

DJ-1 蛋白在喉鳞状细胞癌与 Hep-2 细胞系表达

祝小林¹, 雷文斌¹, 何小洪², 贾涛¹, 苏振忠¹(中山大学附属第一医院 1. 耳鼻咽喉科医院//耳鼻咽喉科研究所,
2. 卫生部重点实验室辅助循环实验室, 广东 广州 510800)

摘要:【目的】探讨 DJ-1 基因在喉鳞状细胞癌组织及 Hep-2 细胞系中的表达特征。【方法】采用间接免疫荧光方法, 检测 15 例喉鳞状细胞癌手术切除癌组织、癌旁组织、正常黏膜标本和 Hep-2 细胞系的 DJ-1 蛋白。【结果】喉鳞状细胞癌组织与 Hep-2 细胞系中 DJ-1 蛋白均有表达; DJ-1 蛋白在喉鳞状细胞癌组织的表达水平分别高于癌旁组织、正常黏膜组织, 差异有统计学意义 ($F=8.098$, $P=0.002$); 低分化喉癌较高分化喉癌的 DJ-1 水平增高, 差异有统计学意义 ($t=3.099$, $P=0.008$); 喉癌的临床分期和年龄与 DJ-1 蛋白的表达没有相关性 ($t=0.476$, $P=0.642$; $t=0.019$, $P=0.985$)。【结论】喉鳞状细胞癌组织及 Hep-2 细胞系中均有 DJ-1 蛋白的表达, 喉鳞癌组织内的表达高于癌旁组织和黏膜组织; DJ-1 基因在喉鳞状细胞癌组织中的表达可能提示它参与了喉癌的发生发展的有关过程, 为基因治疗提供了理论基础。

关键词: DJ-1 蛋白; 喉鳞状细胞癌; 间接免疫荧光方法

中图分类号: R76

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)02-0142-04

DJ-1 Protein Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and in Hep-2 Cell Line with Immunofluorescence

ZHU Xiao-lin, LEI Wen-bin, HE Xiao-hong, JIA Tao, SU Zheng-zhong

(Otorhinolaryngology Hospital of The First Affiliated Hospital // Otorhinolaryngology Institute,
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of DJ-1 gene and its significance in carcinogenesis and development of the laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and in Hep-2 cell line in human laryngeal cancer in vitro. 【Methods】 The expression of DJ-1 protein was examined by indirect immunofluorescence in 15 cases with the laryngeal squamous cell carcinoma—for their carcinoma and paraneoplastic tissues, normal mucous membranes, and Hep-2 cell line. 【Results】 DJ-1 protein expression in LSCC tissues was significantly higher than those in paraneoplastic tissues and normal mucous membranes ($F=8.098$, $P=0.002$); DJ-1 level increased in poorly differentiated laryngeal cancer more than in well differentiated laryngeal cancer ($t=3.099$, $P=0.008$); DJ-1 protein expression presented no relation with clinical stage and age ($t=0.476$, $P=0.642$; $t=0.019$, $P=0.985$). 【Conclusion】 DJ-1 protein expression is present both in LSCC and Hep-2 cell line and higher than that in paraneoplastic tissues and normal mucous membranes. DJ-1 gene appears to be closely related to the genesis and development of LSCC. A better understanding of it may help to develop new strategies for treatment of the cancer.

Key words: DJ-1 protein; laryngeal squamous cell carcinoma; immunofluorescence

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):142-145;151]

恶性肿瘤发展的过程中, 癌基因的异常扩增和抑癌基因的突变、缺失或低表达都起着十分重要的作用。研究已证明 DJ-1 基因在人体 22 个以

上组织中广泛存在^[1]。DJ-1 基因较多的研究发现与帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 有关, 认为 DJ-1 基因的突变可导致早发性帕金森病的发

收稿日期: 2006-07-18

基金项目: 广东省博士启动基金资助项目(5300781)

作者简介: 祝小林(1968-), 男, 江西南昌人, 博士生, 副主任医师; 雷文斌, 主治医师, 博士, 通讯作者。E-mail: Leiwb2003@Yahoo.com.cn

生^[2]。最新发现^[3-6] DJ-1 基因与恶性肿瘤进展及预后等有关,可能是潜在抗癌治疗靶点。DJ-1 基因在头颈鳞癌组织中的研究尚未见报道。本研究旨在检测喉鳞癌组织、癌旁组织、正常黏膜组织以及 Hep-2 细胞系的 DJ-1 基因表达特征,进而探讨其在喉鳞状细胞癌发生发展中的意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院 2006 年 1-7 月期间住院治疗 15 例喉鳞状细胞癌手术切除新鲜癌组织标本与癌旁组织(离肿瘤边缘小于 1 cm)、正常喉或下咽黏膜组织标本各 15 份。喉鳞状细胞癌患者中男 13 例,女 2 例,年龄 31-77 岁(平均 58.7 岁);高分化 4 例、中分化 6 例、低分化 5 例,声门上型 5 例、声门型 10 例, 期 3 例、期 3 例、期 6 例、A 期 3 例(UICC2002TNM 分期)。所有标本编号保存在-75℃低温冰箱备用。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Hep-2 细胞系,由中山大学肿瘤防治中心实验研究部提供。Hep-2 细胞系于体积分数 5%CO₂、饱和湿度,37℃下,常规培养在 RPMI 1640 培养液加 100 ml/L 小牛血清的培养基。待培养细胞进入对数生长期后,将其消化、传代,接种于 6 孔板,当细胞达 80%融合时即进行实验。

1.2.2 间接免疫荧光方法 取丙酮固定 1 min 后的 Hep-2 细胞涂片,吹干后用锡纸包好-20℃保存备用;喉鳞状细胞癌术后组织标本冰冻切片,每例切 5 张,厚 10 μm,56℃烤片 1 h 置-75℃低温冰箱保存备用,另同时作 HE 染色和阴性对照。羊抗人 DJ-1 多克隆抗体(1:400;N-20, SC-27004, Santa Cruz 公司产品)滴在切片上,盖上湿盒,避光 4 h 孵育过夜,从湿盒中取出载玻片,弃去多余抗体,载玻片放入 PBS 缸中清洗 30 min,共洗 3 次,弃去 PBS 液后用 FITC 标记兔抗羊第二抗体(1:100)(武汉博士德公司)滴在载玻片上,保湿避光室温(25℃)放置 30 min,弃去多余的二抗,用 PBS 浸洗 3 次,吹干后既用甘油封片,在避光的条件下用 Olympus BX51 荧光显微镜下观察并摄片。

1.3 数据采集与统计学分析

荧光显微镜下随机选取 5 个高倍视野,

Image-Pro Plus 软件(Media Cybernetics 公司)图象分析系统照相和分析计数全部细胞数和发绿色荧光细胞数,根据如下公式计算发绿色荧光细胞阳性表达率:阳性表达率(%)=发绿色荧光细胞数/全部细胞数×100%。阴性对照:PBS 替代第一抗体,再加羊抗兔的荧光标记抗体进行检测。为了满足正态性要求,数据先行平方根反正弦变换($y = \arcsin \sqrt{x}$),用均数±标准差($\bar{y} \pm s$)表示,所有数据输入 SPSS 13.0,喉癌组组内关系进行 t 检验;喉癌组、癌旁组、正常黏膜组三组间的关系采用随机区组设计的方差分析,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Hep-2 细胞系 DJ-1 蛋白表达

Hep-2 细胞系 DJ-1 蛋白表达阳性率(52%);荧光显微镜下观察可见 DJ-1 蛋白的绿色荧光主要在胞浆内,少量位于胞核(图 1)。

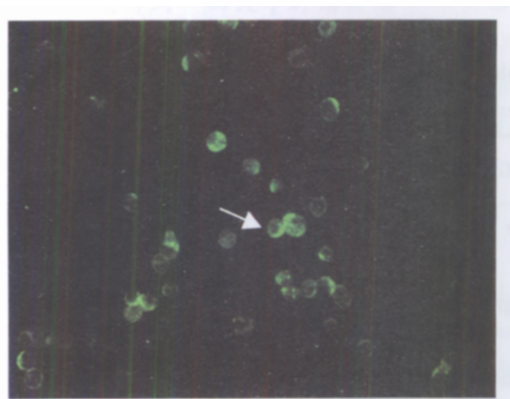


图 1 Hep-2 细胞的 DJ-1 蛋白免疫荧光结果

Fig.1 Immunofluorescence of DJ-1 protein located in Hep-2 cell line

DJ-1 protein was present mainly in cytoplasm but fewer in nuclei. (×400)

2.2 喉鳞状细胞癌 DJ-1 蛋白的表达

DJ-1 蛋白的绿色荧光主要在细胞的胞浆内。喉鳞状细胞癌(15 份)与癌旁、正常喉黏膜组织(图 2)中 DJ-1 蛋白均有表达(表 1);喉鳞癌的 DJ-1 蛋白表达(44%)分别与癌旁黏膜(35%)、正常喉黏膜(34%)%相比差别有统计学意义($F=8.098, P=0.002$)。高中分化喉鳞癌(图 3)与低分化喉鳞癌(图 4)中 DJ-1 蛋白的阳性表达率分别为(40%)和(56%),呈增高趋势有统计学意义($t=3.099, P=0.008$);喉鳞癌的年龄、临床分期与 DJ-1 蛋白的

表达差别无统计学意义 ($t=0.476$, $P=0.642$; $t=0.019$, $P=0.985$; 表 2)。

表 1 喉鳞状细胞癌与癌旁、正常喉黏膜组织中 DJ-1 的阳性表达比较

Table 1 Comparison of DJ-1 protein positive expression among laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC), paraneoplastic and normal mucous membranes.

Tissue	n	DJ-1	
		Median(x)	Transformed($\bar{y} \pm s$)
LSCC	15	0.44	0.46 \pm 0.11
Paraneoplastic membranes	15	0.35	0.36 \pm 0.07
Normal mucous membranes	15	0.34	0.34 \pm 0.07

No statistical significance found for comparison of DJ-1 protein expression between paraneoplastic tissues and normal mucous membranes ($q=0.33$, $P=0.693$); DJ-1 expression in both groups was lower than that in LSCC ($q_1=3.033$, $P<0.01$; $q_2=2.703$, $P<0.01$); statistical significance was found among three groups ($F=8.098$, $P=0.002$)

表 2 喉鳞状细胞癌组织中 DJ-1 的阳性表达特征

Table 2 Characteristics of DJ-1 protein positive expression in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC)

Group	n	DJ-1		t	P	
		Median(x)	Transformed($\bar{y} \pm s$)			
Age	65	7	0.43	0.73 \pm 0.14	0.476	0.642
	>65	8	0.47	0.76 \pm 0.09		
Staging	A	9	0.44	0.75 \pm 0.10	0.019	0.985
		6	0.45	0.75 \pm 0.13		
Differentiation	Poor	5	0.56	0.85 \pm 0.06	3.099	0.008
	Well	10	0.40	0.70 \pm 0.10		

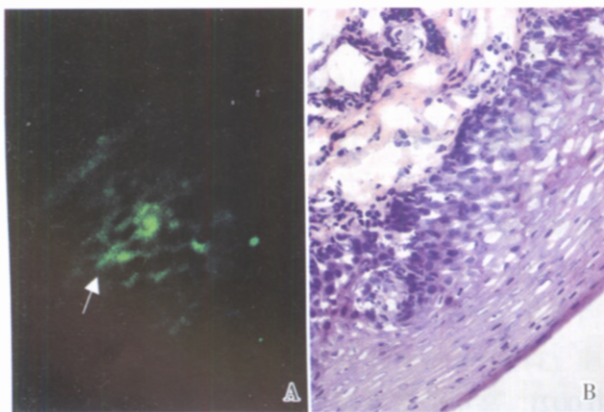


图 2 正常喉黏膜的 DJ-1 蛋白免疫荧光结果
Fig.2 Immunofluorescence of DJ-1 protein in normal mucous membranes ($\times 400$)

A: Immunofluorescence; B: frozen section HE

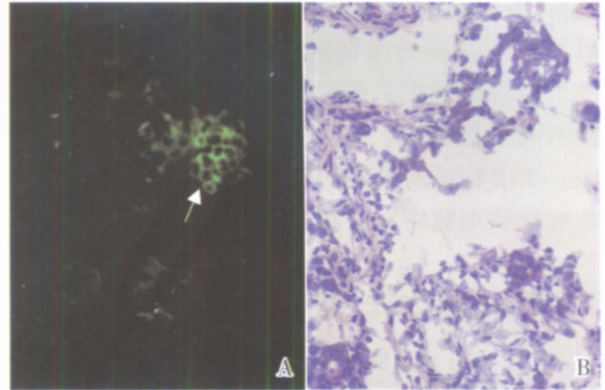


图 3 中分化喉鳞癌的 DJ-1 蛋白免疫荧光结果
Fig.3 Immunofluorescence of DJ-1 protein in moderate differentiated laryngeal squamous cell carcinoma ($\times 400$)

A: immunofluorescence; B: frozen section HE

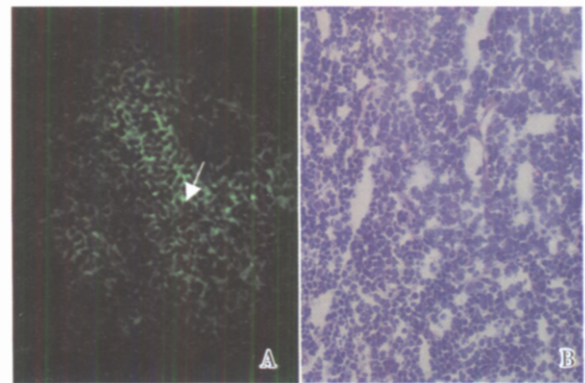


图 4 低分化喉鳞癌的 DJ-1 蛋白免疫荧光结果
Fig. 4 Immunofluorescence of DJ-1 protein in poorly differentiated squamous cell carcinoma ($\times 400$)

A: immunofluorescence; B: frozen section HE

3 讨论

DJ-1 基因是 Nagakubo 等^[1](1997) 在研究 NIH-3T3 细胞的 H-ras 基因中发现一种新的丝裂原依赖性癌基因, 对 Ras 基因有协同作用。在随后的研究中发现 DJ-1 基因位于 1p36, 含有 8 个外显子, 长度 24 ku, 其含有 570 bp 的 ORF, 编码一个含 189 个氨基酸的蛋白。人类的 DJ-1 蛋白又称 RS, 人与鼠的 DJ-1 蛋白的氨基酸序列同源性 90%。目前在帕金森病 (PD) 的研究中认为 DJ-1 基因的突变可导致早发性帕金森病的发生^[2]。Nagakubo 等^[1] 将 DJ-1 基因转导到 NIH-3T3 细胞中观察 DJ-1 对肿瘤生长影响, 分别用 NIH-3T3-DJ-1 细胞、NIH-3T3-lacZ 细胞注入裸鼠皮下成瘤, 结果前者肿瘤明显较后者大, 说明 DJ-1 基因

对 NIH-3T3 细胞形成肿瘤有促进作用。Hod^[7] 和 Grzmil 等^[8]在前列腺癌的研究中报道在前列腺增生细胞中 DJ-1 蛋白较低表达而在前列腺癌细胞 (PC-3) 中较高表达, 用 RNA 干扰技术使 DJ-1 基因沉默则发现前列腺癌细胞 (PC-3) 受细胞凋亡促进剂 (TRAIL) 作用后凋亡增多, 认为 DJ-1 基因参与前列腺细胞凋亡调节、促进前列腺癌细胞增殖和转录水平。有的学者持不同观点: 在 Neuro2a 细胞中利用 siRNA 使 DJ-1 基因沉默的研究中发现 DJ-1 沉默的 Neuro2a 细胞对 Staurosporin (非选择性抑制蛋白激酶 C 的凋亡促进剂) 作用不敏感, 说明 DJ-1 基因下调后没有使 Neuro2a 细胞凋亡增多^[9]。在原发肺癌研究中发现高水平 DJ-1 mRNA 较低水平 DJ-1 mRNA 癌症患者复发率明显增多 (两者 3 年复发率分别为 46% 与 28%)^[3]。乳腺癌患者中 DJ-1 蛋白及其抗体较非癌者明显增多, 乳腺癌带瘤者外周血中测出 DJ-1 抗体, 认为 DJ-1 蛋白是一潜在肿瘤抗原与标记物, 乳腺癌中 DJ-1 蛋白明显增高且可作为预后指标^[9]。眼葡萄膜恶性黑色素瘤研究中发现眼葡萄膜恶性黑色素瘤能分泌和表达 DJ-1 蛋白且在眼葡萄膜恶性黑色素瘤患者的血清检测出 DJ-1 蛋白, 认为 DJ-1 蛋白是眼葡萄膜恶性黑色素瘤潜在血清标志物^[10]。MacKeigan 等^[6]报道 7 例原发非小细胞肺癌组织中有 6 例 DJ-1 蛋白增高, 应用 Paclitaxel 及 MEK 的抑制物 U0126 对肺癌的 NCI-H157 细胞进行治疗中发现 DJ-1 的蛋白表达降低, DJ-1 作用在于降低细胞凋亡水平, 是细胞生存促进因子, 认为 DJ-1 基因是一个潜在抗癌治疗靶点。目前认为 DJ-1 基因与恶性肿瘤的发生和预后密切相关并可能是潜在抗癌治疗靶点, 其具体作用机制不清, 已成为研究的热点。头颈鳞癌是常见全身恶性肿瘤之一, 与之相关基因研究有较多的报道^[11], 但 DJ-1 在头颈鳞癌组织中的研究尚未见报道。

本研究以病理确诊的喉鳞状细胞癌及 Hep-2 细胞系为研究对象, 采用间接免疫荧光方法对 15 例喉鳞状细胞癌、癌旁、正常黏膜及 Hep-2 细胞系中 DJ-1 蛋白进行检测, 结果示 Hep-2 细胞系与喉鳞状细胞癌组织中均有 DJ-1 基因存在, 这说明可以通过研究 Hep-2 细胞系来进一步了解 DJ-1 基因在喉癌中作用机制; 喉鳞状细胞癌组织及癌旁、正常黏膜组织 DJ-1 蛋白表达均为阳性且表达强度不同, 这与 Zhu 等^[12]采用瞬时 RT-PCR 检测 12

例肺鳞状细胞癌及癌旁肺组织中均有 DJ-1 的 mRNA 表达相一致。DJ-1 蛋白表达在喉鳞状细胞癌组织的表达水平分别高于癌旁和正常黏膜组织, 而癌旁的 DJ-1 蛋白表达与正常黏膜组织差异无统计学意义, 这与 Zhu 等^[12] 和 Hod^[7] 分别在非小细胞肺癌和前列腺癌检测 DJ-1 蛋白水平分别高于肺组织与前列腺增生组织的结果一致。喉癌的临床分期、年龄与 DJ-1 蛋白的表达没有相关性, 这与 Raymond 等^[3]的报道相符。

本研究发现在 Hep-2 细胞系和喉癌手术切除的癌组织中有 DJ-1 蛋白表达, 同时发现低分化喉癌较高分化喉癌的 DJ-1 蛋白水平增高, 这可能提示 DJ-1 基因在喉癌的发展中起着重要作用, 这结果可为下一步采用 RNAi 干扰 DJ-1 基因, 使 DJ-1 基因沉默, 分析 DJ-1 基因对 Hep-2 细胞系增殖的体内外实验研究提供理论基础; 同时, 今后还可以通过前瞻性研究 DJ-1 基因, 探索其在喉鳞癌中的复发和预后中作用。

(本研究得到中山大学肿瘤防治中心实验研究部曾木胜主任、张昌卿主任、冯凯涛主管技师; 中山大学公共卫生学院张晋昕副教授的精心指导和卫生部重点实验室辅助循环实验室方典秋主任大力支持, 在此一并致谢!)

参考文献:

- [1] NAGAKUBO D, TAIRA T, KITAURA H, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras [J]. *Biochem Biophys Res*, 1997, 231(2): 509-513.
- [2] BONIFATI V, RIZZU P, VAN BAREN M J, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism [J]. *Science*, 2003, 299(5604): 256-259.
- [3] RAYMOND H K, MALTE P, YINGJU J, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(3): 263-273.
- [4] SHI W, ZHANG X, PINTILIE M, MA, et al. Dysregulated PTEN-PKB and negative receptor status in human breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(2): 195-203.
- [5] NAOUR F, MISEK D E, KRAUSE M C, et al. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(3): 3328-3335.

(下转第 151 页 to page 151)

参考文献:

- [1] COUTURE M, BURMESTERT, HANKELNT, et al. The heme environment to mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36377- 36382.
- [2] SCHWARZE S R, HO A, VOCERO- AKBAM A, et al. In vivo protein transduction: Delivery of biologically active protein into the mouse [J]. *Science*, 1999, 285 (5433): 1569- 1572.
- [3] SCHWARZE S R, DOWDY S F. In vivo protein transduction: Intracellular delivery of biologically active protein, compounds and DNA [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21(2): 45- 48.
- [4] BURMESTER T, WEICH B, REINHARDT S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain [J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 520- 523.
- [5] SUN Y, JIN K, MAO X O, et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic - ischemic injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (26): 15306- 15311.
- [6] DODD C H, HSU H C, CHU W J, et al. Normal T-cell response and in vivo Magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles[J]. *J Immunol Methods*, 2001, 256 (1- 2): 89- 105.
- [7] ZHANG W R, HAYASHI T, IWAI M, et al. Time dependent amelioration against ischemic brain damage by glial cell line derived neurotrophic factor after transient middle cerebral artery occlusion in rat [J]. *Brain Res*, 2001, 903 (1- 2): 253- 256.
- [8] CAO G, PEI W, GE H, et al. In vivo delivery of a Bcl - xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis[J]. *J Neurosci*, 2002, 22 (13): 5423- 5431.
- [9] ASOH S, OHSAWA I, MORI T, et al. Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (26): 17107- 17112.
- [10] GUEGAN C, BRAUDEAU J, COURIAUD C, et al. PTD- XIAP protects against cerebral ischemia by anti- apoptotic and transcriptional regulatory mechanisms [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22 (1): 177- 186.
- [11] JINSEU P, JIYOON R, KYEONGAK, et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(5): 1173- 1181.
- [12] WADIA J S, STAN R V, DOWDY S F. Transducible TAT- HA fusogenic peptide enhances escape of TAT- fusion proteins after lipid raft macropinocytosis [J]. *Nat Med*, 2004, 10(3): 310- 315.
- (编辑 刘清海)
-
- (上接第 145 页 from page 145)
- [6] MACKEIGAN J P, CLEMENTS C M, LICH J D, et al. Proteomic profiling drug - induced apoptosis in non - small cell lung carcinoma: identification of RS/DJ- 1 and RhoGDIalpha [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (20): 6928- 6934.
- [7] Hod Y. Differential control of apoptosis by DJ- 1 in prostate benign and cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(6): 1221- 1233.
- [8] GRZMIL M, VOIGT S, THELEN P, et al. Up- regulated expression of the MAT- 8 gene in prostate cancer and its siRNA- mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(1):97- 105.
- [9] YOKOTA T, SUGAWARA K, ITO K, et al. Down regulation of DJ- 1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312 (4):1342- 1348.
- [10] PARDO M, GARCIA A, THOMAS B, et al. The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG - 1 metastasis markers and leads to the identification of DJ- 1 as a potential serum biomarker [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(5):1014- 1022.
- [11] 雷文斌, 苏振忠. eIF4E 在喉癌和下咽癌组织中的表达及意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25 (3): 108- 111.
- [12] ZHU C Q, BLACKHALL F H, PINTILIE M, et al. Skp2 gene copy number aberrations are common in non- small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 1984- 1991.
- (编辑 刘清海)