

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.30.010

文章编号: 1005-8982(2017)30-0056-04

口腔黏膜白斑和口腔鳞癌中 *Bcl-2*、*CDK2AP1* 的基因表达和临床意义

张国富¹, 高建明²

(1. 湖北三峡职业技术学院附属医院 口腔科, 湖北 宜昌 443002;

2. 三峡大学医学院生理与病理生理学系, 湖北 宜昌 443002)

摘要:目的 研究在口腔黏膜白斑和口腔鳞癌组织中 *Bcl-2* 和 *CDK2AP1* 的表达情况及临床意义。**方法** 运用免疫组织化学和实时荧光定量 PCR 技术对组织中 *Bcl-2*、*CDK2AP1* 表达进行检测。**结果** 在口腔正常黏膜组织、口腔黏膜白斑组织和口腔鳞癌组织中 *Bcl-2* 蛋白细胞阳性率依次为 $(2.72 \pm 1.45)\%$ 、 $(19.29 \pm 8.18)\%$ 和 $(57.20 \pm 19.37)\%$; *CDK2AP1* 蛋白细胞阳性率依次为 $(62.68 \pm 11.07)\%$ 、 $(25.68 \pm 8.17)\%$ 和 $(7.87 \pm 2.18)\%$ 。*Bcl-2* 和 *CDK2AP1* mRNA 表达水平与蛋白表达水平一致。各组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 随着口腔病变恶性程度增高, 在口腔正常黏膜、口腔黏膜白斑和口腔鳞癌中 *Bcl-2* 表达水平上升, 而 *CDK2AP1* 表达水平降低, 这 2 个指标可能与口腔肿瘤的发生、发展及预后有关。

关键词: *Bcl-2*; *CDK2AP1*; 口腔黏膜白斑; 口腔鳞癌

中图分类号: R739.8

文献标识码: A

Expression and clinical value of *Bcl-2* and *CDK2AP1* in oral leukoplakia and oral squamous carcinoma tissue

Guo-fu Zhang¹, Jian-ming Gao²

(1. Department of Stomatology, the Affiliated Hospital of Hubei Three Gorges Professional Technology College, Yichang, Hubei 443002, China; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, Three Gorges University School of Medicine, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: Objective To investigate expression levels of *Bcl-2* and *CDK2AP1* in oral leukoplakia and oral squamous carcinoma tissue and its potential clinical value. **Methods** Patient samples of oral leukoplakia, oral squamous carcinoma and normal tissue were collected in this study. Immunohistochemistry and the fluorescence quantitative PCR were utilized to identify expression of *Bcl-2* and *CDK2AP1*. **Results** Immunohistochemistry data suggested that ratio of *Bcl-2* positive cells in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma tissue were increased significantly when compared with normal oral mucosa [$(19.29 \pm 8.18)\%$ vs $(2.72 \pm 1.45)\%$ ($P < 0.05$), $(57.20 \pm 19.37)\%$ vs $(2.72 \pm 1.45)\%$ ($P < 0.05$), respectively]. However, ratio of *CDK2AP1* positive cells in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma tissue were decreased dramatically when compared with normal oral mucosa [$(25.68 \pm 8.17)\%$ vs $(62.68 \pm 11.07)\%$ ($P < 0.05$), $(7.87 \pm 2.18)\%$ vs $(62.68 \pm 11.07)\%$ ($P < 0.05$), respectively]. Immunohistochemistry data were well echoed by PCR results and statistical significance among each groups were obtained. **Conclusion** Expression levels of *Bcl-2* increase while *CDK2AP1* decreases along with the increase of malignancy from normal oral mucosa, oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma tissue, which may indicates that *Bcl-2* and *CDK2AP1* may be involved in development as well as prognosis of oral tumors.

Keywords: *Bcl-2*; *CDK2AP1*; oral leukoplakia; oral cancer

收稿日期: 2017-04-14

[通信作者] 高建明, 补充 E-mail: jianminggao@163.com; Tel: 0717-6397466

近年来,随着生活的环境、习惯及饮食等结构的变化,口腔癌前病变及口腔鳞癌呈现年轻化的趋势,发病率有明显的上升。口腔黏膜白斑是最常见的口腔角化异常,往往伴有上皮异常增生,属于癌前病变,研究表明,4%~6%^[1]的口腔黏膜白斑恶变为口腔鳞状细胞癌。口腔鳞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,占全身恶性肿瘤的2%~4%,其5年生存率仅30%~40%^[2-3],严重威胁人们的生活和健康。口腔颌面部肿瘤病因复杂,涉及多种癌基因和抗癌基因的功能改变和相互作用以及环境和饮食习惯,本研究通过对口腔黏膜白斑恶变为口腔鳞状细胞癌中 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和细胞周期蛋白依赖激酶 2- 相关蛋白 1 (cyclin-dependent kinase 2 associated protein 1, CDK2AP1) 表达的检测,观察其在口腔白斑癌变过程中的变化,可为口腔鳞癌的早期诊断、治疗以及预后提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料 选取 2015 年 3~10 月于湖北三峡职业技术学院附属医院口腔科收治的患者,口腔正常黏膜组织 12 例;口腔黏膜白斑 11 例,口腔鳞癌 8 例,标本来自宜昌市中心医院和一医院口腔科。所有患者均有完整的随访资料,术后均由病理科确诊。

1.1.2 主要试剂 鼠抗人抗体 Bcl-2 和鼠抗人抗体 CDK2AP1 (购自上海博英生物有限公司), 二步法检测试剂盒、即用型 SABC 试剂盒和酶底物 DAB 显色剂 (北京中杉金桥生物技术公司提供), Oligod T (购自上海生工生物有限公司), 逆转录酶 Revert Aid™ M-MuLV (购自美国 Fermentas 公司), SYBR Premix Ex Taq™ (购自 TaKaRa 公司), Bcl-2、CDK2AP1 和 β -actin 基因的引物 (由上海铂尚生物合成)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学(免疫组化)结果分析 Bcl-2 蛋白主要表达在细胞浆内,棕黄色颗粒;CDK2AP1 蛋白主要表达在细胞浆内,呈棕黄色颗粒。在高倍镜下进行结果评估方法参照 CAMPO 等^[4]标准综合计分。基本不着色为 0 分,着色弱为 1 分,着色中度的为 2 分,着色强的为 3 分;阳性细胞数所占比例为 4 个等级:0~5%为 0 分,6%~25%为 1 分,25%~50%为 2 分,50%~为 3 分。最后以阳性细胞的百分比和染色强度计分之之和所得的总分进行结果判定:0 分为阴性(-);1、2 分为弱阳性(+);3、4 分为中等阳

性(++);5 分或 6 分以上为强阳性(+++)。

附表 Bcl-2 mRNA、CDK2AP1 mRNA 的引物序列

基因	引物
Bcl-2	正向:5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3'
	反向:5'-CGGTTCAGGTACTIONCAGTCATCC-3'
CDK2AP1	正向:5'-GCTGCGAAGTGGAACCATC-3'
	反向:5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'
β -actin	正向:5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
	反向:5'-CCAGAGCGGTACAGGGATAG-3'

1.2.2 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分析 提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA 后, 用 Taq Man Universal PCR Master Mix 和 Taq Man microRNA Assay Kit 检测样本中 Bcl-2 mRNA、CDK2AP1 mRNA 含量。采用的特异性引物序列为见附表。

反应条件为 95℃ 5 min 变性;95℃ 30 s, 60℃ 40 s, 40 个循环, 反应结束后得到各个标本和内参 β -actin 的基本循环数 (Ct 值)。根据公式计算目的基因相对含量: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 即 Bcl-2 mRNA、CDK2AP1 mRNA 的相对含量, 实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较做秩和检验 (H 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bcl-2 蛋白表达情况

Bcl-2 蛋白在人正常口腔黏膜组织中阳性细胞分散在上皮基层; 在口腔黏膜白斑组织中随着上皮异常增生程度的增加, 其阳性细胞也呈进一步的增加, 分布范围从上皮基层向表层扩散, 甚至可达上皮全层; 在口腔鳞癌组织中, Bcl-2 蛋白分布于浸润性鳞癌的癌性团块、条索和浸润癌细胞之中。见图 1。

在人正常口腔黏膜上皮细胞中 Bcl-2 蛋白微量或少部分阳性表达, 其平均阳性率为 $(2.72 \pm 1.45)\%$, 在口腔白斑上皮细胞平均阳性率为 $(19.29 \pm 8.18)\%$ 。而在口腔鳞癌细胞组织中 Bcl-2 蛋白大部分组织呈阳性表达, 细胞平均阳性率为 $(57.20 \pm 19.37)\%$ 。3 组 Bcl-2 蛋白表达差异有统计学意义 ($H = 23.504$, $P = 0.000$), 且经两两比较, 任意两组间 Bcl-2 蛋白细胞阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 CDK2AP1 蛋白表达情况

CDK2AP1 蛋白在人正常口腔黏膜组织中阳性细胞分散在上皮基底层, 在口腔黏膜白斑组织中随着上皮异常增生程度的增加而减少, 在口腔鳞癌组织中, CDK2AP1 蛋白分布于浸润性鳞癌的癌性团块、条索和浸润癌细胞之中, 癌组织中癌巢周围的阳性表达强于癌巢中央, 阳性细胞数进一步减少。见图 2。

在人正常口腔黏膜上皮中 CDK2AP1 蛋白大部分组织呈阳性表达, 其细胞平均阳性率为(62.68 ± 11.07)%, 在口腔白斑上皮细胞平均阳性率为(25.68 ± 8.17)%。而在口腔鳞癌细胞组织中 CDK2AP1 蛋白微量或少部分阳性表达, 细胞平均阳性率为(7.87 ± 2.18)%。经统计学分析, 在口腔正常黏膜、口腔黏膜白斑、口腔鳞状细胞癌中 CDK2AP1 蛋白表达差异有统计学意义($H=25.172, P=0.000$), 且经两两比较, 任意两组间 CDK2AP1 蛋白表达差异有统

计学意义($P<0.05$)。

2.3 Bcl-2 mRNA 表达情况

正常口腔黏膜、口腔黏膜白斑和口腔鳞状细胞癌组织中 Bcl-2 mRNA 表达水平组间比较, 差异有统计学意义($H=36.840, P=0.000$), 两两比较结果显示, 口腔白斑组织中 Bcl-2 mRNA 表达水平与正常口腔黏膜组织中 Bcl-2 的 mRNA 表达水平相比前者升高, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而口腔鳞癌组织中 Bcl-2 的 mRNA 表达水平最高($P<0.05$), 与口腔黏膜白斑组织和正常口腔黏膜组织比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 CDK2AP1 mRNA 表达情况

正常口腔黏膜、口腔黏膜白斑和口腔鳞状细胞癌组织中 CDK2AP1 mRNA 表达水平组间比较, 差异有统计学意义($H=19.271, P=0.000$), 两两比较结果显示, 口腔黏膜白斑组织中 CDK2AP1 mRNA 表达水平比口腔鳞癌组织中 CDK2AP1 的 mRNA 表达

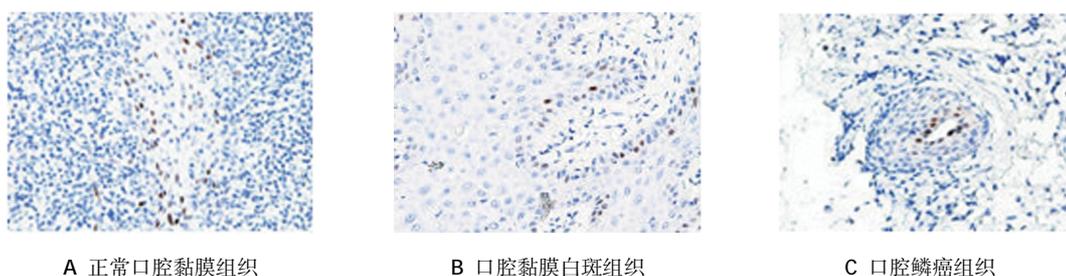


图 1 Bcl-2 蛋白在不同组织中的表达

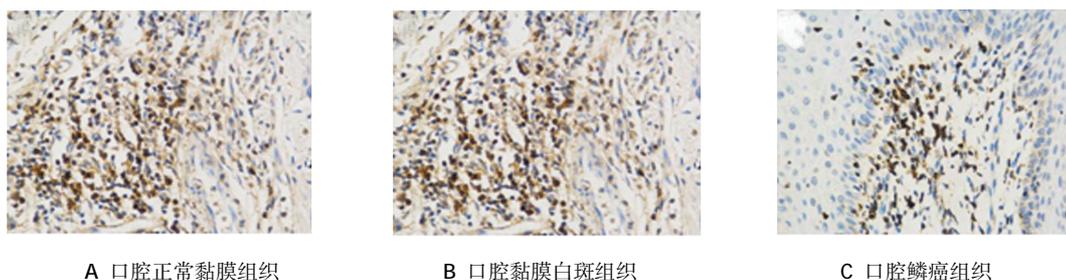
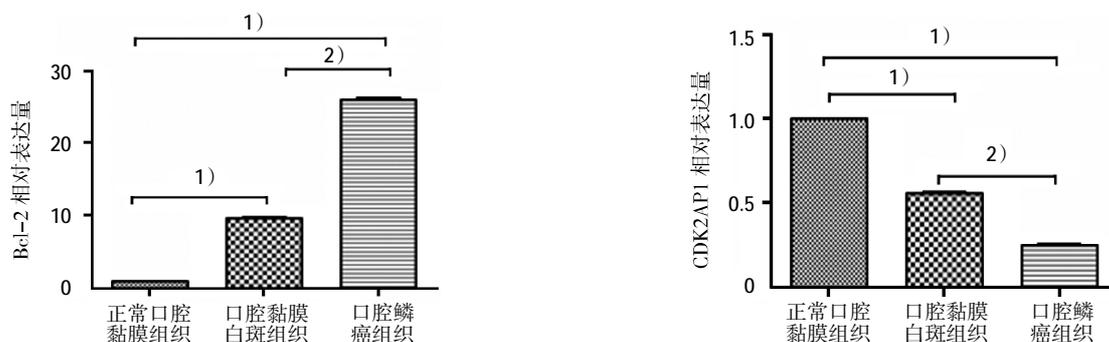


图 2 CDK2AP1 蛋白在不同组织中的表达



1)与正常口腔黏膜组织比较, $P<0.05$; 2)与口腔黏膜白斑组织比较, $P<0.05$

图 3 Bcl-2 mRNA、CDK2AP1 mRNA 在正常口腔黏膜组织、口腔黏膜白斑组织、口腔鳞癌组织中的相对表达情况

水平提高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而口腔正常黏膜中 CDK2AP1 的 mRNA 表达水平在 3 者之中最高,与口腔黏膜白斑组织和口腔鳞癌组织比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

Bcl-2 基因是一种抑制凋亡基因,该蛋白位于细胞中的线粒体内膜、核膜及胞浆内质网膜上^[9]。Bcl-2 可以通过抑制细胞凋亡,破坏细胞的动态平衡,导致癌变^[6]。本研究发现,Bcl-2 蛋白在正常口腔黏膜可见微量表达,在口腔黏膜白斑中呈部分阳性表达,在口腔鳞状细胞癌组织中呈强阳性表达,各组间 Bcl-2 蛋白的表达有差异,可推断 Bcl-2 蛋白在口腔黏膜白斑和口腔鳞癌的发病过程中可能是通过抑制细胞凋亡,从而使 DNA 受损的细胞得以存活、复制,破坏细胞的动态平衡,继而诱导癌基因的激活和抑癌基因的失活,产生癌变^[7-8]。Bcl-2 蛋白在鳞癌细胞中的表达较白斑上皮细胞的表达水平增高,可能是在鳞癌组织中有更多的 DNA 受损细胞得以存活、累积,使得 Bcl-2 在鳞癌细胞中的表达水平增高,这或许能为口腔鳞癌的治疗提供一个新思路。

CDK2AP1 是在仓鼠的口腔癌模型研究中最先被 TODD 等发现^[9],在细胞各周期的调控过程中起到很大作用,可以让各种信号在细胞内外进行传递,通过整合汇集到细胞核,进而调控细胞的增殖^[10-11]。在细胞的增殖过程中,依赖性激酶 CDK4C 能和 G1/S 期转换的调控因子 DK2AP1 发生特异性结合,进一步让 S 期相关基因的转录启动,从而加剧 G 期的细胞进入 S 期,最终让细胞增殖失去控制^[12-13]。由此可见口腔黏膜组织的病变发生与细胞周期调控机制紊乱关系密切,细胞周期的调控因子发生异常变化可以导致细胞出现失控性生长,而促进肿瘤细胞的增殖^[14]。本实验结果显示,在口腔正常黏膜组织、口腔黏膜白斑组织和口腔鳞癌组织中 CDK2AP1 表达率依次降低。各组间有差异,说明 CDK2AP1 在口腔黏膜组织恶变的初始阶段就已经参与并起到一定的作用,并且在口腔黏膜中的阳性表达率有随着组织的恶变程度增强而减弱的趋势,可以初步判断 CDK2AP1 蛋白与口腔的恶性病变程度相关。

综上所述,同时用免疫组化和 qRT-PCR 两种方法检测 Bcl-2 蛋白和 CDK2AP1 蛋白在口腔黏膜白斑和口腔鳞癌中的表达情况,不仅可以了解口腔白斑和口腔鳞癌的癌变过程,而且可以为患者早期

诊断和干预提供分子生物学支持。

参 考 文 献:

- [1] 周曾同,冯安心. 口腔黏膜病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2012: 88-89.
- [2] CHOI S, MYERS J N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy[J]. Journal of Dental Research, 2008, 87(1): 14-32.
- [3] PETERSEN P E. Oral cancer prevention and control—the approach of the World Health Organization[J]. Oral Oncol, 2009, 45(4/5): 454-460.
- [4] CAMPO E, MERINO M J, LIOTTA L, et al. Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue[J]. Human Pathol, 1992, 23(12): 1395-1401.
- [5] WEI W, WANG Y Q, YU X M, et al. Expression of TP53, BCL-2, and VEGFA genes in esophagus carcinoma and its biological significance[J]. Med Sci Monit, 2015(21): 3016-3022.
- [6] CHAMI M, PRANDINI A, CAMPANELLA M, et al. Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not depend on their putative pore-forming region [J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54581-54589.
- [7] LUANPITPONG S, CHANVORACHOTE P, STEHLIK C, et al. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(6): 858-869.
- [8] ADEM J, ROPPONEN A, EEVA J, et al. Differential expression of Bcl-2 family proteins determines the sensitivity of human follicular lymphoma cells to dexamethasone-mediated and anti-BCR-mediated apoptosis[J]. J Immunother, 2016, 39(1): 8-14.
- [9] HIYOSHI Y, WATANABE M, HIRASHIMA K, et al. P12 CDK2-AP1 is associated with tumor progression and a poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2009, 22(1): 35-39.
- [10] ZHONG G, XIONG X. miR-205 promotes proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma by suppressing CDK2AP1 expression[J]. Biol Res, 2015, 48(1): 60.
- [11] ZOLOCHEVSKA O, FIGUEIREDO M L. Novel tumor growth inhibition mechanism by cell cycle regulator cdk2ap1 involves antiangiogenesis modulation [J]. Microvasc Res, 2010, 80 (15): 324-331.
- [12] BUAJEED W, ZHANG X, OHYAMA H, et al. Interaction of the CDK2 associated protein-1, p12 (DOC-1/CDK2AP1), with its homolog, p14 (DOC-1R)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(4): 998-1003.
- [13] MATSUO K, SHINTANI S, TSUJI T, et al. P12 (DOC-1), a growth suppressor, associates with DNA polymerase alpha / primase[J]. FASEB J, 2000, 14(10): 1318-1324.
- [14] 高楠,姜睿,罗树立,等. CDK2AP1 与肿瘤[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(1): 156-158.

(王荣兵 编辑)