

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.08.049

◇临床医学◇

ROCK1 基因在鼻咽癌组织中的表达及其与细胞侵袭的关系

田双双^{1a}, 王俊美², 崔云东^{1a}, 张礼涛^{1b}作者单位:¹临沂市河东区人民医院,^a耳鼻喉科,^b检验科,山东 临沂 276000;²临沂市兰山区方城中心卫生院检验科,山东 临沂 276000

通信作者:崔云东,男,副主任医师,研究方向为头颈肿瘤,E-mail:cyd921@163.com

摘要:目的 观察干扰 ROCK1 基因对鼻咽癌的细胞侵袭影响。方法 收集 2016 年 1—12 月临沂市河东区人民医院 30 例鼻咽癌病人临床鼻咽癌标本及同期鼻咽癌的癌旁组织,通过免疫组织化学法(免疫组化)检测 ROCK1 的表达;培养鼻咽癌细胞株 6-10B 和永生化的鼻咽上皮细胞 NP69,蛋白质印迹法(Western Blot)方法检测 ROCK1 的表达;使用 ROCK1 的抑制剂 Y-27632 处理 6-10B 细胞株,通过 Transwell 小室实验,检测鼻咽癌的细胞侵袭。结果 免疫组化结果显示,30 例鼻咽癌组织中,ROCK1 有 18 例阳性,12 例阴性;而对照组中只有 2 例阳性,鼻咽癌组的 ROCK1 明显高表达,与对照组相比差异有统计学意义($\chi^2 = 19.20, P < 0.0001$);Western Blot 检测结果显示,6-10B 组的 ROCK1 表达明显高于 NP69 细胞组;侵袭实验结果显示,未处理组为(171.67 ± 17.89),明显高于 10 μM 组(120 ± 19.07)和 30 μM 组(67.33 ± 13.58),差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ROCK1 基因与鼻咽癌的细胞侵袭有关。

关键词:鼻咽肿瘤; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 肿瘤浸润; 印迹法,蛋白质; 免疫组织化学

Expression of ROCK1 gene in nasopharyngeal carcinoma and its relationship with cell invasion

TIAN Shuangshuang^{1a}, WANG Junmei², CUI Yundong^{1a}, ZHANG Litao^{1b}

Author Affiliations: ^{1a}Department of ENT, ^{1b}Department of Clinical Laboratory, Linyi Hedong District People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China; ²Department of Clinical Laboratory, Fangcheng Central Hospital, Lanshan District, Linyi City, Linyi, Shandong 276000, China

Abstract: Objective To observe the effects of the interfering ROCK1 gene on the cell invasion of nasopharyngeal carcinoma. **Methods** Clinical samples of 30 patients in Linyi Hedong District People's Hospital from January to December 2016 were collected, which nasopharyngeal carcinoma tissue and non-nasopharyngeal carcinoma tissue were assigned into the experimental group and the control group. The ROCK1 expression of clinical samples was detected by immunohistochemistry. Nasopharyngeal carcinoma cells line 6-10B and immortalized nasopharyngeal epithelial cells NP69 were cultured. The ROCK1 expression level in cells line was detected by Western blot. After treated with Y-27632 (10 μM and 30 μM), cell invasion was detected by transwell assay. **Results** Immunohistochemical results showed that 18 of 30 cases of nasopharyngeal carcinoma were positive and 12 cases were negative, while only 2 cases were positive in the control group. Compared with the control group, the ROCK1 expression level of nasopharyngeal carcinoma group was significantly higher by immunohistochemical assay ($\chi^2 = 19.20, P < 0.0001$). Western blot assay results showed that ROCK1 expression of 6-10B group was higher than that of NP65 cell group. Transwell assay showed that the cell number of untreated group (171.67 ± 17.89) was higher than (120 ± 19.07) of Y-27632 (10 μM) group and (67.33 ± 13.58) of Y-27632 (30 μM) group with statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** ROCK1 gene is associated with the cell invasion of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: Nasopharyngeal neoplasms; Protein-serine-threonine kinases; Neoplasm invasiveness; Blotting, western; Immunohistochemistry

鼻咽癌是一种恶性的上皮细胞肿瘤。在世界范围内,我国鼻咽癌的发病率和病死率是最高的。鼻咽癌通常具有侵袭和转移的特性,而这一特性却导致许多鼻咽癌病人死亡^[1]。研究发现,95%的鼻咽癌在早期就发生了肿瘤的侵袭和转移^[2]。因此,鼻咽癌侵袭相关因子的研究,成了治疗该病的重中

之重。但是目前关于鼻咽癌的侵袭相关因子还未见明确报道。

Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rho-associated coiled coil-containing protein kinase, ROCK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 RhoA 的下游效应蛋白。文献报道,ROCK 有两种异构体,分别是 ROCK1 和

ROCK2,其中 ROCK1 蛋白具有调节细胞骨架重组和细胞粘附等作用,ROCK1 的调节作用,使其具有调节细胞运动和细胞迁移的功能^[3]。

虽然 ROCK1 在诸多癌症中被研究,但其与鼻咽癌的相关性并没有去阐述。这个研究,将收集鼻咽癌住院病人 30 例,并收集同期住院的鼻咽癌病人的癌旁组织作为对照,通过免疫组织化学法和蛋白质印迹法(Western Blot),分析鼻咽癌中,ROCK1 的表达情况;然后使用 ROCK 的抑制剂 Y-27632 处理鼻咽癌细胞株 6-10B,来揭示 ROCK1 与鼻咽癌细胞侵袭的关系,以此来评估鼻咽癌中 ROCK1 的临床学意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2016 年 1—12 月,在临沂市河东区人民医院收集 30 例鼻咽癌病人病理组织,同期收集 30 例鼻咽癌的癌旁组织。所选标本都由该院两个病理科同事,进行双盲病理学检查确诊,这些标本都未进行化疗治疗。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,并且所选病人均签署知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂 二氧化碳培养箱(型号 371)购自 Thermo 公司;移液器、高速低温离心机(型号 5810R)购自 eppendorf 公司;超低温冰箱(型号 MDF-192)购自 SANYO 公司;垂直电泳仪购自 BioRad 公司;免疫组化试剂盒、BCA protein assay kit(P0010)购自碧云天生物试剂公司;ROCK1 抗体(#4035)购自 Cell Signalling Technology 公司; β -actin(BM0627)、二抗(BM2002)购自博士德公司。

1.3 免疫组织化学 将病理组织进行石蜡包埋,石蜡包埋后,进行切片,厚度为 4 μm ,将切片置于载玻片上,放在 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘片机上烘烤 1 h;再置于二甲苯 I 中浸泡 5 min,二甲苯 II 中浸泡 5 min;乙醇梯度水化;然后在蒸馏水中浸泡 2 min;进行柠檬酸盐抗原修复,将玻片置于室温自然冷却后。每张切片滴 50 μL ,3% 过氧化氢,室温 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;每张切片使用 50 μL 10% 山羊血清进行封闭,室温封闭 30 min;每张切片滴加 ROCK1 抗体,37 $^{\circ}\text{C}$,2 h;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;滴加二抗,室温 30 min;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;再滴加链霉素康生物素蛋白-过氧化酶,室温 30 min;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;用新鲜配制的 DAB 显色 3 min,在显微镜下掌握染色程度,自来水冲洗终止染色;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;苏木素复染,自来水冲洗后 1% 盐酸分化,自来水冲洗 5 min;梯度脱水,切片烤干,中性树胶封片,阅片。

1.4 细胞培养 鼻咽癌细胞株 6-10B 培养在 RPMI1640(含有 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)培养基中。永生化鼻咽上皮细胞株 NP69 培养在 KMSF 培养基中。将细胞株置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳的全湿环境下,进行培养。当细胞生长到融合度为 80% 左右时,进行细胞传代培养。在进行实验时,当细胞生长到对数生长期时,进行下一步实验处理。

1.5 药物处理 对鼻咽癌细胞株 6-10B 进行 ROCK1 抑制剂(Y-27632)的处理。当细胞培养到对数生长期时,将 Y-27632 加入到细胞培养基中,分别设两个浓度进行培养,10 μM 和 30 μM ,在药物处理 1 h 后,收集细胞,进行后续实验。

1.6 Western Blot 使用含有 1% 苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白;使用 BCA 法进行蛋白浓度测定。然后制备 10% 的 SDS-PAGE 凝胶,将蛋白加入上样 Buffer 后,加入孔中,进行垂直电泳,之后在全湿环境下,转膜(PVDF 膜),使用 5% 的牛血清白蛋白(BSA)进行封闭,加入 ROCK1 抗体进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。第 2 天 PBS 洗 3 次,每次 5 min,再进行 HRP-二抗孵育 2 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min,最后进行 ECL 发光液处理,暗室曝光。

1.7 细胞侵袭实验 在 Transwell 小室的提篮底部铺上 ECMatrix 胶,然后在里面加入 PRMI1640 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中。在 Transwell 小室的下室中加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,上室加入不含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,每孔加入一定浓度的细胞悬液,设置 3 个复孔,培养 24 h 后,进行染色,空气中干燥。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据分析采用 t 检验和单因素方差分析以及 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床标本中 ROCK1 的表达升高 在临床组织标本中,使用免疫组织化学法检测 ROCK1 在鼻咽癌组织中的表达情况(图 1)。图中棕褐色为 ROCK1 阳性表达,蓝色部分为 ROCK1 的阴性表达,观察结果显示,30 例鼻咽癌组织中,有 18 例阳性,12 例阴性;而对照组中只有 2 例阳性。说明鼻咽癌组中 ROCK1 的表达明显高于对照组($\chi^2 = 19.20$, $P < 0.0001$)。

2.2 细胞株中 ROCK1 的表达 为了揭示鼻咽癌中 ROCK1 的表达情况,使用了鼻咽癌细胞株 6-10B

和永生化鼻咽上皮细胞株 NP69,通过 Western Blot 方法,检测在细胞株中 ROCK1 的表达情况,如图 2 所示,与对照组(NP69) (0.43 ± 0.08) 相比,鼻咽癌组(6-10B)细胞中的 ROCK1 的表达 (1.25 ± 0.23) 明显升高($t = 3.187, P = 0.033$)。

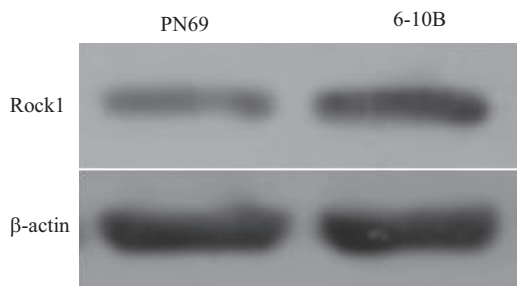


图2 ROCK1 在鼻咽癌组(6-10B)和对照组(NP69)细胞株中的表达

2.3 药物处理后 6-10B 中 ROCK1 表达 对鼻咽癌细胞株 6-10B 进行药物处理后,通过 Western Blot 方法,检测在细胞株中 ROCK1 的表达情况。如图 3 所示,未处理为 (2.6 ± 0.54), $10 \mu\text{M}$ Y-27632 处理为 (1.2 ± 0.78), $30 \mu\text{M}$ Y-27632 处理为 (0.73 ± 0.12)。随着 Y-27632 的浓度增加,ROCK1 的表达减少,差异有统计学意义($F = 5.76, P = 0.04$)。

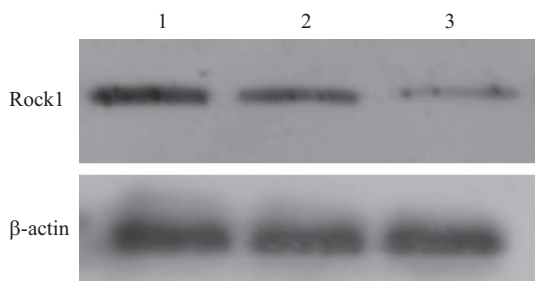
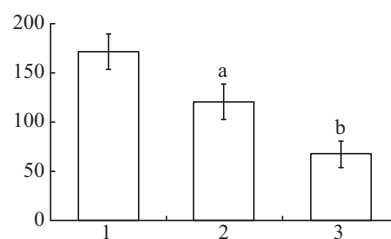


图3 Y-27632 处理前后 ROCK1 的表达:1 为未处理;2 为 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 处理;3 为 $30 \mu\text{M}$ Y-27632 处理

2.4 Transwell 小室检测药物处理前后细胞侵袭能力 以 6-10B 未处理组作为对照组, Y-27632 的 $10 \mu\text{M}$ 和 $30 \mu\text{M}$ 为实验组,通过 Transwell 小室实验,检测 Y-27632 处理前后细胞的侵袭能力。在 560 nm 处记录数值,三个组的数据为 (171.67 ± 17.89)、(120 ± 19.07) 和 (67.33 ± 13.58),差异有统计学意义($F = 29.65, P = 0.0008$)。

3 讨论

鼻咽癌是一种异质性实体瘤,我国为鼻咽癌高发区,尤其是华南和香港等地区^[4-5]。在 2010 年,报道显示,在我国华南地区鼻咽癌的发病率和死亡率均为 19.5%,包括香港在内,每 10 万人有 7.7 人高发鼻咽癌^[6]。目前关于鼻咽癌的病因,大致总结为:遗传成分,如染色体 1、3、9、11、12 和 14 的畸变;



注:a 表示与 1 相比, $t = 3.45, P = 0.025$; b 表示与 1 相比, $t = 8.40, P = 0.001$

图4 Y-27632 处理前后 6-10B 细胞的侵袭能力:1 为未处理;2 为 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 处理;3 为 $30 \mu\text{M}$ Y-27632 处理

感染因素,如 Epstein Barr 病毒(EBV)和环境因素等。根据 WHO 分类,鼻咽癌的病理类型分为角化性鳞状细胞癌(I 型,称为高分化),分化鼻咽非角化性癌(II 型,称为中度分化),未分化癌(III 型,称为低分化)^[7]。事实上,在上述发病率高的地区,至少有 95% 的鼻咽癌病人是低分化的病理类型^[8]。目前放疗和化疗是鼻咽癌的主要治疗手段^[9]。但不幸的是,大约有 20% 的鼻咽癌病人在治疗后仍有局部复发^[10-11]。在鼻咽癌复发因素中,鼻咽癌细胞的侵袭性,被认为起到了重要的作用。

ROCK1 蛋白在细胞骨架蛋白重排和细胞粘附上,具有重要作用。有文献报道,ROCK1 蛋白在乳腺癌、肺癌及肝癌中都有高表达^[3]。在本研究中,我们使用临床标本和细胞株发现,ROCK1 在实验组中的表达均明显高于对照组,提示 ROCK1 蛋白与鼻咽癌的发生存在相关性,这与我们及其他研究者^[12]在其他实体瘤中的报道相一致。先前研究表明,ROCK1 的高表达可以促进肿瘤细胞的侵袭^[13-14]。Rho/ROCK 信号通路是细胞侵袭的重要机制之一^[15-16]。当 Rho GTP 结合 ROCK 蛋白后,ROCK 蛋白构象发生了改变,将其催化结构域充分暴露了出来,从而使 ROCK 可以激活下游效应分子^[17]。在前列腺癌和其他恶性肿瘤中,研究者均发现,ROCK1 在促进肿瘤的侵袭和转移中,起到了非常重要的作用^[18]。在本研究中,我们也发现,在鼻咽癌细胞株 6-10B 中,使用 Y-27632 去抑制 ROCK1 的表达,随着抑制剂浓度的增加,鼻咽癌细胞株的细胞侵袭性减弱,差异有统计学意义。提示 ROCK1 蛋白与鼻咽癌的侵袭性相关。

总之,本研究的结果表明,ROCK1 基因在鼻咽癌组织和细胞株中均高表达,揭示 ROCK1 与鼻咽癌的发展相关。本研究为今后的临床治疗和靶标药物的开发提供了理论基础。

(本文图 1 见插图 8-5)