

桥粒芯胶蛋白-1 与头颈部鳞状细胞癌发生及预后相关性的研究*

寇飞¹ 李芬¹ 汪雷¹ 喻迪¹ 陈晨¹ 陈始明¹ 肖伯奎¹ 陶泽璋¹

[摘要] 目的:本研究拟探讨桥粒芯胶蛋白-1 与头颈部鳞状细胞癌发生及预后的相关性。方法:本研究通过对 NCBI 数据库 GEO 获取的基因芯片数据进行统计学分析,并且采用头颈部鳞状细胞癌组织芯片予以验证。免疫组织化学的方法检测了组织芯片中芯胶蛋白-1 的表达,并采用统计学方法分析了芯胶蛋白-1 的表达与头颈部鳞状细胞癌发生、分化、预后等的相关性。结果:对 GEO 获取的芯片数据分析发现芯胶蛋白-1 在头颈部鳞状细胞癌中表达增高,且表达增高的患者预后较差。组织芯片的验证实验显示结果与 GEO 数据库获取数据分析结果基本一致,在头颈部鳞状细胞癌中 DSC1 的表达显著高于正常组织,且在低分化头颈部鳞状细胞癌中表达高于高分化鳞状细胞癌。结论:桥粒芯胶蛋白-1 的增高可促进头颈部鳞状细胞癌的发生,且与肿瘤分化相关。此外,其表达增高提示患者预后不良。

[关键词] 桥粒芯胶蛋白-1;头颈部鳞状细胞癌;预后;组织芯片;NCBI 数据库

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.10.001

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

Desmocollin-1 significant correlated with the tumorigenesis and prognosis of HNSCC

KOU Fei LI Fen WANG Lei YU Di CHEN Chen CHEN Shiming
XIAO Bokui TAO Zezhang

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Research Institute of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wuhan, 430060, China)

Corresponding author: TAO Zezhang, E-mail: taozezhang@hotmail.com

Abstract Objective: To explore the correlation between the expression of desmocollin-1 and the tumorigenesis and prognosis of HNSCC. **Method:** Five datasets of HNSCC from the GEO were analyzed. A tumor tissue microassay was chosen for further test. The expression of DSC1 of TMA was detected by immunohistochemical staining. **Result:** The expression of DSC1 was significantly increased in HNSCC. Meanwhile, the expression of DSC1 was much higher in poor-differentiated tumor than the well-differentiated tumor in HNSCC. What's more, the HNSCC patients with lower expression of DSC1 had better outcomes. **Conclusion:** The results were according with the results of statistical analysis with the bioinformatics data from GEO, indicating that DSC1 significant correlated with the tumorigenesis and prognosis of HNSCC.

Key words desmocollin-1; HNSCC; prognosis; tissue microassay; NCBI database

上皮细胞间连接以桥粒为主^[1],桥粒由桥粒芯及桥粒斑两类蛋白组成,桥粒芯包括两种主要的跨膜糖蛋白,桥粒芯糖蛋白(desmogleins, DSG)及桥粒芯胶蛋白(desmocollins, DSC)。桥粒芯糖蛋白及芯胶蛋白均为钙黏素家族的非经典成员^[2],其作用依赖于 Ca²⁺。桥粒作为上皮源性肿瘤和脑膜瘤的电镜标记物^[3],其抗体可作为肿瘤的免疫组织化学标记物,在很多肿瘤相关研究中报道^[2,4-6],且大

量的相关研究已经明确了其功能及结构。其亚单位芯胶蛋白 DSC1-3 与恶性肿瘤的相关性也有部分报道^[7]。芯胶蛋白-1(desmocollins-1, DSC1)表达主要见于复层鳞状上皮,在天疱疮的发生中有重要作用,而在肿瘤相关的报道较少。

本研究中,通过从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)建立的基因芯片数据库 GEO 获取的大数据进行统计学分析,发现 DSC1 与头颈部鳞状细胞癌的发生及预后具有显著相关性,同时,采用头颈部鳞状细胞癌组织芯片进行了进一步的研究探讨。

1 材料与方法

1.1 基因芯片数据库 GEO 获取头颈部鳞状细胞癌相关数据库

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81372880);教育部高校研究基金(No:20130141120093,20110141110062);湖北省自然科学基金(No:012FFA045)

¹ 武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科 耳鼻咽喉头颈外科研究所(武汉,430060)

通信作者:陶泽璋, E-mail: taozezhang@hotmail.com

本研究中从 GEO 数据库下载了 5 个头颈部鳞状细胞癌相关大数据, 分别为 GSE33205、GSE6631、GSE59102、GSE51985、GSE27020。GSE33205 的数据来源于 44 例头颈部鳞状细胞癌及 25 例正常黏膜组织, 其中正常黏膜来源于悬雍垂腭咽成型术患者。GSE6631 的数据来源于 22 例头颈部鳞状细胞癌及其癌旁正常组织。GSE59102 的数据来源于 29 例喉鳞状细胞癌组织样本及 13 例癌旁组织样本。GSE51985 的数据来源于 10 例喉鳞状细胞癌组织。GSE27020 的数据来源于 59 例喉癌组织。

1.2 组织芯片

头颈部鳞状细胞癌组织芯片 (tissue microarray, TMA) 购买自西安艾丽娜生物科技有限公司, 产品编号: HN803b。芯片中包括 3 种类型肿瘤: 舌、喉及鼻肿瘤。组织来源患者平均年龄为 53.4 岁。芯片中包含的组织来源的信息详见表 1。

表 1 组织芯片患者临床数据

项目	例数(%)
组织来源	
舌	42(52.5)
喉	31(38.6)
鼻	7(8.9)
分化程度	
1 级	12(16.7)
2 级	36(50.0)
3 级	24(33.3)
正常组织	9(11.2)

1.3 免疫组织化学检测方法

本研究中免疫组织化学采用武汉谷歌生物科技有限公司产品免疫组织化学试剂盒进行。试剂盒产品编号: G1210-2。采用两步法进行, 一抗为美国西格玛公司抗体 (Sigma-Aldrich; 鼠抗, 稀释度 1:100)。实验步骤如下: ①切片常规脱蜡; ②柠檬酸缓冲液修复; ③3%过氧化氢避光孵育, 阻断过氧

化物酶; ④一抗孵育过夜, 4℃; ⑤HRP 标记二抗室温孵育 0.5 h; ⑥DAB 显色, 苏木精复染; ⑦梯度乙醇脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树脂封片。柠檬酸液修复步骤后每一步均用 PBS 冲洗 3 遍, 每遍 5 min。

1.4 免疫组织化学结果评价

DSC1 表达位于胞外, 评分根据 DSC1 表达的强度及频率两项指标进行评价。强度依据 DSC1 表达的强度分为 0~3, 分别为 0: 阴性; 1: 弱阳; 2: 阳性; 3: 强阳。频率依据 DSC1 表达的量分为 0~3, 分别为 0: 0~25%; 1: 26%~50%; 2: 51%~75%; 3: 76%~100%。计算 CES 评分=强度×频率, CES 的值介于 0~12。CES 的评分分为阴性 (0)、弱阳性 (1~4)、阳性 (5~8)、强阳性 (9~12)。

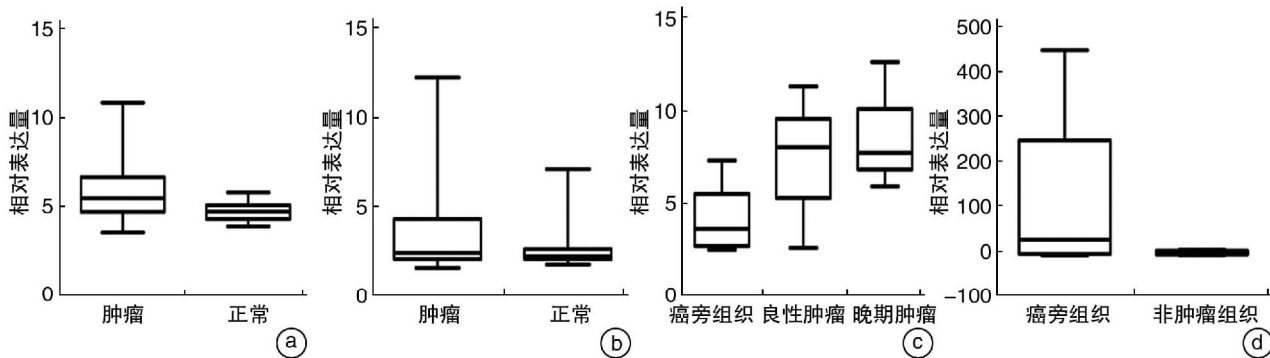
1.5 统计学分析

将 GEO 数据库下载的大数据分别导入 excel 表, 进行统计学分析。DSC1 在肿瘤及正常组织中的表达差异分析采用 *t* 检验, DSC1 在不同分化程度的肿瘤组织中的表达差异采用 χ^2 检验, 预后分析采用 ROC 曲线分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DSC1 在头颈部鳞状细胞癌组织中表达明显增高

本研究分别分析了从 GEO 数据库下载的 GSE33205、GSE6631、GSE59102、GSE51985 共 4 个大数据中 DSC1 的表达在肿瘤组织及正常组织中的差异。经过 excel 表数据导入, 整理, 对 GSE33205、GSE6631、GSE51985 3 个数据进行 *t* 检验分析, 对 GSE59102 数据进行 χ^2 分析, 对 4 个大数据分析的 $P < 0.05$ (图 1)。具体分别为: GSE33205, $t = 3.243, P < 0.01$ (图 1a); GSE6631, $t = 2.124, P < 0.05$ (图 1b); GSE59102, $F = 13.2, P < 0.01$ (图 1c); GSE51985, $t = 2.113, P < 0.05$ (图 1d); 4 个大数据的统计分析结果均提示在头颈部鳞状细胞癌肿瘤组织中 DSC1 的表达较正常组织中的表达显著增高, 表明 DSC1 的表达异常增高可能与头颈部鳞状细胞癌的发生显著相关。



a: 正常; b: 低分化; c: 中分化; d: 高分化。

图 1 GEO 数据库获取的头颈部鳞状细胞癌相关芯片数据分析 DSC1 表达在头颈部鳞状细胞癌与正常组织的表达差异

2.2 DSC1 在不同分化头颈部鳞状细胞癌中的表达

本研究分析了 GEO 数据库获取的数据 GSE27020 中不同中肿瘤分化程度中 DSC1 表达差异。经过 excel 表数据导入,整理, χ^2 检验分析(图 2)。结果表明在不同分化的头颈部鳞状细胞癌中 DSC1 表达差异明显($P < 0.05$),在分化越差的肿瘤中表达越高,分化好的肿瘤中表达明显较低,提示 DSC1 可能与头颈部鳞状细胞癌的分化程度显著相关。

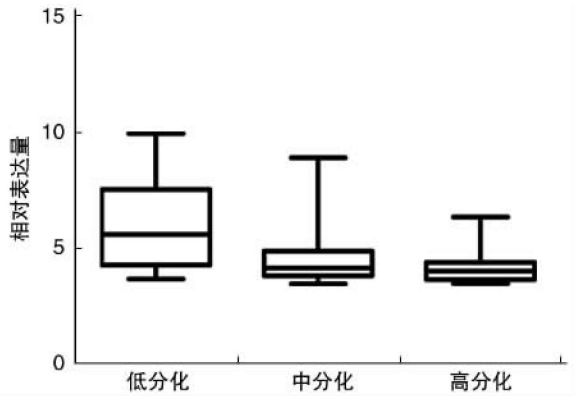


图 2 GEO 数据库获取的头颈部鳞状细胞癌相关芯片数据分析 DSC1 表达在不同分化程度头颈部鳞状细胞癌的表达差异

2.3 DSC1 在头颈部鳞状细胞癌表达较高的患者预后较差

本研究分析了 GEO 数据库获取的数据 GSE27020 中 DSC1 表达差异的患者的预后。经过 excel 表数据导入,整理,ROC 曲线分析(图 3)。结果表明 DSC1 的表达差异可能与头颈部鳞状细胞癌患者的预后显著相关($P < 0.01$),DSC1 表达越高的患者,其预后相对较差,而 DSC1 表达越低的患者,具有相对较好的预后。

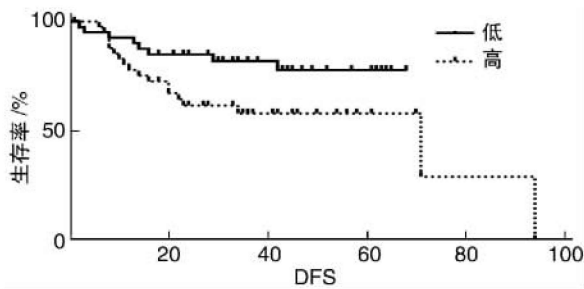


图 3 GEO 数据库获取的头颈部鳞状细胞癌相关芯片数据分析 DSC1 表达与头颈部鳞状细胞癌患者预后的相关性

2.4 组织芯片中 DSC1 表达分析

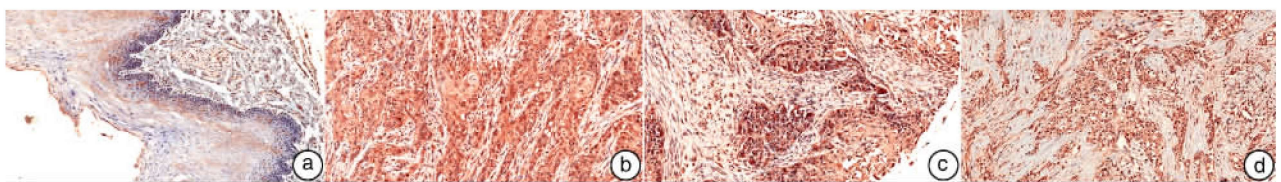
本研究中采用免疫组织化学的方法检测了头颈部鳞状细胞癌组织芯片中 DSC1 的表达(图 4)。根据计算出的 CES 值进行统计学分析,结果提示在头颈部鳞状细胞癌组织中 DSC1 的表达显著增高。且在不同分化的肿瘤组织中,分化差的肿瘤组织中 DSC1 的表达显著增高(图 5)。

3 讨论

桥粒芯胶蛋白-1 是桥粒的亚单位,在细胞连接中发挥着关键的作用^[1],针对桥粒产生抗体而结合到表皮细胞上导致棘刺松解是天疱疮等皮肤病的主要发病原因^[8-9]。桥粒芯胶蛋白 1~3 作为钙黏素家族成员,是跨膜糖蛋白,其编码基因位于 18 号染色体长臂,也被报道了在肿瘤中异常表达^[7-10]。而关于桥粒芯胶蛋白-1 与鳞状细胞癌相关的报道较少^[3],本研究通过对 GEO 数据库头颈部鳞状细胞癌相关基因芯片数据进行分析,发现芯胶蛋白-1 可能在头颈部鳞状细胞癌的发生及预后中有重要的作用。

本实验通过对 NCBI 数据库 GEO 获取的基因芯片数据进行统计学分析,发现在头颈部鳞状细胞癌肿瘤组织中 DSC1 的表达较正常组织中的表达显著增高,表明 DSC1 的表达异常增高可能与头颈部鳞状细胞癌的发生显著相关;在不同分化的头颈部鳞状细胞癌中 DSC1 表达差异明显,在分化越差的肿瘤中表达越高,分化好的肿瘤中表达明显较低,提示 DSC1 可能与头颈部鳞状细胞癌的分化程度显著相关;DSC1 的表达差异可能与头颈部鳞状细胞癌患者的预后显著相关,DSC1 表达越高的患者,其预后相对较差,而 DSC1 表达越低的患者,具有相对较好的预后。并且采用头颈部鳞状细胞癌组织芯片予以验证,可见在头颈部鳞状细胞癌组织中 DSC1 的表达显著增高。且在不同分化的肿瘤组织中,分化差的肿瘤组织中 DSC1 的表达显著增高。

芯胶蛋白-1 的表达主要位于复层鳞状上皮,其异常表达可能促进恶性转化。有学者发现芯胶蛋白-1 在口腔癌发生中的潜在促进作用。Mattila 等^[11]探讨了口腔黏膜慢性疾病口腔萎缩性扁平苔藓易于发生恶性转化的标志物。研究中发现,对 70 例患者的口腔扁平苔藓组织的 DSC1 进行免疫组织化学检测,结果提示 DSC1 是口腔扁平苔藓恶性分化发展为口腔癌的重要的标记。本研究中对



a: 正常; b: 低分化; c: 中分化; d: 高分化。

图 4 头颈部鳞状细胞癌组织芯片分析 DSC1 表达在头颈部鳞状细胞癌与正常组织中的表达差异

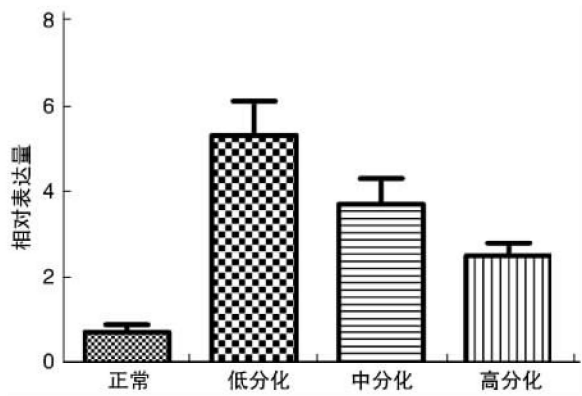


图 5 不同分化组织中 DSCI 的表达

GEO 获取的基因芯片的数据分析提示分化越低的头颈部鳞状细胞癌其 DSC1 的表达越高,组织芯片中对不同分化程度的头颈部鳞状细胞癌中 DSC1 的表达检测结果同样类似,提示 DSC1 与鳞状细胞癌的恶性转化进展等明显相关,其可能作为恶性转化的标志,提示肿瘤的进展。

在不同组织学类型的肿瘤中,芯胶蛋白-1 表达差异较大。Knösel 等^[10]检测了结肠癌组织中桥粒芯胶蛋白 1~3 的表达,以及几种结肠癌细胞系中桥粒芯胶蛋白 1~3 的 RNA 的表达。结果提示在结肠癌中癌组织的分级越高,其表达显著降低。结肠癌细胞中 DSC1 的表达下调可能与 DNA 甲基化有关。其研究结果与本研究中的结果差异较大,分析可能的原因为结肠癌多为腺癌,其生物学行为与鳞状细胞癌差异较大。在一些鳞状细胞癌相关的 DSC1 的研究中,DSC1 被发现为高表达。Myklebust 等^[12]对 53 例放疗或者联合化疗后的肛门鳞状细胞癌患者的研究中发现,DSC1 及 DSG1 高表达可能是影响肛门鳞状细胞癌预后的重要因素。此外,尚未见 DSC1 对肿瘤预后影响相关报道,而本研究中研究表明 DSC1 与头颈部鳞状细胞癌患者的预后显著相关,提示 DSC1 可能作为头颈部鳞状细胞癌患者预后判断的指标。

芯胶蛋白家族在肿瘤中的异常表达已有较多报道^[6-7,13],其家族中成员 DSC2,DSC3 促进肿瘤的机制也有部分报道^[14-15]。已报道的机制主要包括 DSC3 启动子甲基化,P53 与 DSC3 启动子区结合后引起组蛋白乙酰化,此外,DSC2 可调控 β -catenin,而改变肿瘤细胞的增殖与迁移等。而 DSC1 与肿瘤相关的机制报道较少。本研究通过大数据分析以及组织芯片验证,发现了 DSC1 在头颈部鳞状细胞癌中的重要作用,为下一步进行 DSC1 与头颈部鳞状细胞癌发生发展相关的机制研究提供了基础,也为头颈部鳞状细胞癌的靶向研究提供了新的方向。

参考文献

[1] GETSIOS S,AMARGO E V,DUSEK R L,et al. Co-ordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin

1 regulates intercellular adhesion[J]. Differentiation, 2004,72:419-433.

[2] STAHLEY S N,KOWALCZYK A P. Desmosomes in acquired disease[J]. Cell Tissue Res,2015,360:439-456.

[3] 李荣雪,王青钊. 桥粒胶糖蛋白在肿瘤中的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(18):1572-1574.

[4] XIN Z,YAMAGUCHI A,SAKAMOTO K. Aberrant expression and altered cellular localization of desmosomal and hemidesmosomal proteins are associated with aggressive clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma[J]. Virchows Arch, 2014, 465:35-47.

[5] AIZAWA S,OCHIAI T,ARA T, et al. Heterogeneous and abnormal localization of desmosomal proteins in oral intraepithelial neoplasms[J]. J Oral Sci, 2014, 56:209-214.

[6] KHAN K,HARDY R,HAQ A, et al. Desmocollin switching in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2006, 95:1367-1370.

[7] SCHULE S,NEUHAUSER C,RAUCHFUSS F, et al. The influence of desmocollin 1-3 expression on prognosis after curative resection of colorectal liver metastases[J]. Int J Colorectal Dis, 2014,29:9-14.

[8] ON H R,HASHIMOTO T,KIM S C. Pemphigus herpeticiformis with IgG autoantibodies to desmoglein 1 and desmocollin 1[J]. Br J Dermatol, 2015, 172: 1144-1146.

[9] BIZIKOVA P,DEAN G A,HASHIMOTO T, et al. Cloning and establishment of canine desmocollin-1 as a major autoantigen in canine pemphigus foliaceus[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012,149:197-207.

[10] KNOSEL T,CHEN Y,HOTOVY S, et al. Loss of desmocollin 1-3 and homeobox genes PITX1 and CDX2 are associated with tumor progression and survival in colorectal carcinoma[J]. Int J Colorectal Dis, 2012, 27:1391-1399.

[11] MATTILA R,ALANEN K,SYRJANEN S. Desmocollin expression in oral atrophic lichen planus correlates with clinical behavior and DNA content[J]. J Cutan Pathol, 2008,35:832-838.

[12] MYKLEBUST M P,FLUGE O,IMMERVOL H T, et al. Expression of DSG1 and DSC1 are prognostic markers in anal carcinoma patients[J]. British J Cancer, 2012,106:756-762.

[13] NARAYANA N,GIST J,SMITH T, et al. Desmosomal component expression in normal, dysplastic, and oral squamous cell carcinoma[J]. Dermatol Res Pract,2010,2010:649731-649731.

[14] FANG W K,LIAO L D,LI L Y, et al. Down-regulated desmocollin-2 promotes cell aggressiveness through redistributing adherens junctions and activating beta-catenin signalling in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. J Pathol,2013,231:257-270.

[15] OSHIRO M M, KIM C J,WOZNIAK R J, et al. Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer [J]. Breast Cancer Research, 2005, 7: R669-R680.