

口腔鳞状细胞癌中 SOCS3 及其 DNA 甲基化的表达及生物学意义*

史培荣^① 王旦霞^① 王银珠^① 陈维毅^① 陈显久^②

摘要 目的:研究口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织中细胞因子信号转导抑制因子3(SOCS3)的DNA甲基化及蛋白表达水平,探讨其在OSCC发生、发展、浸润和转移中的作用。**方法:**采用甲基化特异性焦磷酸测序技术(Pyrosequencing)和Western blot法分别检测100例口腔鳞状细胞癌组织中SOCS3的DNA甲基化及蛋白表达水平,并与20例正常口腔黏膜组织进行对照研究,分析其与OSCC临床病理参数的关系。**结果:**1)OSCC组织SOCS3 DNA甲基化的阳性率为85%,显著高于正常口腔黏膜组织的20% ($P < 0.05$); 2)OSCC组织中SOCS3蛋白表达(1.76 ± 0.12)明显低于正常口腔黏膜组(1.93 ± 0.25),差异有统计学意义($P < 0.01$)。口腔鳞状细胞癌组织中甲基化组SOCS3蛋白表达(1.72 ± 0.21)显著低于非甲基化组(1.92 ± 0.23),差异有统计学意义($P < 0.01$); 3)在TNM分期中Ⅲ期组表达均低于Ⅰ~Ⅱ期组($P < 0.05$),伴有淋巴结转移组表达也低于无淋巴结转移组($P < 0.05$); 4)口腔鳞状细胞癌组织中SOCS3蛋白表达水平与肿瘤分化级别呈正相关($r = 0.416, P < 0.05$),与TNM分期、淋巴结转移呈负相关($r = -0.357, P < 0.05$)。**结论:**口腔鳞状细胞癌组织中SOCS3 DNA甲基化阳性率高,导致SOCS3基因表达下调,与口腔鳞状细胞癌的分化、浸润和转移密切相关。

关键词 口腔鳞状细胞癌 细胞因子信号转导负调控因子3 DNA甲基化

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.18.006

Expression and Biological Significance of SOCS3 and SOCS3 DNA Methylation in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC)

Peirong SHI¹, Danxia WANG¹, Yinzhu WANG¹, Weiyi CHEN¹, Xianjiu CHEN²

Correspondence to: Weiyi CHEN; E-mail: chenweiyi@tyut.edu.cn

¹Institute of Technology Applied Mechanics and Biomedical Engineering Research Institute, Taiyuan University of Polytechnics, Taiyuan 030001, China

²Shanxi Medical University Biochemistry and Molecular Biology Staff Room, Taiyuan 030013, China

This work was supported by funds from the Shanxi Project of Tackling Key Problems in Science and Technology (No. 20110321076-02) and Shanxi Medical University Foundation of Scientific and Technological Innovation (No. 01201002) and International Cooperation Project of Shanxi Province(No.2012081050-1)

Abstract Objective: This work aims to study the DNA methylation and protein levels of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissue, and to explore its function in the development, invasion, and metastasis of OSCC. **Methods:** A total of 20 cases with normal oral mucosa were used as the case-control group. The expression of SOCS3 DNA methylation and SOCS3 protein in 100 cases with OSCC is determined and analyzed using methylation pyrosequencing and Western blot to determine its correlation with clinico-pathological parameters. **Results:** The positive rate of SOCS3 DNA methylation is significantly higher in OSCC (85%) than that in the normal oral mucosa tissues (20%, $P < 0.05$); ii. The SOCS3 protein expression was also overtly lower in OSCC (1.76 ± 0.12) than in the normal oral mucosa ($1.93 \pm 0.25, P < 0.01$). In OSCC, the SOCS3 expression was notably lower in the group with methylation (1.72 ± 0.21) than in the group without ($1.92 \pm 0.23, P < 0.01$); iii. Tumor, Node and Metastasis classification revealed that the protein expression in the group with stage III OSCC is lower than in the groups with both stage I and II lesions ($P < 0.05$), and lower in the group with lymph node metastasis compared with the group without metastasis ($P < 0.05$); iv. The expression of SOCS3 protein in OSCC is positively correlated with the differentiation degree ($0.203 < r < 1, P < 0.05$), but had a negative correlation with TNM staging and nodal metastasis ($-1 < r < -0.203, P < 0.05$). **Conclusion:** The high positive rate of SOCS3 DNA methylation in OSCC leads to the down-regulation of the SOCS3 gene, which is closely related to the differentiation, invasion, and metastasis in OSCC.

Keywords Oral squamous cell carcinoma; Negative suppressor of cytokine signaling 3; DNA methylation

作者单位:①太原理工大学应用力学与生物医学工程研究所(太原市030001);②山西医科大学生物化学与分子生物学教研室

*本文课题受山西省科技攻关(工业)项目(编号:2011032107-02)、山西医科大学科技创新基金项目(编号:01201002)和山西省国际合作项目(编号:2012081050-1)资助

通信作者:陈维毅 chenweiyi@tyut.edu.cn

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)在口腔颌面部恶性肿瘤中最为常见,其发生与抑癌基因的表达有密切的关系^[1]。抑癌基因参与细胞的信号传导系统,在正常情况下对DNA的复制、细胞的生长和增殖起着监控作用,其在基因水平上的突变和因此导致其编码蛋白质功能的丧失是肿瘤细胞生长失控的重要原因。目前认为,肿瘤的发生发展不仅是细胞增殖失控、分化异常的结果,而且与细胞凋亡失衡有关^[2],细胞因子信号转导抑制因子3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)做为潜在的抑癌基因,其基因启动子区的CpG岛异常甲基化可导致SOCS3基因表达沉默^[3]。JAK/STAT是信号转导通路中最重要的抑制子,主要通过对该通路的负性调节而抑制信号转导,其激活及表达具有潜在抑癌作用^[4]。关于SOCS3及其甲基化在OSCC组织中表达的生物学意义国内外鲜见报道。本研究采用甲基化特异性焦磷酸测序技术(Pyrosequencing)和Western blot法分别检测OSCC组织中SOCS3的DNA甲基化及蛋白表达水平,并与正常口腔黏膜组织进行对照研究,进一步探讨其与OSCC临床病理参数的关系以明晰SOCS3在OSCC癌变过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与试剂盒 PyroMark Q24焦磷酸测序仪由德国Qiagen公司生产,ABI PCR仪、UVP分析仪由美国ABI公司生产,FFPE组织DNA抽提试剂盒、新基因定制甲基化检测试剂盒均购自基因科技(上海)有限公司,兔抗人SOCS3和兔抗人(β -actin多克隆抗体购自Santa Cruz公司,山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术公司,DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

1.1.2 标本来源 OSCC标本取自山西医科大学第一医院病理科2004年1月至2011年12月存档蜡块。共100例,其中:唇癌20例,舌癌24例,颊癌20例,牙龈癌20例,口底癌16例;男性55例,女性45例;年龄最大76岁,最小20岁,平均年龄51.5岁;高分化鳞状细胞癌36例,中分化鳞状细胞癌30例,低分化鳞状细胞癌34例。按照国际抗癌联盟(UICC)2009年TNM分类及分期标准对100例口腔鳞状细胞癌标本进行TNM分类和临床分期,其中T₁期14例,T₂期30例,T₃期30例,T₄期26例。伴颈淋巴结转移50例。选取20例正常口腔黏膜组织做为对照,其中:男性12例,女性8例;平均年龄52.5岁。实验组病例纳入标准为:要求均为首次治疗病例;2位病理科专家检查共同证实确为OSCC病例;有完整记录。实验组病例剔除标准为:复发后入院病例;术前曾行放疗治疗的OSCC病例。

1.2 实验方法

1.2.1 Pyrosequencing焦磷酸测序 1)DNA模板的制备:按照GTpure FFPE组织DNA提取试剂盒操作步骤,从选取的口腔鳞状细胞癌石蜡切片中提取基因组DNA,切取10片口腔鳞状细胞癌石蜡切片样本,放入1.5 mL离心管内;向离心管内加入1.2 mL二甲苯,漩涡震荡,12 000 r/min离心5 min;弃上清液,加入1.2 mL无水乙醇,震荡混匀,12 000 r/min离心2 min;弃上清液,打开管盖在室温晾干残留的乙醇;加入DR Buffer、20 μ L Proteinase K充分混匀,56 $^{\circ}$ C消化完全至没有可见组织块;加入GDT Buffer,充分混匀后,70 $^{\circ}$ C孵育10 min;加入无水乙醇,震荡混匀;待冷却到室温后,加入到离心柱内,8 000 r/min,离心1 min,弃收集管内滤液;向离心柱内加入PW Buffer,8 000 r/min离心30 s,弃滤液;向离心柱内加入WA Buffer,8 000 r/min离心30 s,弃滤液;12 000 r/min离心2 min,将离心柱放入新的1.5 mL离心管内;向离心柱内的膜中央加入预热的DE Buffer,室温放置1 min,8 000 r/min离心2 min,常规亚硫酸盐处理。2)PCR扩增:选取碱基长度为50 bp的DNA片段为目标片段,上游引物序列是5'-CCCCAGAAGAGCCTATTACATC-3',T_m值是58.33 $^{\circ}$ C,下游引物序列是5'-AGGAACTCCCGAATG GGCCCC GGCA-3',T_m值是64.77 $^{\circ}$ C,进行常规PCR扩增。PCR反应结束后,对PCR产物进行Agarose电泳分析。3)Pyrosequencing焦磷酸测序:参照新基因定制甲基化检测试剂盒操作说明进行,采用PyroMark Q24型全自动焦磷酸测序仪配套的单链纯化装置从PCR反应液中分离单链DNA。采用PyroMark Q24型焦磷酸测序仪配套的MA2.02分析软件进行甲基化结果分析。

1.2.2 Western blot 向OSCC组织中加入10倍体积的含有20 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,50 mmol/L NaCl,50 mmol/L NaF,1 mmol/L Na₃VO₄,1% Triton-X100和1 mmol/L磷酸酶抑制剂PMSF的组织裂解缓冲液,置于冰上匀浆;4 $^{\circ}$ C下15 000 r/min离心30 min,收集上清并保存于-70 $^{\circ}$ C备用;考马斯亮蓝法检测蛋白浓度;上样总蛋白为80 μ g,12%SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜;5%脱脂奶粉封闭,兔抗人SOCS3(1:200)和兔抗人 β -actin(1:200),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;山羊抗兔IgG(1:2 000)37 $^{\circ}$ C孵育2 h;DAB显色,最后采用美国UVP分析仪器,对胶片进行扫描,括住每一个条带,系统按预先设定参数,自动生成灰度值进行统计学分析。

1.3 统计学方法

使用SPSS 13.0统计学软件建立数据库并进行分析。各组间数据进行正态性检验、方差齐性检验,符合正态或近似正态分布,用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 χ^2 检验、 t

检验及 Spearman 秩相关统计学方法进行数据分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR法扩增基因SOCS3

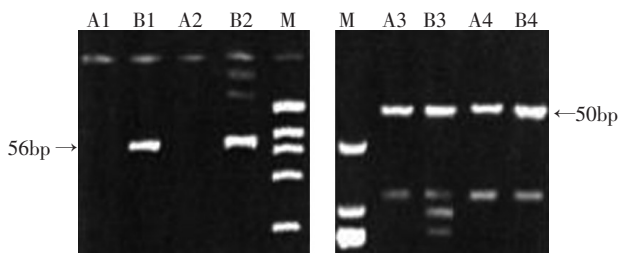
100例OSCC组织中85例检测到SOCS3阳性, (85%); 20例正常口腔黏膜组织仅2例阳性, (10%), 两组差异有统计学意义($P<0.05$, 图1)。

2.2 SOCS3甲基化检测

经焦磷酸测序检测SOCS3基因21个CpG位点的甲基化状态, 结果显示, 成功检测到20个位点甲基化程度, 仅一个位点测序失败。

2.3 SOCS3蛋白的表达

OSCC组织中SOCS3蛋白表达(1.76 ± 0.12)明显低于正常口腔黏膜组(1.93 ± 0.25), 差异有统计学意义($P<0.01$)。OSCC组织中甲基化组SOCS3蛋白表达(1.72 ± 0.21)显著低于非甲基化组(1.92 ± 0.23), 差异有统计学意义($P<0.01$)。



M: Maker; A: 正常口腔黏膜组织; B: 口腔鳞癌组织; A1, A2, B1, B2为甲基化状态; A3, A4, B3, B4为非甲基化状态; 甲基化条带产物为56bp; 非甲基化条带产物50bp

图1 SOCS3基因PCR扩增结果

Figure 1 PCR amplification of the SOCS3 gene

2.4 SOCS3蛋白的表达与OSCC临床病理参数的关系

OSCC的分化程度越低, SOCS3蛋白的表达水平越低, 除高分化组与中分化组之间差异无统计学意义外, 其余各组间对比差异均有统计学意义($P<0.05$)。III期组OSCC组织的SOCS3蛋白表达水平平均低于I~II期组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 伴有淋巴结转移组亦低于无转移组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。SOCS3蛋白的表达与肿瘤分化级别呈正相关($r=0.416$, $P<0.05$), 与TNM分期($r=-0.287$, $P<0.05$)、淋巴结转移呈负相关($r=-0.357$, $P<0.05$)。

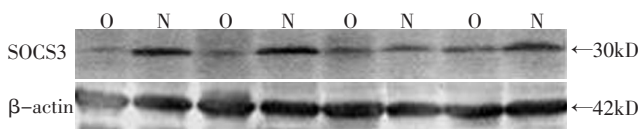


图3 Western blot方法检测OSCC(O)和正常口腔黏膜组织(N)中SOCS3蛋白表达

Figure 3 Western blot assay for the protein expression of SOCS3 in OSCC (O) and normal oral mucosa (N)

表1 OSCC组织中SOCS3表达与临床病理参数的关系($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Relationship between SOCS3 expression and clinicopathologic parameters of OSCC ($\bar{x}\pm s$)

临床病理指标	例数	SOCS3蛋白(灰度值)	F/t	P
OSCC组织	100	0.98 ± 0.83	2.734	<0.05
正常组织	20	0.05 ± 0.13		
分化程度				
高	36	0.15 ± 0.11	5.662	<0.01
中	30	1.85 ± 0.15		
低	34	1.52 ± 0.23		
临床分期				
T ₁	14	1.73 ± 0.12	3.657	<0.05
T ₂	30	1.67 ± 0.18		
T ₃	30	1.43 ± 0.26		
T ₄	26	1.56 ± 0.22		
淋巴结转移				
有	20	1.67 ± 0.25	2.198	<0.01
无	30	1.59 ± 0.21		

3 讨论

OSCC是口腔颌面部常见的恶性肿瘤, 约占口腔颌面部恶性肿瘤的80%, 其发病因素与烟酒等不良嗜好、环境污染、机械刺激及生物学因素等有关, 并涉及多个基因的改变^[5]。SOCS3在染色体上的位置为17q25.3, 其CDS区由675个连续核苷酸组成, 编码225个氨基酸, 编码框上游大约1.1kb范围内是该基因的启动子区^[6]。SOCS3基因在多种肿瘤中表达下调, 导致细胞增殖信号通路的异常活化, 进而使其下游原癌基因异常表达, 促使肿瘤发生^[7]。抑癌基因、细胞周期调节基因以及信号传导抑制基因异常甲基化发生在多种肿瘤或癌前病变, 基因高度甲基化导致SOCS3表达沉默, 与肿瘤的发生发展关系密切^[11]。随着表现遗传学的发展, SOCS3及其DNA甲基化与恶性肿瘤的关系受到众多学者的关注。

焦磷酸测序技术是近年来发明的一项依靠4种酶、2种底物完成的新型DNA测定技术^[9-10], 可以快速准确地检测短片段DNA序列(50bp以内), 其特点是操作简便、高通量、自动化, 适合大量样本的快速检测, 序列无须荧光标记等, 是一个理想的遗传分析技术平台。此外, 该技术是目前唯一能对甲基化模式进行直接、绝对定量的技术。

本研究采用甲基化特异性焦磷酸测序技术(Pyrosequencing)和Western blot法分别检测OSCC组织中SOCS3的DNA甲基化及蛋白表达水平, 并与正常口腔黏膜组织进行对照研究, 结果表明: OSCC组织中SOCS3 DNA甲基化的阳性率明显高于正常口腔黏膜组织, 其SOCS3蛋白表达明显低于正常口腔黏膜组织; 甲基化组SOCS3蛋白表达显著低于非甲基化组,

说明SOCS3 DNA异常甲基化导致SOCS3基因表达下调,与OSCC的发生、发展、浸润、转移等恶性生物学行为密切相关。这说明SOCS3基因甲基化可能是导致SOCS3基因功能缺失的主要原因。这也提示应用甲基化试剂恢复内源性SOCS3蛋白表达可显著抑制STAT3和FAK磷酸化,诱导细胞凋亡,阻断细胞迁移,可能有助于控制OSCC的浸润、转移。本研究结果提示,SOCS3不但参与了OSCC原位肿瘤形成过程的调节,促进其发展,还参与了癌细胞转移过程的调节,在转移过程中发挥作用。这说明,SOCS3基因是治疗OSCC新的靶点之一,也是预测OSCC预后的重要分子生物学指标。

参考文献

- Shpizer T, Hamzany Y, Bahar G, et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers[J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(7): 1194–1198.
 - Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: Clinico-pathological applications[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(5): 404–413.
 - Rigby RJ, Simmons JG, Greenhalcy CJ, et al. Suppressor of cytokine signaling 3(SOCS3)limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon[J]. *Oncogene*, 2007, 26(33): 4833–4841.
 - Ogawa Y, Yamakawa K, Ogura H, Kiguchi T, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin improves mortality and respiratory dysfunction in patients with severe sepsis[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 72(5): 1150–1157.
 - Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(4): 311–327.
 - Krebs DL, Hilton DJ. Agm1/Pgm3-mediated sugar nucleotide synthesis is essential for hematopoiesis and development[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(16): 5849–5859.
 - Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, et al. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(1): 179–193.
 - Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, et al. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2005, 24(42): 6406–6417.
 - Garza-González E, Rentería A. A pyrosequencing method for molecular monitoring of regions in the inhA, ahpC and rpoB genes of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(6): 607–612.
 - Jureen P, Engstrand L, Eriksson S, et al. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Pyrosequencing technology[J]. *Clin Microbiol*, 2006, 44(6): 1925–1929.
 - Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, et al. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2005, 24(42): 6406–6417.
- (2012-04-23收稿)(2012-06-12修回)
(本文编辑:贾树明)
-
- (上接第1348页)
- expression causes G2-M cell cycle arrest and/or apoptosis[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(19): 4238–4244.
 - Hutajulu SH, Indrasari SR, Indrawati LP, et al. Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population[J]. *Mol Cancer*, 2011, 2(10): 48.
 - Abbondanza C, De Rosa C, D'Arcangelo A, et al. Identification of a functional estrogen-responsive enhancer element in the promoter 2 of PRDM2 gene in breast cancer cell lines[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(3): 964–975.
 - Geli J, Kiss N, Kogner P, et al. Suppression of RIZ in biologically unfavourable neuroblastomas[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5): 1323–1330.
 - Mori N, Yoshinaga K, Tomita K, et al. Aberrant methylation of the RIZ1 gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2011, 35(4): 516–521.
 - Zhao F, Chen Y, Zeng LL, et al. Effects of triptolide on RIZ1 expression, proliferation, and apoptosis in multiple myeloma U266 cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(6): 733–740.
 - Zhang C, Li H, Wang Y, et al. Epigenetic inactivation of the tumor suppressor gene RIZ1 in hepatocellular carcinoma involves both DNA methylation and histone modifications[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(5): 889–895.
 - Cheng HY, Gao Y, Lou G. DNA methylation of the RIZ1 tumor suppressor gene plays an important role in the tumorigenesis of cervical cancer[J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15(1): 20–24.
 - Sun W, Qiao L, Liu Q, et al. Anticancer activity of the PR domain of tumor suppressor RIZ1[J]. *Int J Med Sci*, 2011, 8(2): 161–167.
 - Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. *Science*, 1994, 264(5157): 436–440.
 - Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, et al. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 406–411.
 - Jiang G, Liu L, Buyse IM, et al. Decreased RIZ1 expression but not RIZ2 in hepatoma and suppression of hepatoma tumorigenicity by RIZ1[J]. *Int J Cancer*, 1999, 83(4): 541–546.
 - Steele-Perkins G, Fang W, Yang XH, et al. Tumor formation and inactivation of RIZ1, an Rb-binding member of a nuclear protein-methyltransferase superfamily[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(17): 2250–2262.
 - Du Y, Carling T, Fang W, et al. Hypermethylation in human cancers of the RIZ1 tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase superfamily[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(22): 8094–8099.
 - Noman AS, Koide N, Iftakhar-E-Khuda I, et al. Retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1, a tumor suppressor, augments lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production via enhancing nuclear factor-kappaB activation[J]. *Cell Immunol*, 2010, 264(2): 114–118.
- (2011-12-30收稿)(2012-07-05修回)
(本文编辑:邢颖)