

# CDK1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义<sup>\*</sup>

石 静<sup>\*\*</sup>, 马 洪<sup>\*\*\*</sup>, 段晓峰

(贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004)

**[摘 要]** **目的:** 研究细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 组织中的表达及与 OSCC 患者临床特征之间的关系。**方法:** 选择 20 例正常口腔黏膜组织 (正常对照组) 以及 64 例 OSCC 组织 (OSCC 组), 用免疫组织化学方法检测 CDK1 蛋白的表达, 采用 Real-Time qPCR 检测 CDK1 mRNA 的表达, 比较 OSCC 组及正常对照组 CDK1 蛋白及 mRNA 的表达水平, 同时观察不同分化程度、不同临床分期及是否发生淋巴结转移患者的 CDK1 mRNA 的表达水平。**结果:** OSCC 组 CDK1 蛋白阳性表达率显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); OSCC 组 CDK1 mRNA 表达明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); 中、低分化 OSCC 组织中 CDK1 mRNA 相对表达量显著高于高分化 OSCC 组织 ( $P < 0.05$ ), Ⅲ、Ⅳ期 OSCC 组织中 CDK1 mRNA 相对表达量也高于 I、Ⅱ期 OSCC 组织 ( $P < 0.05$ ); 有淋巴结转移 OSCC 组织中 CDK1 mRNA 相对表达量也高于无淋巴结转移组织 ( $P < 0.05$ )。**结论:** CDK1 表达增高可能在 OSCC 发生及发展过程中起到重要的作用。

**[关键词]** 细胞周期蛋白依赖性激酶 1; 口腔肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 实时荧光定量聚合酶链反应; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R363.2; R739.85 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)01-0064-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.01.012

## Expression and Significance of CDK1 in Oral Squamous Cell Carcinoma

SHI Jing, MA Hong, DUAN Xiaofeng

(Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of CDK1 in OSCC (oral squamous carcinoma) and its relationships with clinical features of OSCC patients. **Methods:** Using Real-Time qPCR to detect the expression of CDK1 mRNA in 20 cases of normal oral mucosa tissues (normal control group) and 64 cases of OSCC tissues (OSCC group) and immunohistochemical assay to detect CDK1 protein expression. Comparing expression level of CDK1 protein and mRNA of both groups. Meanwhile, observing CDK1 mRNA expression level of patients with degrees of differentiation, different clinical staging and lymph nodes metastasis or not. **Results:** The results showed that the protein positive expressions rate of CDK1 in OSCC group was significantly higher than that of normal control group ( $P < 0.01$ ). The expression of CDK1 mRNA in OSCC was significantly higher than that of the normal control group ( $P < 0.01$ ). The relative expression of CDK1 mRNA in low and medium differentiated OSCC tissue was significantly higher than that of high differentiated OSCC tissues ( $P < 0.05$ ); CDK1 mRNA relative expression in stage Ⅲ and IV OSCC tissues was also higher than that in stage I and II ( $P < 0.05$ ); lymph node metastasis OSCC group showed higher CDK1 mRNA relative expression than none metastasis OSCC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The increased expression of CDK1 may play an important role in the pathogenesis and development of OSCC.

**[Key words]** Cyclin dependent kinase 1; oral neoplasms; carcinoma, squamous cell; reverse-transcription polymerase chain reaction; immunohistochemical assay

<sup>\*</sup> [基金项目] 贵州省国际合作计划项目 [黔科合外 G 字 (2014) 7009 号]

<sup>\*\*</sup> 贵州医科大学 2018 届硕士研究生

<sup>\*\*\*</sup> 通信作者 E-mail: mahong1966@126.com

网络出版时间: 2019-01-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190118.1118.012.html>

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是发生在口腔颌面部最常见的一种恶性肿瘤,占口腔颌面部肿瘤的 80% 以上且全球每年新发现的 OSCC 人数超过 300 000 例,死亡人数超过 120 000 例<sup>[1]</sup>。目前针对中晚期 OSCC 病人以手术治疗为主,手术治疗后患者面容及口腔功能会有严重的缺陷,影响其生活质量、言语等。现已有一些 OSCC 的诊断标志物,帮助早期诊断 OSCC,但肿瘤的发生发展是多基因多因素共同造成的结果,因此仍需要更进一步探讨潜在的一些肿瘤生物学标记物。近年来相关研究发现,细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)与多种肿瘤包括乳腺癌、胃癌,卵巢癌等发生发展关系密切,本研究采用免疫组织化学和 Real-Time qPCR 法检测 CDK1 基因和蛋白在 OSCC 中的表达,同时观察不同分化程度、不同临床分期及是否发生淋巴结转移患者的 CDK1 mRNA 的表达水平,为 OSCC 的早期发现和治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本主要仪器及试剂

**1.1.1 标本采集** 收集 2015 年 10 月~2017 年 4 月颌面外科手术切除的新鲜 OSCC 组织 64 例(OSCC 组),病理类型经病理科证实。OSCC 患者男 45 例、女 19 例,年龄 <60 岁 26 例、≥60 岁 38 例,高分化癌 40 例、中或低分化癌 24 例,临床分期 I 或 II 期 35 例、I 或 II 29 例,无淋巴结转移 45 例、有淋巴结转移 19 例;另取 20 例正常组织标本(正常对照组)。本研究获医院伦理学会审核同意。切取 1~2 mm<sup>3</sup> 大小组织,一部分立即用 RNAlater 液暂封, -80 ℃ 冻存,用于 Real-Time PCR 检测 *CDK1* mRNA 的表达;另一部分用福尔马林固定,石蜡包埋,用于免疫组织化学检测 CDK1 蛋白的表达。

**1.1.2 主要仪器及试剂** CFX connect Real Time System PCR 扩增仪(BIO - RAD CFX96, 美国), S1000 PCR 热循环仪(BIO - RAD, 美国), YS100 光学显微镜(Nikon, 日本), 各种规格的微量移液器(Eppendorf, 德国), Dynabeads mRNA DIRECT™ Kit 试剂盒(Abcam 公司, 美国), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(Roche 公司, 美国), Light Cycler R480 SYBR Green I Master(Roche

公司, 美国); CDK1 引物序列(上游 TAGCATCAT-CAGATGCACGC, 下游 GTGTCCAGCAGTCGCAC-TAT; 上海生工, 中国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学** 采用免疫组织化学超敏二步法检测组织切片中 CDK1 的表达。利用高温高压修复(0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液, 4 min), 一抗按 1:250 比例稀释, 阴性对照以 PBS 代替一抗。所有操作均严格按试剂盒说明进行, 阳性染色主要表现为胞质中出现棕黄色颗粒, 采用双盲法在光学显微镜下随机观察切片, 根据免疫反应评分(IRS)评估染色强度和阳性细胞的比例; 阳性细胞数 <10%、10%~30%、>30% 分别计 0、1、2 分, 染色强度无着色、淡黄色、棕黄色及以上分别计 0、1、2 分; 根据两者综合计分, 0~1 分计阴性(-), 2~3 分计阳性(+), 4 分计强阳性(++).

**1.2.2 qPCR** 利用 Dynabeads mRNA DIRECT™ Kit 试剂盒, 磁珠法提取组织 mRNA, 使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒逆转录成 cDNA( -80 ℃ 储存备用)。按 Light Cycler R480 SYBR Green I Master 说明在冰上操作, 配制 10 μL 反应体系, SYBR Green I Master 5 μL, 上下游引物 4.0 μL, 模板 1 μL。反应条件为变性 95 ℃, 5 min, 变性 95 ℃, 10 s, 退火 65 ℃, 30 s 共 64 个循环。每个样本 3 个复孔取平均值, 采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法进行分析。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。对于免疫组化 CDK1 蛋白表达与临床病例特征关系分析采用  $\chi^2$  检验, 对于荧光定量 PCR 数据不符合正态分布应用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CDK1 蛋白表达

64 例 OSCC 组织中可见细胞质中出现不同染色程度的棕黄色颗粒, 少部分胞核见黄染, CDK1 阳性率为 82.81%; 正常口腔黏膜细胞胞质中也存在少量棕黄色颗粒, CDK1 阳性率为 20.00%。经统计学分析, OSCC 组 CDK1 阳性表达率显著高于正常对照组( $P < 0.01$ ), 见图 1、表 1。

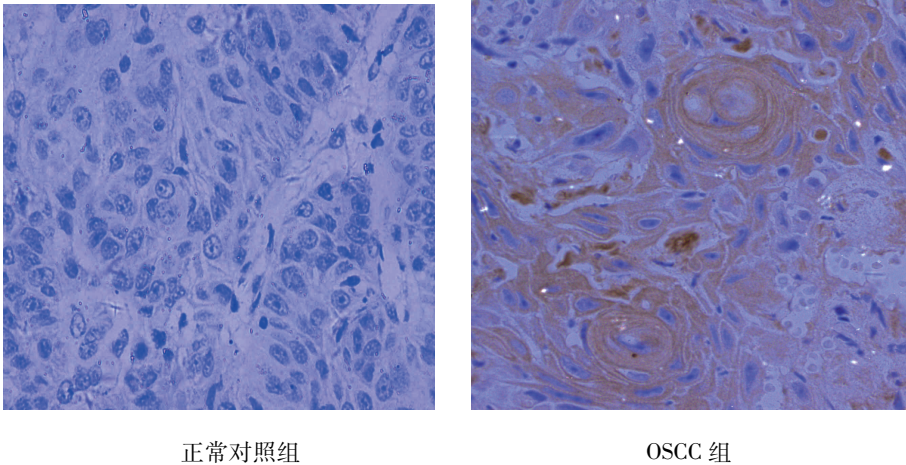


图 1 两组口腔组织 CDK1 蛋白的表达 (×400)

Fig. 1 CDK1 protein expression in oral tissues in the two groups

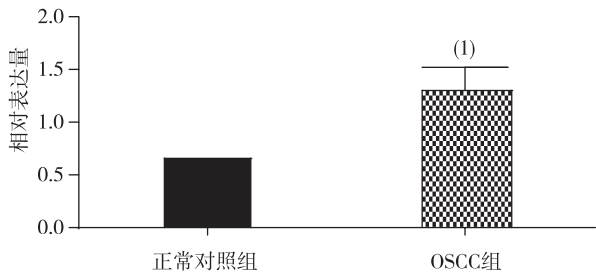
表 1 口腔鳞癌组织及正常口腔组织中 CDK1 的表达

Tab. 1 The expression of CDK1 in OSCC and normal samples

分组	n	CDK1 蛋白表达				$\chi^2$	P
		-	+	++	阳性率 (%)		
正常对照组	20	16	2	2	20.00	27.56	<0.05
OSCC 组	64	11	24	29	82.81		

2.2 CDK1 mRNA 表达

OSCC 组及正常组织 CDK1 mRNA 相对表达量分别为  $1.3013 \pm 1.0337$ ,  $0.6563 \pm 0.1750$ , OSCC 组表达明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。



(1) 与正常对照组比较,  $P < 0.01$

图 2 CDK1 mRNA 在两组口腔组织中的相对表达  
Fig. 2 Relative expression of CDK1 mRNA in OSCC and Normal tissue

2.3 不同临床特征 OSCC 组织中 CDK1 mRNA 的表达

中、低分化 OSCC 的 CDK1 mRNA 的相对表达量显著高于高分化 OSCC ( $P < 0.05$ ), 并且 III、IV 期 OSCC 组织中 CDK1 mRNA 的相对表达量也高于

I、II 期 ( $P < 0.05$ ), 存在淋巴结转移的 OSCC 组织中 CDK1 mRNA 相对表达量高于未见淋巴结转移组织 ( $P < 0.05$ ); 但是 CDK1 mRNA 的表达在不同性别及年龄中, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 CDK1 mRNA 的表达与 OSCC 临床特征的关系  
Tab. 2 The relationships between CDK1 mRNA expression and clinical characteristics in patients with OSCC

临床特征	n	CDK1 相对表达量	Z	P
性别				
男	45	$1.3867 \pm 1.1424$	-1.017	0.313
女	19	$1.0991 \pm 0.6985$		
年龄 (岁)				
<60	26	$1.1887 \pm 1.0843$	-0.718	0.475
≥60	38	$1.3783 \pm 1.0050$		
分化程度				
高分化	40	$1.1008 \pm 1.0217$	-2.128	0.037
中、低分化	24	$1.6586 \pm 0.9764$		
临床分期				
I ~ II	35	$1.0048 \pm 0.7656$	-2.637	0.011
III ~ IV	29	$1.6591 \pm 1.2041$		
淋巴结转移				
否	46	$1.2002 \pm 1.0201$	-1.908	0.031
是	19	$1.5407 \pm 1.1994$		

3 讨论

细胞周期主要通过细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKS) 的活化进行调控。CDKS 功能的失调在许多肿瘤中均有报道, 推测 CDKS 因子在肿瘤的发生发展中起重要作用<sup>[2-4]</sup>。

细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的成员之一,其是 CDC2 基因编码的相对分子质量为  $3.4 \times 10^4$  的蛋白质。CDK1 与 cyclinB 组成的复合物(即有丝分裂促进因子,MPF),促使细胞周期从 G2 期进入 M 期,是影响细胞有丝分裂的主要因素<sup>[5-6]</sup>。CDK1 是细胞周期的一个重要的调节分子,在细胞由 G2 期进入 M 期中发挥着重要的作用。研究表明,多种恶性肿瘤的发生发展都与细胞周期调节机制的紊乱有着密切的关联,认为肿瘤是一种细胞周期性疾病<sup>[7]</sup>。CDK1 在非小细胞肺癌、结肠癌及乳腺癌中是影响临床预后的标志物<sup>[8]</sup>。因此,推测 CDK1 与肿瘤的发生发展有潜在的相关性。本研究在 OSCC 组织中,检测出 CDK1 蛋白和基因的表达水平均增高,可能与大量癌细胞的增殖、恶性程度以及侵袭性的增加有关,有望成为判断 OSCC 临床预后的标志物。

本研究中免疫组织化学结果显示 64 例 OSCC 组 CDK1 蛋白阳性表达率显著高于 20 例正常对照组,同时 qPCR 结果显示 OSCC 中 CDK1 mRNA 的表达明显高于正常对照组,这与 CDK1 在其他肿瘤病变如胃癌<sup>[9]</sup>、乳腺癌<sup>[10]</sup>、卵巢癌<sup>[11]</sup>、肝癌<sup>[12]</sup> 等中的报道相一致,其作用机制均是 CDK1 的含量增高,引起肿瘤细胞的增殖和发展。同时进一步分析比较不同临床特征 OSCC 患者中 CDK1 mRNA 的表达情况,结果显示,中、低分化 OSCC 中的 CDK1 mRNA 的相对表达量显著高于高分化的 OSCC,Ⅲ、Ⅳ期 OSCC 组织中 CDK1 相对表达量也高于 I、II 期 OSCC 组织,伴有淋巴结转移 OSCC 组织的 CDK1 mRNA 相对表达量高于无淋巴结转移组织,推测 CDK1 可作为判断 OSCC 临床预后的一个标志物,但是在性别以及年龄的分组中无明显差异,推测随着 OSCC 组织分化程度的降低以及临床分期的进展,CDK1 mRNA 的相对表达量就越高,肿瘤恶性程度随之升高,从而促进肿瘤细胞增殖,加重侵袭性,临床预后较差。

基于本次实验,推测 CDK1 的高表达在 OSCC 中可能加速细胞周期 G2/M 期的转化,促进细胞有丝分裂,进一步促进肿瘤细胞的增殖。有关于 CDK1 更精准的调控机制有待进一步研究,为进一步实现早期诊断及精准治疗做准备。

## 4 参考文献

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global

cancer statistics, 2012[J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2):87-108.

[2] ESTEY M P, DI CIANO-OLIVEIRA C, FROESE C D, et al. Mitotic regulation of SEPT9 protein by cyclin-dependent Kinase 1 (Cdk1) and Pin1 protein is important for the completion of cytokinesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(42):30075-30086.

[3] IIZUMI Y, OISHI M, TANIGUCHI T, et al. The flavonoid apigenin downregulates Cdk1 by directly targeting ribosomal protein S9 [J]. PloS one, 2013, 8(8):e73219.

[4] HUANG H, HU M, ZHAO R, et al. Dihydromyricetin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C pathway[J]. Oncology Reports, 2013, 30(5):2467-2475.

[5] 刘谦, 路名芝, 刘勇. 细胞周期标记物在肿瘤中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(2):192-196.

[6] SCHMIDT M, ROCHE A, PLATZER C, et al. Regulation of G2/M transition by inhibition of WEE1 and PK-MYT1 kinases[J]. Molecules, 2017, 22(12):2045.

[7] HONG L, SAMARASINGHE S, KULASIRI D. Computational experiments reveal the efficacy of targeting CDK1 and CKIs for significantly lowering cellular senescence bar for potential cancer treatment [J]. Bio Systems, 2013, 111(2):71-82.

[8] SUNG W W, LIN Y M, WU P R, et al. High nuclear/cytoplasmic ratio of Cdk1 expression predicts poor prognosis in colorectal cancer patients [J]. BMC Cancer, 2014, 14(1):951.

[9] LIU L, CHEN G, SONG Z, et al. Expression of Cdk2 and p21 in gastric cancer and its relationship with clinicopathological features and prognosis [J]. Jiangsu Medical Journal, 2014, 40(17):2045-2047.

[10] REESE J M, BRUINSMA E S, MONROE D G, et al. ERβ inhibits cyclin dependent kinases 1 and 7 in triple negative breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(57):96506-96521.

[11] ZHANG Y, HUANG W, RAN Y, et al. miR-582-5p inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma by targeting CDK1 and AKT3 [J]. Tumour Biol, 2015 (36):8309-8316.

[12] QIU L, WANG J J, YING S H, et al. Wee1 and Cdc25 control morphogenesis, virulence and multistress tolerance of Beauveria bassiana by balancing cell cycle-required cyclin-dependent kinase 1 activity [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(4):1119.

(2018-10-20 收稿, 2018-12-28 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅