

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.11.004

4NQO 诱导大鼠舌黏膜癌变过程中 E-cad 及 PCNA 的表达研究*

王敏, 廖鹏程, 刘琼瑶, 谭红, 张绪, 聂敏海[△]

(西南医科大学附属口腔医院口腔黏膜科/西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究上皮钙依赖黏附蛋白(E-cad)和增殖细胞核抗原(PCNA)在大鼠口腔黏膜癌变过程中的表达变化,探讨其相关性。**方法** 采用4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)饮水法诱导大鼠舌癌变模型,免疫组织化学SP法检测82只大鼠舌癌变过程不同病理阶段组织中E-cad、PCNA蛋白的表达,分析E-cad与PCNA相关性。**结果** 在正常黏膜、上皮单纯增生、轻度上皮异常增生、中重度上皮异常增生和舌鳞状细胞癌组织中,E-cad的阳性率分别是100%、95.24%、92.86%、80.00%、68.75%,差异均有统计学意义($P < 0.05$);PCNA的阳性率分别是9.52%、14.29%、35.71%、50%、56.25%,差异有统计学意义($\chi^2 = 16.676, P < 0.05$)。二者的蛋白表达呈负相关($r = -0.614, P < 0.01$)。**结论** E-cad和PCNA有望成为舌黏膜癌变的生物标志物之一。

[关键词] 舌肿瘤;癌;鳞状细胞;动物模型;E-cad;PCNA;免疫组织化学

[中图分类号] R739.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)11-1454-03

Expression of E-cadherin and PCNA in the process of tongue mucosal carcinogenesis induced by 4NQO in rats*

Wang Min, Liao Pengcheng, Liu Qiongyao, Tan Hong, Zhang Xu, Nie Minhai[△]

(Department of Oral Mucosa, the Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University/Laboratory of Oral and Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the expression of epithelial cadherin (E-cad) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in various stages of tongue carcinogenesis and explore its relevance. **Methods** SP immunohistochemical method was employed to detect the expression of E-cad and PCNA protein in 82 rat tongue carcinogenesis specimens which induced by 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO). Chi-square test for trend and the spearman correlation were used to analysis the correlation between E-cad and PCNA. **Results** In normal mucosa, epithelial hyperplasia, mild dysplasia, severe dysplasia and squamous cell carcinoma, the positive rate of E-cad were 100%, 95.24%, 92.86%, 80%, 68.75%, the differences were statistically significant ($P < 0.05$); The positive rate of PCNA were 9.52%, 14.29%, 35.71%, 50%, 56.25%, the difference were statistically significant ($\chi^2 = 16.676, P < 0.05$). The expression of E-cad and PCNA has negative correlation ($r = -0.614, P < 0.01$). **Conclusion** E-cad and PCNA may be one of the biomarkers of carcinogenesis of tongue mucosa.

[Key words] tongue neoplasms; carcinoma, squamous cell; animal model; E-cad; PCNA; immunohistochemistry

口腔鳞状细胞癌尤其是舌鳞状细胞癌的侵袭性强,恶性度高,严重威胁患者的生命健康^[1]。上皮钙依赖黏附蛋白(E-cadherin, E-cad)是存在于上皮组织中的细胞黏附分子,是肿瘤转移的抑制因素^[2]。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种存在于细胞核内的蛋白,作为评价细胞增殖状态的指标已被广泛认可,与肿瘤的浸润转移有关。细胞黏附能力下降与增殖活跃在口腔癌变中的相互关系,尚无确切定论。本研究拟采用免疫组织化学方法检测 E-cad 和 PCNA 蛋白在大鼠舌黏膜癌变过程中的表达情况及意义。

1 材料与方

1.1 材料与试剂 实验取得西南医科大学生物医学伦理委员会批准,所有动物相关的实验操作符合实验动物指导原则。90只6周龄SPF级SD雄性大鼠(200±10)g购于西南医科大学实验动物中心[生产许可证号:SCXK(川)2013-17]。严格按照免疫组织化学SP法检测试剂盒提供的说明书进行E-cad、PCNA的免疫组织化学染色,阳性对照采用已知E-cad和PCNA阳性切片,阴性对照采用PBS缓冲液。兔抗大鼠E-cad多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)、兔抗大鼠PCNA多克隆抗体(美

国CST公司)、免疫组织化学试剂盒SP-0023(SP,博奥森生物技术有限公司)、即用型DAB显色试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 按照随机数字表法随机分为6组,每组15只,分3笼喂养,A、B、C、D、E组为实验组,F组为对照组。饲养于标准屏障环境中,实验组采用质量分数为0.004%的4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO,美国Sigma公司)SPF级动物专用纯净灭菌水溶液诱癌,对照组饮SPF级动物专用纯净灭菌水,分别于第10周(A组)、14周(B组)、18周(C组)、22周(D组)、24周(E、F组),分5批乙醚麻醉、颈椎脱臼处死,取舌黏膜组织标本,一部分组织标本于液氮速冻后转移至-80℃冰箱冻存备用,另一部分组织标本即刻4%多聚甲醛固定,24h内,梯度乙醇脱水、石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色,病理分级参照WHO2005年标准,由西南医科大学两位高年资病理医师共同读片确定病理分级。

1.2.2 结果判定 E-cad的阳性染色以细胞膜为主,PCNA为细胞核。组织染色强度记分标准:无为0分,弱为1分,中等

强度为 2 分,强为 3 分。阳性细胞数比例进行评级记分,待观测切片在 400 倍视野下随机选定 5 个视野观察:阳性细胞数小于 10% 为 0 分,10%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分。每张切片细胞染色情况总记分为组织染色强度记分与阳性细胞数得分之和。按照总分分值分为:0~1 分为阴性(-),2 分为弱阳性(+),3~4 分为中阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。弱阳性、中阳性及强阳性表达归为阳性表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件对数据进行分析,组间比较采用等级资料的非参数秩和检验(Kruskal-Wallis Test),多个样本间两两比较的秩和检验及 χ^2 趋势检验,相关性检验采用 Spearman 相关系数分析。统计学检验水准为 $\alpha=0.05, P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

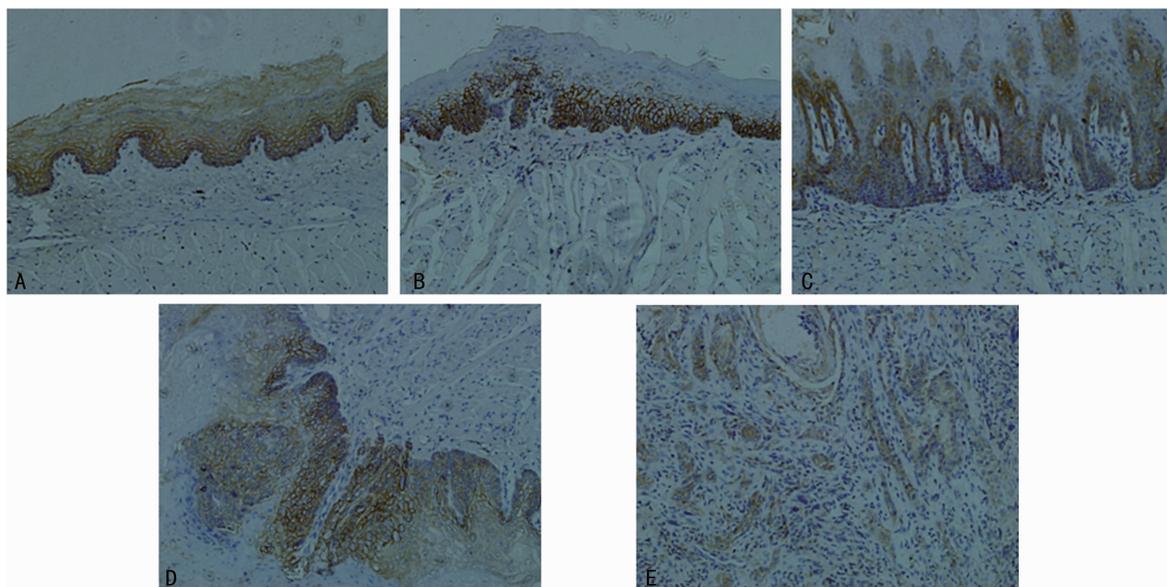
2.1 大鼠舌黏膜癌建模 实验组大鼠之间斗殴死亡 1 只,麻醉意外死亡 1 只,癌发后身体衰竭死亡 6 只,共获有效实验对象 82 只,实验组病理分级结果差异有统计学意义($\chi^2=24.267, P<0.05$)。本实验中,由于中度上皮异常增生和重

度上皮异常增生样本含量较少,在进行数据统计时不能成为独立的分析组,遂将其归为一个分析组。其中正常黏膜 21 只,上皮单纯增生 21 只,轻度高上皮异常增生 14 只,中重度上皮异常增生 10 只,舌鳞状细胞癌 16 只。

2.2 E-cad 在大鼠正常舌黏膜和癌变各阶段组织中的表达 在大鼠舌黏膜癌变过程中,E-cad 蛋白阳性表达率降低,并且由单纯的细胞膜表达为主,发展到细胞膜、细胞质均有较明显表达,见图 1。各组间阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=15.308, P=0.004$),见表 1。

表 1 E-cad 在大鼠舌黏膜癌变过程中的表达比较

病理分组	n	-	+	++	+++	阳性率 (%)
正常黏膜	21	0	3	8	10	100.00
上皮单纯增生	21	1	5	8	7	95.24
轻度上皮异常增生	14	1	4	6	3	92.86
中重度上皮异常增生	10	2	2	3	3	80.00
舌鳞状细胞癌	16	5	6	4	1	68.75



A: 正常舌黏膜; B: 上皮单纯增生; C: 轻度上皮异常增生; D: 中重度上皮异常增生; E: 舌鳞状细胞癌。

图 1 E-cad 在大鼠舌黏膜癌变各阶段组织中的表达(SP×200)

2.3 PCNA 在大鼠正常舌黏膜和癌变各阶段组织中的表达 在大鼠舌黏膜癌变过程中,PCNA 蛋白阳性表达率升高,主要表达于基底细胞层的细胞核内,见图 2。各组间阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=16.676, P=0.002$),见表 2。

表 2 PCNA 在大鼠舌黏膜癌变过程中的表达

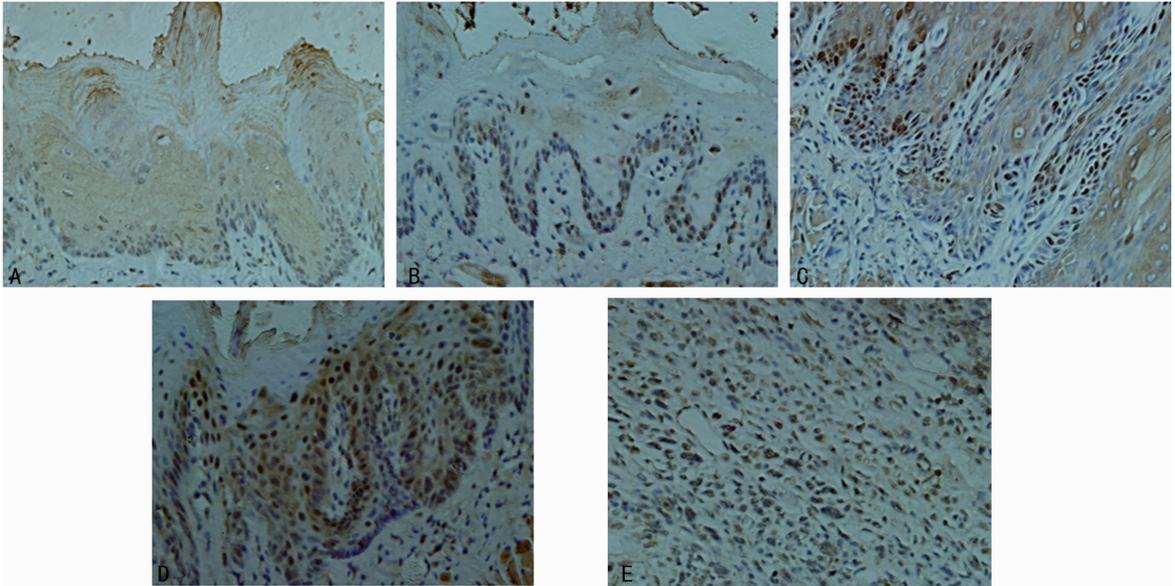
病理分组	n	-	+	++	+++	阳性率 (%)
正常黏膜	21	19	2	0	0	9.52
上皮单纯增生	21	18	3	0	0	14.29
轻度上皮异常增生	14	9	3	2	0	35.71
中重度上皮异常增生	10	5	2	2	1	50.00
舌鳞状细胞癌	16	7	3	4	2	56.25

2.4 E-cad 与 PCNA 在大鼠舌黏膜癌变各阶段组织中的相关性分析 结果显示,PCNA 表达为阳性者,其 E-cad 较多的表

达为阴性,反之亦然。Spearman 相关分析显示,二者呈负相关($r=-0.614, P=0.000$),随病变程度加重,E-cad 表达下降,而 PCNA 表达增强。见表 3。

表 3 在大鼠舌黏膜癌变各阶段组织中 E-cad 和 PCNA 表达相关性分析(n)

项目	E-cad				合计
	-	+	++	+++	
PCNA	-	0	11	14	39
	+	1	3	7	11
	++	5	3	0	8
	+++	3	0	0	3
合计	9	17	21	14	61



A: 正常舌黏膜; B: 上皮单纯增生; C: 轻度上皮异常增生; D: 中重度上皮异常增生; E: 舌鳞状细胞癌。

图 2 PCNA 在大鼠舌黏膜癌变各阶段组织中的表达 (SP×400)

3 讨 论

口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈升高趋势,尚无确切的早期诊断方法。4NQO 饮水法诱导大鼠口腔癌变建立口腔鳞状细胞癌的动物模型较为成熟,对研究口腔鳞状细胞癌的发生、发展机制、治疗、预防措施具有重要意义^[3]。

E-cad 是上皮组织中一类依赖钙离子的细胞黏附分子。人类的 E-cad 编码基因 CDH1 定位于 16q22.1^[4];大鼠与人类稍有不同,其定位于 19q12。在维持组织形态结构和上皮极性上具有重要意义^[5],是肿瘤转移的抑制因素^[2]。近年来,研究发现 E-cad 与口腔鳞状细胞癌的分化程度,发展转移密切相关^[6]。E-cad 能否作为口腔鳞状细胞癌的预后指标,尚存在争议^[7-8]。本研究结果发现:E-cad 在正常黏膜上皮的基底部细胞排列紧密,细胞数目多,细胞与细胞之间的联系紧密,E-cad 的表达相对较多,染色强度也高,可达到 100%;颗粒层到角质层细胞数少、排列疏松,其阳性着色强度相对较弱。从中度和重度上皮异常增生到舌鳞状细胞癌阶段,E-cad 阳性率持续下降,细胞排列紊乱无序,可见其在维持上皮正常结构中起着关键性作用。本实验观察了 E-cad 在大鼠舌黏膜从正常-上皮单纯增生-轻度上皮异常增生-中重度上皮异常增生-鳞状细胞癌这一动态癌变过程中的表达变化,随着病变程度加重,组织中 E-cad 表达降低,表达部位由细胞膜表达为主发展至细胞膜、细胞质均有表达,可导致细胞间、细胞与组织间黏附降低,促使舌黏膜组织异型性提高直至舌鳞状细胞癌发生。与 Hung 等^[9]研究 E-cad 在人口腔鳞状细胞癌中的表达结果一致,因此笔者推测组织中 E-cad 表达下调可能是口腔黏膜癌变过程的早期事件。

PCNA 是公认的反映细胞增殖状态的一种核蛋白,基因定位于人染色体 20p12,参与细胞周期调控、复制、修复和凋亡等细胞重要事件^[10]。PCNA 与细胞增殖、病变活跃和恶性程度密切相关^[11],不仅可以评估口腔鳞状细胞癌的分化和分级,还能作为口腔鳞状细胞癌的肿瘤标志物、评估口腔鳞状细胞癌浸润、转移、术后复发和预后。本研究结果表明:从正常舌黏膜到舌鳞状细胞癌的过程中,虽然 PCNA 总体表达程度均不高,舌

鳞状细胞癌中的表达率最高为 56.25%,其表达仍然能够呈现由低到高的增长趋势,反映舌黏膜癌变过程中组织细胞增殖活性增强。与 Madan 等^[12]研究结果一致。推测 PCNA 一定程度上可反映肿瘤细胞的异常增殖。

本实验研究发现,在大鼠舌黏膜癌变过程中,PCNA 表达随病变程度的增加上调,E-cad 表达随病变程度的增加下调,与 Lim 等^[13]对人口腔鳞状细胞癌生存分析结果一致,即 E-cad 低表达和 PCNA 高表达可反映口腔鳞状细胞癌的不良预后。本研究结果显示,PCNA 和 E-cad 蛋白表达呈负相关,与翁密霞等^[14]研究 PCNA 和 E-cad 在非小细胞肺癌中的结果一致。PCNA 反映的是细胞的增殖活性,在癌变过程中就体现了癌变细胞的增殖能力,说明在此过程中,癌变区舌黏膜细胞具有高度的增殖活性,细胞间的黏附能力下降更容易脱离原有细胞群,侵入周边其他组织。因此笔者推测联合检测 E-cad 和 PCNA 对口腔鳞状细胞癌的侵袭转移具有重要意义,有望成为舌黏膜癌变的标志物。然而口腔鳞状细胞癌的发生、发展机制是一个涉及多因素,多体系,多种蛋白分子的复杂过程,E-cad 表达下调和 PCNA 增殖活跃在口腔鳞状细胞癌中的具体作用机制,仍需采用更多分子生物学技术对该结果进行验证,进一步深入研究 E-cad 和 PCNA 的相关性及在口腔鳞状细胞癌中的作用与意义。

参考文献

- [1] 邓婷婷,谭红,毛亮,等. 4NQO 诱导大鼠舌黏膜癌变过程中波形蛋白的表达研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(16): 2194-2197.
- [2] Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antúnez-López J, et al. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2006, 42(2): 190-200.
- [3] Vered M, Yarom N, Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations [J]. Oral Oncol, 2005, 41(4): 337-339.
- [4] Pannone G, Santoro A, Feola A, et al. (下转第 1462 页)

ocardial inflammation and non-ischaemic heart failure; is there a role for C-reactive protein? [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(6):591-599.

- [13] Mamamtavrivshvili ND, Kvirkvelia AA, Abashidze RI, et al. Role of immune inflammatory activity in chronic heart failure progress [J]. *Georgian Med News*, 2008 (160/161):30-34.
- [14] Yu M, Wen S, Wang M, et al. TNF- α -secreting B cells contribute to myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(5):1002-1008.
- [15] Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, et al. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways[J]. *Clin Invest*, 2007, 117(9):2692-2701.
- [16] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation [J]. *Nature*, 2002, 418(6894):191-195.
- [17] Vande Walle, Kanneganti TD, Lamkanfi M. HMGB1 release by inflammasomes[J]. *Virulence*, 2011, 2(2):162-165.
- [18] Rauvala H, Rouhiainen A. RAGE as a receptor of HMGB1 (Amphoterin): roles in health and disease [J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(8):725-734.
- [19] Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, et al. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells[J]. *J Cell Biol*, 2001, 152(6):1197-1206.
- [20] Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite out-

growth and activation of NF- κ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(28):19919-19924.

- [21] 高小清, 姜红, 邹云增. 热休克转录因子 1 在心肌及其他组织中的抗炎作用[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2008, 8(6):371-374.
- [22] Kokkola R, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages[J]. *Scand J Immunol*, 2005, 61(1):1.
- [23] 闵笑颜. 热休克蛋白 27 对 LPS 诱导小鼠心功能不全保护机制的研究[D]. 南京:南京医科大学, 2007.
- [24] Shimamoto A, Pohlman TH, Shomura S, et al. Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury[J]. *Ann Thorac Surg*, 2006, 82(6):2017-2023.
- [25] 于鹏, 姜红. 高迁移率族蛋白 1 与心血管疾病关系概述 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2013, 13(2):509-512.
- [26] Volz HC, Laohachewin D, Schellberg D, et al. HMGB1 is an independent predictor of death and heart transplantation in heart failure[J]. *Clin Res Cardiol*, 2012, 101(6):427-435.
- [27] Tzeng HP, Fan J, Vallejo JG, et al. Negative inotropic effects of high-mobility group box 1 protein in isolated contracting cardiac myocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(3):H1490-1496.
- [28] 苏兆亮. HMGB1 在心肌炎中的致病机制及调控作用研究[D]. 镇江:江苏大学基础医学与医学技术学院, 2011.

(收稿日期:2016-10-19 修回日期:2016-12-25)

(上接第 1456 页)

The role of E-cadherin down-regulation in oral cancer: CDH1 gene expression and epigenetic blockage[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14(2):115-127.

- [5] Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development; cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(23):3199-3214.
- [6] Luo SL, Xie YG, Li Z, et al. E-cadherin expression and prognosis of oral cancer; a meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6):5533-5537.
- [7] Fan CC, Wang TY, Cheng YA, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(10):1735-1744.
- [8] Wang C, Liu X, Chen Z, et al. Polycomb group protein EZH2-mediated E-cadherin repression promotes metastasis of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(3):229-236.
- [9] Hung KF, Chang CS, Liu CJ, et al. Differential expression of E-cadherin in metastatic lesions comparing to primary

oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2006, 35(10):589-594.

- [10] Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(3):605-613.
- [11] Kato K, Kawashiri S, Yoshizawa K, et al. Expression form of p53 and PCNA at the invasive front in oral squamous cell carcinoma; correlation with clinicopathological features and prognosis[J]. *J Oral Pathol Med*, 2011, 40(9):693-698.
- [12] Madan M, Chandra S, Raj V. Evaluation of cell proliferation in malignant and potentially malignant oral lesions [J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2015, 19(3):297-305.
- [13] Lim J, Kim JH, Paeng JY, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(11):1199-1205.
- [14] 翁密霞, 吴翠环, 杨秀萍, 等. E-cadherin, CD44v6 和 PCNA 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义 [J]. *癌症*, 2008, 27(2):191-195.

(收稿日期:2016-10-17 修回日期:2016-12-23)