

胰腺癌缺失基因 DPC4 在牙龈癌中的表达

张 强¹, 刘继刚², 杨国海³, 刘 江⁴, 刘 昊⁵

摘要 应用免疫组织化学技术和 Real-time PCR 法检测 33 例牙龈癌(高分化 15 例,中分化 10 例,低分化 8 例)和 8 例正常牙龈组织中 DPC4 蛋白和 mRNA 的表达情况。结果显示,牙龈癌组织 DPC4 阳性细胞百分比显著低于正常牙龈组织,高分化、中分化、低分化牙龈癌和牙龈组织的 DPC4 蛋白相对表达、mRNA 表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示牙龈癌 DPC4 表达降低,可能与牙龈癌的发生与发展有关。

关键词 胰腺癌缺失基因 4; 牙龈癌; 免疫组织化学; Real-time PCR

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)04-0598-03

牙龈癌有较高的发病、转移和复发率,绝大多数为高分化的鳞状上皮细胞癌^[1]。研究与牙龈癌的发生、转移、预后有关的生物学指标将有助于合理应用综合性治疗方法,提高患者的生存率及生存质量。胰腺癌缺失基因 4 (deleted in pancreatic cancer 4, DPC-4) 是最近几年在胰腺癌中发现的一种新型肿瘤抑制基因,其主要作用为调节细胞的生长、分化、凋亡^[2-4]。研究 DPC-4 基因和蛋白在牙龈癌不同类

型中表达、分布及变化情况,有助于为临床检测牙龈癌进行早期确诊和制定合理的治疗方案提供参考和借鉴的指标。

1 材料与方法

1.1 材料 牙龈癌组织石蜡标本来自华北理工大学附属医院口腔颌面外科,共 33 例,其中高分化 15 例,中分化 10 例,低分化 8 例。所有病例经病理学确诊,术前未进行放疗化疗。正常牙龈组织 8 例,为随机从癌旁牙龈组织中获取。鼠抗 DPC4 抗体和 PCR 相关试剂购自武汉博士德生物工程有限公司;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 石蜡切片常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 溶液室温封闭内源性过氧化物酶活性,抗原热修复和 5% BSA 封闭后,一抗 4 ℃ 孵育过夜(一抗浓度为 1:150),DAB 显色。DPC4 以细胞胞质和(或)细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性表达。高倍镜下,随机选择 10 个视野,计算阳性细胞数占视野总细胞数的平均百分比。同时应用 Image-Pro-plus 6.0 软件分析系统对其阳性细胞表达的光密度进行定量分析,测定其积分光密度(integral optical density, IOD)值。

1.2.2 Real-time PCR 法检测 提取石蜡组织 DNA,进行 PCR 扩增。DPC-4 上游引物 5'-AG-GCTAACTCATCTGGATCG-3',下游引物:5'-GC-CACITCCGCATTACCTG-3'。PCR 扩增条件:94 ℃、4 min;94 ℃、30 s;55 ℃、30 s;72 ℃、25 s;35 个循

2016-01-18 接收

基金项目:河北省 2015 年度医学科学研究重点课题计划项目(编号:20150087)

作者单位:华北理工大学附属医院¹ 口腔科、⁵ 神经内科,唐山 063000

² 遵化市人民医院口腔科,遵化 064200

³ 唐山工人医院分院口腔科,唐山 063000

⁴ 华北理工大学基础医学院,唐山 063000

作者简介:张 强,男,硕士,副主任医师;

刘 昊,女,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:liuhao938@163.com

34, and 40 h. Round or class round plaque morphologies and plaques in 1, 1.5, 3 and 5 mm diameter were formed in different layer inversion training time, respectively. Plaques size which was formed by RSV could be affected by virus incubation time after added layer and plaques dimensions were increased gradually with the time extending in the plaque formation assay for RSV. The plaques were easy to be counted during 30 ~ 34 h in which the best size and number of plaques could be detected. The number of plaques formed eventually could also be affected by the dilution of virus and with the increase of dilution degrees, the reduction of plaque quantities was observed.

Key words respiratory syncytial viruses; plaque forming assay; formaldehyde-crystal violet

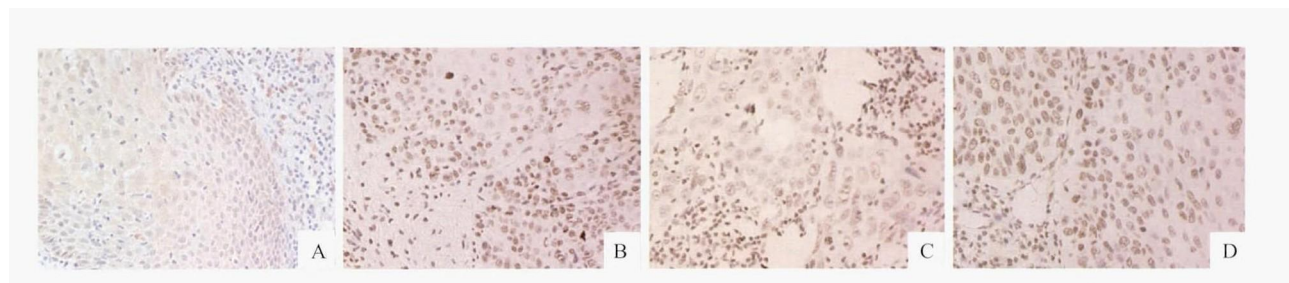


图1 牙龈癌及牙龈组织 DPC-4 的表达 SP×400

A:正常牙龈组;B:高分化组;C:中分化组;D:低分化组

环。按照公式 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{管家基因})$ 、 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$, 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (mRNA 表达水平)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行分析, DPC4 蛋白和 mRNA 表达比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。

2 结果

2.1 DPC4 在正常牙龈组织和牙龈癌组织中的表达 DPC4 基因编码的蛋白在正常牙龈组织和牙龈癌组织中主要定位在细胞质和细胞核,呈棕黄色、弥散分布,见图1、表1。经方差分析和组间两两比较显示,DPC4 在各组间的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。正常牙龈组织中表达最高,牙龈癌组织分化程度越低,DPC4 表达越低。见表2。

表1 牙龈癌及正常牙龈组织 DPC4 阳性细胞百分比的比较(%, $x \pm s$)

组别	n	阳性细胞百分比(%)
正常牙龈	8	91.25 ± 10.33
高分化	15	64.63 ± 7.18 *
中分化	10	47.02 ± 5.62 * #
低分化	8	25.28 ± 4.88 * # Δ

与正常牙龈组比较: * $P < 0.05$;与高分化组比较: # $P < 0.05$;与中分化组比较: Δ $P < 0.05$

2.2 DPC4 mRNA 在正常牙龈组织和牙龈癌组织中的表达 正常牙龈组织、高分化、中分化和低分化组牙龈癌组 DPC4 mRNA 相对表达量组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。牙龈癌组织 DPC4 mRNA 表达明显低于正常牙龈组织 ($P < 0.05$),中分化组和低分化组均低于高分化组 ($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

牙龈癌是常见的口腔颌面部恶性肿瘤之一,绝大多数为高分化的鳞状上皮细胞癌,目前其分子生物学行为机制还不是很清楚。对于牙龈癌的治疗目

表2 不同分化类型牙龈癌组织中 DPC4 蛋白和 mRNA 表达($x \pm s$)

组别	n	蛋白	mRNA
正常牙龈	8	21.64 ± 3.17	1.00 ± 0.00
高分化	15	13.47 ± 1.25 *	0.74 ± 0.10 *
中分化	10	9.33 ± 1.00 * #	0.51 ± 0.03 * #
低分化	8	2.42 ± 0.42 * # Δ	0.33 ± 0.02 * # Δ

与正常牙龈组比较: * $P < 0.05$;与高分化组比较: # $P < 0.05$;与中分化组比较: Δ $P < 0.05$

前以手术切除为主。但手术治疗会造成患者颜面部的缺损和畸形,给患者生理和心理上带来极大的痛苦。因此研究与牙龈癌的发生、转移、预后有关的生物学指标将有助于合理应用综合性治疗方法,提高患者的生存率及生存质量。

研究^[5]显示肿瘤组织内出现细胞凋亡和增殖失衡,肿瘤组织增殖较快,细胞凋亡减少。DPC4 首次发现于胰腺癌^[6-7],其编码的蛋白 Smad-4 是转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 信号传导途径的中心分子^[8],能调控细胞凋亡^[9]。DPC4 被认为是一种重要的肿瘤抑制基因,在胰腺、胆道、结肠、子宫等部位肿瘤发生发展过程中发挥重要作用^[10-11]。但其在口腔鳞状上皮癌中的表达改变目前报道不多。在口腔鳞状上皮癌抑制基因中,标记物很多,如 p53、p16、PTEN 等^[12]。DPC4 属于 Smad 基因家族,所编码的 Smad 蛋白可将 TGF-β 信号传给转录启动子,从而激活转录反应。DPC4 基因失活可使 TGF-β 信号传导通路中断,消除了 TGF-β 对细胞增殖的抑制,从而导致细胞恶性转化。目前,DPC4 研究较多地集中于胰腺癌,在肺癌、白血病等亦有表达改变。

为探讨 DPC4 在牙龈癌中的表达及与牙龈癌的关系,本研究将不同分化类型的牙龈癌作为研究对象,观察 DPC4 在各型牙龈癌中的定性和定量表达情况。结果表明,DPC4 蛋白在牙龈组织中的阳性细胞百分比明显高于各种不同分化类型的牙龈癌组织,定量结果也表明 DPC4 在牙龈癌组织中表达降

低。随着分化程度降低,DPC4 的表达率也随之降低。分化程度越低,DPC4 阳性细胞百分比越低,提示 DPC4 突变可能在牙龈癌的发生发展过程中起重要作用。本研究提示 DPC4 蛋白低表达可能和牙龈癌癌变有密切的关系,其机制可能是由于 DPC4 基因缺失或者突变失去了对 TGF- β 的调控作用,导致细胞凋亡程序紊乱进而发生肿瘤。

综上所述,在临床诊疗过程中,可以通过免疫组织化学法对牙龈组织中 DPC4 的表达进行检测,其结果可作为诊断牙龈癌的一项指标。

参考文献

- [1] 万艳,尚政军. 牙龈癌的流行病学危险因素研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2013, 29(7): 402-4.
- [2] 李赞滨,孙大伟,邱法波,等. 胰腺癌组织中 MUC1 和 hTER 及 DPC4 的表达及意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2013, 16(11): 850-4.
- [3] 张强,李金源. Bcl-2 和 DPC4 与口腔癌关系的研究进展[J]. 中国当代医药, 2013, 20(16): 28-9.
- [4] 孙大伟. MUC1、DPC4 基因及端粒酶基因在胰腺癌中的表达及临床意义[D]. 青岛大学, 2013.
- [5] Bortner C D, Cidlowski J A. Ion channel and apoptosis in cancer [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369(1638): 20130104.
- [6] Mullany L K, Fan H Y, Liu Z, et al. Molecular and functional characteristics of ovarian surface epithelial cells transformed by KrasG12D and loss of Pten in a mouse model *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2011, 30(32): 3522-36.
- [7] Shearn C T, Smathers R L, Stewart B J, et al. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) inhibition by 4-hydroxynonenal leads to increased akt Activation in hepatocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(6): 941-52.
- [8] Chen H, Wang J W, Liu L X, et al. Expression and significance of transforming growth factor- β receptor type II and DPC4/Smad4 in non-small cell lung cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(1): 227-31.
- [9] Martis R J, Krishnan M M, Chakraborty C, et al. Automated screening of arrhythmia using wavelet based machine learning techniques [J]. *J Med Syst*, 2012, 36(2): 677-88.
- [10] Liu L, Nie J, Chen L, et al. The oncogenic role of microRNA-130a/301a/454 in human colorectal cancer *via* targeting smad4 expression [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55532.
- [11] 陈晶晶,陈柯,王晓秋,等. 子宫内样腺癌中 Id-1、Smad4 和 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白及 RNA 的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(1): 39-42.
- [12] 殷操,黄荣彩,纪焕中,等. 口腔癌及癌前病变中 PTEN 与 CXCR4 的蛋白表达及相关性研究 [J]. 广东牙病防治, 2015, 23(2): 61-5.

Expression of deleted in pancreatic cancer 4 in gingival cancer

Zhang Qiang¹, Liu Jigang², Yang Guohai³, et al

(¹Dept of Dentist, Affiliated Hospital of North China University of Sciences and Technology,

Tangshan 063000; ²Dept of Dentist, Zunhua People's Hospital, Zunhua 064200;

³Dept of Dentist, Branch of Tangshan Worker Hospital, Tangshan 063000)

Abstract To observe the expression of DPC4 in gingival cancer tissue, the expression of protein and mRNA in 33 cases of gingival cancer and 8 cases of normal gum tissue were investigated by immunohistochemistry and Real-time PCR. Results showed that the positive cell rate of DPC4 in gingival cancer was lower than that in normal gum tissue. The expression of DPC4 and the expression of mRNA protein showed significant differences in well-differentiated, moderately differentiated, poorly differentiated gingival cancer and normal gum tissue ($P < 0.05$). The expression of DPC4 in normal gum tissue is significantly higher than that in various differentiation types of gingival cancer tissue.

Key words DPC4; gingival cancer; immunohistochemistry; Real-time PCR