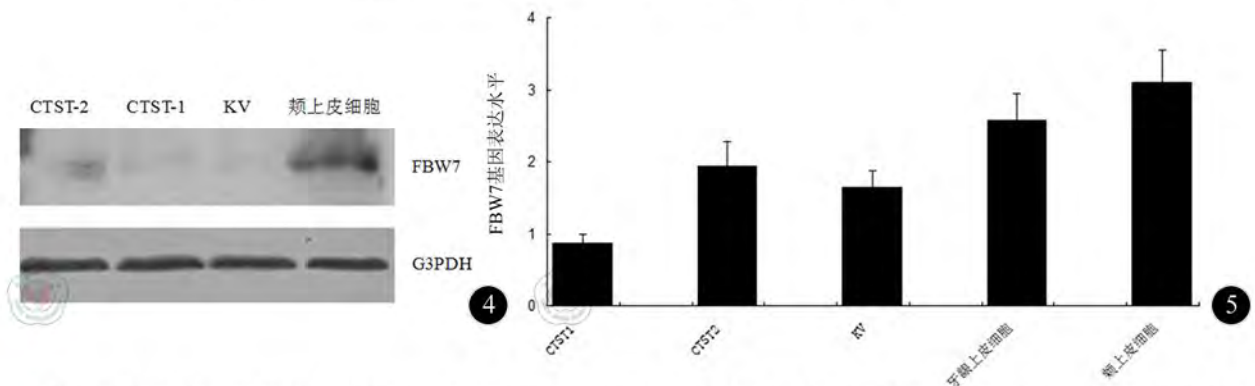


图4 颊黏膜正常上皮细胞中FBW7蛋白表达较高, CTST-1、CTST-2和KV细胞系中FBW7蛋白表达低 图5 FBW7基因在舌癌细胞系及正常黏膜上皮细胞中的表达比较 ($P<0.05$)



图6 细胞克隆形成能力比较。6A: 正常颊黏膜上皮细胞; 6B: CTST-2舌癌细胞; 6C: CTST-1舌癌细胞

研究通过对正常黏膜上皮细胞以及两株 FBW7 表达率不同的舌癌细胞系进行克隆形成实验,发现 FBW7 表达较低的舌癌细胞克隆形成能力较强,而 FBW7 表达较高的舌癌细胞克隆能力较弱,FBW7 的表达与舌癌细胞的克隆形成能力具有一定相关性。因此,协同与其他肿瘤的研究成果^[21],我们的研究也提示 FBW7 作为 OSCC 治疗靶点基因的可能。

本研究显示 OSCC 患者中预后较差的病例组织标本中,FBW7 的表达水平低于预后较好患者的组织标本及正常组织标本。进一步的研究是增大病例数量,和延长随访时间,调查 FBW7 与患者预后的关系。

参考文献

- [1] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19: 92-105.
- [2] Joaquim Bellmunt, William K. Castration-resistant prostate cancer: new science and therapeutic prospects. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2010, 2: 189-207.
- [3] Croce CM. Causes and consequences of micro-RNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 704-714.
- [4] Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung*, 2008, 58: 261-264.
- [5] Wijer OB, Levendag PC, Braaksma MM, et al. Patients with head and neck cancer cured by radiation therapy: a survey of the dry mouth syndrome in long-term survivors. *Head Neck*, 2002, 24: 737.
- [6] Jennifer Couzin-Frankel. Immune Therapy Steps Up the Attack. *J Science*, 2010, 330: 440-443.
- [7] Zhang T, Hamada K, Hyodo M, et al. Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAI. 3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. *Oncol Rep*, 2011, 25: 795-802.
- [8] Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, et al. SCF FBW7 regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature*, 2011, 471: 104-109.
- [9] Bhaskaran N, van Drogen F, Ng HF, et al. Fbw7 α and Fbw7 γ collaborate to shuttle cyclin E1 into the nucleolus for multiubiquitylation. *Mol Cell Biol*, 2013, 33: 85-97.
- [10] Ishikawa Y, Hosogane M, Okuyama R, et al. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene*, 2012, 32: 1921-1932.
- [11] Zhang J, Zhu F, Li X, et al. Rack1 protects N-terminal phosphorylated c-Jun from Fbw7-mediated degradation. *Oncogene*, 2012, 31: 1835-1844.
- [12] Welcker M, Clurman BE. Fbw7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nature Rev. Cancer*, 2008, 8: 83-93.
- [13] Zhao D, Zheng HQ, Zhou Z, et al. The Fbw7 tumor suppressor targets KLF5 for ubiquitin-mediated degradation and suppresses breast cell proliferation. *Cancer Res*, 2010, 70: 4728-4738.
- [14] Li J, Guo Y, Liang X, et al. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4. *Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138: 763-774.
- [15] Sancho R, Jandke A, Davis H, et al. F-box and WD repeat domain-containing 7 regulates intestinal cell lineage commitment and is a haploinsufficient tumor suppressor. *Gastroenterology*, 2010, 139: 929-941.
- [16] Zeng T, Gao H, Yu P, et al. Up-regulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer. *PLoS One*, 2011, 6, : e25343.
- [17] Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 438-449.
- [18] Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*, 2011, 333: 1154-1157.
- [19] Grim JE, Gustafson MP, Hirata RK, et al. Isoform-and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cell Biol*, 2008, 181: 913-920.
- [20] Xu Y, Sengupta T, Kukreja L, et al. MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7. *J Biol Chem*, 2010, 285: 34439-34446.
- [21] Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, et al. Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2012, 106: 182-188.

(收稿日期:2013-04-14)

(本文编辑:梁雷)