

LCE3C 在皮肤癌组织中分布和细胞定位及其调控机制的初步研究

陈琼琼¹, 涂珍珍¹, 王 瑞¹, 张思平², 赵 盼¹, 成 芳¹, 查晓军¹, 周海胜¹

摘要 目的 研究 LCE3C 蛋白在皮肤鳞状细胞癌(SCC)以及基底细胞癌(BCC)中的分布及其调控的分子机制。**方法**

免疫组织化学法检测 LCE3C 在 SCC 和 BCC 组织中的表达。构建绿色荧光蛋白融合表达的 LCE3C 重组表达载体 pLCE3C-GFP, 转染人 SCC 细胞系 A431, 采用激光共聚焦显微镜分析 LCE3C 在 A431 细胞中的定位。Western blot 法检测转录因子 GRHL3 对 LCE3C 表达的影响。**结果** 免疫组化结果显示, 与正常皮肤组织比较, LCE3C 在 SCC 和 BCC 组织中表达明显增加; 在皮肤癌组织中 LCE3C 主要分布在表皮的角质层。激光共聚焦结果显示, LCE3C 主要分布在细胞外基质(ECM)中; Western blot 结果显示, 与角质形成细胞(HaCaT)比较, A431 细胞中 GRHL3 表达量显著降低, 而 LCE3C 表达量明显增高; 过量表达 GRHL3 的细胞(A431/GRHL3) LCE3C 表达量显著降低。**结论** 与正常皮肤组织比较, LCE3C 在皮肤癌中的表达增加, 主要分布在皮肤角质层的 ECM; 转录因子 GRHL3 与皮肤癌组织 LCE3C 的表达呈负相关性。

关键词 LCE3C; 皮肤鳞状细胞癌; 基底细胞癌; 细胞定位

中图分类号 R 319; R 758.69

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1413-05

全基因组关联分析研究^[1]显示位于人染色体 1q21 区域中的晚期角质化包膜蛋白(late cornified envelope, LCE)基因与中国汉族人的银屑病易感性明确相关。LCE 基因的主要功能是参与皮肤角质化的构成。功能研究^[2]显示 LCE3C 基因的缺失是诱发银屑病的危险因素。皮肤癌是一种常见的皮肤肿瘤, 如皮肤鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)和基底细胞癌(basal cell carcinoma, BCC), 角质形成细胞的过度增殖和异常分化等与银屑病有相似特点。关于 LCE3C 在皮肤癌中的表达水平及其调控表达的分子机制鲜有报道。GRHL3 作为一种转录因子, 在胚胎发育过程中参与上皮细胞迁移, 与

神经管闭合有关^[3], 而且参与成人表皮划痕的损伤修复^[4]。在表皮的正常分化过程中, 基底层细胞会由先前的未分化状态逐渐发展成熟, GRHL3 在这一过程中可以促进表皮基底层细胞特异性基因的表达^[5]。该研究通过观察 LCE3C 在皮肤癌的表达变化及其细胞分布, 初步探讨 GRHL3 是否参与调控 LCE3C 表达, 进一步探讨 LCE3C 在皮肤癌的发病过程中作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本、细胞系与载体 人皮肤癌组织标本由安徽医科大学附属省立医院病理科提供, 其中 SCC 和 BCC 组织标本各 12 例; 正常皮肤组织标本 5 例, 均取自安徽医科大学附属省立医院泌尿外科门诊包皮环切手术患者; 人 SCC 细胞株 A431 和人永生角质形成层细胞株 HaCaT 由安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室实验室冻存; 过量表达 GRHL3 的 A431 细胞(A431/GRHL3)由本实验室建立; pEGFP N1 载体由本实验室冻存; 人 LCE3C cDNA 的质粒由厦门大学韩家淮教授惠赠。

1.1.2 培养基及试剂 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素/链霉素(P/S)均购自美国 Hyclone 公司; Lip2000(LipofectaminTM 2000)购自美国 Invitrogen 公司; G418、DAPI 染色液均购自上海碧云天生物技术有限公司; Top 10 感受态细胞、质粒小提试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; DL 2 000 DNA Marker、DL 15 000 DNA Marker、Nhe I、Xho I、T4 DNA 连接酶和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 均购自日本 TaKaRa 公司; 通用型 SP 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 蛋白 Marker、超敏 SuperSignal[®] West Pico 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 兔源抗 LCE3C、鼠源抗 GAPDH 均购自美国 Abcam 公司; 兔源抗 GRHL3、羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP 均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 组织切片(4 μ m)常规脱蜡入水

2015-05-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81172591)

作者单位: ¹安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学附属省立医院皮肤科, 合肥 230001

作者简介: 陈琼琼, 女, 硕士研究生;

周海胜, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

后,微波热修复抗原,用 3% H_2O_2 除去内源性过氧化物酶,山羊血清封闭,4℃ 孵育一抗 LCE3C (1:100) 过夜。第 2 天依次室温孵育生物素化通用二抗工作液、辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木精复染,最后组织经脱水透明后烘干封片。在 400 倍下,每张切片取 3 个视野拍照,并用 Image pro plus 6.0 图像分析系统测定图像中阳性反应部位的积分光密度(integral optical density, IOD) 值。

1.2.2 载体构建 按 1:150 的比例扩增含 LCE3C cDNA 的质粒菌液,培养过夜后提取质粒;根据 GenBank 提供的人 LCE3C 基因 mRNA 的序列(GenBank 序列号: NM_178434.2),利用 Primer 5.0 软件,设计引物(上游引物: 5'-CTAGCTAGCTATGTCCTGC-CAGCAAAAC-3',下游引物: 5'-CCGCTCGAGCGG GCAGCAGCCCCAGAGC-3'),在上游和下游引物的 5'末端分别引入内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 的识别序列。PCR 扩增目的片段,1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的片段,用 T4 DNA 连接酶连接 LCE3C 目的片段和 pEGFP N1 载体,然后转化到 Top 10 中,平板克隆后挑取菌落扩大培养,PCR 鉴定,提取质粒,经 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切后,选取目的片段大小一致的克隆,送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.2.3 构建细胞系 将重组表达载体 pLCE3C-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 用脂质体 Lip2000 转染到 A431 细胞中,转染 2 d 后,可见部分细胞有绿色荧光,改用含 400 μ g/ml G418 的 DMEM 培养基筛选细胞;筛选 1 个月后,换用含有 1% P/S、10% FBS 的高糖 DMEM 继续培养,冻存。

1.2.4 激光共聚焦实验 按一定的比例将 A431 细胞传至铺有无菌玻璃片的 12 孔板,使细胞可以在第 2 天融合至 70%~80%,转染前将细胞饥饿处理 6~8 h;按照 Lip2000 说明书分别向 2 孔细胞瞬时转染 pLCE3C-GFP 和 pEGFP N1 做对照;48 h 后,荧光显微镜(XDS-3FL,意大利 Optika 公司)下观察到大部分细胞有荧光,PBS 洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定,DAPI 染核,最后取出板底的玻璃片,倒扣在载玻片上,激光共聚焦显微镜(SPS-DMI6000-DIC,德国徕卡公司)观察、拍片。

1.2.5 Western blot 法检测 收集细胞总蛋白,制备 SDS-PAGE 凝胶,上样后电泳,待目的蛋白充分分离至不同位置后移至 PVDF 膜上,室温封闭 45 min,4℃ 过夜孵育一抗 LCE3C (1:1 000)。次日 PBST 洗涤 3 次,室温 HRP 标记的二抗 6~8 h, TBST 洗涤

后,加入超敏,暗室中 X 线片曝光,最后用 Image J 软件对目的条带进行灰度分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。进行单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 SNK 检验。

2 结果

2.1 免疫组化检测 LCE3C 在 SCC 和 BCC 组织中的分布及表达 免疫组化结果显示,正常皮肤组织表皮层仅少量着色,表皮各层之间着色差异无统计学意义;而 SCC 和 BCC 患者皮肤组织表皮层着色显著,但细胞鲜少着色,棕黄色沉淀主要集中在细胞外基质(extracellular matrix, ECM),同时 LCE3C 在表皮各层之间的分布差异有统计学意义,相比基底层、棘层、颗粒层、表皮的最外层,即角质层着色最深,提示皮肤癌组织表皮层 LCE3C 表达明显增加,主要分布在角质层。其中 12 例 SCC 的 IOD 值(29.775 ± 1.630)和 12 例 BCC 的 IOD 值(49.076 ± 1.594)均为阳性,与 5 例正常皮肤组织的 IOD 值(15.859 ± 0.975)比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

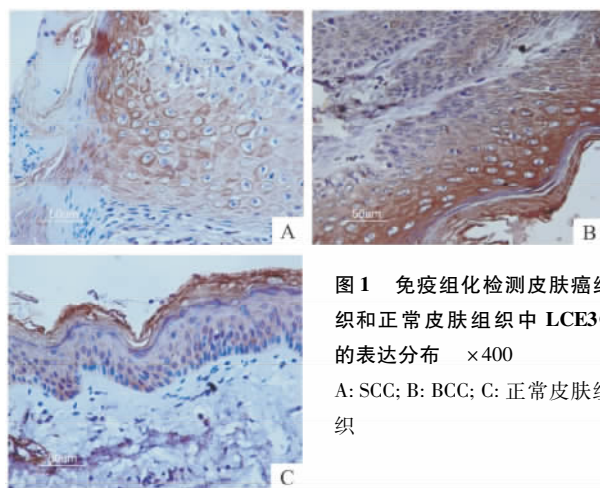


图 1 免疫组化检测皮肤癌组织和正常皮肤组织中 LCE3C 的表达分布 $\times 400$
A: SCC; B: BCC; C: 正常皮肤组织

2.2 构建 pLCE3C-GFP 载体及鉴定 为进一步观察 LCE3C 在细胞定位,拟构建 GFP 融合表达载体。重组菌的 PCR 检测结果显示扩增出的目的片段约为 280 bp。见图 2A。重组载体经 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切出现 2 个 DNA 片段,经过 DL 15 000 DNA Marker 比对,和 pEGFP N1 (4 700 bp)、目的片段 LCE3C (285 bp) 条带位置一致,重组载体送上海生工测序,序列与 GenBank 序列一致,证明载体构建成功。见图 2B、2C。

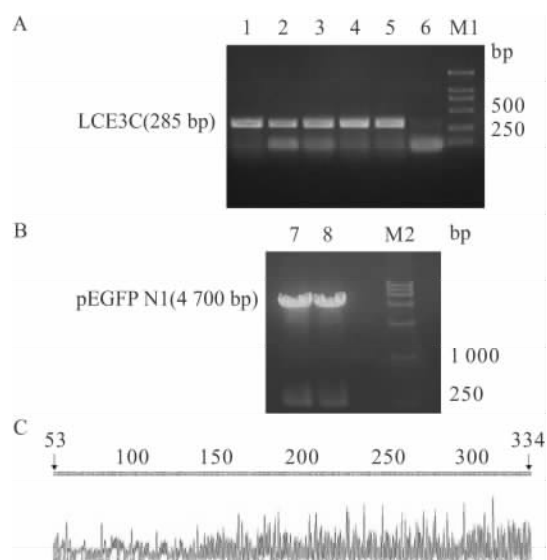


图2 重组质粒 pLCE3C-GFP 鉴定

A: 重组菌的 PCR 电泳图谱; 1~5: 5 个重组菌的菌液; 6: 阴性对照; M1: DL 2 000 DNA Marker; B: 重组载体 Nhe I 与 Xho I 双酶切鉴定电泳图谱; 1: 1 号克隆; 2: 2 号克隆; M2: DL 15 000 DNA Marker; C: 1 号克隆测序结果

2.3 A431/LCE3C-GFP 细胞系的构建 将 A431 细胞利用脂质体分别转染重组质粒 pLCE3C-GFP 和对照质粒 pEGFP N1, 转染 24 h 后, 荧光显微镜下可观察到 A431 细胞, 细胞轮廓清晰, 荧光较强。通过 G418 筛选, 得到单个细胞克隆。见图 3。

2.4 激光共聚焦显微镜实验检测 LCE3C 在 A431/LCE3C-GFP 细胞中的定位 激光共聚焦结果显示, 对照组 A431/GFP 细胞绿色荧光分布于整个细胞。而在 A431/LCE3C-GFP 的细胞中, 融合表达的 LCE3C-GFP 蛋白主要定位于 ECM 中。见图 4。

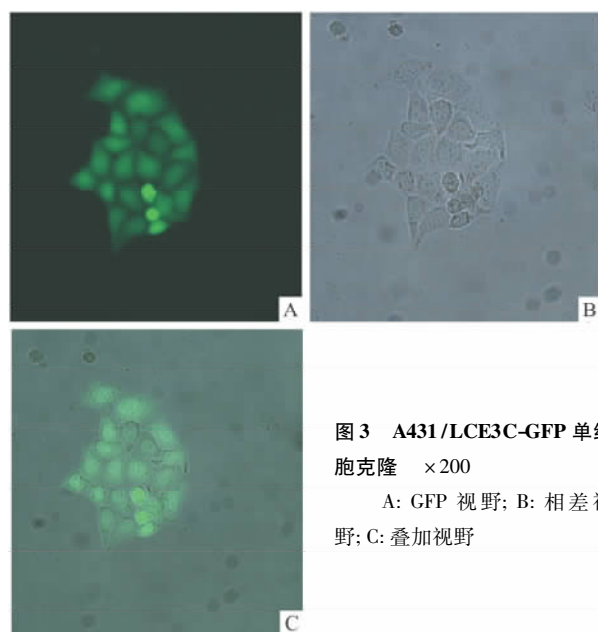


图3 A431/LCE3C-GFP 单细胞克隆 ×200
A: GFP 视野; B: 相差视野; C: 叠加视野

2.5 Western blot 法检测 LCE3C、GRHL3 在 HaCaT、A431、A431/GRHL3 细胞中的表达 为探讨转录因子 GRHL3 在皮肤癌细胞中是否参与调控 LCE3C 基因的表达, 拟利用实验室已经建立的过量表达 GRHL3 的细胞株, 通过 Western blot 法分析 GRHL3 对 LCE3C 表达的影响。与 HaCaT 细胞比较, A431 细胞中 GRHL3 表达量明显降低, 与 A431 细胞比较, A431/GRHL3 细胞中 GRHL3 表达量明显升高 ($F = 37.602, P < 0.05$); 与 HaCaT 细胞比较, A431 细胞中 LCE3C 表达量明显升高, 与 A431 细胞比较, A431/GRHL3 细胞中 LCE3C 表达量显著降低 ($F = 45.109, P < 0.05$)。见图 5。

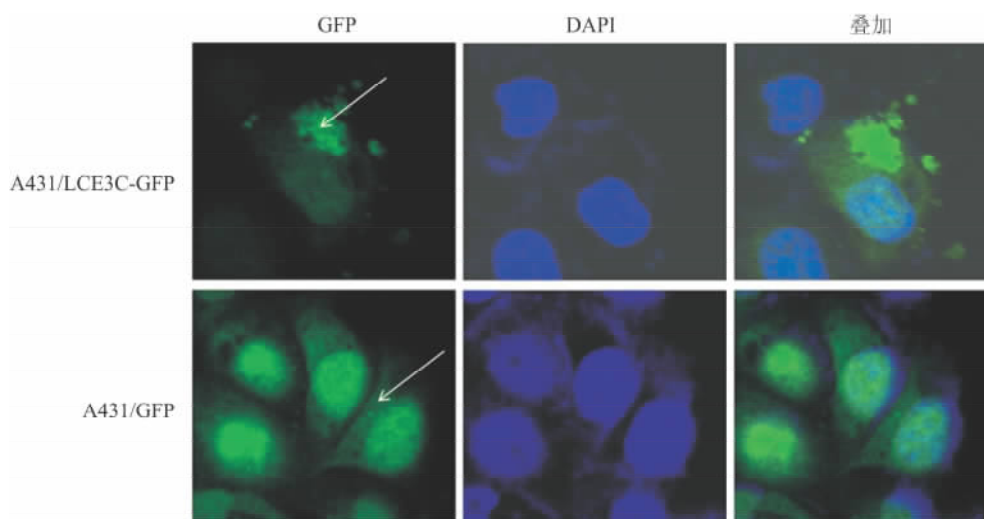


图4 激光共聚焦检测 LCE3C 在细胞中的定位 ×400

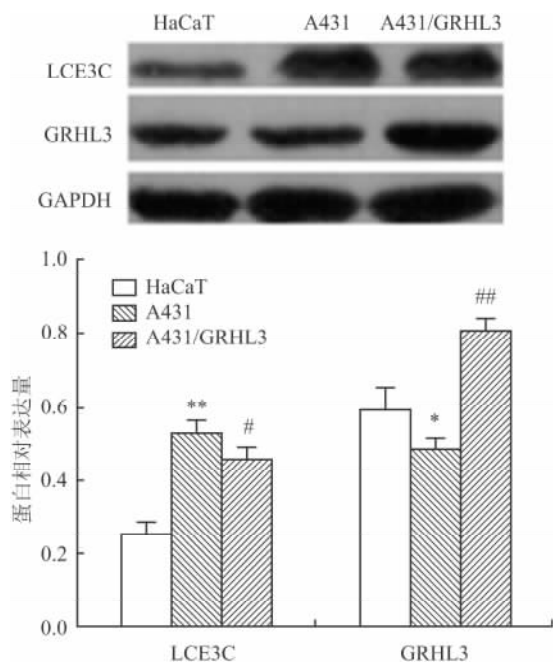


图5 Western blot 法检测 LCE3C、GRHL3 表达

与 HaCaT 细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 A431 细胞比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

SCC 和 BCC 是一类非黑色素瘤皮肤癌,多发于头部、颈部、子宫以及肺部^[6-7],SCC 和 BCC 在表皮分化的过程中会出现过度增殖与角化不完全的现象,类似于银屑病局部病理特征。LCE 基因是位于人类 1 号染色体长臂近端的一个具有表皮分化复合物功能区的基因家族^[8]。在表皮细胞分化的过程中这一功能区的基因均表达,如兜甲蛋白、外皮蛋白、丝聚合蛋白、富含脯氨酸的小分子量蛋白以及 LCE^[9-10]。根据氨基酸序列、基因结构以及表达方式的不同,可以将 LCE 家族分为 LCE1 ~ LCE6 等 6 组,共 18 个成员。研究^[11]表明银屑病组织标本的皮损部位 LCE3 表达升高;当正常皮肤发生表皮损伤时,LCE3 表达增加^[12]。在皮肤癌组织学方面,本研究显示,LCE3C 在 SCC 和 BCC 组织中的表达量明显高于正常组织,主要分布在表皮的角质层;在细胞定位方面,本研究显示 LCE3C 主要分布于 ECM;与 HaCaT 比较,LCE3C 在人鳞癌细胞系 A431 中的表达也是明显增高,这和皮肤癌的免疫组化结果一致,提示 LCE3C 表达增加可能参与 SCC 和 BCC 的发生过程。LCE3C 作为 ECM 的一种分泌蛋白,促进表皮损伤修复而协同参与形成表皮屏障。皮肤癌大都具有较强的局部侵袭能力,这种侵袭作用可能

作为一种破坏表皮屏障的诱发因素,诱导 LCE3C 的表达以促进表皮的创伤修复。

GRH 家族最早被发现参与调控果蝇上皮发育的过程,其中转录因子 GRHL3 是 GRH 家族的成员之一,在哺乳动物胚胎发育过程中,参与上皮细胞的迁移;而在成人表皮损伤后,GRHL3 参与调控表皮的损伤修复过程^[13]。Darido et al^[14]证实 GRHL3^{-/-}小鼠在受到二甲基苯并蒽或佛波酯刺激后,较野生型小鼠更易发生皮肤癌。前期研究^[15]显示,已经成功构建了肾小管上皮间质细胞转分化模型;通过过量表达 GRHL3 可以诱导上皮-间质细胞转分化,从而促进肿瘤的局部侵袭和远处转移;同时,Guardiola-Serrano et al^[16]也在人乳腺癌细胞系中证实肿瘤坏死因子促进 GRHL3 的表达,并参与调控肿瘤细胞的迁移。这些研究提示 GRHL3 可能参与调控 LCE3C 的表达。细胞水平研究显示 GRHL3 在人 SCC 细胞系 A431 中的表达水平较 HaCaT 明显下降,同时 LCE3C 的表达增加;相反,在 A431/GRHL3 细胞系中,LCE3C 的表达显著降低。这些结果提示 LCE3C 的表达可能与 GRHL3 的负调控有关,但其调控的分子机制有待进一步研究。

LCE3C 作为皮肤表皮分化复合物的成分之一,分布于皮肤角质层的表皮 ECM,参与表皮损伤的修复和表皮屏障的形成。在 SCC、BCC 等潜在的侵袭作用而导致表皮的局部损伤,可能诱发 LCE3C 的表达增加以促进局部损伤修复;LCE3C 的表达改变可能受到转录因子 GRHL3 的负调控;这将为后续研究 LCE3C 在皮肤癌中的作用及其调控分子机制奠定基础。

参考文献

- [1] Zhang X J, Huang W, Yang S, et al. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21 [J]. Nat Genet, 2009, 41(2): 205-10.
- [2] Chiraz B S, Myriam A, Ines Z, et al. Deletion of late cornified envelope genes, LCE3C_LCE3B-del, is not associated with psoriatic arthritis in Tunisian patients [J]. Mol Bio Rep, 2014, 41(6): 4141-6.
- [3] Yu Z, Bhandari A, Mannik J, et al. Grainyhead-like factor Get1/Grhl3 regulates formation of the epidermal leading edge during eyelid closure [J]. Dev Biol, 2008, 319(1): 56-67.
- [4] Gordon W M, Zeller M D, Klein R H, et al. A GRHL3-regulated repair pathway suppresses immune-mediated epidermal hyperplasia [J]. J Clin Invest, 2014, 124(12): 5205-18.
- [5] Chalmers A D, Lachani K, Shin Y, et al. Grainyhead-like 3, a transcription factor identified in a microarray screen, promotes the

- specification of the superficial layer of the embryonic epidermis [J]. *Mech Dev*, 2006, 123(9): 702–18.
- [6] Sauter E R, Herlyn M, Liu S C, et al. Prolonged response to anti-sense cyclin D1 in a human squamous cancer xenograft model [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2): 654–60.
- [7] Trakatelli M, Ulrich C, del Marmol V, et al. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions [J]. *Br J Dermatol*, 2007, 157(3): 634.
- [8] Mischke D, Korge B P, Marenholz I, et al. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21 [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(5): 989–92.
- [9] Jackson B, Tilli C M, Hardman M J, et al. Late cornified envelope family in differentiating epithelia—response to calcium and ultraviolet irradiation [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(5): 1062–70.
- [10] Zhao X P, Elder J T. Positional cloning of novel skin-specific genes from the human epidermal differentiation complex [J]. *Genomics*, 1997, 45(2): 250–8.
- [11] Bergboer J G, Tjabringa G S, Kamsteeg M, et al. Psoriasis risk genes of the late cornified envelope-3 group are distinctly expressed compared with genes of other LCE groups [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(4): 1470–7.
- [12] Bergboer J G, Umićević-Mirkov M, Fransen J, et al. A replication study of the association between rheumatoid arthritis and deletion of the late cornified envelope genes LCE3B and LCE3C [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32045.
- [13] Yu Z, Lin K K, Bhandari A, et al. The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grhl3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4 [J]. *Dev Biol*, 2006, 299(1): 122–36.
- [14] Darido C, Georgy S R, Wilanowski T, et al. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 635–48.
- [15] 陈芳, 成芳, 项倩彤, 等. 肾小管上皮-间质细胞转分化模型的建立 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(6): 595–600.
- [16] Guardiola-Serrano F, Haendeler J, Lukosz M, et al. Gene trapping identifies a putative tumor suppressor and a new inducer of cell migration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(4): 748–52.

The LCE3C expression in human skin cancers and the potential regulation mechanisms

Chen Qiongqiong, Tu Zhenzhen, Wang Rui, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the LCE3C expression in squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BCC), and the potential mechanisms for regulating LCE3C expression. **Methods** Immunohistochemical method was performed to detect the expression levels of LCE3C in the normal skin tissues or the lesion skin tissues from patients with SCC and BCC. To find the cellular localization of the LCE3C proteins, human skin cancer cells were transfected by recombinant plasmid (pLCE3C-GFP) containing human LCE3C cDNA fused with the GFP, and then were observed under the confocal laser scanning microscopy. To further investigate the potential mechanisms for regulating LCE3C expression in skin cancer, Western blot was used to detect the expression levels of GRHL3 and LCE3C in the skin cancer cells. **Results** Immunohistochemical analysis showed that the LCE3C highly expressed at the stratum corneum in the lesion skin tissues from patients with SCC and BCC, compared with the normal skin tissues. LCE3C proteins fused with GFP in A431 cells were mainly observed in extracellular matrix (ECM) based on the confocal laser scanning. Western blot analysis showed that the expression level of GRHL3 in the A431 cells was reduced than that of the HaCaT cells; on the contrary, the expression level of LCE3C significantly increased in the A431 cells. Furthermore, LCE3C expression was also significantly decreased in the GRHL3 over-expressed cell (A431/GRHL3) compared with the A431 cells. **Conclusion** Compared to the normal skin tissues, LCE3C is dramatically expressed at the corneous layers in the skin cancer tissues. LCE3C proteins are mainly expressed in ECM, and might be negatively regulated by GRHL3 in A431 cells.

Key words LCE3C; squamous cell carcinoma; basal cell carcinoma; cellular localization