

Fat1 蛋白在下咽癌中的表达及在侵袭转移过程中的作用

曾俊丰,吴 平,唐瑶云,谢楚波,汪 炜

(中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科 耳鼻咽喉重大疾病湖南省重点实验室,湖南 长沙 410008)

摘 要: **目的** 探讨 Fat1 蛋白在下咽癌中的表达及其生物学行为。**方法** 应用免疫组织化学染色检测组织中 Fat1 蛋白的表达水平,采用 Kaplan-Meier 法分析 Fat1 蛋白的表达与下咽癌患者生存期的关系。siRNA 干扰下咽癌 Fadu 细胞中 Fat1 蛋白的表达;Western blot 法检测 siRNA 干扰后 Fat1 蛋白的表达;CCK-8 实验检测细胞增殖能力;克隆形成实验检测细胞成瘤能力;划痕实验、Transwell 小室实验检测其侵袭、迁移能力。**结果** Fat1 蛋白主要在胞浆中表达,在下咽癌复发病例中的表达强度明显低于未复发患者($P=0.001$);低表达组患者总生存时间明显低于高表达组($P=0.001$)。体外实验提示,siRNA 下调 Fat1 蛋白后,Fadu 细胞生长能力明显高于对照组($P=0.004$),且细胞克隆数也明显高于对照组($P=0.001$);此外,下调 Fat1 蛋白后,Fadu 细胞的迁移能力高于对照组,且细胞穿越小室的细胞数明显高于对照组($P=0.000$)。**结论** Fat1 蛋白表达下调提示下咽癌患者预后较差;Fat1 蛋白能显著抑制下咽癌细胞的生长、增殖、侵袭、转移能力。

关 键 词: 下咽癌;Fat1;临床预后;侵袭;转移

中图分类号:R739.63 文献标识码:A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2018,24(1):45-49]

Expression of Fat1 in hypopharyngeal carcinoma tissues and its role in invasion and metastasis of the tumor

ZENG Jun-feng, WU Ping, TANG Yao-yun, XIE Chu-bo, WANG Wei

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Key Laboratory of Otolaryngology Major Disease Research of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Fat1 in hypopharyngeal carcinoma and its role in the biological behavior of the tumor. **Methods** The expression of Fat1 was detected by immunohistochemical staining, and the correlation between the expression of Fat1 and the survival time was analyzed by Kaplan-Meier survival analysis. siRNA was used to down-regulate Fat1 expression in Fadu cells, the expression of Fat1 protein was detected by Western blot; CCK-8 was used to evaluate cell proliferation. Clone forming test was used to estimate cell tumorigenicity, the invasion and migration ability were quantified by cell scratch test and transwell assay. **Results** Fat1 protein was mainly expressed in cytoplasm, and the staining intensity patients with recurrence was significantly lower than that in those without recurrence ($P=0.001$). The overall survival time of strong expression group was significantly higher than that of weak expression group ($P=0.001$). Moreover, down-regulation of Fat1 by siRNA enhanced the growing ability ($P=0.004$) and the number of cell clones ($P=0.001$) in Fadu cells. In addition, down-regulation of Fat1 promoted Fadu cells' migration and invasion ability ($P=0.000$). **Conclusions** Down-regulated expression of Fat1 indicates poor prognosis in hypopharyngeal carcinoma. Fat1 probably controls the growth, proliferation, invasion and metastasis of hypopharyngeal carcinoma cells.

Key words: Hypopharyngeal neoplasms; Fat1; Clinical prognosis; Invasion; Metastasis

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2018, 24(1): 45-49]

下咽癌是一种恶性程度较高的肿瘤,年发病率为(0.17~0.8)/10万,占全身恶性肿瘤的0.5%。由于早期下咽癌无明显症状,一经发现,肿瘤往往已是中晚期,严重影响治疗效果,目前临床统计5年生存率仅为25%~40%^[1]。因此,寻找合适的肿瘤分子标志物用于早期诊断及预后判断对下咽癌的临床

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81302355)。
作者简介:曾俊丰,男,在读硕士研究生。
通信作者:吴 平,Email:623735213@qq.com

诊治大有裨益。

Fat1 蛋白是果蝇 Fat 基因的同源基因,其编码的蛋白能控制果蝇发育过程中的细胞增殖,被认为是一种肿瘤抑制蛋白。最近,有研究报道 Fat1 基因在多种人类肿瘤中发生突变,包括头颈部鳞状细胞癌^[2]。进一步研究表明,Fat1 基因突变能激活 Wnt 信号传导通路及多种人类癌症的发生,并影响患者的生存^[2]。本研究旨在明确 Fat1 蛋白在下咽癌中的表达特点和对患者预后的影响;并通过体外实验探讨 Fat1 蛋白对下咽癌生长、增殖、侵袭、转移功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 组织样本选取于 2007 年 4 月 ~ 2012 年 3 月在湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科行手术治疗 88 例下咽癌患者石蜡切片癌组织及 24 例经病检确诊的鳞状上皮组织。其中,男性患者 84 例,女性患者 4 例;年龄 38 ~ 77 岁,平均年龄为 58.1 岁。病理分型:高中分化鳞癌 77 例、低分化鳞癌 11 例。临床分期(AJCC 标准):I 期 3 例、II 期 18 例、III 期 26 例、IV 期 41 例;有颈部淋巴结转移者 50 例,无颈部淋巴结转移者 38 例。术后随访时间不少于 5 年,随访发现肿瘤复发者 39 例,无复发者 44 例(其中有 5 例患者失访)。下咽癌细胞系 Fadu 细胞购自中国科学院细胞库(上海)。

1.1.2 主要试剂、抗体 兔二步法检测试剂盒(PV-9001)购自中杉金桥公司,DMSO、Lipofectamine[®] RNAiMAX 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,DMEM HIGH Glucose 购自美国 Hyclone 公司,特级胎牛血清购自 Gibco 公司,Fat1(兔抗人)抗体、 β -actin(鼠抗人)抗体购自 Abcam 公司,FAT1 siRNA(sc-88872)购自美国 Santa Cruz Biotechnology。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色检测 Fat1 蛋白的表达采用免疫组化 PV-9001 二步法。具体实验步骤为:石蜡切片脱蜡后常规水化,将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液中,微波炉中火加热至沸腾,然后持续小火加热 15 min,冷却后 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。以 3% 去离子水孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶反应。PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加试剂 1,室温下孵育 15 min,取出后 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。滴加试剂 2,室温下孵育

15 min,取出后 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。新鲜配制的 DAB 显色,苏木素染核,盐酸乙醇分化,冲洗 15 min。脱水、透明,中性树胶封片后,显微镜观察。

1.2.2 免疫组织化学检测结果判定 在光镜下随机观察切片 10 个高倍视野(10×40),以阳性细胞百分率与阳性细胞染色强度两者的乘积作为总分对结果进行判定。结果采用总分 12 分制,按照阳性细胞所占百分比 $\leq 25\%$ 计 1 分,26% ~ 50% 计 2 分,51% ~ 75% 计 3 分,76% ~ 100% 计 4 分;按阳性细胞染色强度计算:无染色计 0 分,淡黄色计 1 分,中等黄色计 2 分,棕黄色染色计 3 分。最终评定总分 1 ~ 4 分计为低表达组,5 ~ 12 分的计为高表达组。由两名未参与实验的病理科医生独立观察切片,协助判断免疫组化结果。

1.2.3 siRNA 转染 Fadu 沉默 Fat1 基因 ①将待转染 Fadu 细胞接种于六孔板中,密度约为 2×10^5 个/ml,待细胞融合率约为 30% ~ 50% 时,进行下一步转染实验;②取无血清培养基 150 μ l 稀释 9 μ l Lipofectamine[®] RNAiMAX,并小心混匀;③另取 150 μ l 无血清培养基,加入 siRNA 30 pmol,混匀后加入到步骤②中的溶液中,并小心混匀,形成 siRNA-Lipofectamine[®] RNAiMAX 复合物,室温放置 5 min;④将 siRNA-Lipofectamine[®] RNAiMAX 复合物加入到六孔板中,并小心混匀。然后继续培养,4 ~ 6 h 后更换新鲜细胞培养基。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达情况 转染 48 h 后收集各组细胞提取总蛋白,采用 BCA 法对蛋白定量后,取 30 μ g 蛋白加入上样缓冲液后混匀,95 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min。60 V 浓缩胶,100 V 分离胶电泳分离蛋白质,280 mA 100min 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。转膜结束后,置入 5% 脱脂奶封闭 1 h 加入 I 抗,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,PBS 溶液漂洗 3 次,每次 5 min。加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗室温孵育 1 h,PBS 溶液漂洗 3 次,每次 5 min,将 ECL 液工作液均匀滴加在条带表面,于凝胶自动成像系统曝光,用 Image J 软件进行分析。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞生长情况 将处于对数生长期的细胞制成 2×10^4 个/ml 的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,细胞融合度达到 30% 时按以上方法进行转染。转染 24 h 后换液,在换液后 0、24、48、72、96 h 时,吸净培养基,每孔分别加入浓度为 10% 的 CCK-8 培养基混合溶液,充分混匀后继续培养细胞 1 h;在酶标仪上测量各孔在波长 450 nm 处的 OD 值,并做好记录。实验重复 3 次。

1.2.6 平板克隆形成实验 接种 200 个细胞于 6 孔板中,加入培养基 37℃ 培养箱中培养 2 周。待克隆形成后,吸走培养液,甲醇室温固定 10 min,1 × 结晶紫染色 5 min,拍照计数,各组设置 3 个复孔,重复 3 次。

1.2.7 划痕试验 接种 5 × 10⁵ 个细胞铺至 6 孔板中,细胞长至融合度 70% ~ 80% 时用 200 μl 无菌 Tip 头在 6 孔板底部划一直且均匀的划痕。清洗去除漂浮的细胞,拍照后加入无血清培养基继续培养。并在 12、24、48 h 后,观察划痕愈合情况,设置复孔并重复 3 次。

1.2.8 Transwell 细胞迁移实验 在 24 孔板中放入 8 μm 的 Boyden 小室(Corning),准备好无血清细胞悬液,计数板计数后在上室中准确加入整细胞密度为 3.0 × 10⁵ 个/ml 的细胞悬液,每个小室上室中加入 100 μl 细胞悬液,并轻轻摇匀;下室中加入含有 10% 特级胎牛血清培养基作为趋化因子,处理完毕后,继续放入培养箱中培养。48 h 后将小室取出。PBS 清洗 3 遍,加入甲醇固定细胞 30 min,0.1% 结晶紫(Sigma)染色 20 min。将结晶紫吸出,用 PBS 清洗 3 遍,放在显微镜下(× 200)观察,随机选取 5 个高倍视野,计算基底膜下室面染色的细胞数量,每个标本重复 3 次,取其平均值。

1.2.9 统计学处理 计数资料采用卡方检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较使用独立样本 *t* 检验。多个样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),Kaplan-Meier 法分析计算下咽癌症患者 Fat1 不同表达水平的组间患者的总生存率;两组间生存率的差异分析采用 Log-rank 法。由 SPSS 17.0 统计软件完成,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Fat1 蛋白在下咽癌组织及癌旁组织中的表达情况

Fat1 蛋白主要在胞膜和胞浆中表达,同时以出现棕黄色为阳性染色。88 例癌组织中 65 例 Fat1 蛋白为高表达,23 例为低表达;24 例癌旁组织中 20 例高表达,4 例低表达(图 1ABC)。癌组织与癌旁组织的表达强度无明显统计学差异。进一步分析 Fat1 蛋白的表达强度与临床病理参数的相关性,发现 Fat1 蛋白的表达与年龄、性别、病理分级、T 分级、临床分期、是否淋巴结转移无明显差异性,但与肿瘤是否复发有明显差异,复发病例中 Fat1 蛋白的表达强度明显低于未复发患者(*P* = 0.001,表 1)。

表 1 Fat1 蛋白在下咽癌不同临床病理参数病例中的表达情况 (例)

临床特征	例数	Fat1 蛋白表达		<i>P</i>
		高表达	低表达	
年龄(岁)				
≥58	52	36	16	0.325
<58	36	29	7	
性别				
男	84	61	23	0.569
女	4	4	0	
病理分级				
高中分化	77	59	18	0.147
低分化	11	6	5	
T 分级				
T1、T2	34	26	8	0.804
T3、T4	54	39	15	
临床分期				
I、II	21	15	6	0.781
III、IV	67	50	17	
淋巴结转移				
N0	47	37	10	0.333
N+	41	28	13	
有无复发				
有	39	21	18	0.001
无	44	39	5	

2.2 Fat1 蛋白表达水平与下咽癌患者预后之间的关系

为了进一步分析 Fat1 蛋白的表达是否与下咽癌患者的总生存率相关,本研究使用 Kaplan-Meier 曲线及 Log-rank 检验比较 Fat1 蛋白低表达组与高表达组两组患者的总生存率差异,发现 Fat1 蛋白低表达组患者总生存时间(36.9 ± 3.1)个月明显低于高表达组(49.6 ± 2.1)个月(*P* = 0.001,图 1D)。

2.3 沉默 Fat1 对细胞增殖和集落形成能力的影响

为了研究 Fat1 蛋白对细胞生长增殖能力的影响,我们用 mock-siRNA、Fat1-siRNA 转染 Fadu 细胞,用 CCK-8 法分别检测 5 个不同时间点细胞的生长情况。结果显示,Fat1-siRNA 转染的 Fadu 细胞生长能力明显高于对照组(*P* = 0.004,图 2B)。另外,我们用平板克隆形成实验进一步观察 Fat1 表达下调后对 Fadu 细胞增殖能力的影响。结果如下,Fat1-siRNA 转染的 Fadu 细胞的克隆数 154 ± 11.4 明显高于对照组 96 ± 8.3,并且克隆集落明显大于对照组(*P* = 0.001,图 3A)。

2.4 沉默 Fat1 蛋白对细胞侵袭转移能力的影响

下咽癌容易早期发生淋巴结转移。因此我们进行了侵袭与转移能力的研究。我们将细胞株进行了划痕实验和 Transwell 实验,划痕实验结果显示 Fat1-siRNA 转染的 Fadu 细胞的迁移能力高于 mock-siRNA 转染细胞(图 3C)。为进一步验证这一结果,Tr-

answell 体外侵袭试验结果显示 Fat1-siRNA 转染的 Fadu 细胞穿越小室的细胞数 226 ± 16.6 明显高于对照组 115 ± 12.7 ($P=0.000$,图 3B)。

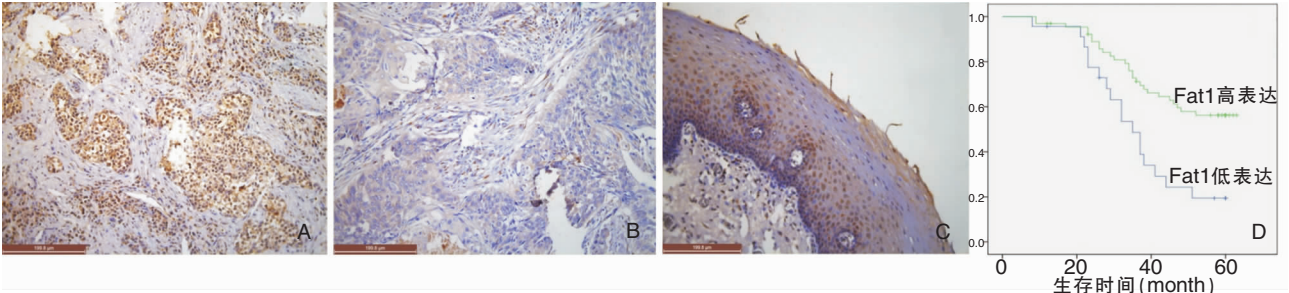


图 1 Fat1 蛋白在下咽癌中的表达（免疫组化 ×200）A:Fat1 蛋白在下咽癌组织中高表达;B:Fat1 蛋白在下咽癌组织中低表达;C:Fat1 蛋白在癌旁黏膜组织中高表达;D:Fat1 蛋白的表达强度与下咽癌生存时间的关系

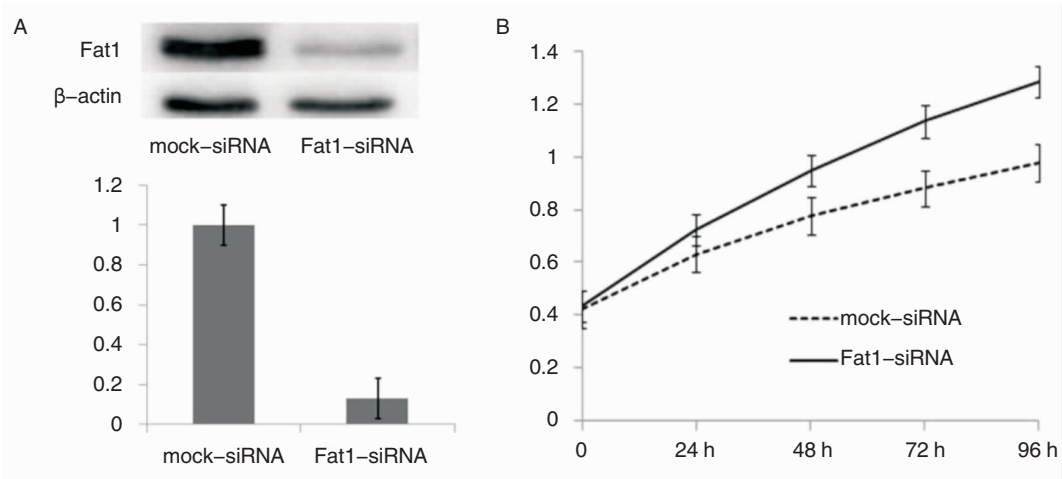


图 2 siRNA 干扰后 Fat1 蛋白的表达情况及对细胞生长的影响 A:Western blot 显示 siRNA 转染后 Fat1 蛋白的表达明显下调;B:CCK-8 法显示 mock-siRNA、Fat1-siRNA 2 组细胞在不同时间点的生长增殖情况

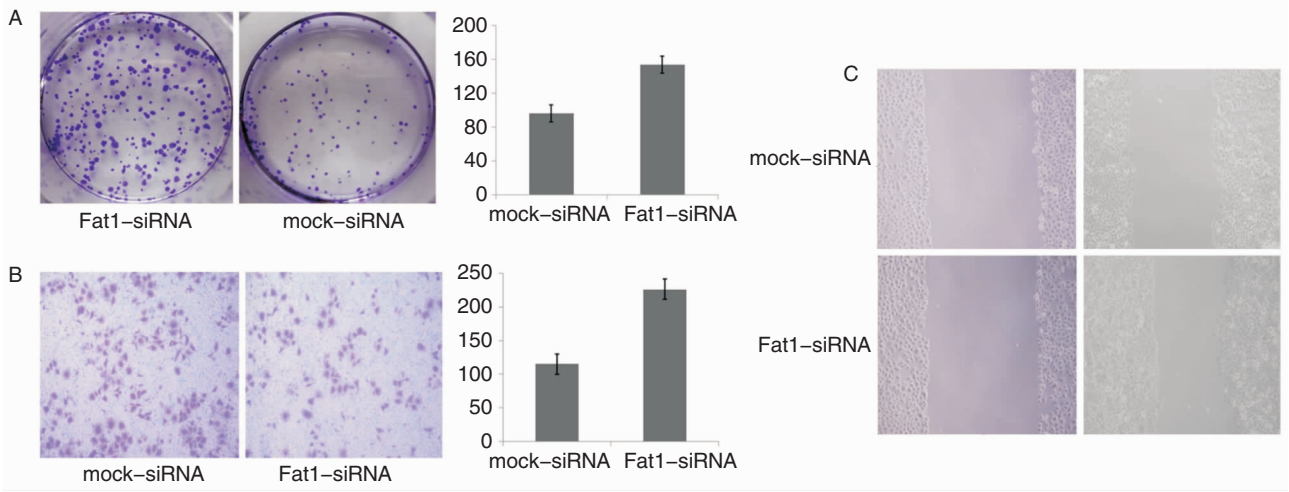


图 3 下调 Fat1 蛋白对细胞克隆形成、侵袭、转移能力的影响 A:克隆形成实验显示 mock-siRNA、Fat1-siRNA 2 组细胞的成瘤能力;B:Transwell 实验显示 mock-siRNA、Fat1-siRNA 2 组细胞的转移能力;C:划痕实验显示 mock-siRNA、Fat1-siRNA 2 组细胞的侵袭能力

3 讨论

Fat1 蛋白是 Fat 基因家族中的 1 型跨膜蛋白。它包括 34 个钙黏蛋白重复序列,5 个表皮生长因子(EGF)以及 1 个层黏连蛋白 A-G 域^[3]。Fat1 蛋白经过蛋白水解裂解释放胞内结构域(ICD),ICD 能够进入细胞核^[4],而且能与 β -catenin 结合并防止其移位到核内^[2]。此外,还能与 Ena/VASP 及 Scribble 蛋白结合,促进肌钙蛋白介导的细胞迁移及抑制 YAP1 介导的细胞增殖^[5-6]。

近年来研究表明,钙黏蛋白不仅作为一种机械性的黏附分子,而且参与信号传导通路,在调控细胞的分子生物学行为中起着重要的作用。Wang 等^[7]研究发现 Fat1 蛋白在乳腺导管原位癌(DCIS)的表达量要明显高于在浸润性导管癌(IDC),并且 Fat1 蛋白的表达缺失提示肿瘤进展和预后不佳。Kwaepila 等^[8]通过免疫组化方法观察 Fat1 蛋白在人类乳腺癌组织中的表达,发现 Fat1 在原位癌和侵袭癌的过表达和弥散性表达与乳腺癌发病、侵袭及转移有关。

此外,最近的 2 个大规模外显子测序研究显示,Fat1 蛋白在头颈鳞癌中有明显和较高频次的突变^[9-10]。Kim 等^[11]发现 Fat1 基因突变在非人乳头状病毒感染的头颈鳞癌中频率较高,大部分的无义突变均可导致 Fat1 蛋白功能丧失,并且发现 Fat1 基因突变是肿瘤不良预后的独立影响因子。这些研究表明 Fat1 蛋白在多种恶性肿瘤中表达失活或低表达,提示 Fat1 蛋白很可能是一种抑癌基因。

本研究发现与癌旁黏膜组织相比,Fat1 蛋白在下咽癌组织中的表达下调,并且无表达或弱表达 Fat1 蛋白提示不良预后。这说明 Fat1 蛋白很可能在下咽癌中是一种抑癌基因。为了进一步研究 Fat1 蛋白在下咽癌中所起的生物学功能,我们在体外实验通过 siRNA 下调 Fat1 蛋白的表达,与对照组相比,沉默 Fat1 蛋白明显增强了 Fadu 细胞的生长、增殖、侵袭、转移能力,该结果进一步证实了 Fat1 蛋白起到了抑制下咽癌肿瘤发展的作用。

Morris 等^[2]研究表明,Fat1 蛋白功能失活能解除对 β -catenin 的绑定,激活 Wnt- β -catenin 信号传导通路,进而促进细胞的生长增殖。并发现 Fat1 蛋白通过阻断 MAPK/ERK 信号通路抑制上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)的形成。这些研究表明 Fat1 蛋白可能通过多条信号通路调控细胞的生长、增殖及侵袭、转移能力。综上所述,

我们首次证实 Fat1 蛋白在下咽癌中表达下调,并在体外实验中发现 Fat1 蛋白可抑制下咽癌细胞的增殖、成瘤、迁移及侵袭能力。下咽癌中 Fat1 蛋白失活及表达下调会增强肿瘤的恶性程度。深入了解 Fat1 蛋白在下咽癌发病、侵袭转移等过程中的具体机制,对认识下咽癌的发生发展及治疗抗性发生具有重要意义,为下咽癌的治疗提供新策略和新靶点。

参考文献:

- [1] 潘新良,雷大鹏,许风雷,等. 下咽癌的外科治疗[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2007, 21(1): 1-7.
Pan XL, Lei DP, Xu FL, et al. Surgical treatment of hypopharyngeal carcinoma[J]. Journal of Otolaryngology and laryngophthology in Shandong University, 2007, 21(1): 1-7.
- [2] Morris LGT, Kaufman AM, Gong Y, et al. Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation, 2013, 45(3): 253-261.
- [3] Dunne J, Hanby AM, Poulosom R, et al. Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the Drosophila fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule[J]. Genomics, 1995, 30(2): 207-223.
- [4] Magg T, Schreiner D, Solis GP, et al. Processing of the human protocadherin Fat1 and translocation of its cytoplasmic domain to the nucleus[J]. Exp Cell Res, 2005, 307(1): 100-108.
- [5] Moeller MJ, Soofi A, Braun GS, et al. Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization, 2004, 23(19): 3769-3779.
- [6] Tanoue T, Takeichi M. Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact[J]. J Cell Biol, 2004, 165(4): 517-528.
- [7] Wang L, Lyu S, Wang S, et al. Loss of FAT1 during the progression from DCIS to IDC and predict poor clinical outcome in breast cancer[J]. Exp Mol Pathol, 2016, 100(1): 177-183.
- [8] Kwaepila N, Burns G, Leong AS. Immunohistological localisation of human FAT1 (hFAT) protein in 326 breast cancers. Does this adhesion molecule have a role in pathogenesis[J]. Pathology, 2006, 38(2): 125-131.
- [9] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas[J]. Nature, 2015, 517(7536): 576-582.
- [10] India Project Team of the International Cancer Genome Consortium. Mutational landscape of gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma reveals new recurrently-mutated genes and molecular subgroups[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2873.
- [11] Kim KT, Kim BS, Kim JH. Association between FAT1 mutation and overall survival in patients with human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma[J]. Head Neck, 2016, 38 Suppl 1: E2021-E2029.

(收稿日期: 2017-12-01)