

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.05.002

牙本质基质蛋白 1 在口腔鳞癌细胞中的表达 *

孟 祥 朴松林 孙长生 杨 帅 李吉辰[△]

(哈尔滨医科大学口腔医院口腔颌面外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察牙本质基质蛋白 1(dentin matrix protein 1, DMP1)在舌鳞癌细胞 Cal-27、Tca-8113 以及人永生表皮细胞 Hacat 中的表达情况,初步探讨 DMP1 与口腔鳞癌的相关性。**方法:**免疫荧光染色用于人永生表皮细胞 Hacat 与舌鳞癌细胞 Cal-27 中,于共聚焦显微镜下观察 DMP1 在两组细胞的染色情况;采用 Western blot 方法,分别提取 Hacat, Cal-27 和人舌鳞癌细胞 Tca-8113 中 DMP1 蛋白并检测其含量。**结果:**通过免疫荧光实验观察到 DMP1 在 Cal-27 细胞及 Hacat 细胞中都表达于细胞质,同时发现 DMP1 在 Hacat 细胞中的荧光强度为 41.2,高于 Cal-27 细胞荧光强度 26.5;Western blot 实验结果显示 Hacat 细胞中 DMP1 蛋白的灰度分析值为 100 和 109,明显高于 Cal-27 和 Tca-8113 细胞的 40.8 和 37.6。**结论:**DMP1 在口腔鳞癌细胞和 Hacat 细胞中的表达存在差异,提示 DMP1 可能与口腔鳞癌的发生相关。

关键词:DMP1;Cal-27;Tca-8113;Hacat

中图分类号:R739.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)05-806-04

The Expression of Dentin Matrix Protein 1 in Oral Squamous Cancer Cells*

MENG Xiang, PIAO Song-lin, SUN Chang-sheng, YANG Shuai, LI Ji-chen[△]

(Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of dentin matrix protein 1 in tongue squamous cell carcinoma Cal-27, Tca-8113 and immortalized human epidermal cells Hacat, then analysis the relationship between DMP1 and oral squamous cell carcinoma. **Methods:** Immunofluorescence was used to detect the expression of DMP1 in Hacat and Cal-27 cells by the confocal microscopy. DMP1 protein would be extracted in squamous carcinoma Tca-8113, Cal-27 and Hacat cells respectively, the western blot was used to detect the protein content of DMP1 in the two groups. **Results:** In immunofluorescence, the expression of DMP1 protein in the cytoplasm, the fluorescence intensity of DMP1 in Hacat cells is 41.2, higher than the fluorescence intensity of DMP1 in Cal-27 cells is 26.5. Western blot experiments have shown, DMP1 protein fold change is 100 and 109 in Hacat cells, higher than DMP1 protein fold change is 40.8 and 37.6 in the Cal-27 and Tca-8113 cells. **Conclusions:** The expression between oral squamous cell carcinomas and normal tissue have differences, prompt DMP1 may be associated with the occurrence of oral squamous cell carcinomas.

Key words: DMP1; Cal-27; Tca-8113; Hacat

Chinese Library Classification(CLC): R739.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)05-806-04

前言

口腔颌面部的恶性肿瘤中以鳞状细胞癌最为多见,一般占 80%以上,我国口腔颌面部鳞状细胞癌多发生于 40~60 岁的成人,男性多于女性,以舌、颊、牙龈、腭、上颌窦为常见。口腔鳞癌由于其治愈难度较大,预后较差,一直作为临床及科研的重点研究对象^[1]。

DMP1 是 George 等^[2]由大鼠成牙质细胞 cDNA 克隆中发现的一种高度磷酸化的非胶原蛋白,其属于小整合素结合配体 N 端糖蛋白家族 (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein family, SIBLING) 成员,是矿化组织中非胶原蛋白的重要组成部分。该蛋白最初被认为仅仅存在于牙本质当中,后来研究发现在骨^[3]以及非矿化组织,如脑^[4]、唾液腺^[5]等软

组织也出现相应表达,也可表达于恶性肿瘤^[6]。而该蛋白在口腔鳞癌中的研究尚未见报道,故本实验拟检测 DMP1 在口腔鳞癌细胞中的表达情况,初步探讨 DMP1 与口腔鳞癌的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

口腔鳞癌细胞系 cal-27 和 Tca-8113 (北方转化中心实验室)、人永生表皮细胞 Hacat (一研生物科技,上海);高糖型改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), 胎牛血清和青链霉素 (Gibco, 美国), 二氧化碳培养箱 (Heal Force, 中国), 小鼠抗人 DMP1 (LFMb-31) 单克隆抗体 (Santa Crus Biotechnology, 美国), 山羊抗鼠 IgG-FITC 二抗 (博士德, 武汉), BSA-AR1006 封闭液 (博士德, 武汉), 荧光封片胶

* 基金项目:国家自然科学基金委员会批准资助对外交流与合作项目(30740420551);黑龙江省留学归国科学基金项目(LC2009C04)

作者简介:孟祥(1987-),男,硕士,主要研究方向:口腔颌面外科,电话:18646307959, E-mail: 707203741@qq.com

△ 通讯作者:李吉辰(1963-),研究方向:口腔颌面肿瘤,电话:0451-8885474, E-mail: lijichen@163.com

(收稿日期:2016-03-26 接受日期:2016-04-19)

(DAKO, 丹麦), ECL 发光液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, 上海), RIPA 蛋白裂解液(碧云天, 上海), Zeiss LMD 800 共聚焦显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Cal-27 细胞和 Hacat 细胞用含 10 % 胎血清、1 % 青链霉素的 DMEM, 在 37 °C、5 % CO₂ 的培养箱中常规培养, 3 d 更换一次培养液, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 免疫荧光染色 将细胞接种至装有载玻片的孔板中, 4 % 多聚甲醛固定 15 min, PBS 浸洗 3 次, 0.1 % Triton X-100 室温通透 10 min, PBS 浸洗 3 次, 1 % BSA 封闭 30 分钟, 一抗 4 °C 湿盒内过夜。次日取出后 PBS 冲洗 3 次, 二抗 37 °C 孵育 1 小时, PBS 冲洗 3 次, 行 DAPI 细胞核染色, 封片, 于共聚焦显微镜下观察, 随机选取 10 个视野, 应用 Image J 软件行荧光定量分析, 将取得结果进行统计学分析。

1.2.3 Western bolt 检测 DMP1 蛋白表达 分别取 cal-27 和 Hacat 细胞, RIPA 蛋白裂解液试剂盒提取总蛋白, BCA 比色法测定蛋白质浓度, 取相同质量的细胞裂解液, 配置 12 % SDS-PAGE 凝胶和 4 % 的浓缩胶, 80 v 30 min, 120 v 1 h 电泳分离, 转至 PVDF 膜上 5 % 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 DMP1

抗体 (1:1000), 4 °C 孵育过夜, 次日 TBST 洗膜, 加二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, 漂洗, ECL 显色, 分析比较记录。应用 Image J 软件对结果进行定量灰度分析。

1.3 统计学分析

应用 SPSS19.0 统计软件, 采用 t 检验对以上实验数据结果进行统计学分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光蛋白显色及定位

共聚焦显微镜下观察, 在 Hacat 细胞中, 胞核呈蓝色 (如图 1a), DMP1 蛋白于细胞质显色, 胞质呈绿色, 显色程度较明显, 胞核形态完整, 染色均匀一致 (如图 1b); 在 Cal-27 细胞中, 胞核呈蓝色 (如图 1d), DMP1 蛋白于细胞质显色, 胞质色绿, 显色程度较弱, 亮度不均匀 (如图 1e); 故 DMP1 蛋白在 Cal-27 及 Hacat 细胞中的阳性表达有差异性。荧光定量分析显示 Hacat 细胞的荧光强度为 41.2, Cal-27 细胞中 DMP1 荧光强度为 26.5, Hacat 细胞的荧光强度明显高于 Cal-27 细胞, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 如图 2)。

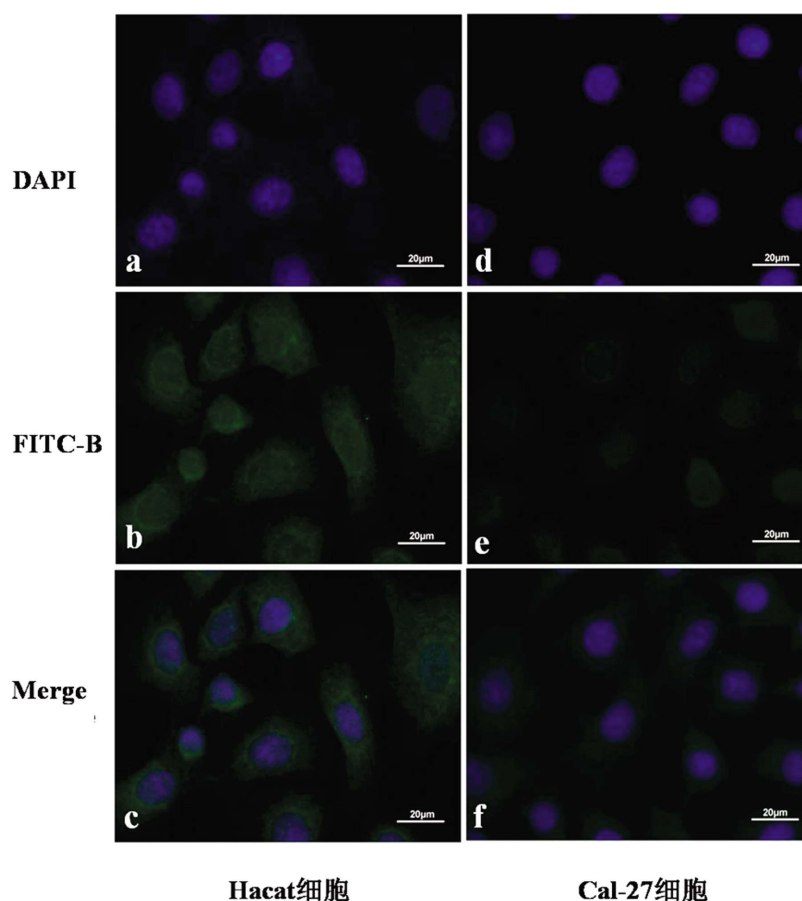


图 1 免疫荧光显色结果图

Fig.1 The results of DMP1 protein immunofluorescence chromogenic

2.2 Western blot 检测口腔鳞癌中 DMP1 蛋白表达水平

定量 western-blot 检测结果, 灰度分析值显示 DMP1 蛋白在 Hacat 细胞中的表达分别为 100 和 109, 显著高于 Cal-27 细胞和 Tca-8113 细胞中的表达 40.8 和 37.6 (如图 3), Hacat 细胞

中 DMP1 蛋白表达水平为 Cal-27 和 Tca-8113 的 2.45 倍和 2.90 倍 (如图 4)。

3 讨论

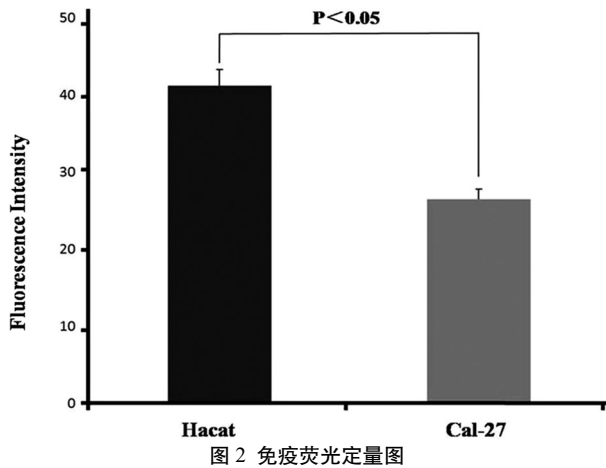


图2 Immunofluorescence quantitative figure

研究证明 DMP1 主要参与牙本质及骨的形成和矿化过程, DMP1 基因敲除动物可表现牙本质和全身骨组织的明显异常, 并发现其在成牙本质细胞、成牙骨质细胞、成釉细胞、成骨细胞、骨细胞前体细胞、骨细胞以及某些非矿化组织中均有表达, 其对启动矿化结晶、维持矿化结构起着重要作用^[7,8]。除了参与矿化过程, DMP1 可以作为转录因子调节相关基因表达。

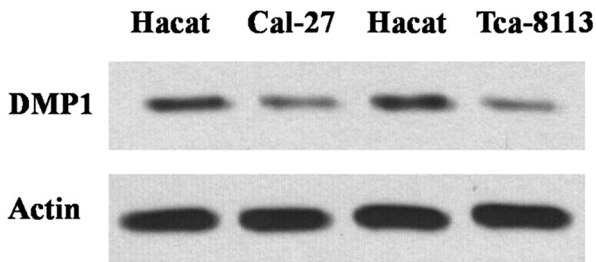


图3 Western blot 检测 DMP1 蛋白在正常细胞及口腔鳞癌中的表达
Fig.3 Western blot shows the expression of DMP1 in normal oral cell and oral squamous cell

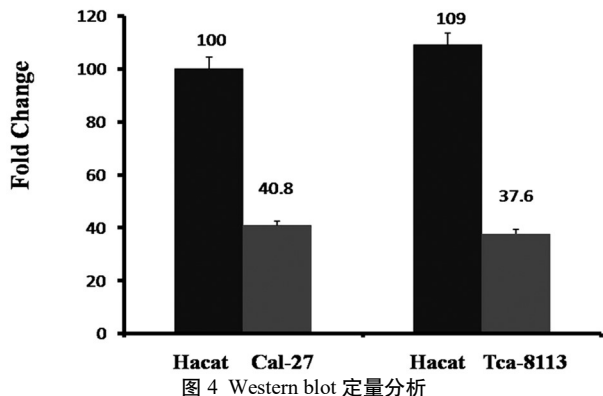


图4 Western blot quantitative figure

Fisher^[6]等在九种不同的恶性肿瘤中均检测到 SIBLING 家族蛋白的存在, 认为这些蛋白可以作为肿瘤早期诊断的标记物, DMP1 作为 SIBLING 家族蛋白的成员之一, 现已被发现作为一种特殊的肿瘤抑制因子, 其能够促使依赖 Arf/p53 的细胞周期停滞。Mallakin^[9]等研究发现 DMP1 缺失可损害 Arf/p53 对细胞周期调控的抑制作用, 从而促进 K-ras 介导的肺肿瘤的发生。DMP1 对 Arf-p53 调控同时, 能够被 E2F 和 NF- κ B 抑制其

表达, 从而促进肿瘤的发生^[8]。同时 DMP1 能通过激活基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 降解基底膜的 IV 型胶原和血管内皮钙粘蛋白, 肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor, TNF) 能促进 MMP9 的表达, 故 TNF- α 与 DMP1 可能共同参与了渗透性增高过程^[11]。

在软组织中, DMP1 广泛分布于大脑、乳腺、结肠、肺和口腔癌组织中^[12-16], 特异性的激活 proMMP-9 并与之结合, 进而促进肿瘤细胞的侵袭^[12]。而对涎腺肿瘤的研究发现, 在多型性腺瘤和粘液表皮样癌中均可见其表达, 并存在部位差异性, 提出 DMP1 C 末端可能参与涎腺肿瘤不同的发展过程。而对乳腺癌的研究^[15]中发现, DMP1 存在三种不同的剪切变异形式, DMP1- α 、 β 、 γ , 并通过实验证实了在乳腺癌中, 三种编码形式的表达存在差异, DMP1- β 过表达, DMP1- α 低表达, DMP1- γ 几乎不表达, 这对该蛋白的研究开拓新的方向。

本实验的研究结果显示: 免疫荧光实验中, 在 Hacat 细胞中, DMP1 于细胞质显色, 胞质呈现绿色, 显色程度明显, 胞核形态完整, 染色均匀一致, 胞核呈蓝色; 而在 Cal-27 细胞中 DMP1 蛋白亦于细胞质显色, 显色程度较弱, 亮度不均匀, 胞核呈蓝色。免疫荧光定量分析显示, Hacat 细胞中 DMP1 荧光显色强度明显高于 Cal-27 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 Western blot 实验中, 我们分别检测 Hacat 细胞、Cal-27 细胞与 Tca-8113 细胞中的 DMP1 表达, 通过定量分析, Hacat 细胞中 DMP1 蛋白表达水平为 Cal-27 和 Tca-8113 的 2.45 倍和 2.90 倍。上述实验证实了 DMP1 蛋白在正常细胞中的表达高于口腔鳞癌中的表达。

DMP1 作为肿瘤抑制因子, 其活性可以被多种转录因子如 E2F^[17], 药物如蒽环类抗癌药或多种蛋白如 p56 抑制^[18], 并且受多条通路调控和影响, 我们对 DMP1 在矿化过程中的作用及机制有了一定的了解^[19], 其在牙和骨发育过程中扮演着重要作用, 但对其在肿瘤中的作用机制尚不明确。本研究初步探究了其在口腔鳞癌和正常细胞中的表达情况, 这一现象提示 DMP1 可能与口腔鳞癌的发生具有相关性, 但其在肿瘤的发生、发展、转移及预后中的功能和机制尚有待研究, 故而 DMP1 在口腔鳞癌中具有一定的研究前景和研究价值。

参考文献 (References)

- [1] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 1980
- [2] Qiu Wei-liu. Oral and Maxillofacial surgery [M]. The third Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 1980
- [3] George A, Sabsay B, Simonian PAL, et al. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 12624-12630
- [4] MacDougall M, Gu TT, Luan X, et al. Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues[J]. J Bone Miner Res, 1998, 13(3): 422-431
- [5] Hirst KL, Ibaraki-O'Connor K, Young MF, et al. Cloning and expression analysis of the bovine dentin matrix acidic phosphoprotein gene [J]. J Dent Res, 1997, 76(3): 754-760
- [6] Ogbureke KU, Fisher LW. Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands[J]. J Dent Res, 2004, 83(9): 664-670
- [7] Fisher LW, Jain A, Tayback M, et al. Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoprotein Gene Family Expression in Different Cancers

- [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8501-8511
- [7] Lorenz Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pages A, et al. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis [J]. Nat Genet, 2006, 3(8): 1248-1250
- [8] Ye L, Mishina Y, Chen D, et al. Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrocyte dysplasia-like phenotype[J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 6197-6203
- [9] Mallakin A, Sugiyama T, Taneja P, et al. Mutually exclusive inactivation of DMP1 and ARF/p53 in lung cancer [J]. Cancer Cell, 2007, 12(4): 381-394
- [10] Takayuki Sugiyama, Donna P, Pankaj Taneja, et al. Signal Transduction Involving the Dmp1 Transcription Factor and its Alteration in Human Cancer[J]. Clinical Medicine: Oncology, 2008, 2: 209-219
- [11] 史东沙, 谢明. DMP1 促进汉坦病毒感染的脐静脉内皮细胞通透性增加[C]. 第十届全国免疫学学术大会, 2015
Shi Dong-sha, Xie Ming. DMP1 promote the increase of umbilical vein endothelial cell permeability by hantavirus infection [C]. The 10th Chinese Society for Immunology, 2015
- [12] Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, et al. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(3): 212-226
- [13] Takayuki sugiyama, Donna p, Pankaj taneja, et al. Role of DMP1 and its future lung cancer diagnostics [J]. Expert Reviews, 2008, 8(4): 435-447
- [14] Mallakin A, Sugiyama T, Taneja P, et al. Scientists identify new gene associated with lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(11): 1674
- [15] Dejan Maglic, Daniel B Stovall J, Mark Cline, et al. DMP1 β , a splice isoform of the tumour suppressor DMP1 locus, induces proliferation and progression of breast cancer [J]. Journal of Pathology, 2015, 236: 90-102
- [16] Y Inagaki, T G Kashima, E S Hookway, et al. Dentin matrix protein 1(DMP1) is a marker of bone formation and mineralization in soft tissue tumours[J]. Virchows Arch, 2015, 466: 445-452
- [17] Mallakin A, Taneja P, Matise LA, et al. Expression of Dmp1 in specific differentiated, nonproliferating cells and its repression by E2Fs [J]. Oncogene, 2006, 25(59): 7703-7713
- [18] Taneja P, Mallakin A, Matise LA, et al. Repression of Dmp1 and Arf transcription by anthracyclins: critical roles of the NF-kB subunit p65 [J]. Oncogene, 2007, 26(53): 7457-7466
- [19] 占柳, 谢淑娟, 潘卫红. 牙本质基质蛋白-1 及其相关蛋白矿化作用的研究进展[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2012, 2(10): 115-118
Zhan Liu, Xie Shu-juan, Pan Wei-hong. Dentin matrix protein-1 and its related research progress of mineralization [J]. Chinese Journal of Geriatric Dentistry March, 2012, 2(10): 115-118
- (上接第 805 页)
- [17] Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation [J]. Journal of autoimmunity, 2015, 60: 1-11
- [18] Vlachos S, Tsaroucha AK, Konstantoudakis G, et al. Serum profiles of M30, M65 and interleukin-17 compared with C-reactive protein in patients with mild and severe acute pancreatitis [J]. Journal of hepatobiliary-pancreatic sciences, 2014, 21(12): 911-918
- [19] Zhao LN, Han WY, Lu L, et al. Clinical features and expressions of Foxp3 and IL-17 in type 1 autoimmune pancreatitis in China[J]. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 2014, 20: 2720-2728
- [20] Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases [J]. Postepy dermatologii i alergologii, 2014, 31(4): 256-261
- [21] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation [J]. Nature reviews Drug discovery, 2012, 11(10): 763-776
- [22] Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, et al. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice [J]. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2004, 84(12): 1610-1618
- [23] Tahara H, Sato K, Yamazaki Y, et al. Transforming growth factor- α activates pancreatic stellate cells and may be involved in matrix metalloproteinase-1 upregulation[J]. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2013, 93(6): 720-732
- [24] Charrier A, Chen R, Kemper S, et al. Regulation of pancreatic inflammation by connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)[J]. Immunology, 2014, 141(4): 564-576
- [25] Marrache F, Tu SP, Bhagat G, et al. Overexpression of interleukin-1 β in the murine pancreas results in chronic pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2008, 135(4): 1277-1287
- [26] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance[J]. European journal of immunology, 2010, 40(7): 1830-1835
- [27] Hamada S, Masamune A, Yoshida N, et al. IL-6/STAT3 Plays a Regulatory Role in the Interaction Between Pancreatic Stellate Cells and Cancer Cells [J]. Digestive diseases and sciences, 2016, 61(6): 1561-1571
- [28] Mace TA, Ameen Z, Collins A, et al. Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner [J]. Cancer research, 2013, 73(10): 3007-3018
- [29] Loncle C, Bonjoch L, Folch-Puy E, et al. IL17 Functions through the Novel REG3 β -JAK2-STAT3 Inflammatory Pathway to Promote the Transition from Chronic Pancreatitis to Pancreatic Cancer [J]. Cancer research, 2015, 75(22): 4852-4862