

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.029

DNMT1、PDCD4 在舌鳞状细胞癌中的表达及临床意义

王倩¹,唐维平^{1△},魏智艺²,金丹丹³

(1. 南昌大学第二附属医院口腔科,南昌 330006;2. 中国人民解放军第 180 医院烧伤整形科,福建泉州 362000;3. 广东医学院检验学院,广州 510000)

摘要:目的 探讨 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)、程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)在舌鳞状细胞癌(TSCC)组织中的表达及临床意义。方法 采用免疫组织化学 Elivision 二步法检测 40 例 TSCC 组织及其相对应的癌旁非肿瘤组织中 DNMT1、PDCD4 蛋白表达水平,并分析两者蛋白表达与临床病理参数的关系。结果 在 TSCC 组织中 DNMT1 蛋白呈高表达,而 PDCD4 蛋白呈低表达甚至不表达;两者在癌旁非肿瘤组织中的表达则与之相反。两者的表达呈明显的负相关($r = -0.452, P < 0.05$)。DNMT1 蛋白表达与组织分化类型、有无淋巴结转移及 TNM 临床分期相关($P < 0.05$),与性别、年龄无关;而 PDCD4 蛋白的表达则只与区域淋巴结有无转移和 TNM 分期有关,与性别、年龄及组织病理分化程度无关。结论 提示 DNMT1、PDCD4 蛋白异常表达与 TSCC 的发生、发展密切相关, DNMT1 可能通过负向调节 PDCD4 的蛋白表达使抑癌基因沉默或消失而致肿瘤发生。

关键词: DNA 甲基转移酶 1;程序性细胞死亡因子 4;舌鳞状细胞癌;蛋白表达;临床病理特征

中图分类号:R739.86

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)31-4206-04

Expression and clinical significance of DNMT1 and PDCD4 in tongue squamous cell carcinoma

Wang Qian¹, Tang Weiping^{1△}, Wei Zhiyi², Jin Dandan³

(1. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Burn and Plastic Surgery, the 180th Hospital of PLA, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical college, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of DNMT1 and PDCD4 in Tongue Squamous cell carcinoma and their significance to Clinical. **Methods** The protein expression of DNMT1 and PDCD4 in 40 cases of TSCC tissues and The adjacent no tumor tissues were measured by Elivision Two Step immunohistochemical method(IHC), the relationship between DNMT1, PDCD4 and clinicopathological parameters were analyzed. **Results** There was positively over expression of DNMT1 while the expression of PDCD4 was at a low lever or lost in TSCC tissues, the expression of two genes DNMT1 and PDCD4 in the adjacent no tumor tissues were in contrast; there was a significant negative correlation between DNMT1 and PDCD4 expression in TSCC($r = -0.452, P < 0.05$). The expression of DNMT1 protein were associated with histopathological differentiation types, regional lymph node metastasis and TNM staging($P < 0.05$), it had nothing to do with age and gender; the expression of PDCD4 protein were associated with regional lymph node metastasis and TNM staging($P < 0.05$), and it had nothing to do with age, gender, histopathological differentiation types. **Conclusion** Implying the abnormal expression of DNMT1 and PDCD4 protein might be closely related to the development and progression of TSCC. DNMT1 may be participates in the inactivation of PDCD4 expression, and led to the development of the cancer at last.

Key words: DNA methyltransferase 1; programmed cell death 4; tongue squamous cell carcinoma; expression of proteins; clinicopathological characteristics

舌癌是最常见的口腔癌,98%以上为鳞状细胞癌。舌细胞恶变是受多种因素影响且经过多个阶段的复杂变化过程。目前,舌癌发生、发展及术后复发机制尚不明确,但研究结果证实舌癌的发生、发展与某些肿瘤相关基因的调控有关。DNA 甲基化是表观遗传学研究的焦点,它在基因的表达调控中发挥着关键的作用。DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)是 DNA 甲基转移酶众多成员之一,对 DNA 复制、修复并维持其正常甲基化起到至关重要的作用,是 DNA 进行正常甲基化的关键酶。程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, PDCD4)是与细胞周期及细胞凋亡相关的抑癌基因。当 DNMT1 超表达时可以通过催化抑癌基因启动子区的 CpG

岛使基因发生异常甲基化,异常甲基化的抑癌基因转录复制异常导致表达缺失。研究证实胃癌、肝癌、肺癌中 DNMT1 呈高表达而 PDCD4 呈低表达,且二者表达具有负相关性^[1-3]。舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)组织中两者的表达情况目前尚无研究。本实验通过检测 DNMT1、PDCD4 在 TSCC 组织中的表达,研究两者在 TSCC 发生、发展过程中的作用,分析两者表达的关系及与临床病理参数的关系,为 TSCC 的早期诊断治疗及预后评价提供有力的科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 4 月至 2013 年 4 月,南昌大学二附院病理科 TSCC 与癌旁非肿瘤组织标本蜡块 18 例,中国

中国人民解放军第 180 医院病理科 TSCC 与癌旁非肿瘤组织标本蜡块 22 例(所采集的患者标本均无其他恶性肿瘤且术前也未接受过放疗)。男 23 例,女 17 例;年龄大于或等于 60 岁 24 例,小于 60 岁 16 例;高分化 8 例,高/中分化 8 例,中分化 18 例,低分化 6 例;根据 TNM 临床分期 I + II 24 例,III + IV 16 例;区域淋巴结转移 13 例,远处转移 1 例。以上标本(石蜡块)以 4 μm 厚度连续切片后备用。

1.2 主要试剂 兔抗人 DNMT1、PDCD4 多克隆抗体(浓度 1:200,购自北京博奥森生物公司),免疫组织化学检测试剂盒(PV6001 二步法,购自北京中杉金桥公司),DAB 显色试剂盒(购自北京中杉金桥公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学检测方法 采用 Elivision 二步法免疫组化检测。(1)将蜡块进行脱蜡水化处理,用 3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 min \times 3 次;(2)滴加一抗 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h,PBS 冲洗 2 min \times 3 次;(3)滴加检测试剂 PV-6001 山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 冲洗 2 min \times 3 次;(4)DAB 显色后自来水充分冲洗;(5)苏木精复染脱水透明;(6)中性树胶封片,光学显微镜观察。每例标本均用 PBS 液代替一抗进行阴性对照,滴加一抗作为阳性对照。

1.3.2 免疫组织化学结果判读 DNMT1、PDCD4 蛋白表达与细胞质和(或)细胞核中。镜下观察到细胞质和(或)细胞核呈淡黄色、棕黄色甚至棕褐色均为阳性指标。标本于 200 倍视野随机观察,(1)以着色细胞占总视野细胞数多少评分:无阳性细胞 0 分,阳性细胞数小于 25% 1 分,阳性细胞数 25%~50% 2 分,阳性细胞数 51%~75% 3 分,大于 75% 阳性细胞数 4 分;(2)按细胞着色强度评分:细胞无着色 0 分,细胞着色淡黄色 1 分,细胞着色棕黄色 2 分,细胞着色棕褐色 3 分。选取 5 个视野细胞观察统计,采用两种评分的平均值计算阳性结果,小于或等于 2 分表示阴性(-),3~7 分为阳性(+)。所有染色结果判断均采用统一评分标准和双盲法,由两名病理医师对实验结果进行判断、打分,所有评分均平均 2 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。分析 DNMT1、PDCD4 蛋白在 TSCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达及对比二者表达的差异;二者的表达与临床病理参数的关系均采用阳性率及 χ^2 检验进行分析,二者蛋白表达的相关性用 Spearman 秩相关分析,由于组织分化类型两两比较样本数量小于 40 例,故采用 Fisher's 精确概率法直接求得 P ,其余采用两样本率的 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNMT1、PDCD4 蛋白的表达 DNMT1、PDCD4 蛋白在细胞质和(或)细胞核中表达,阳性指标细胞呈淡黄色、棕黄色甚至棕褐色程度不等,见图 1~4。DNMT1 蛋白在 TSCC 组织及癌旁非肿瘤组织中阳性表达率分别为 72.5%、12.5%,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);PDCD4 阳性表达率分别为 30.0%、77.5%,组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 TSCC 组织中 DNMT1、PDCD4 蛋白表达水平与临床病理参数的关系 DNMT1 蛋白表达水平与组织分化类型、有无淋巴结转移及 TNM 分期有关,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);与患者的性别、年龄无关($P > 0.05$)。PDCD4 蛋白表达

水平与有无淋巴结转移及 TNM 分期有关,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);与患者的性别、年龄、组织分化类型无关($P > 0.05$),见表 2。

2.3 DNMT1、PDCD4 蛋白在 TSCC 组织表达的相关性 40 例 TSCC 患者,两种蛋白表达均为阳性 5 例,均为阴性 4 例,采用 Spearman 秩相关分析在 TSCC 组织中 DNMT1、PDCD4 蛋白表达水平呈负相关($r = -0.452, P < 0.05$)。

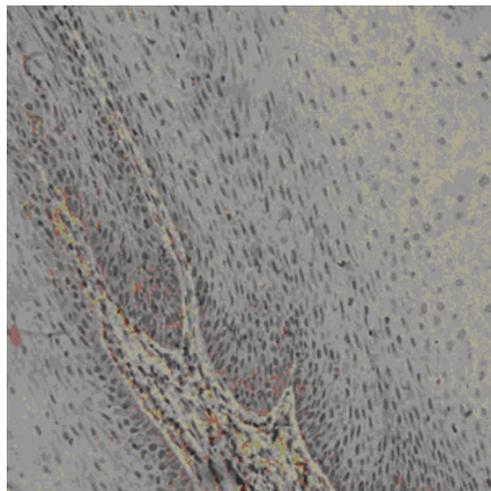


图 1 DNMT1 在癌旁非肿瘤组织中呈阴性($\times 200$)

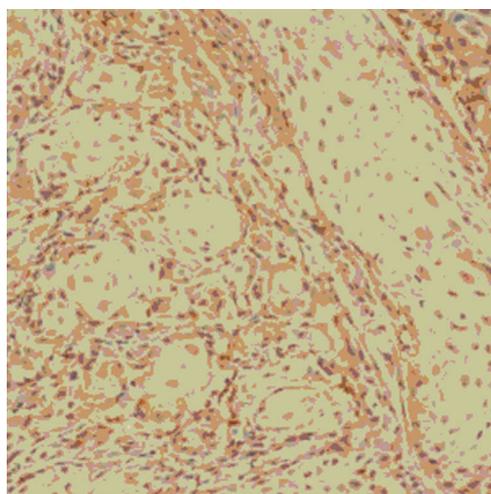


图 2 DNMT1 在 TSCC 组织中呈阳性($\times 200$)

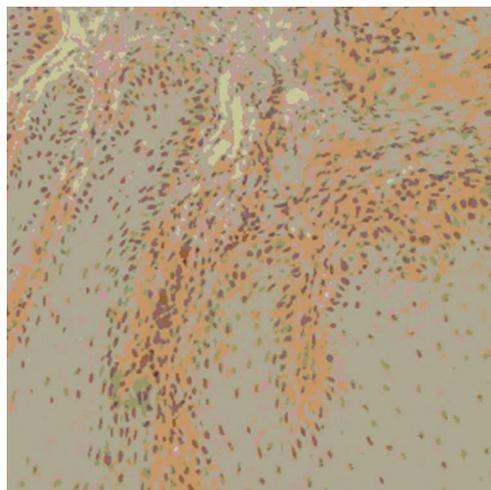


图 3 PDCD4 在癌旁非肿瘤组织中呈阳性性($\times 200$)

表 1 DNMT1、PDCD4 蛋白在 TSCC 组织及癌旁非肿瘤组织的表达及比较(n)

组织类型	n	DNMT1			χ^2	P	PDCD4			χ^2	P
		阳性	阴性	阳性率(%)			阳性	阴性	阳性率(%)		
TSCC 组织	40	29	11	72.5	29.463	0.000	12	28	30.0	18.152	0.000
癌旁非肿瘤组织	40	5	35	12.5			31	9	77.5		

表 2 DNMT1、PDCD4 蛋白表达与 TSCC 临床病理参数的关系(n)

临床病理特征	n	DNMT1			χ^2	P	PDCD4			χ^2	P
		阳性	阴性	阳性率(%)			阳性	阴性	阳性率(%)		
性别											
男	23	16	7	69.6	0.016	0.900	9	14	39.1	2.148	0.143
女	17	13	4	76.5			3	14	17.6		
年龄(岁)											
<60	17	11	6	64.7	0.349	0.555	5	7	29.4	0.005	0.944
≥60	23	18	5	78.3			12	16	30.4		
组织分化程度											
高	8	3	5	37.5	—	0.026 ^a	4	4	50.0	—	0.608 ^a
高-中	8	8	0	100	—	0.132 ^b	2	6	25.0	—	1.000 ^b , 0.473 ^f
中	18	12	6	66.7	—	0.218 ^c , 0.277 ^d	6	12	33.3	—	0.664 ^c , 0.277 ^d
低	6	6	0	100	—	0.031 ^e	0	6	0	—	0.085 ^e
区域淋巴结转移											
有	13	13	0	100	5.405	0.020	0	13	0	6.273	0.012
无	27	16	11	59.3			12	15	44.4		
TNM 分期											
I + II	24	13	11	54.2	7.947	0.005	12	12	50.0	9.172	0.002
III + IV	16	16	0	100			0	16	0		

^a: $P > 0.05$, 高-中分化程度比较; ^b: $P > 0.05$, 与中分化程度比较; ^c: $P > 0.05$, 与高分化程度比较; ^d: $P > 0.05$, 与低分化程度比较; ^e: $P > 0.05$, 与高分化程度比较; ^f: $P > 0.05$, 与低分化程度比较; —: 表示此项无数据。

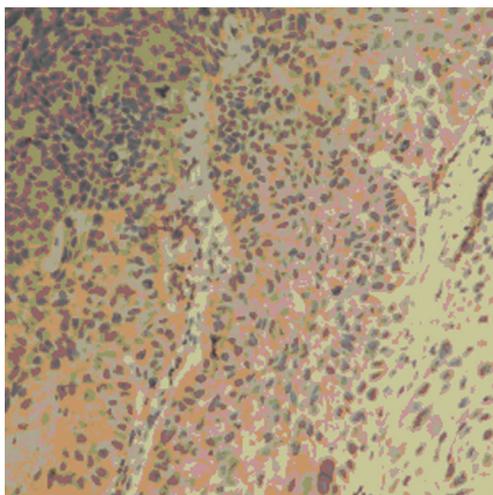


图 4 PDCD4 在 TSCC 组织中呈阴性(×200)

3 讨 论

舌癌的病因学及发生、发展是一个复杂多因素的过程, 众多研究得出与组织中相关基因遗传学及表观遗传学的改变有关。随着分子生物学-表观遗传学的不断深入研究及发展, 发现 DNA 甲基化是表观遗传修饰基因表达调控机制的关键^[4]。

Ung 等^[5]研究得出雌激素受体 α 影响肿瘤基因启动子 CpG 岛甲基化可促进乳腺癌的发生。de Freitas Cordeiro-Silva 等^[6]的研究也得出 DNA 异常甲基化可导致口腔鳞状细胞癌发生的结论。DNMT1 是催化 DNA 甲基化的关键酶, 具有维持 DNA 甲基化的重要作用^[7]。研究表明, DNMT1 表达增高作用于抑癌基因的 CpG 岛使 DNA 异常甲基化, 发生异常甲基化的抑癌基因得不到正常表达基因沉默致肿瘤发生^[8]。DNMT1 在胃癌^[1]、胰腺癌^[9]、肺癌^[10]、卵巢癌^[11]、喉癌^[12]等多种恶性肿瘤中呈高表达, 并和肿瘤的组织分化类型、有无淋巴结转移及 TNM 临床分期相关, 还有研究证明 DNMT1 的表达程度与肿瘤的预后相关, 蛋白表达越高则预后越不理想^[13]。

PDCD4 是与细胞周期及凋亡相关的抑癌基因, 它的蛋白水平变化与肿瘤的发生、发展密切相关^[14]。PDCD4 基因转录水平下降使蛋白表达水平相应降低甚至缺失, 其主要原因是基因转录过程中 CpG 岛区域发生异常甲基化, 正常的 DNA 转录受阻甚至中断抑癌基因沉默。Park 等^[15]在胶质瘤中发现抑制基因 PDCD4 的 5'-CpG 岛发生异常甲基化导致 PDCD4 mRNA 转录缺失, 同时当 PDCD4 超表达时则可以抑制细胞的无限增殖。Yang 等^[16]用鼠细胞做实验, 通过减少 PDCD4 的表达, 发现细胞无限增殖, 相反提高 PDCD4 的表达, 细胞的恶

性转化能力则受到一定程度的抑制。说明 PDCD4 基因表达降低或缺失与恶性肿瘤的发生有密切关系。目前在食管癌、卵巢癌、喉癌、泌尿系统等多种恶性肿瘤中发现 PDCD4 蛋白或 mRNA 表达都有不同程度的下降或缺失,且与肿瘤的恶性程度密切相关^[17-19]。Fan 等^[20]研究发现,PDCD4 在有 DNMT1 参与的 SMMC-7721 肝癌细胞中 mRNA 表达水平明显下降。戴兵等^[2]应用 DNMT1 抑制剂 5-aza-CD 作用于相同肝癌细胞株 SMMC-7221,发现 PDCD4 mRNA 蛋白的表达明显上升。说明 DNMT1 高表达可促使 PDCD4 基因 5'-CpG 岛区域发生异常甲基化,使 PDCD4 蛋白表达水平降低或不表达。

本实验研究表明,在 TSCC 组织中 DNMT1 呈高表达,PDCD4 呈低表达,癌旁非肿瘤组织的表达结果则与之相反,且两者的表达呈负相关($r = -0.452, P < 0.05$),此结论在胃癌、肝癌、肺癌等恶性肿瘤中得到证实,提示 DNMT1、PDCD4 蛋白表达水平的改变可能是肿瘤发生的重要原因之一;DNMT1 与肿瘤组织分化类型、有淋巴结转移及 TNM 分期有关($P < 0.05$),与患者的性别、年龄无关($P > 0.05$);而 PDCD4 的表达则只与有淋巴结转移及 TNM 分期有关,与患者的年龄、性别及组织分化类型无关。

本试验尚有不足之处,如只应用了免疫组织化学得出病理结果,方法比较陈旧单一,但免疫组织化学是目前临床较常用且非常成熟的方法,得出的病理结果也是临床诊断的“金标准”。本试验得出的结果可以更好地指导 TSCC 的研究及癌细胞移植动物体进行相应的动物实验研究提供依据。本试验样本量较少,试验结果尚需其他方法及动物实验进一步研究,以此进一步完善。但此结论有助于舌癌表观遗传学 DNA 甲基化的理论研究。通过联合检测 DNMT1、PDCD4 蛋白的表达水平有望成为舌癌早期诊断的又一方法,希望通过改变两者的表达水平找到治疗舌癌的突破口。

参考文献:

- [1] 孙娜,卢雪峰,刘盛楠,等. DNMT1 和 PDCD4 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 医学与哲学:临床决策论坛版, 2011,32(11):54-56.
- [2] 戴兵,薛建锋,李仁锋,等. DNMT1、PDCD4 在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 山东医药,2008,48(41):36-37.
- [3] 刘启明,滕琳,张雪梅. DNMT1、PDCD4 在肺癌组织中的表达的研究[J]. 现代医药卫生,2010,26(8):1152-1153.
- [4] Ma B, Wilker EH, Willis-Owen SA, et al. Predicting DNA methylation level across human tissues[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014,42(6):3515-3528.
- [5] Ung M, Ma X, Johnson KC, et al. Effect of estrogen receptor α binding on functional DNA methylation in breast cancer[J]. *Epigenetics*, 2014,9(4):523-532.
- [6] de Freitas Cordeiro-Silva M, Oliveira ZF, de Podestá JR, et al. Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2011,38(8):5435-5441.
- [7] Tittle RK, Sze R, Ng A, et al. Uhrf1 and Dnmt1 are required for development and maintenance of the zebrafish lens[J]. *Dev Biol*, 2011,350(1):50-63.
- [8] Mohan KN, Chaillet JR. Cell and molecular biology of DNA methyltransferase1[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, 306:1-42.
- [9] Gao J, Wang L, Xu J, et al. Aberrant DNA methyltransferase expression in pancreatic ductal adenocarcinoma development and progression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013,32(1):86.
- [10] Tennis MA, Vanscoyk MM, Wilson LA, et al. Methylation of Wnt7a is modulated by DNMT1 and cigarette smoke condensate in non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2012,7(3):e32921.
- [11] Gu Y, Yang P, Shao Q, et al. Investigation of the expression patterns and correlation of DNA methyltransferases and class I histone deacetylases in ovarian cancer tissues [J]. *Oncol Lett*, 2013,5(2):452-458.
- [12] Wang J, Xu Y, Li J, et al. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation in laryngeal carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(6):541-546.
- [13] Issa JP. Methylation and prognosis: of molecular clocks and hypermethylator phenotypes[J]. *Clin Cancer Res*, 2003,9(8):2879-2881.
- [14] Yang HS, Cho MH, Zakowicz H, et al. A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor PDCD4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A [J]. *Mol Cell Biol*, 2004,24(9):3894-3906.
- [15] Park YM, Hwang SJ, Masuda K, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 controls the metastatic potential of glioblastoma by regulating PDCD4[J]. *Mol Cell Biol*, 2012,32(20):4237-4244.
- [16] Yang HS, Knies JL, Stark C, et al. PDCD4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1transactivation[J]. *Oncogene*, 2003,22(24):3712-3720.
- [17] Fassan M, Pizzi M, Battaqlia G, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) expression during multistep Barrett's carcinogenesis[J]. *J Clin Pathol*, 2010,63(8):692-696.
- [18] Wang X, Wei Z, Gan F, et al. Expression and prognostic significance of PDCD4 in human epithelial ovarian carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2008,28(5B):2991-2996.
- [19] Feng G, Li P, You H, et al. The expression and clinical pathological significance of PDCD in laryngocarcinoma [J]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2011,25(1):16-19.
- [20] Fan H, Zhao ZJ, Quan YM, et al. DNA methyltransferase 1 knockdown induces silenced CDH1 gene reexpression by demethylation of methylated CpG in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2007,19(11):952-961.