

Fra-1 基因在喉鳞状细胞癌中的表达研究

张云龙¹ 段云静² 宋晓飞³ 赵瑞力⁴

[摘要] 目的:探讨喉鳞状细胞癌组织中 Fra-1 基因的表达情况。方法:应用免疫组织化学 SP 法及 RT-PCR 检测 Fra-1 在 47 例喉鳞状细胞癌组织和 21 例癌旁正常黏膜中的表达情况,进一步分析此基因在癌组织中表达与各临床病理参数的关系。结果:Fra-1 基因在喉鳞状细胞癌组织中蛋白水平阳性表达率均高于癌旁正常黏膜组织($P < 0.05$),Fra-1 基因在喉鳞状细胞癌组织中蛋白水平表达与临床分期、淋巴结转移、吸烟相关,与病理分级、年龄、解剖分区均不相关;Fra-1 基因在喉鳞状细胞癌组织中 mRNA 水平表达量均高于癌旁正常黏膜组织($P < 0.01$),Fra-1 基因在 mRNA 水平的表达与病理分级、临床分期、淋巴结转移、吸烟相关,与年龄、解剖分区无关。结论:喉鳞状细胞癌组织中 Fra-1 基因过度表达,此基因可能在喉癌发生、发展过程中发挥作用。

[关键词] 喉肿瘤;癌;鳞状细胞;免疫组织化学;逆转录-多聚酶链反应;Fra-1

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.12.005

[中图分类号] R739.65 [文献标志码] A

Expression of Fra-1 in laryngeal squamous cell carcinoma

ZHANG Yunlong¹ DUAN Yunjing² SONG Xiaofei³ ZHAO Ruili⁴

(¹The Third Department of Intensive Care Unit, the First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, 050011, China;²Department of Otolaryngology, the First Hospital of Shijiazhuang;³Department of Otolaryngology, Hebei General Hospital;⁴Department of Otolaryngology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University)

Corresponding author:ZHANG Yunlong, E-mail:290318841@qq.com

Abstract Objective: To investigate expressions of Fra-1 in laryngeal squamous cell carcinoma. **Method:** Using immunohistochemical method and RT-PCR detecting 47 cases of laryngeal squamous carcinoma tissues and 21 cases of para-carcinoma tissues with the level of protein and mRNA, we analysed the relationship of the genes expression and clinical parameters. **Result:** The level of protein positive expression of Fra-1 genes in laryngeal squamous cancer tissue were higher than adjacent tissues($P < 0.05$). The expression of Fra-1 protein in laryngeal squamous cancer tissue were significant correlation with the clinical stages, lymph metastasis, smoking. They had no significant correlation with the pathological grade, age, anatomic zonation. The mRNA level expression of Fra-1 genes in laryngeal squamous cancer tissue were higher than adjacent tissues($P < 0.01$). The expression of Fra-1 gene in the mRNA level was correlated with pathologic stage, clinical stage, lymph metastasis, and smoking, but wasn't correlated with age and anatomic zonation. **Conclusion:** In laryngeal squamous cell carcinoma, the expression of Fra-1 gene are overexpressed. Fra-1 may play a role in the occurrence and development of the laryngeal cancer.

Key words laryngeal neoplasms; carcinoma, squamous cell; immunohistochemistry; RT-PCR; Fra-1

喉癌是上呼吸道常见的恶性肿瘤之一,以喉鳞状细胞癌最为多见。近年来,随着手术、放化疗、生物治疗等技术的进步,喉癌预后较前大为改善,但其远期生存率并未得到明显提高^[1]。随着分子生物学研究进展,从基因水平寻找喉鳞状细胞癌靶向标志物进行针对性治疗有望降低患者病死率。Fra-1(Fos related antigen-1)为癌基因,在全身多个系统肿瘤中表达增多^[2-4],但此基因在喉癌中的表达尚未见明确报道。本实验采用免疫组织化学、逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)方法检测 Fra-1 基因在喉鳞状细胞癌与癌旁组织中的表达,分析其

意义,在癌组织表达情况下探讨其与各临床参数的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我院耳鼻咽喉头颈外科 2012—2015 年收治的有完整病历资料的住院患者手术切除标本,其中喉鳞状细胞癌 47 例,癌旁正常组织 21 例。所取标本患者术前均未接受放、化疗,且均经苏木精-伊红染色证实癌组织为鳞状细胞癌,癌旁组织为炎症或正常黏膜。标本一部分保存用于液氮备提取 RNA,另一部分置 10% 甲醛固定行免疫组织化学。喉癌病例分组见表 1,其中病理分级 G1、G2 为高中分化,G3 为低分化;临床分期采用 UICC 第 7 版 TNM 分期;N+ 为有淋巴结转移,N0 为无淋巴结转移(均依据术后病理而定);吸烟量 ≥ 400 (年 \times

¹石家庄市第一医院重症医学三科(石家庄,050011)

²石家庄市第一医院耳鼻喉科

³河北省人民医院耳鼻喉科

⁴河北医科大学第四医院耳鼻喉科

通信作者:张云龙, E-mail:290318841@qq.com

支/d)者为吸烟阳性患者,<400(年×支/d)者为吸烟阴性患者;解剖分区按 UICC 标准分为声门上区和声门区。

表 1 喉鳞状细胞癌中 Fra-1 蛋白和 mRNA 表达与各临床参数之间的关系

临床参数	例数	Fra-1		
		蛋白		mRNA
		例	%	($\bar{x} \pm s$)
病理分级				
G1+G2	37	16	43.2	0.59±0.19 ¹⁾
G3	10	7	70.0	0.74±0.16
临床分期				
I+II	18	3	16.7 ²⁾	0.55±0.19 ¹⁾
III+IV	29	20	69.0	0.67±0.19
淋巴结转移				
N+	26	17	65.4 ¹⁾	0.68±0.17 ¹⁾
N0	21	6	28.6	0.56±0.21
吸烟				
阳性	38	22	57.9 ¹⁾	0.69±0.13 ²⁾
阴性	9	1	11.1	0.33±0.12
年龄/岁				
<60	15	5	33.3	0.55±0.18
≥60	32	18	56.3	0.67±0.19
解剖分区				
声门上区	21	11	52.4	0.64±0.18
声门区	26	12	46.2	0.62±0.21

组内比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

1.2 试剂

1.2.1 免疫组织化学主要试剂 Fra-1 鼠抗人单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Sc-28310)。二抗试剂盒 (SP-9002), DAB 显色液 (ZLI-9032) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 RT-PCR 主要试剂 组织总 RNA 提取试剂 TRIzol (SBS Corporation), 总 RNA 提取试剂 (total RNA isolation reagent, Promega Corporation), 逆转录 PCR 试剂盒 M-MLV 逆转录试剂盒 (Promega Corporation), DNA Marker I II 北京 Solarbio 科学技术有限公司, 绿色体系 (Promega Corporation), PCR 引物 (上海生工生物工程有限公司), Fra-1 上游引物 (5'→3') GCCTCTGACCTACCCTCAGT, 下游引物 (5'→3') AGTTTGT-CAGTCTCCGCCTG。GAPDH 作为内参照, 其上游引物为 (5'→3') AGGTGAAGGTCGGAGT-CAACG, 下游引物为 (5'→3') AGGGGTCATT-GATGGCAACA。

1.3 方法

采用 SP 法行免疫组织化学染色, 步骤: 取石蜡切片常规脱蜡、水化、纯化水冲洗; Fra-1 置 ED-

TA 缓冲液中压力锅抗原修复; 继续纯化水冲洗、滴加过氧化氢、孵育、PBS 冲洗; 继而滴加一抗、冲洗、滴加二抗、孵育、再冲洗、滴加 DAB 显色剂、蒸馏水终止; 再经复染、分化、返蓝、梯度脱水、二甲苯透明、树胶封片、观察。PBS 代替一抗作为空白对照。

RT-PCR 方法检测喉癌及癌旁组织中 Fra-1 基因 mRNA 表达, 按 Trizol 试剂说明书提取标本组织中的 RNA, 并参照逆转录试剂盒说明书的比例加样, 将 RNA 逆转录成 cDNA。反应条件为: 95℃ 预变性 8 min 后, 95℃ 45 s, (Fra-1 为 60℃) 30 s, 72℃ 25 s, 共 35 个循环后, 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, Fra-1 产物为 222 bp, GAPDH 为 104 bp。

1.4 结果判定

免疫组织化学结果采用半定量评分方法^[3]: 将染色强度 (intensity, I) 分为 4 级, 无染色 0 级, 弱染色 (淡黄色) 1 级, 中等染色 (棕黄色) 2 级, 强染色 (棕褐色) 3 级; 阳性细胞百分率 (percentage, P) 分为 0~3 级, 阳性细胞 <5% 为 0 级, 5%~<25% 为 1 级, 25%~50% 为 2 级, >50% 为 3 级。组织学评分 (histology score, H) = I × P。如在同一病变中存在多个不同评分的视野, 则取最大值和最小值的平均值作为免疫组织化学评分。按其评分分为低表达 (-, 0~3 分), 中度表达 (+, 4~6 分) 和高表达 (++, 7~9 分)。低表达按阴性计, 中、高表达按阳性计。

RT-PCR 结果采用 Gel work-2ID 软件, 对电泳图像中 Fra-1 的表达进行半定量研究。以 Fra-1 条带与 GAPDH 条带的光密度值的比值作为参数, 该值表示 Fra-1 基因的相对表达强度。

1.5 统计学方法

所有数据经 Excel 整理, 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。免疫组织化学结果采用 χ^2 检验, RT-PCR 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较采用 t 检验, 相关性分析用直线相关分析。采用双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

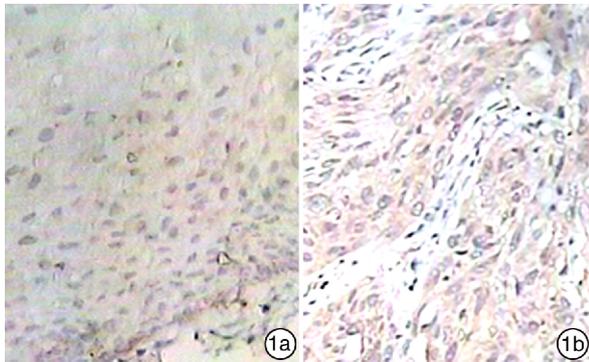
2 结果

2.1 免疫组织化学结果

Fra-1 蛋白表达位于细胞质、细胞核, 以细胞质为主, 呈棕褐色 (图 1)。癌组织中阳性表达率为 48.9% (23/47), 癌旁黏膜中为 19.0% (4/21), 经统计学分析, 两者比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.416, P < 0.05$)。喉鳞状细胞癌组织 Fra-1 基因蛋白水平表达与各临床参数关系 (表 1) 示, Fra-1 基因蛋白表达与临床分期、淋巴结转移和吸烟有关 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 而与病理分级、年龄、解剖分区无关 ($P > 0.05$)。

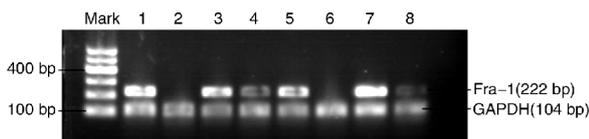
2.2 RT-PCR 检测结果

Fra-1 mRNA 在喉鳞状细胞癌和癌旁组织中均表达(图 2),但强度不一,表达量分别为 0.63 ± 0.19 和 0.13 ± 0.09 ,两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。喉鳞状细胞癌中 Fra-1 基因 mRNA 水平表达与各临床参数的关系(表 1)示,Fra-1 基因 mRNA 表达与病理分级、临床分期、淋巴结转移和吸烟有关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而与年龄和解剖分区无关 ($P > 0.05$)。



1a: Fra-1 基因蛋白在癌旁正常组织中的阴性表达; 1b: Fra-1 基因蛋白在喉鳞状细胞癌组织中的阳性表达。

图 1 免疫组织化学方法检测喉鳞状细胞癌组织及正常喉黏膜 Fra-1 蛋白的表达(免疫组织化学 ×200)



1, 3, 5, 7 为喉鳞状细胞癌组织;2, 4, 6, 8 为癌旁正常组织。

图 2 Fra-1 mRNA 在喉鳞状细胞癌组织及正常喉黏膜中的表达

3 讨论

Fra-1 属原癌基因,为 AP-1(activator protein 1)家族中 Fos 亚家族中的成员之一^[5]。有研究显示,Fra-1 在肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、头颈肿瘤中高表达并通过多种途径参与肿瘤的恶性进展^[6]。Fra-1 可活化多个信号转导通路而发挥多种重要生物学效应,例如促进细胞癌变、增殖分化增强、凋亡受抑制等生物学进程,尤其在肿瘤细胞外基质降解、癌细胞迁移、粘附、浸润及促进新生血管生成等多种肿瘤恶性行为中发生作用^[6]。

本实验研究采用免疫组织化学及 RT-PCR 法,检测 47 例喉鳞状细胞癌及 21 例癌旁正常黏膜中 Fra-1 的表达,结果显示喉癌组织中 Fra-1 蛋白和 mRNA 表达水平均明显高于癌旁正常组织,提

示 Fra-1 表达与喉鳞状细胞癌相关。

本实验研究显示 Fra-1 基因蛋白及 mRNA 水平表达情况:有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组,临床分期 III、IV 期高于 I、II 期,吸烟阳性组高于阴性组,组内对比差异有统计学意义;病理分级中仅 mRNA 水平表达量在低分化组明显高于高中分化组,差异有统计学意义。这些结果表明 Fra-1 与喉癌的发生、转移有关,可能在促进细胞恶性转化中发挥作用。Hanson 等^[7]在对胰腺导管癌细胞的研究中发现,Fra-1 通过调控附膜蛋白(MUC1)信号通路介导胰腺肿瘤的生长,此通路激活后可刺激细胞形态学改变和侵袭、转移增强。此结论与本研究结果(在较晚临床分期和淋巴结转移阳性患者中 Fra-1 表达增多)一致。另有研究发现,膀胱癌侵袭细胞中 80% 表现为 Fra-1 高表达,Fra-1 可通过上调受体酪氨酸激酶增加膀胱癌细胞的侵袭能力^[8],此结论也与我们的研究结果一致。Wu 等^[9]研究 Fra-1 在前列腺癌细胞中的作用时,选取前列腺癌细胞与正常前列腺细胞做成组对照的免疫组织化学微阵列实验,发现癌组织中 Fra-1 蛋白表达明显高于对照组。而我们的免疫组织化学实验结果也显示喉鳞状细胞癌细胞中 Fra-1 蛋白表达明显多于原位癌及正常细胞,这一结论也和上述报道相一致。烟草燃烧释放烟雾中含尼古丁、烟焦油、苯并芘、放射性物质、刺激性化合物、有害金属等,吸入这些物质可导致细胞功能障碍,刺激组织氧化应激水平,诱发癌变。Zhang 等^[10]将支气管上皮细胞分组,分别暴露于吸烟刺激及对照的过滤空气环境,后行 Northern 和 Western blot 实验分析,结果表明暴露于吸烟环境组的 Fra-1 mRNA 水平和蛋白水平均明显高于对照组。这与本研究结果(吸烟阳性组在蛋白和 mRNA 水平表达均显著高于吸烟阴性组)一致。

Fra-1 可通过多种机制促进肿瘤发展。Belguise 等^[11]在研究乳腺癌 T217 和 T227 两个细胞系时证明,PKC 通路激活诱导 Fra-1 磷酸化可刺激 MMP1 和 IL-6 表达增加。MMP1 既可改变细胞微环境有利于肿瘤形成,又可通过细胞粘附分子(如 CD44 和整合素)来调节细胞和基质的相互作用,促进细胞转移,还可以在肿瘤血管新生过程中发挥作用,促进肿瘤生长转移;而 IL-6 的作用为促进细胞分化、抑制细胞凋亡。Zhong 等^[12]对 H460 肺癌细胞株进行培养并行 Western blot 检测发现,Fra-1 增加可导致细胞内活性氧和 Ca^{2+} 降低,进而阻止细胞凋亡。Hanson 等^[7]对胰腺癌 ERK 通路进行研究得出,MUC1 介导 Fra-1 激活可调节结缔组织生长因子(CTGF)和 MMP1 表达增多。CTGF 与细胞外基质相互作用,可调节细胞间的粘附迁移、促进有丝分裂的发生、细胞活化和参与血管

生成,从而发挥促肿瘤作用。

Belguise 等^[13]在研究 Fra-1 表达增多的乳腺癌细胞系时,提示 Fra-1 表达促进肿瘤恶性发展与血管内皮细胞生长因子(VEGF)、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP1)有关。VEGF 促进肿瘤机制研究较多的为:①增加血管通透性,延缓水肿液清除,使正常组织抗血管生成向促进血管生成转化;②诱导多种内皮细胞基因表达,促进新生血管生长;③抑制肿瘤宿主的免疫系统,促进肿瘤生长、发展;④改变细胞外基质,促进肿瘤浸润和迁移。Jackson 等^[14]报道 TIMP1 参与恶性肿瘤的侵袭和转移,为恶性肿瘤侵袭和转移潜能的重要调节蛋白。

综上所述,喉鳞状细胞癌组织中可检测 Fra-1 高表达,过表达 Fra-1 显著增加了喉鳞状细胞癌细胞的侵袭、转移能力,其途径可通过下游分子 MMP1、IL-6、CTGF、VEGF 和 TIMP1 等的表达实现。提示 Fra-1 过表达在喉癌的发展及转移过程中发挥重要作用。对 Fra-1 基因的深入研究将为喉癌发病机制提供重要的理论依据,为进一步开展喉癌的生物靶向治疗及预测患者预后提供参考。

参考文献

- [1] SIEGEL R, DESANTIS C, VIRGO K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62: 220-241.
- [2] D'ANGELO D, MUSSNICH P, ARRA C, et al. Critical role of HMGA proteins in cancer cell chemoresistance [J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95: 353-360.
- [3] USUI A, HOSHINO I, AKUTSU Y, et al. The molecular role of Fra-1 and its prognostic significance in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer, 2012, 118: 3387-3396.
- [4] DESMET C J, GALLENNE T, PRIEUR A, et al. Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110: 5139-5144.
- [5] 周长春, 刘芝华, 齐军. AP-1 和肿瘤的关系研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(1): 1-5.
- [6] YOUNG M R, COLBURN N H. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention [J]. Gene, 2006, 379: 1-11.
- [7] HANSON R L, BROWN R B, STEELE M M, et al. Identification of Fra-1 as a novel player in pancreatic cancer in cooperation with a MUC1; ERK signaling axis [J]. Oncotarget, 2016, 7: 39996-40011.
- [8] SAYAN A E, STANFORD R, VICKERY R, et al. Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL [J]. Oncogene, 2012, 31: 1493-1503.
- [9] WU J, JI A, WANG X, et al. MicroRNA-195-5p, a new regulator of Fra-1, suppresses the migration and invasion of prostate cancer cells [J]. J Transl Med, 2015, 13: 289-289.
- [10] ZHANG Q, ADISESHAIHAH P, KALVAKOLANU D V, et al. A Phosphatidylinositol 3-kinase-regulated Akt-independent signaling promotes cigarette smoke-induced Fra-1 expression [J]. J Biol Chem, 2006, 281: 10174-10181.
- [11] BELGUISE K, CHERRADI S, SARR A, et al. PKC θ -induced phosphorylations control the ability of Fra-1 to stimulate gene expression and cancer cell migration [J]. Cancer Lett, 2017, 385: 97-107.
- [12] ZHONG G, CHEN X, FANG X, et al. Fra-1 is up-regulated in lung cancer tissues and inhibits the apoptosis of lung cancer cell by the P53 signaling pathway [J]. Oncology Rep, 2016, 35: 447-453.
- [13] BELGUISE K, KERSUAL N, GALTIER F, et al. Fra-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells [J]. Oncogene, 2005, 24: 1434-1444.
- [14] JACKSON H W, DEFAMIE V, WATERHOUSE P, et al. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17: 38-53.

(收稿日期: 2017-03-14)