

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001900

DDIT4在皮肤基底细胞癌中的表达及
对细胞增殖和自噬通路的调控张晓姣¹, 李 婧², 罗福玲³

(1. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学附属第一医院药学部, 重庆 400016)

【摘要】目的:检测 DNA 损伤诱导转录因子-4(DNA damage-inducible transcript 4, DDIT4)在皮肤基底细胞癌(basal cell carcinoma, BCC)中的表达及其对下游的细胞蛋白合成、增殖和自噬水平的影响。**方法:**采用免疫组化和 Western blot 分别对 15 例人皮肤 BCC 组织和正常皮肤 15 例进行检测, 比较两者 DDIT4、pS6K1、p4E-BP1 和 LC3 II/I 的表达。**结果:**与正常组织相比, DDIT4(0.247 ± 0.152 , $P=0.005$) 在 BCC 中的表达被明显抑制, 伴 p4E-BP1 表达(0.290 ± 0.169 , $P=0.015$) 和 LC3 II/I 的比值(0.692 ± 0.154 , $P=0.007$)降低, 但 pS6K1(0.837 ± 0.050 , $P=0.000$)表达明显增加, 具有统计差异。**结论:**DDIT4 在 BCC 中的表达受抑制, 可能通过其下游的 mTORC1 通路进而促进癌细胞的蛋白合成和增殖能力, 但自噬流受阻, 参与 BCC 的发生发展过程; DDIT4 及其下游通路信号可能作为 BCC 的进一步治疗及预后研究的靶点。

【关键词】DNA 损伤诱导转录因子-4; 基底细胞癌; 肿瘤增殖; 自噬流**【中图分类号】**R751.05**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-22DDIT4 expression in cutaneous basal cell carcinoma and its regulation
on cell proliferation and autophagy fluxZhang Xiaojiao¹, Li Jing², Luo Fuling³(1. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;
2. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University;
3. Department of Pharmacology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the expression of DDIT4 (DNA damage-inducible transcript 4) in human cutaneous basal cell carcinoma (BCC) tissues and its regulating effects on cellular protein synthesis, proliferation and autophagy flux of the downstream signals involved in. **Methods:** Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expressions of DDIT4, pS6K1, p4E-BP1 and LC3 II/I in 15 cases of human skin BCC and 15 cases of normal skin tissues respectively. **Results:** The expression of DDIT4 (0.247 ± 0.152 , $P=0.005$) in BCC was significantly inhibited as compared with that in the normal tissues. Meanwhile the expression of p4E-BP1 (0.290 ± 0.169 , $P=0.015$) and ratio of LC3 II/I (0.692 ± 0.154 , $P=0.007$) were decreased, but the expression of pS6K1 (0.837 ± 0.050 , $P=0.000$) was significantly increased. **Conclusion:** DDIT4 expression is inhibited in human BCC cells, which may promote the downstream protein synthesis and proliferation, and inhibit the autophagy flux through the mTORC1 pathway to finally involve in the pathogenesis and development of BCC. DDIT4 and its downstream signals may serve as target for the further treatment and prognosis of BCC.

【Key words】DNA damage-inducible transcript 4; basal cell carcinoma; carcinoma proliferation; autophagy flux

DNA 损伤诱导转录因子-4 (DNA damage-inducible transcript 4, DDIT4) 是一种胞浆表达蛋白

作者介绍: 张晓姣, Email: 1172214175@qq.com,

研究方向: 皮肤肿瘤。

通信作者: 罗福玲, Email: luofuling623@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81301617)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181103.1452.018.html>

(2018-11-06)

质, 在低氧、营养缺乏、氧化应激条件下被诱导高表达^[1], 目前已证实 DDIT4 与部分内脏肿瘤的发生发展密切相关, 如乳腺癌、前列腺癌、卵巢、肝癌与肾癌等^[2-6]。自噬是细胞程序性死亡的一种方式, 能降解老化、无功能的胞内蛋白, 从而维持细胞的正常生长与细胞的蛋白合成和增殖调控等路径一道共同参与肿瘤的形成与发展^[7]。DDIT4 可通过调控

mTORC1 信号通路从而影响肿瘤细胞的自噬、蛋白质合成与增殖的全部过程^[8-9],故在肿瘤发病与治疗研究越来越受到重视。基底细胞癌(basal cell carcinoma, BCC)是皮肤最常见的恶性肿瘤之一,目前对其发病机制研究不清,治疗手段有限^[10-11]。本课题旨在检测皮肤 BCC 组织中 DDIT4 的表达及其对 mTORC1 通路中与调控肿瘤细胞的蛋白质合成、增殖与自噬相关的信号分子的影响作用,以揭示 DDIT4 在 BCC 中发病中的作用,并对其能否作为 BCC 的靶向治疗研究提供基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料

人皮肤 BCC 标本 15 例,均来自重庆医科大学第一附属医院皮肤科 2016 年 5 月至 2017 年 2 月经临床和病理检查确诊,其中男性 8 例,女性 7 例;年龄 50~71 岁 $[(62.5 \pm 6.5)$ 岁]。对照组正常皮肤 15 例,来自该科非肿瘤性皮瓣移植手术的正常供皮区,其中男性 9 例,女性 6 例,年龄 46~72 岁 $[(57.2 \pm 8.1)$ 岁]。2 组性别($\chi^2=0.000, P=1.000$)、年龄($t=1.970, P=0.059$)均无统计学差异。

1.2 主要试剂

DDIT4 兔抗人多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。LC3 兔抗人多克隆抗体购自美国 Sigma 公司。p4E-BP1、pS6K1 兔抗人多克隆抗体购自美国 CST 公司。DAB 工作液及 SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。BCA 试剂盒购自上海碧云天技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 HE 染色 所有组织均为石蜡包埋。试验时,石蜡切片于二甲苯内脱蜡至水,按常规 HE 染色方法进行。

1.3.2 免疫组化 石蜡切片于二甲苯内脱蜡至水,用柠檬酸盐缓冲液行抗原修复。实验步骤严格按照 SP 试剂盒说明书进行。加入一抗 DDIT4(1:200),4℃过夜,加入二抗,DAB 显色,苏木精复染,脱水,中性树脂封片,镜检。采用 Image Pro-plus6.0 分析图像平均光密度(AOD),计算公式 $AOD=IOD(SUM)/Area(SUM)$ 。

1.3.3 Western blot 组织于液氮中研磨,提取组织蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。配胶,以 60 μ g 总蛋白上样量上样,电泳 2 h,转膜 1.5 h,室温 Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and molecular pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and molecular pharmacology 封闭 2 h,一抗孵育(DDIT4、LC3、p4E-BP1、pS6K1 工作液浓度均为 1:1 000),4℃过夜,二抗孵育,曝光。采用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

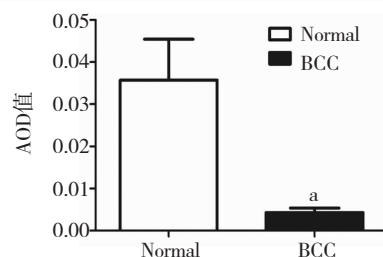
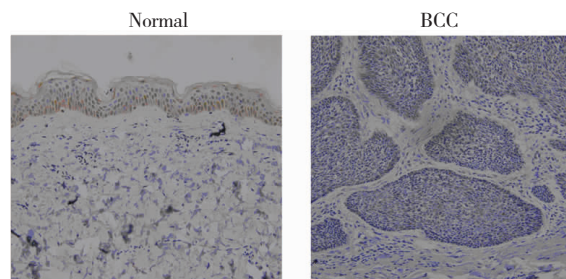
1.4 统计方法

采用 SPSS 20.0 软件处理。计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

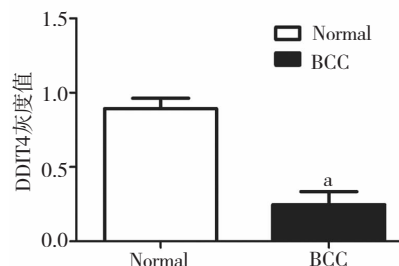
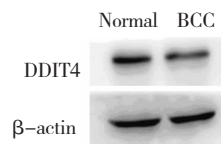
2.1 DDIT4 在 BCC 中呈明显低表达

在 HE 染色切片中,BCC 组织见肿瘤细胞呈抱团样生长,大量边界清楚的瘤团密集排列。免疫组化结果显示,DDIT4 在 BCC 肿瘤组织中呈明显低表达,仅为弱阳性,平均 AOD 值为 0.004 ± 0.001 。而在正常对照皮肤组织中,DDIT4 呈明显高表达,平均 AOD 值为 0.036 ± 0.009 ,且以基底层细胞表达最强,由此向上经棘层至颗粒层逐渐减弱(图 1A)。2 组间 AOD 具有统计学差异($t=5.546, P=0.029$)。与免疫组化结果相似,Western blot 结果表明 DDIT4 在 BCC 组织的总表达量明显较正常组织低(0.247 ± 0.152 vs. $0.893 \pm 0.122, t=5.738, P=0.005$)(图 1B)。



a: 2 组比较, $P=0.029$

A. DDIT4 在人皮肤基底细胞癌和正常皮肤组织中的 IHC 检测及 AOD 值比较 (IHC, 40 $\times$)



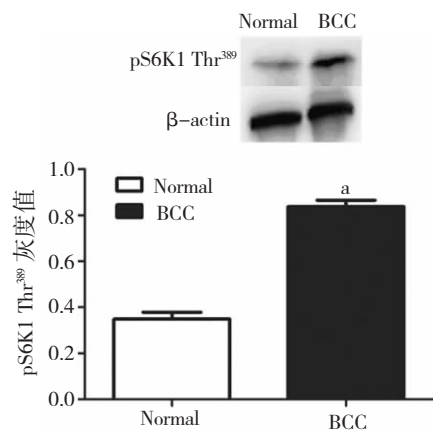
a: 2 组比较, $P=0.005$

B. DDIT4 在人皮肤基底细胞癌和正常皮肤组织中的 Western blot 检测及灰度值比较

图 1 DDIT4 在人皮肤基底细胞癌和正常皮肤组织中的表达

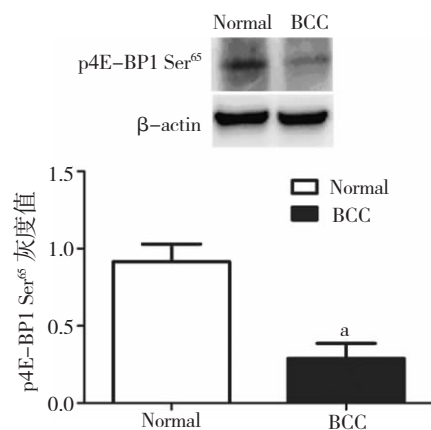
2.2 mTORC1 通路中与调控细胞蛋白合成与增殖的下游信号被显著激活

在对 mTORC1 通路的下游信号中参与调控细胞蛋白合成与增殖的相关分子 pS6K1、p4E-BP1 的检测中发现, pS6K1 (Thr³⁸) 在 BCC 中的表达明显较正常组织高 (0.837 ± 0.050 vs. 0.349 ± 0.051 , $t=-11.851$, $P=0.000$), 而 p4E-BP1 (Ser⁶⁵) 在 BCC 中的表达则明显较正常对照皮肤组织低 (0.290 ± 0.169 vs. 0.916 ± 0.196 , $t=4.177$, $P=0.015$)。两者在 2 组间具有统计学差异 ($P<0.05$)。如图 2 所示。



a: 2 组比较, 差异有统计学意义, $P=0.000$

A. pS6K1 在人皮肤基底细胞癌和正常皮肤组织中的 Western blot 检测及灰度值比较



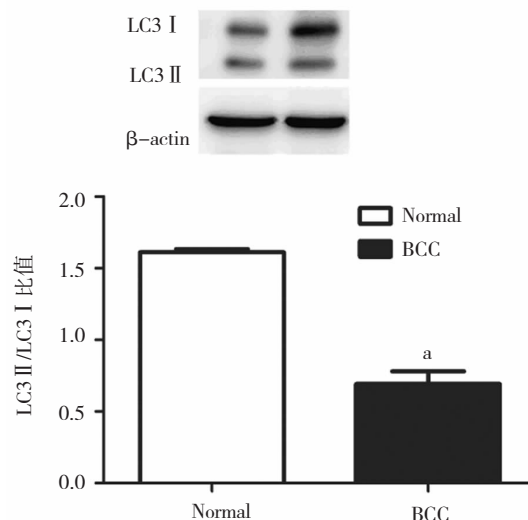
a: 2 组比较, $P=0.015$

B. p4E-BP1 在人皮肤基底细胞癌和正常皮肤组织中的 Western blot 检测及灰度值比较

图 2 mTORC1 通路下游信号分子 pS6K1、p4E-BP1 在人皮肤基底细胞癌和正常皮肤组织中的表达

2.3 BCC 中瘤细胞的自噬功能被明显显著抑制

Western blot 结果表明, 在 BCC 组织中, 瘤细胞 LC3 II / I 比值明显较正常对照皮肤组织降低 (0.692 ± 0.154 vs. 1.613 ± 0.037 , $t=10.064$, $P=0.007$), 表明瘤细胞的自噬流受到明显抑制, 瘤细胞的自噬通路发生障碍。如图 3 所示。



a: $P<0.05$

图 3 细胞自噬相关蛋白 LC3B 在人皮肤基底细胞癌和正常皮肤组织中的表达

3 讨论

DDIT4 为一种缺氧诱导因子, 在低氧、营养缺乏、氧化应激等条件下被诱导高表达, 其基因突变或异常表达已在一些内脏肿瘤如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肝癌与肾癌中被证实^[2-6], 并被认为是与肿瘤治疗的预后判断具有一定参考价值^[12], 但在皮肤肿瘤中的研究报道极少^[13]。BCC 是临床最常见的皮肤恶性肿瘤之一, 好发于皮肤曝光部位^[10-11], 但目前对其发病机制研究并不清楚, 治疗手段有限。本研究有助于进一步拓展 BCC 的发病机制研究。

实验表明, 在正常皮肤组织中, DDIT4 表达明显较强, 尤其在以快速增殖为主要特征的基层细胞层, 且向上经棘层向颗粒层表达逐渐减少, 表明 DDIT4 与角质形成细胞的正常增殖具有一定相关性。在 BCC 中, DDIT4 表达明显降低, 预示肿瘤细胞失去正常的增殖能力, 向异常增殖转化, 这与倪晓辰等对肾癌的研究结果一致; 并且在 BCC 中, 伴随 DDIT4 的表达降低, 肿瘤细胞内调节蛋白合成与细胞增殖的信号分子 S6K1 的磷酸化明显增强, 而 4E-BP1 的磷酸化明显减少, 表明细胞的增殖加速; 同时 LC3 II / I 的比值降低, 表明细胞的自噬流受到明显抑制。这种细胞的增殖过程加速反映了肿瘤组织的基本特征, 而受抑制的自噬功能则会导致细胞内突变和异常的蛋白质不能及时被识别和清除, 则可能是包括 BCC 等在内的多种肿瘤细胞持续存在和进

一步发展的原因^[14-15],如倪晓辰等^[6]也曾证实 miR-222 是肾癌细胞 DDIT4 的特异抑制剂,其可通过负向调节 DDIT4 的表达从而抑制肾癌细胞的自噬,在肾癌的发生发展中起着重要作用。

在 DDIT4 的下游通路中,mTORC1 已被证实为 DDIT4 的下游靶点。DDIT4 可通过与 FBP-12 蛋白结合,稳定 TSC1/TSC2 复合物,从而抑制 mTORC1 的功能^[16]。在 DDIT4 表达降低后,mTORC1 的活性将增强,并通过进一步调控其下游的相关蛋白 4E-BP1 和 S6K1 的磷酸化,及 LC3 II/I 的差异性转化从而调控细胞的蛋白合成、增殖与自噬流形成^[17-18]。在毛囊和皮肤伤口的研究中,本研究作者前期实验也证实 DDIT4 可通过 mTORC1 通路参与毛囊的压力诱导和皮肤伤口的表皮再生化进程^[19]。因此,结合本实验结果,推测 DDIT4 可能通过 mTORC1 通路调节 4E-BP1、S6K1 和 LC3 II/I 的功能,从而参与 BCC 的发生发展过程。同时,有既往研究指出,维生素 D 类似物如卡泊三醇可用于皮肤癌的化疗^[20-21],且被证实实在皮肤组织中维生素 D 能促进 DDIT4 的表达^[19]。因此,本课题结果还能部分解释卡泊三醇的抗癌机制,但具体机制尚需进一步探究。

参 考 文 献

- [1] Qiao S, Dennis M, Song X, et al. A REDD1 TXNIP pro-oxidant complex regulates ATG4B activity to control stress-induced autophagy and sustain exercise capacity[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7014.
- [2] Knowles LM, Yang C, Osterman A, et al. Inhibition of fatty-acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4[J]. J Biol Chem, 2008, 283(46): 31378-31384.
- [3] Wang Y, Han E, Xing Q, et al. Baicalein upregulates DDIT4 expression which mediates mTOR inhibition and growth inhibition in cancer cells[J]. Cancer Lett, 2015, 358(2): 170-179.
- [4] Koo JS, Jung W. Alteration of REDD1-mediated mammalian target of rapamycin pathway and hypoxia-inducible factor-1 α regulation in human breast cancer[J]. Pathobiology, 2010, 77(6): 289-300.
- [5] Pineau P, Volinia S, McJunkin K, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(1): 264-269.
- [6] 倪晓辰, 赵志红, 马永良, 等. miR-222 通过下调 DDIT4 抑制肾癌细胞自噬[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(3): 161-166.
- [7] Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research[J]. Cell Res, 2014, 24(1): 9-23.
- [8] Wang Y, Han E, Xing Q, et al. Baicalein upregulates DDIT4 expression which mediates mTOR inhibition and growth inhibition in cancer cells[J]. Cancer Lett, 2015, 358(2): 170-179.
- [9] Gordon BS, Steiner JL, Williamson DL, et al. Emerging role for regulated in development and DNA damage 1 (REDD1) in the regulation of skeletal muscle metabolism[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2016, 311(1): E157-174.
- [10] Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management [J]. Yale J Biol Med, 2015, 88(2): 167-179.
- [11] 黄远深, 李航, 涂平, 等. 632 例皮肤恶性肿瘤及癌前病变临床分析[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(7): 452-454.
- [12] Pinto JA, Rolfo C, Raza LE, et al. In silico evaluation of DNA damage inducible transcript 4 gene (DDIT4) as prognostic biomarker in several malignancies[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1526.
- [13] Caporali S, Alvino E, Levati L, et al. Down-regulation of the PTTG1 proto-oncogene contributes to the melanoma suppressive effects of the cyclin-dependent kinase inhibitor PHA-848125[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(5): 598-611.
- [14] Hönscheid P, Datta K, Muders MH. Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response[J]. Int J Radiat Biol, 2014, 90(8): 628-635.
- [15] Macintosh RL, Ryan KM. Autophagy in tumour cell death[J]. Semin Cancer Biol, 2013, 23(5): 344-351.
- [16] Desantis A, Bruno T, Catena V, et al. Che-1-induced inhibition of mTOR pathway enables stress-induced autophagy[J]. EMBO J, 2015, 34(9): 1214-1230.
- [17] Vadysirisack DD, Ellisen LW. mTOR activity under hypoxia[J]. Methods Mol Biol, 2012, 821: 45-58.
- [18] Tan CY, Hagen T. mTORC1 dependent regulation of REDD1 protein stability[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63970.
- [19] Zhao H, Rieger S, Abe K, et al. DNA damage-inducible transcript 4 is an innate surveillant of hair follicular stress in vitamin D receptor knockout mice and a regulator of wound re-epithelialization[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): E1984.
- [20] Cho KH, Son YS, Lee DY, et al. Calcipotriol (MC 903), a synthetic derivative of vitamin D3 stimulates differentiation of squamous carcinoma cell line in the raft culture[J]. Anticancer Res, 1996, 16(1): 337-347.
- [21] Cunningham TJ, Tabacchi M, Eliane JP, et al. Randomized trial of calcipotriol combined with 5-fluorouracil for skin cancer precursor immunotherapy[J]. J Clin Invest, 2017, 127(1): 106-116.

(责任编辑:冉明会)