论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0554-04

IRF-4结合蛋白对人涎腺腺样囊性癌细胞增殖的抑制作用

熊 剑[1,3],简从相[1],李 鹏[2],范 舒[2],申 涛[1],常慧君[1],胡川闽[2],周继祥[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院口腔科[1],临床生物化学教研室[2];437100 湖北 咸宁,咸宁学院口腔系[3])

【摘要】 **目的** 探讨IRF-4结合蛋白(IRF-4 binding protein,IBP)对人涎腺腺样囊性癌细胞增殖的影响。**方法** 用免疫组化(S-P法)染色技术对27例人涎腺腺样囊性癌组织和20例正常涎腺组织标本进行IBP表达的检测和分析。用脂质体法转染IBP过表达及空白对照载体至人腺样囊性癌细胞株ACC2,G418筛选后建立IBP稳定表达细胞株;MTT法和平板克隆形成实验检测IBP表达对ACC2细胞增殖的影响。**结果** IBP在20例正常涎腺中全部表达阳性,在27例涎腺腺样囊性癌中仅3例低表达,余皆不表达,阳性率为11.11%;将IBP转染入ACC2细胞内以后,其增殖明显受到抑制($P<0.05$);同时克隆形成实验显示IBP转染组的克隆形成率明显低于空白质粒对照组(分别为48%、92%,$P<0.05$)。**结论** IBP能明显抑制腺样囊性癌细胞的增殖。

【关键词】 免疫组化;IRF-4结合蛋白;克隆形成

【中图法分类号】 R341;R730.23;R739.87 **【文献标志码】** A

Inhibitory effect of IRF-4 binding protein on proliferation of human salivary adenoid cystic carcinoma cells

Xiong Jian[1,3], Jian Congxiang[1], Li Peng[2], Fan Shu[2], Shen Tao[1], Chang Huijun[1], Hu Chuanmin[2], Zhou Jixiang[1]([1]Department of Stomatology, Southwest Hospital, [2]Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Stomatology, Xianning University, Xianning, Hubei Province, 437100, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of IRF-4 binding protein (IBP) on human salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) cell proliferation. **Methods** IBP expression was detected and analyzed in 27 paraffin-embedded human SACC tissue specimens and 20 paraffin-embedded normal salivary gland tissue specimens with immunohistochemical staining (S-P method). ACC2 human SACC cells was transfected with plasmid pEGFP-C1/IBP (IBP group) and blank control plasmid pEGFP-C1 (control group) *via* lipofection. Then, the positive cells were screened with G418 to establish a cell strain with stable IBP overexpression. The effect of IBP on ACC2 cell proliferation was studied with MTT method and plate colony formation assay. **Results** IBP was positively expressed in all normal salivary gland tissue specimens, weakly expressed in 3 human SACC tissue specimens, and not expressed in other 24 SACC tissue specimens (IBP positive rate = 11.11% in human SACC tissue specimens). The proliferation of ACC2 cells in the IBP group was significantly inhibited ($P<0.05$). In addition, the colony formation assay results indicated that the colony formation rate of the IBP group was significantly lower than that of the control group (48% *vs* 92%, $P<0.05$). **Conclusion** IBP can significantly inhibit SACC cell proliferation.

【Key words】 IRF-4 binding protein; salivary adenoid cystic carcinoma; inhibition

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30901458) and the Nature Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BB5027). Corresponding author: Zhou Jixiang, Tel: 86-23-68754387, E-mail: Zhoujx6518@sina.com

IRF-4结合蛋白(IRF-4 binding protein,IBP)是近来发现的和免疫反应相关的一个分子,主要表达于T淋巴细胞并发挥重要作用[1]。新近发现IBP具有鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors,GEF)活性[2],能够激活Rho GTPase家族的部分成员:Rac1、Cdc42、RhoA[3]。Rho GTPase在肿瘤的发生与发展过程中有着重要的作用,Rho GTPase通过调节肿瘤细胞基因转录活性、细胞分裂、细胞凋亡及肿瘤细胞与周围基质细胞间相互作用从而影响肿瘤的演进[4]。已有

【基金项目】 国家自然科学基金(30901458);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5027)
【通信作者】 周继祥,电话:(023)68754387,E-mail:Zhoujx6518@sina.com

研究证实,IBP在乳腺癌和结肠癌中高表达[5-6]。我们在前期工作中发现在口腔鳞癌中也存在IBP的表达,且与鳞癌细胞的增殖与侵袭能力的强弱相关。作为一种特殊的口腔肿瘤,人涎腺腺样囊性癌具有沿神经扩散、易复发易转移的特点,IBP是否在腺样囊性癌中表达及其功能值得进一步研究。我们采用免疫组化方法(S-P法),检测27例人涎腺腺样囊性癌组织和20例正常涎腺组织中IBP的表达;并以腺样囊性癌ACC2细胞株为工具细胞,构建了稳定高表达IBP的细胞株,探讨IBP的稳定高表达对腺样囊性癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

收集本院及重庆医科大学附属口腔医院病理科2006-2010年手术切除的人涎腺腺样囊性癌石蜡标本27例及正常涎腺组织20例作对照。免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥;人腺样囊性癌细胞株ACC2由成都四川大学华西医学中心细胞生物学教研室提供;质粒pEGFP-C1(即空白对照质粒)、pEGFP-C1/IBP由美国哥伦比亚大学Pernis教授馈赠,由第三军医大学临床生化教研室保存;SunBio™ Trans-EZ常见细胞系转染试剂购自上海生博;G418购自Invitrogen公司;DMSO购自Sigma公司;MTT购自上海捷瑞生物工程有限公司;一抗鼠抗IBP单抗由第三军医大学临床生化教研室制备;二抗羊抗鼠购自北京中杉金桥公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天;Bio-Rad酶联免疫检测仪。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 采用S-P法染色,基本步骤严格按试剂盒说明书进行:石蜡切片常规脱蜡至水;高温高压抗原修复;3% H_2O_2室温阻断15 min;0.5% Triton X-100/PBS破膜处理10 min;0.025% Triton X-100/PBS洗2次,5 min/次;PBS洗片后加入5%正常山羊血清37 ℃孵箱中封闭60 min;滴加一抗工作液4 ℃孵育过夜;PBS洗片后加入二抗于37 ℃孵箱中孵育30 min;PBS洗片后加入辣根酶标记链霉卵白素工作液37 ℃孵箱中孵育30 min;PBS洗片后DAB显色,苏木精复染,脱水透明、封片,光镜下观察。PBS代替一抗作为阴性对照。由2名有经验的病理科医师独立阅片并取均值。结果判定IBP阳性染色为棕黄色颗粒,主要定位于细胞质。选取5个高倍视野(×400)计数200个肿瘤细胞中表达的阳性细胞数:阳性细胞数<10%为(-)、10%~25%(+)、26%~75%(++)、>75%(+++),++以上为强阳性。

1.2.2 细胞转染及转染后的鉴定 选择恶性度较低的腺样囊性癌细胞株ACC2,转染前1 d,将细胞接种到24孔板中,每个孔中加入1.5×10^5~2×10^5细胞。控制细胞转染时的密度为60%~80%。转染前1 h取出细胞板,去除原有细胞培养基,加入400 μl的Opti-MEM培养基,将细胞送回培养箱。取1.5 ml Ep管2支,其中1支加入1 μg待转染质粒,用Opti-MEM培养基补齐到30 μl。另1支中加入1 μl Trans-pri-N溶液和29 μl Opti-MEM培养基,用移液器轻轻混匀。将Trans-EZ稀释液滴加到质粒管中,边加边轻轻弹匀。在室温放置20 min,使DNA和Trans-pri-N充分结合形成转染复合体。取出细胞培养板,将DNA-Trans-pri-N复合体加入到细胞中,做好标记。放回培养箱。4~6 h后,除去细胞上清。更换为500 μl的正常完全培养基。pEGFP-C1、pEGFP-C1/IBP质粒因携带增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因表达框,导入细胞后会呈现绿色荧光,转染24 h后,通过荧光显微镜观察质粒转染效率及荧光效果。

1.2.3 转染细胞的筛选、单克隆及建立细胞株 转染后24 h,选择荧光强度最强的pEGFP-C1和pEGFP-C1/IBP组细胞进行后续实验。胰酶消化荧光强度最强的2组细胞制备细胞悬液,接种细胞于一新24孔板,继续培养24 h。按照400 mg/L的浓度加入G418筛选试剂(1mol/L Hepes 1 ml溶解1 g G418后补充无菌纯水至10 ml后过滤除菌,-20 ℃保存)进行筛选。筛选7 d后,荧光显微镜观察细胞荧光强度,选择24孔板中荧光强度高的孔以有限稀释法进行单克隆,并将96孔板中荧光强度高的单个克隆细胞扩大培养,建立稳定转染的细胞株,即ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞。

1.2.4 Western blot鉴定IBP的表达 将建株成功的ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞以及ACC2细胞收集起来,提取总蛋白,用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测3株细胞株中IBP蛋白的表达:各样品取60 μg/孔的蛋白量加样到7.5%的SDS-PAGE蛋白电泳;半干电转移蛋白质到PVDF膜,恒压18 V电转,时间45 min;5%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗鼠抗IBP(1∶1 500)4 ℃过夜;TBST洗膜后加入二抗羊抗鼠(1∶7 500)37 ℃孵育1 h;TBST洗膜后显色。用Jurkat细胞作阳性对照。

1.2.5 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期的ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞进行细胞计数,按2×10^3/孔接种于96孔板,2株细胞在同一96孔板中各设30复孔,如上法共接种7块96孔板。分别于1、2、3、4、5、6、7 d后取出1块96孔板,加入20 μl MTT继续培养4 h,弃去培养基,每孔加DMSO 150 μl,振荡10 min,在酶联免疫检测仪570 nm处测量各孔的光密度值[D(570)],记录结果。

1.2.6 平板克隆形成实验 取对数生长期的ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞分别以100/孔接种于同一6孔板中,各设3复孔。以含10%胎牛血清的1640培养液培养2周。弃去培养液,用PBS小心浸洗,4%多聚甲醛固定30 min。弃去固定液,PBS浸洗2遍,伊红染色液染1 min,再用苏木精体细胞快速染色液染30 s,流水缓慢洗去染液,空气干燥。计数每组克隆数(50个细胞以上为1个克隆)。按公式计算克隆形成率。

克隆形成率=(克隆形成数目/接种细胞数)×100%

1.3 统计学分析

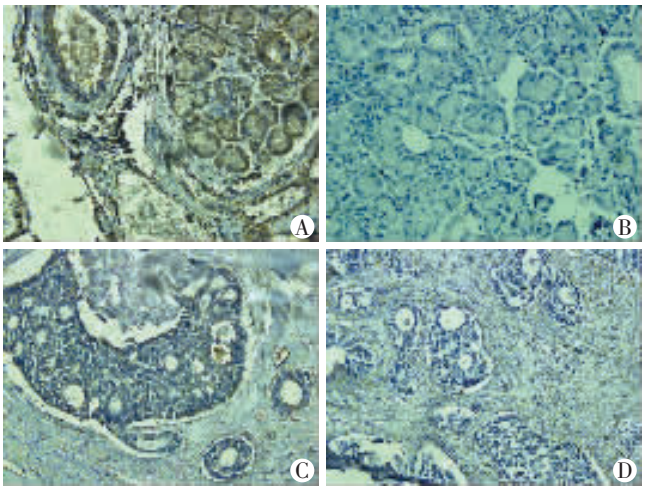
计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件行χ^2检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 人正常涎腺和涎腺腺样囊性癌中IBP的表达

IBP主要定位于细胞质,阳性表达为棕黄色颗粒。结果显示:27例人涎腺腺样囊性癌中仅3例IBP基因表达弱阳性,阳性率为11.11%;20例正常涎腺组织中则全部表达阳性,2组间

差异有统计学意义($P<0.05$)。而IBP的表达与患者的年龄、性别及肿瘤部位均无关($P>0.05$)。见图1,表1。



A:正常涎腺组织中呈阳性表达;B:正常涎腺组织阴性对照;C:腺样囊性癌组织中呈弱阳性表达;D:腺样囊性癌组织阴性对照

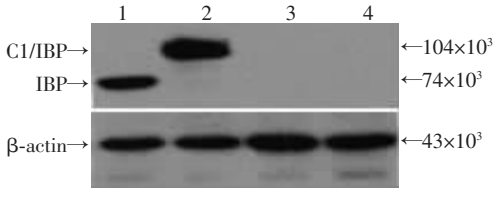
图1　免疫组化染色观察IBP在正常涎腺组织和腺样囊性癌中的表达　(S-P ×40)

表1　IBP在涎腺腺样囊性癌中的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
年龄				
<55岁	12	1	11	8.33
≥55岁	15	2	13	13.33
性别				
男	12	1	11	8.33
女	15	2	13	13.33
肿瘤部位				
大涎腺	18	2	16	11.11
小涎腺	9	1	8	11.11

2.2　Western blot鉴定IBP的表达

IBP的相对分子质量为74×10^3,C1/IBP因为携带EGFP,相对分子质量增大为104×10^3。见图2。Western blot结果表明,稳定高表达IBP的ACC2-C1/IBP细胞株已成功建立。



1:Jurkat;2:ACC2-C1/IBP;3:ACC2-C1;4:ACC2

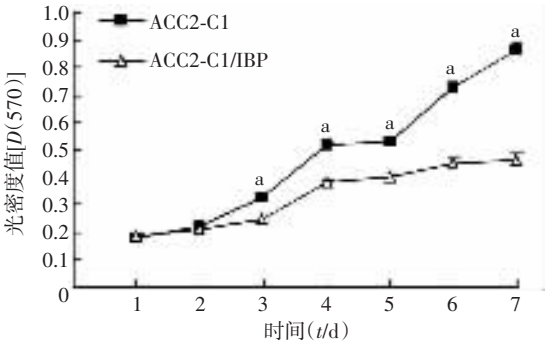
图2　Western blot检测ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞株中IBP的表达

2.3　MTT检测细胞增殖

MTT法检测结果显示:ACC2-C1/IBP的增殖速率从第3天起就开始明显低于ACC2-C1($P<0.05$),说明IBP明显抑制了ACC2的增殖。见图3。

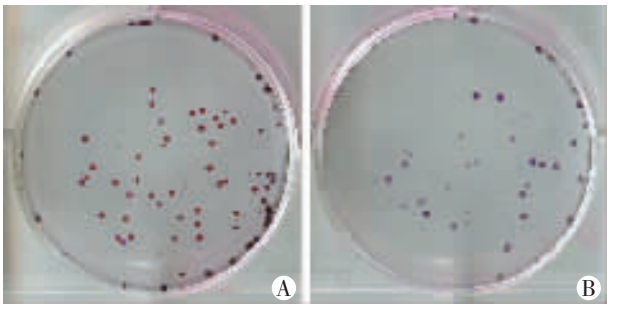
2.4　克隆形成

ACC2-C1/IBP的克隆形成数较少,克隆体积较小,ACC2-C1/IBP的克隆形成率(48%)明显低于ACC2-C1(92%,$P<0.05$)。见图4。



a:$P<0.05$,与ACC2-C1/IBP比较

图3　MTT法检测ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞株的增殖



A:ACC2-C1;B:ACC2-C1/IBP

图4　ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞株克隆形成实验结果观察

3　讨论

IBP是Gupta等[1]于2002年通过酵母双杂交技术从人淋巴结cDNA文库中筛选出的1个与IRF-4具有潜在结合作用的蛋白,主要表达于T淋巴细胞,在TCR信号下募集到免疫突触,发挥GEF活性[2],在免疫突触形成及细胞骨架重建中发挥作用。同年Altman研究组分离出鼠IBP基因,发现鼠IBP可能与Th2细胞极性分化相关[7]。2004年Mavrakis等[3]发现IBP能够激活Rho GTPase家族的部分成员:Rac1、Cdc42、RhoA。2006年Fanzo等[8]建立IBP缺陷鼠模型,观察到IBP的丢失导致小鼠发生系统性自身免疫疾病反应。早期IBP的研究主要集中于免疫方面,近来已有学者将IBP引入到肿瘤的研究中来。Li等[5]发现IBP在正常乳腺组织中低表达而在乳腺癌中高表达且促进乳腺癌的增殖与侵袭。Zhang等[6]发现IBP在正常直肠组织中低表达而在直肠癌中高表达且与直肠癌的发生、发展相关。简从相等[9]发现RNAi沉默IBP基因的表达后对乳腺癌细胞有明显的抑制作用。

腺样囊性癌是涎腺恶性肿瘤中发病率最高的肿瘤

之一[10-11]，它的发展较为缓慢，但具有很强的侵袭性，极易侵袭神经并循神经扩散，因确切定位神经受侵部位尚无客观手段，从而给临床手术切除肿瘤的准确范围带来较大困难。另外腺样囊性癌远处转移发生率较高；且对于放疗、化疗均不敏感，术后复发率高。基于腺样囊性癌独特的生物学特性，寻找更为有效的治疗手段至关重要。目前对于腺样囊性癌的治疗研究已进入基因分子水平。

本研究表明，IBP在正常的涎腺组织中高表达，与Gupta等[1]发现IBP在涎腺中表达相符，而IBP在涎腺腺样囊性癌中低表达甚至不表达却与IBP在乳腺癌与直肠癌中高表达而在其正常组织中皆低表达完全相反。这可能是组织类型不同：腺样囊性癌腺构成细胞为肌上皮细胞和导管内衬上皮细胞，而乳腺癌来自乳腺终末导管小叶单元上皮，直肠癌来源于肠黏膜上皮和腺体[12]。本实验以ACC2细胞为平台，转染了高表达IBP的质粒，并通过G418的筛选，单克隆扩大化培养后建立了IBP稳定高表达的ACC2细胞株，为深入研究IBP在腺样囊性癌中的作用奠定了实验基础。我们通过增殖和克隆形成实验研究发现，IBP的高表达能显著抑制腺样囊性癌细胞的增殖。

综上所述，IBP可能作为一种诊断标志物，成为临床病理诊断的辅助指标之一。当然，这需要进一步收集大量的临床标本，做统计分析来确认。深入研究IBP在腺样囊性癌中的作用及机制有望使IBP成为腺样囊性癌的新的相关特异性标志物和基因治疗的新靶点，为腺样囊性癌的临床基因治疗开辟一条新的途径。

参考文献：

[1] Gupta S, Lee A, Hu C, *et al*. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system[J]. Hum Immunol, 2003, 64(4): 389-401.

[2] Gupta S, Fanzo J, Hu C, *et al*. T cell receptor engagement leads to the recruitment of IBP, a novel guanine nucleotide exchange factor, to the immunological synapse[J]. J Biol Chem, 2003, 278(44): 43541-43549.

[3] Mavrakis K J, McKinlay K J, Jones P, *et al*. DEF6, a novel PH-DH-like domain protein, is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1, Cdc42, and RhoA[J]. Exp Cell Res, 2004, 294(2): 335-344.

[4] Vega F M, Ridley A J. Rho GTPases in cancer cell biology[J]. FEBS Lett, 2008, 582(14): 2093-2101.

[5] Li P, Zhang Z, Wang Q, *et al*. The ectopic expression of IFN regulatory factor 4-binding protein is correlated with the malignant behavior of human breast cancer cells[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(7/8): 1002-1009.

[6] Zhang Z, Wang Q, Li P, *et al*. Overexpression of the Interferon regulatory factor 4-binding protein in human colorectal cancer and its clinical significance[J]. Cancer Epidemiol, 2009, 33(2): 130-136.

[7] Tanaka Y, Bi K, Kitamura R, *et al*. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells[J]. Immunity, 2003, 18(3): 403-414.

[8] Fanzo J C, Yang W, Jang S Y, *et al*. Loss of IRF-4-binding protein leads to the spontaneous development of systemic autoimmunity[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 703-714.

[9] 简从相，熊剑，李鹏，等. RNAi沉默IBP基因表达对乳腺癌细胞的抑制作用[J]. 第三军医大学学报，2010，32(21)：2277-2280.

[10] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 第5版. 北京：人民卫生出版社，2003：346-348.

[11] 何伟，何巍，曹选平，等. 涎腺腺样囊性癌组织中P27及ki-67蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(3)：554-556.

[12] 李玉林. 病理学[M]. 第7版. 北京：人民卫生出版社，2008：192，280.

（收稿 2010-11-05 修回 2010-12-07）
（编辑 张 维）

（上接549页）

扫描动脉期轻度强化，延迟期强化范围及程度均有增大，并见分隔强化。炎症性纤维肉瘤这种强化方式可能与病灶内富含纤维组织成分有关，并形成线条状分隔，无强化的低密度区提示大片凝固性坏死。炎症性纤维肉瘤的MRI表现与病理过程相关，因其同时含有纤维成分及炎性组织，其MRI表现具有较大的可变性。

尽管炎症性纤维肉瘤的CT和MRI表现具有一定的特征性，由于该病在临床上比较罕见，术前仅通过影像学检查一般难以作出定性诊断，需要通过活检或手术获取标本行病理学检查才能作出定性诊断。术前CT或MRI检查的主要价值在于能够对炎症性纤维肉瘤作出准确的定位诊断，并能明确病变的范围和累及的脏器，对治疗计划的制定具有指导意义。

参考文献：

[1] Boo Y J, Kim J, Kim J H, *et al*. Inflammatory myofibroblastic tumor of the kidney in a child: report of a case[J]. Surg Today, 2006, 36(8): 710-713.

[2] Montgomery E A, Shuster D D, Burkart A L, *et al*. Inflammatory myofibroblastic tumors of the urinary tract: a clinicopathologic study of 46 cases, including a malignant example inflammatory fibrosarcoma and a subset associated with high-grade urothelial carcinoma[J]. Am J Surg Pathol, 2006, 30(12): 1502-1512.

[3] 刘海凌，马红霞，欧陕兴，等. 肝脏炎性肌纤维母细胞瘤CT诊断[J]. 临床放射学杂志，2010，29(8)：1069-1072.

（收稿 2011-02-06 修回 2011-02-19）
（编辑 王小寒）