

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.016

CXXC4、EZH2 在口腔鳞状细胞癌中表达及临床意义 *

钟克涛 静广平 田 兵 俞 晴 王海涛 胡腾龙[△]

(哈尔滨医科大学口腔医学院口腔外科二病房 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨口腔鳞状细胞癌(Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC)中 CXXC 指蛋白 4(CXXC finger protein 4, CXXC4)与 Zeste 基因增强子同源物 2(Enhancer of zeste homolog 2, EZH2)的表达、相关性以及与临床病理特征之间的关系,为 OSCC 的早期诊断、治疗、判断预后及预防等提供参考依据。**方法:**采用免疫组织化学 S-P 法检测 CXXC4 蛋白及 EZH2 蛋白在 60 例口腔鳞状细胞癌组织及 20 例非肿瘤患者正常口腔黏膜组织中的表达情况,分析二者与口腔鳞状细胞癌临床病理特征的相关性。**结果:**口腔鳞状细胞癌组织中 CXXC4 蛋白的表达率为 35.0% (21/60),明显低于正常口腔黏膜组织的 60.0% (12/20)($P < 0.05$);口腔鳞状细胞癌中 EZH2 蛋白的表达率为 70.0% (42/60),高于正常口腔黏膜组织的 25% (5/20)($P < 0.05$)。CXXC4 蛋白与 EZH2 蛋白的表达与口腔鳞状细胞癌的病理分化程度、TNM 分期及淋巴结转移等密切相关($P < 0.05$),而与年龄、性别及肿瘤直径大小等无关。CXXC4 蛋白与 EZH2 蛋白在 OSCC 中表达呈负相关($r = -0.511$, $P < 0.001$)。**结论:**CXXC4 蛋白的表达下调或缺失以及 EZH2 蛋白的表达上调或过表达与口腔鳞状细胞癌的发生、发展及侵袭转移有关,可能作为口腔鳞状细胞癌预后预测的参考指标。

关键词:口腔鳞状细胞癌;CXXC4;EZH2

中图分类号:R739.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-676-04

Expressions and Clinical Significances of CXXC4 and EZH2 in the Oral Squamous Cell Carcinoma*

ZHONG Ke-tao, JING Guang-ping, TIAN Bing, YU Qing, WANG Hai-tao, HU Teng-long[△]

(Department of Oral Surgery Affiliated Stomatology Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expressions of CXXC finger protein 4 (CXXC4) and the enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in the oral squamous cell carcinoma(OSCC)and explore the correlation with the clinicopathologic features. **Methods:** The expression of CXXC4 and EZH2 were measured using immunohistochemistry in 60 cases of oral squamous cell carcinoma and 20 cases of normal oral tissues. Statistical analysis was used to determine the correlation between their expression and clinicopathologic parameters. **Results:** The positive expression rate of CXXC4 was 35.0% (21/60) in OSCC tissue, which was lower than that of 60.0% (12/20) in the normal oral tissues($P < 0.05$). However, the positive expression rate of EZH2 was 70.0% (42/60) in OSCC tissues, which was significantly higher than that of 25.0% (5/20) in the normal oral tissues($P < 0.05$). The expression of CXXC4 and EZH2 were significantly correlated with the differentiation of tumor, TNM staging and the development of lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was a negative correlation between the expression of CXXC4 and EZH2 in oral squamous cell carcinoma ($r = -0.511$, $P < 0.001$). **Conclusion:** The expression of CXXC4 and EZH2 may play an important role in the initiation and development of OSCC. The low expression of CXXC4 and high expression of EZH2 may promote the invasion and metastasis of OSCC.

Key words: Oral Squamous Cell Carcinoma; CXXC4; EZH2

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

Article ID: 1673-6273(2019)04-676-04

前言

口腔鳞状细胞癌(Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,约占口腔颌面恶性肿瘤的 80% 以上^[1],好发于中老年人群,其发病率、侵袭性及淋巴结转移率较高,预后往往较差,且近年来发病趋于年轻化,发病率呈现出

增高趋势。目前,虽然治疗 OSCC 的方法不断革新,但治疗效果没有得到突破性进展,患者 5 年生存率仍然较低^[2]。寻找与 OSCC 发生发展的相关基因,对 OSCC 进行早期诊断、治疗及预防具有重要意义。

Zeste 基因增强子同源物 2 (Enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是多梳抑制复合物 2 (Polycomb repressive complex 2,

* 基金项目:黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA14C101-10)

作者简介:钟克涛(1990-),硕士研究生,住院医师,研究方向:口腔肿瘤的发生发展机制及临床治疗, E-mail: zhongketao@163.com

△ 通讯作者:胡腾龙(1963-),硕士生导师,教授,主要研究方向:口腔肿瘤的发生发展机制及临床治疗, E-mail: flylong_26@sina.com

(收稿日期:2018-04-08 接受日期:2018-04-31)

PRC2)的催化活性亚单位,在多种恶性肿瘤中表达明显增高,其异常表达可使转录机制失调,从而参与肿瘤的发生、发展^[3,4],并与肿瘤预后不良相关。CXXC 指蛋白 4(CXXC finger protein 4)作为 Wnt 信号通路的负调节因子,具有抑制肿瘤细胞增殖的能力^[5],扮演抑癌基因的角色,在胃癌研究中发现 CXXC4 的低表达与患者预后差呈正相关,是受到 EZH2 直接调控的一个新的下游靶基因^[6]。本实验采用免疫组织化学 S-P 法检测 OSCC 组织及非肿瘤患者正常口腔黏膜中 CXXC4 蛋白与 EZH2 蛋白的表达情况,探讨二者与 OSCC 发生及发展的关系,以期对 OSCC 的早期诊断和预后判断提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

标本来自哈尔滨医科大学附属口腔医院 2015 至 2017 年住院的 OSCC 患者共 60 例,所有患者此前均无手术、放疗及其他抗肿瘤治疗史,且术后经病理科确诊。60 例 OSCC 标本中,男性 38 例,女性 22 例,中位年龄 64 岁;肿瘤直径 > 4 cm 20 例,≤ 4 cm 40 例;T1-T2 期 37 例,T3-T4 期 23 例;高分化鳞癌 35 例,中-低分化鳞癌 25 例;淋巴结转移 18 例,无转移 42 例。非肿瘤患者的正常口腔黏膜组织标本 20 例。

1.2 主要试剂

兔抗人 CXXC4 抗体 (14127R),兔抗人 EZH2 抗体 (bs-3521R)、S-P 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购于哈尔滨博士德生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学法

组织标本离体后均经 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,常规 HE 染色观察并确认病理学分

型;免疫组织化学 S-P 法染色,操作步骤按 S-P 试剂盒说明书进行,DAB 显色,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,以已知 OSCC 切片为阳性对照。

1.4 结果判定标准

切片由两名病理科医师以双盲法进行评估,以细胞质或细胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞。CXXC4 蛋白及 EZH2 蛋白阳性着色主要表达于细胞质。结果评价参照 Pluot,杨军^[7,8]等半定量积分法,按阳性细胞百分比及染色程度分级评分:每张切片随机选取 5 个不重叠的肿瘤组织区域,高倍镜下(× 400)计数每一百个细胞中癌细胞所占百分比,取 5 个区域癌细胞所占百分比的平均数作为阳性肿瘤比,以此进行分级:肿瘤细胞 ≤ 10% 为 1,11%-50% 为 2,51%-75% 为 3,>75% 为 4,阴性则为 0;按染色强度分级:棕褐色为 3,棕黄色为 2,浅黄色为 1,无着色为 0。将两分级乘积作为总积分,0-1 为 (-),2-3 为 (±),4-5 为 (+),6-7 为 (++) ,≥ 8 为 (+++)。本实验以 (++) 和 (+++) 定义为阳性,(-) 和 (±) 定义为阴性。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件,分组数据数据进行 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 法,差异性检验标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 CXXC4 与 EZH2 在 OSCC 中的表达

CXXC4 蛋白在 OSCC 中表达率为 35.0%(21/60),明显低于正常口腔黏膜组织的 60.0%(12/20),差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表 1,图 A,B);EZH2 蛋白在 OSCC 中表达率为 70.0%(42/60),显著高于正常口腔黏膜组织的 25.0%(5/20),差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表 1,图 C,D)。

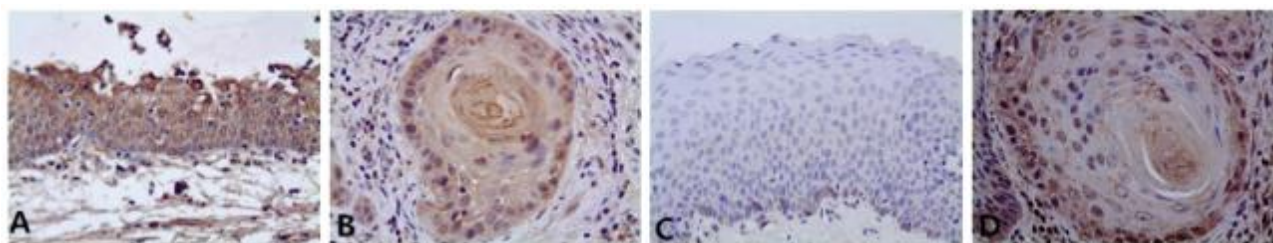


Fig.A expression of CXXC4 in normal oral mucosa (SP × 400); Fig.B expression of CXXC4 in OSCC (SP × 400); Fig.C expression of EZH2 in normal oral mucosa (SP × 400); Fig.D expression of EZH2 in OSCC (SP × 400).

表 1 CXXC4 和 EZH2 在正常口腔黏膜组织及口腔鳞状细胞癌中的表达
Table 1 Expression of CXXC4 and EZH2 in normal oral mucosa and oral squamous cell carcinoma

	CXXC4		P value	EZH2		P value
	-	+		-	+	
NOM	8 (40.0%)	12 (60.0%)	0.049	15 (75.0%)	5 (25.0%)	<0.001
OSCC	39(65.0%)	21(35.0%)		18 (30.0%)	42(70.0%)	

2.2 CXXC4 与 EZH2 的表达与 OSCC 临床病理特征的关系

CXXC4 蛋白与 EZH2 蛋白的表达与 OSCC 患者的病理分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移等密切相关($P < 0.05$),与患者年龄、性别及肿瘤直径大小无关(表 2)。

2.3 CXXC4 与 EZH2 的表达的相关性

在 60 例 OSCC 组织标本中,CXXC4 蛋白与 EZH2 蛋白同时表达的有 8 例,同时阴性的 5 例,CXXC4 蛋白表达而 EZH2 蛋白阴性的有 13 例,CXXC4 蛋白阴性而 EZH2 蛋白表达的有 34 例,Spearman 等级相关分析显示,两者在 OSCC 中表达呈显著负相关($r = -0.511, P < 0.001$,表 3)。

表 2 60 例 OSCC 患者中 CXXC4 和 EZH2 的表达与临床病理特征的关系
Table 2 Association of Clinicopathological Factors with CXXC4 and EZH2 Expression from 60 Patients

Variable	n	CXXC4		P value	EZH2		P value
		-	+		-	+	
Gender							
Male	38	25	13	0.886	11	27	0.81516
Female	22	14	8		7	15	
Age (yrs.)							
≥ 60	34	23	11	0.623	12	22	0.306
< 60	26	16	10		6	20	
Tumor size(cm)							
> 4	20	15	5	0.251	3	17	0.073
≤ 4	40	24	16		15	25	
Clinical stage							
I - II	37	19	18	0.005	16	21	0.005
III-IV	23	20	3		2	21	
Tumor differentiation							
Well	35	18	17	0.009	15	20	0.010
Moderately/Poorly	25	21	4		3	22	
Lymph node metastasis							
No	42	23	19	0.011	17	25	0.007
Yes	18	16	2		1	17	

表 3 口腔鳞状细胞癌中 CXXC4 与 EZH2 表达的相关性
Table 3 Correlation between CXXC4 and EZH2 expression in OSCC

CXXC4	EZH2		r	P value
	+	-		
+	8	13	-0.511	< 0.001
-	34	5		

3 讨论

OSCC 的发生发展是多因素、多阶段的演变过程,涉及基因突变、细胞分化增殖及细胞周期调控信号通路失调等过程。众所周知,Wnt/ β -catenin 和 MAPK 信号通路失调在多种疾病的发生发展过程中具有重要作用^[9],如肺癌^[10]、结肠癌^[11]等。Wnt 信号通路被异常激活时,细胞内 β -catenin 处于高水平状态,从而激活 Wnt 信号靶基因如 c-myc、Cyclin D1^[12]等的转录,进而调控细胞生长、分化,促进肿瘤发生发展。MAPK 信号通路被异常激活,细胞周期和分化、胞间的功能同步紊乱,促进细胞恶性转化、肿瘤发生和侵袭转移等多种病理过程的发生^[13]。

CXXC4 作为 Wnt 信号通路的负调节因子,通过稳定 β -catenin 降解复合物完整性,下调 β -catenin 在胞内含量,抑制 Wnt 信号通路的激活;并通过破坏 Erkl/2 与 MEK1/2 之间的相互作用,抑制 MAPK 通路的激活^[14,15],扮演抑癌基因角色。新近研究表明 CXXC4 在骨髓增生异常综合征^[16]、胃癌^[17]、肝癌^[18]、肾细胞癌及卵巢癌^[19]等肿瘤中表达下调或缺失,并与患者预后不良呈正相关。本实验数据显示在 OSCC 中 CXXC4 表达率为 35.0%,明显低于正常口腔黏膜组织的 60.0%,其表达率与 OS-

CC 分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移相关,且表达率随肿瘤分化程度降低、TNM 分期的进展及淋巴结转移的出现而降低,其表达水平与患者的性别、年龄及肿瘤直径的大小无关。以上数据表明 CXXC4 表达下调或缺失与 OSCC 的发生发展密切相关。

EZH2 是 PRC2 的催化活性亚单位,具有组蛋白甲基转移酶(Histone methyltransferase, HMT)活性^[20],在维持细胞的密度、调节细胞周期及干细胞的自我更新中起着至关重要的作用^[21,22]。大量研究表明 EZH2 作为癌基因^[23],在多种恶性肿瘤中呈高表达,如前列腺癌^[24]、胃癌^[25]、肝癌、肠癌^[26]、肺癌^[27-29]及乳腺癌^[30]等。通过调控转化生长因子 β (TGF- β 1)的表达、下调 TIMP 和上调 MMP 的表达及抑制抗血管生成因子,促进肿瘤细胞的侵袭转移和血管生成^[31]。其表达异常可使转录机制失调,促进肿瘤的发生、发展,并与肿瘤的早期转移、不良预后密切相关。本实验结果显示,在 OSCC 中 EZH2 表达率为 70.0%,明显高于正常口腔黏膜组织的 25.0%,其表达率与 OSCC 分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移相关,且随肿瘤分化程度降低、TNM 分期的进展及淋巴结转移的出现而升高,但与患者的性别、年龄及肿瘤直径的大小无关。以上数据表明 EZH2 表达上调或过

表达与 OSCC 的侵袭转移密切相关。

OSCC 的发生发展与癌基因的激活及抑癌基因的沉默表达密切相关,新近研究表明在胃癌中 CXXC4 是受 EZH2 直接调控的新的靶基因,EZH2 通过直接结合 CXXC4 基因的启动子区域抑制其转录进而抑制其表达。在本实验中,CXXC4 在 OSCC 中低表达,EZH2 过表达,两者呈负相关,我们推测在 OSCC 中 EZH2 抑制了 CXXC4 的表达,从而导致 CXXC4 参与的 Wnt/ β -catenin 信号通路和 MAPK 信号通路激活,促进了 OSCC 的发生发展、侵袭转移及不良预后等。

综上所述,CXXC4 和 EZH2 的阳性表达与 OSCC 的发生、发展、侵袭转移及不良预后密切相关,但 CXXC4 /EZH2 表达失衡的相关机制尚需进一步研究和探讨。通过沉默 EZH2,上调 CXXC4 的表达可能为 OSCC 的基因诊断及靶向治疗提供新思路。

参考文献(References)

- [1] 张志愿,俞光岩. 口腔颌面外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2012: 208
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics [J]. 2014 CA Cancer J Clin, 2014, 64: 9-29
- [3] Roh S, Park S Y, Ko H S, et al. EZH2 expression in invasive lobular carcinoma of the breast[J]. World J Surg Oncol, 2013, 11: 299
- [4] Knutson S K, Warholc N M, Wigle T J, et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2[J]. PNAS, 2013, 110(19): 7922-7927
- [5] Lu H, Jin W, Sun J, et al. New tumor suppressor CXXC finger protein 4 inactivates mitogen activated protein kinase signaling [J]. FEBS Lett, 2014, 588(18): 3322-3326
- [6] 陆海琦. 新的胃癌相关肿瘤抑制因子 CXXC4 的表观遗传调控作用及其机制研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2014
- [7] Pluot M, Cahn V, Ducasse A. Immunohistochemistry in ophthalmic pathology: applications and limitations [J]. J Fr Ophtalmol, 2006, 29 (8): 946-956
- [8] 杨军, 康安静, 苏宝山, 等. 免疫组织化学检测结果判读进展 [J]. 中华临床医师杂志, 2014, 8(20): 3699-3703
- [9] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. Annual review of cell and developmental biology, 2004, 20: 781-810
- [10] D Stewart DJ, Chang DW, Ye Y, et al. Wnt signaling pathway pharmacogenetics in non-small cell lung cancer [J]. The Pharmacogenomics Journal, 2014, 14(6): 509-522
- [11] D Pérez, A Gerger, W Zhang, et al. Association of common gene variants in the WNT/ β -catenin pathway with colon cancer recurrence[J]. The Pharmacogenomics Journal, 2014, 14(2): 142-150
- [12] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms and diseases[J]. Dev Cell, 2009, 17(1): 9-26
- [13] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. Biochimica et biophysica acta, 2007, 1773: 1263-1284
- [14] Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy [J]. Expert opinion on therapeutic targets, 2012, 16: 103-119
- [15] Paluszczak J, Wisniewska D, Kostrzewski-Poczekaj M, et al. Prognostic significance of the methylation of Wnt pathway antagonists-CXXC4, DACT2, and the inhibitors of sonic hedgehog signaling-ZIC1, ZIC4, and HHIP in head and neck squamous cell carcinomas [J]. Clin Oral Investig, 2017, 21(5): 1777-1788
- [16] ShuangLi, RongFan, Xiao-LiZhao, et al. CXXC4 mRNA levels are associated with clinicopathological parameters and survival of myelodysplastic syndrome patients [J]. Elsevierjournal, 2014, 38(9): 1072-1078
- [17] Lu H, Sun J, Wang F, et al. Enhancer of zeste homolog 2 activates wnt signaling through downregulating CXXC finger protein 4[J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e776
- [18] Andrew J. Murphy, Christian de Caestecker, Janene Pierce, et al. CITED1 Expression in Liver Development and Hepatoblastoma [J]. Neoplasia, 2012, 14(12): 1153-1163
- [19] 赵云霞, 宋静, 张灿灿等. CXXC4 促进上皮性卵巢癌细胞对化疗药物敏感性的研究意义[J]. 山东大学学报(医学版), 2016, 54(3)
- [20] Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, et al. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (6): 1859-1864
- [21] Kim W, Bird GH, Neff T, et al. Target disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer[J]. Nature Chemical Biology, 2013, 9(10): 643-650
- [22] Abdel-Wahab O, Levine RL. EZH2 mutations: mutating the epigenetic machinery in myeloid malignancies [J]. Cancer cell, 2010, 18(2): 105-107
- [23] Berg T, Thoenes S, Yap D, et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb group gene EZH2 in lymphomagenesis[J]. Blood, 2014, 123(25): 3914-3924
- [24] Tamgue O, Chai CS, Hao L, et al. Triptolide inhibits histone methyltransferase EZH2 and modulates the expression of its target genes in prostate cancer cells [J]. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 2013, 14(10): 5663-5669
- [25] He LJ, Cai MY, Xu GL, et al. Prognostic significance of overexpression of EZH2 and H3K27me3 proteins in gastric cancer [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012, 13(7): 3173-3178
- [26] Yang Liu, Kangjie Yu, Mingyang Li, et al. EZH2 overexpression in primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma and its association with the clinicopathological features [J]. Human Pathology, 2017, (64): 213-221
- [27] 唐甜, 陆光. Bmi-1 和 EZH2 基因在小细胞肺癌中的表达及其意义 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(1): 48-52
- [28] Nae Yu Kim, Jung-Soo Pyo. Clinicopathological significance and prognostic role of EZH2 expression in non-small cell lung cancer[J]. Pathology - Research and Practice, 2017, (7): 778-782
- [29] Jian Sun, Xin Tian, Sheng-Qiang Lu, et al. MicroRNA-4465 suppresses tumor proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer by directly targeting the oncogene EZH2 [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 96: 1358-1362
- [30] Ke Qian, Gao Liu, Zhonghua Tang, et al. The long non-coding RNA NEAT1 interacted with miR-101 modulates breast cancer growth by targeting EZH2 [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017, 615: 1-9
- [31] 杨大运, 邢亚威, 齐战. RKIP 和 EZH2 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 现代预防医学, 2016, 43(10): 1910-1914