

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.005

生物钟 Per1 基因在人类部鳞状细胞癌中的表达及临床意义

赵春蓉, 杨 凯, 赵宁波, 唐 洪

(重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨生物钟基因 Per1 在口腔颊鳞癌组织中的表达及意义。**方法:**应用免疫组化 SP 法和 Western blot 法检测 38 例口腔颊鳞癌及其癌旁正常颊黏膜组织中 Per1 的表达情况,并结合临床病理指标进行探讨。**结果:**Per1 在颊鳞癌中的表达显著低于在癌旁正常颊黏膜组织中的表达($P=0.025$)。Per1 在 I、II 期颊鳞癌中的表达显著高于在 III、IV 期的表达($P=0.007$),在 T₁、T₂ 期颊鳞癌组织中的表达显著高于在 T₃、T₄ 期中的表达($P=0.030$),在无淋巴结转移者的表达显著高于在有淋巴结转移者中的表达($P=0.008$),Per1 的表达与患者性别、年龄及病理分级无明显相关性(P 均大于 0.05)。**结论:**Per1 的表达在口腔鳞癌的发生发展,浸润、转移中可能占重要作用,为口腔颊鳞癌的诊断、预后评估和治疗提供了新的思路。

【关键词】口腔;鳞状细胞;癌;Per1;免疫组织化学;蛋白质印迹

【中国图书分类法分类号】R739.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-10

Expressions and clinical significances of circadian clock gene Per1 in patients with oral squamous cell carcinoma

ZHAO Chunrong, YANG Kai, ZHAO Ningbo, TANG Hong

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expressions and significances of circadian clock gene Per1 in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** Expressions of Per1 in 38 cases of buccal squamous cell carcinoma and the adjacent non-tumor tissues were examined by immunohistochemical SP method and Western blot method and the significances of Per1 were studied combined with

作者介绍:赵春蓉, Email: zhao-rong-chun@163.com,

研究方向:口腔颌面-头颈肿瘤临床及相关基础研究。

通信作者:杨 凯, Email: cqfyk@yahoo.com.cn。

nuclear transcriptional transactivator with BRCT domain[J]. DNA Cell Biol, 2000, 19(8): 475-485.

[6] Yuan C, Bu Y, Wang C, et al. NFB1/MDC1 is a protein of oncogenic potential in human cervical cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 359(1-2): 333-346.

[7] 刘丹丹, 胡国华, 刘学良, 等. 抑制 NFB1 的表达对鼻咽癌化疗敏感性的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(5): 393-396.

Liu D D, Hu G H, Liu X L, et al. Effect of siRNA mediated NFB1 depletion on chemosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2012, 37(5): 393-396.

[8] 张 新, 吕晓丹, 漆 明, 等. Egr-1 与 TNF- α 在口腔扁平苔藓病损中的表达的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(1): 63-66.

Zhang X, Lv X D, Qi M, et al. The study on the expression of Egr-1 TNF- α in oral lichen planus[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2012, 37(1): 63-66.

[9] Lou Z, Minter-Dykhous K, Franco S, et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of the amplification of ATM-dependent DNA damage signals[J]. Mol Cell, 2006, 21(2): 187-200.

[10] Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoint and cancer[J]. Nature, 2004, 432(7015): 316-323.

[11] Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis[J]. Nature, 2005, 434(7035): 864-870.

[12] Goldberg M, Stucki M, Falck J, et al. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint[J]. Nature, 2003, 421(6926): 952-956.

[13] Xu X Z, Stern D F. NFB1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors[J]. FASEB J, 2003, 17(13): 1842-1848.

[14] Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, et al. NFB1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage[J]. J Biol Chem, 2007, 282(31): 22993-23004.

[15] Yang Z, Bu Y, Wang C, et al. Growth inhibition, morphology change, and cell alterations in NFB1-depleted human esophageal cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 342(1-2): 1-6.

(责任编辑: 关蕴良)

the clinicopathological parameters. **Results:** Expressions of Per1 were significantly decreased in buccal squamous cell carcinoma tissues than in adjacent non-tumor tissues ($P=0.025$). In buccal squamous cell carcinoma, expressions of Per1 were significantly higher in stage I, II period and T₁, T₂ grade than in stage III, IV period and T₃, T₄ grade ($P=0.007$) ($P=0.030$), meanwhile the expressions of Per1 were significantly higher in group without lymph node metastasis than in group with lymph node metastasis ($P=0.008$). Expression of Per1 was in no correlation with patients' gender, age and pathological grade ($P>0.05$). **Conclusions:** Expression of Per1 may play an important role in the development, invasion and metastasis of patients with OSCC, and may provide a new way of thinking for OSCC diagnosis, prognosis assessment and treatment.

【Key words】oral cavity; squamous cell; carcinoma; Per1; immunohistochemistry; Western blot

生物体的许多生理活动都随昼夜的更替而呈节律性的变化,昼夜节律性是生物体生命活动的基本特征之一,这种节律性由生物体内的生物钟控制^[1]。生物钟是由一系列生物钟基因组成,目前已证明生物体内至少存在 9 个核心生物钟基因^[2]:period1 (Per1), period2 (Per2), period3 (Per3), CLOCK, cryptochrome1 (CRY1), cryptochrome2 (CRY2), BMAL1, casein kinase1 epsilon (CSNK1E), timeless (TIM)。目前已证实^[3-9],生物钟基因的表达异常与癌症的发生、发展、治疗疗效和预后等密切相关。对生物钟的研究将为探索癌症的发生发展和治疗提供新的思路和方法。

生物钟 Per1 基因是参与肿瘤发生发展的重要基因^[4-9]。有研究表明:Per1 蛋白具有抑制前列腺癌、结肠癌等肿瘤的生长作用^[4-5],Per1 基因表达异常会导致子宫内膜癌、头颈部鳞状细胞癌、白血病、乳腺癌的发生或促进疾病的发展^[6-9]。目前还未查见 Per1 基因与口腔癌发生发展的相关研究报道。

本研究通过对 38 例口腔颊鳞癌和癌旁正常颊黏膜组织中 Per1 表达情况的检测,结合临床病理指标探讨口腔颊鳞癌中 Per1 的表达及临床意义,希望从生物钟基因改变的角度为研究口腔癌的发生发展和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂 SP 免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),兔抗人 Per1 多克隆抗体(abcam 公司,美国),辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司),光学显微镜(莱卡公司,ts-26,德国),冷冻低速离心机(HERMLE,德国,Z233MK-2),化学发光仪(Bio-Rad,美国,ChemiDocXRS+)。

1.1.2 临床资料 38 例颊鳞癌和其癌旁正常颊黏膜组织均来自重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科 2010 年 9 月至 2012 年 1 月期间颊鳞癌手术病人,获取标本时间为 11:00 至 14:00。纳入标准:①病理检查确诊为颊鳞癌;②术前未进行过放化疗及其他治疗;③手术同期进行同侧颈淋巴结清扫;④颈淋巴结转移情况有病理检查确诊。共获得标本 38 例,其中男 22 例,女 16 例,年龄 32~79 岁,平均年龄 52.3 岁。根据国际抗癌联盟 2010 年分期标准^[10],T₁、T₂、T₃ 和 T₄ 分别为 6 例、10 例、15 例和 7 例;有颈淋巴结转移 12 例,无颈淋巴结转移者 26 例;I 期 6 例,II 期 14 例,III 期 12 例,IV 期 6 例;病理分级:高分化 10 例,中分化 20 例,低分化 8 例。所取每例组织均分为 2 份,1 份用 4%多聚甲醛固定后石蜡包埋,另 1 份迅速置于液氮中。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化 将石蜡包埋后的组织行厚度为 4 μm 的切片,采用 SP 免疫组化法,按照说明书步骤操作,简述如下:①切片常规脱蜡水化后经细胞通透液及 3% H₂O₂ 进行细胞通透,封闭内源性过氧化物酶。②高温高压抗原修复,暴露抗原决定簇。③5%正常羊血清封闭非特异性蛋白。④按照 SP 试剂盒说明书进行一抗孵育、二抗孵育及 SP 反应。⑤DAB 显色。⑥苏木精复染、脱水、透明、中性树胶封片后光学显微镜下观察。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,Per1 的阳性表达为细胞核或细胞质中出现黄色。结果评估:结果评估采用双评分半定量法判断^[11],阳性细胞染色强度(未见染色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分)和阳性细胞百分率(阳性细胞数阴性计为 0 分,<25%计为 1 分,26%~50%计为 2 分,51%~75%计为 3 分,≥76%计为 4 分),最后以阳性细胞百分比计分和染色强度计分之和所得总分进行结果判定:0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为阳性(++),≥6 分为强阳性(+++)。弱阳性(+),阳性(++)和强阳性(+++)均表示阳性。

1.2.2 Western blot 从液氮中取出癌组织和癌旁正常颊黏膜组织解冻后,提取所有癌组织和癌旁正常颊黏膜组织标本蛋白做 Western blot。实验步骤简述如下:各组织用匀浆器碾碎后,加裂解液裂解细胞,然后在 4℃下离心 2 min。用 BCA 法测蛋白浓度。每孔上样 50 μg,进行分离胶 6% SDS-PAGE 电泳,湿转聚偏二氟乙烯膜(Per1:250 mA,145 min;Tubulin:

250 mA, 50 min)。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。Per1 一抗用 5%脱脂奶粉稀释, 稀释比例为 1:200; Tubulin(内参)一抗用专门抗体稀释液稀释, 稀释比例为 1:1 000。一抗 4 ℃摇床过夜。二抗稀释比例均为 1:5 000。二抗室温孵育 1 h, 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, 以上实验重复 3 次。

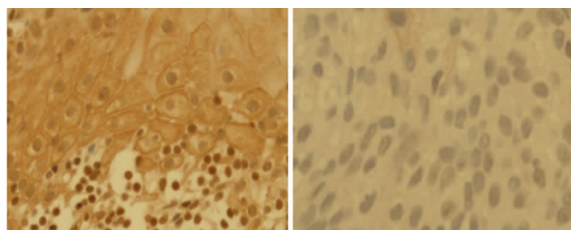
1.3 统计学处理

所有数据应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。免疫组化计数资料以率表示, 统计学方法采用 χ^2 检验; Western blot 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并用 t 检验对两组间均数进行比较。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧), 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Per1 蛋白在口腔颊鳞癌和癌旁正常颊黏膜组织中的表达

免疫组化显示: 癌旁正常颊黏膜组织中 Per1 蛋白主要表达在细胞核, 其次是细胞质, 在癌细胞中 Per1 蛋白主要表达在细胞核和细胞质。Per1 蛋白在口腔颊鳞癌和癌旁正常颊黏膜组织中阳性表达率分别为 84.2% (32/38) 和 100% (38/38), 二者差异具有统计学意义 ($\chi^2=4.524, P=0.033$)。并且 Per1 在癌旁正常颊黏膜中多为强阳性表达, 而在颊鳞癌中多为弱阳性或阳性表达, 见图 1。



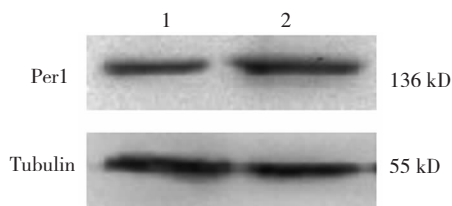
A. Per1 在癌旁正常颊黏膜组 B. Per1 在颊鳞癌组织中呈阳性表达 (++)

图 1 免疫组化检测结果 (SP, 400 $\times$)

Fig.1 Results of immunohistochemistry (SP, 400 $\times$)

2.2 Western blot 检测

Western blot 检测口腔颊鳞癌组织和癌旁正常颊黏膜组织中 Per1 蛋白的凝胶图像见图 2, 癌和癌旁正常颊黏膜组织 Per1 蛋白的平均灰度值比值分别为 0.19 ± 0.04 、 0.42 ± 0.07 , Per1 蛋白在颊鳞癌中的表达显著低于癌旁正常颊黏膜组织 ($t=-4.739, P=0.009$)。



1. 颊鳞癌组织; 2. 癌旁正常颊黏膜组织

图 2 Western blot 检测结果

Fig.2 Results of Western blot

2.3 口腔颊鳞癌组织中 Per1 表达与临床病理参数之间的关系

免疫组化结果表明 Per1 蛋白表达与临床分期显著相关, I、II 期的表达显著高于 III、IV 期的表达, 差异有统计学意义 ($P=0.007$)。Per1 蛋白在 T₁、T₂ 期颊鳞癌组织中的表达显著高于 T₃、T₄ 期 ($P=0.030$), 在无淋巴结转移者表达显著高于有淋巴结转移者 ($P=0.008$)。Per1 在颊鳞癌组织中的表达与患者年龄、性别、病理分级无明显相关, 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 Per1 在颊鳞癌组织中的表达及与临床病理特征的关系

Tab.1 Expressions of Per1 in buccal squamous cell carcinoma and relationship between Per1 and expressions

clinicopathological features					
临床病理参数	例数 (<i>n</i>)	Per1表达		χ^2 值	<i>P</i> 值
		阴性	阳性		
标本类型					
颊鳞癌	38	6	32	4.524	0.033
癌旁正常颊黏膜组织	38	0	38		
年龄					
< 45	10	2	8	0.281	0.869
45 ~	19	3	19		
60~	9	1	8		
性别					
女	16	3	13		0.682 ^a
男	22	3	19		
分化程度					
高	10	2	8	0.208	0.901
中	20	3	17		
低	8	1	7		
T分期					
T ₁ +T ₂	16	0	16		0.030 ^a
T ₃ +T ₄	22	6	16		
淋巴结转移					
无	26	1	25		0.008 ^a
有	12	5	7		
临床分期					
I + II	20	0	20		0.007 ^a
III + IV	18	6	12		

注: a, 代表 Fisher 确切概率法的 P 值

3 讨论

从世界范围总体来看, 口腔癌发病率为 4.7~32.2/10 万, 其中 90% 以上为鳞状细胞癌^[12], 目前对口腔癌治疗后总的 5 年生存率仅为 50%^[13], 因此探索治疗和预防口腔癌的新方法具有重大意义。

目前研究证明: Per1 为核心生物钟基因, 位于人体的 17 号染色体短臂上 (17p12-p13.1), 长约 16 kb。Per1 基因不仅对生物体的许多正常生理节律调节

起重要核心作用,而且与癌症的发生发展密切相关^[4-9]。近来研究报道:Per1 基因在不同癌症中的表达水平和功能具有较大差异^[4-5,7,14-15]。Gery 等^[14]研究表明 Per1 在前列腺癌、结肠癌中为低表达,具有促凋亡作用,而 Sato 等^[15]研究表明 Per1 在胰腺癌、肝癌中为高表达,具有抗凋亡作用。目前还未查见 Per1 基因与口腔癌发生发展的相关研究报道。

本研究结果表明:Per1 蛋白在颊鳞癌中的表达显著低于在癌旁正常颊黏膜组织中的表达。进一步分析发现:Per1 在 T₃、T₄ 期颊鳞癌中的表达显著低于 T₁、T₂ 期,有淋巴结转移患者的表达显著低于无淋巴结转移者,在临床Ⅲ、Ⅳ期的表达显著低于Ⅰ、Ⅱ期的表达。以上结果提示:在口腔鳞癌中,Per1 的表达随着癌症的发展而逐渐减低,提示 Per1 为抑癌基因,可能与癌细胞的浸润和转移有关。Cheng 等^[16]和 Klein 等^[17]研究也表明:Per1 可能是通过调节蛋白基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达和层黏连蛋白受体(laminin receptor 1, LAMR1)在细胞内的分布来发挥生物钟基因 Per1 对癌细胞增殖、侵袭、迁移等方面的调控作用。Per1 表达降低能上调 MMP-2 的表达,并且能改变 LAMR1 在细胞内的分布,使细胞膜上 LAMR1 增加,从而增强癌细胞的侵袭、迁移及转移能力。更详尽的机制还有待进一步研究。

生物钟系统作为机体的一个特殊系统,本研究通过对生物钟 Per1 基因在口腔鳞癌中的表达及与临床病理参数之间的关系的研究表明:颊鳞癌组织及 Per1 等生物钟基因的表达水平有可能用于判断口腔鳞癌患者的分期及远处转移风险,也可能为基于生物钟基因作为靶点治疗口腔癌提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Hara Y, Onishi Y, Oishi K, et al. Molecular characterization of Mybbp1a as a co-repressor on the Period2 promoter[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(4): 1115-1126.
- [2] Badiu C. Genetic clock of biologic rhythms[J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7(4): 408-416.
- [3] Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(12): 886-896.
- [4] Cao Q, Gery S, Dashti A, et al. A role for the clock gene per1 in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7619-7625.
- [5] Mostafaie N, Kállay E, Sauerzapf E, et al. Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(7): 642-647.
- [6] Yeh K T, Yang M Y, Liu T C, et al. Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial carcinoma[J]. *J Pathol*, 2005, 206(1): 111-120.
- [7] Hsu C M, Lin S F, Lu C T, et al. Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2012, 33(1): 149-155.
- [8] Yang M Y, Yang W C, Lin P M, et al. Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia[J]. *J Biol Rhythms*, 2011, 26(2): 136-148.
- [9] 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.
- [10] Sobin L H, Gospodarowicz M K, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors[M]. 7th ed. Wiley: London, 2010.
- [11] 陈 罡, 党裔武, 罗殿中, 等. 原发性肝癌组织芯片中乙酰肝素酶的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(33): 3540-3544.
- [12] Chen G, Dang Y W, Luo D Z, et al. Expression of heparanase in tissue microarrays of primary hepatocellular carcinoma and its significance[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2007, 15(33): 3540-3544.
- [13] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer[J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(4-5): 309-316.
- [14] Johnson N W, Warnakulasuriya S, Gupta P C, et al. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer causes and solutions[J]. *Adv Dent Res*, 2011, 23(2): 237-246.
- [15] Gery S, Komatsu N, Baldjyan 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.
- [16] 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.
- [17] Chang L, Wang Y H, Liu Y Y, et al. Key region of laminin receptor 1 for interaction with human period1[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(38): 6401-6407.
- [18] Klein G, Vellenga E, Fraaije M W, et al. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 50(2): 87-100.

(责任编辑: 关蕴良)