

# Nav1.6 在口腔颌面部鳞状细胞癌组织中的表达

向娟 蔡伯慧 王润 蒋勇

**摘要** 目的 探讨 Nav1.6 在口腔鳞状细胞癌组织中的表达,以及 Nav1.6 在口腔鳞状细胞癌发生中的相关性。方法

采用免疫组化 SP 法、荧光定量 PCR 法,对 50 例口腔鳞癌组织及 16 例非癌症组织中 Nav1.6 表达进行检测,利用仪器对结果进行分析。结果 口腔鳞癌组织中 Nav1.6 的表达量高于非癌症组织。随着分化程度的增高,Nav1.6 的表达量逐渐减少。其表达量与患者年龄、性别、肿瘤部位、有无淋巴结转移无关。结论 Nav1.6 的上调可能与口腔鳞癌的生物行为有关,其作用机制有待进一步研究。

**关键词** 口腔鳞状细胞癌;电压门控型钠离子通道;Nav1.6  
**中图分类号** R 780.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1157-04

口腔颌面部的恶性肿瘤中绝大多数为鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC),占 80% 以上<sup>[1]</sup>。OSCC 发病率正逐年上升,对患者生命构成了严重威胁<sup>[2]</sup>,其晚期转移和复发是口腔颌面外科临床医师不得不面对的一个棘手问题。多年来研究人员一直对 OSCC 的转移机制进行探讨,但至今尚无一种特异并敏感的肿瘤标志物能准确诊断早期肿瘤并确定其恶性程度。电压门控型钠离子通道(voltage-gated sodium channel,VGSC)为多亚基的跨膜糖蛋白,由一个  $\alpha$  亚单位和  $\beta$  亚单位组成。 $\alpha$  亚单位是钠通道的功能性亚单位<sup>[3]</sup>,由 Nav1.1~Nav1.9 共 9 个亚型组成,分布于不同的组织、细胞<sup>[4]</sup>。VGSC 在“非兴奋”细胞(内皮细胞、骨细胞等)和一些癌症细胞(乳腺癌、卵巢癌等)中表达,涉及癌症细胞的迁移和侵袭<sup>[5]</sup>。VGSC 中 Nav1.6 亚型与其他钠离子通道亚型相比,其表达的癌症种类最多,而且在每种癌症中其表达量也最高。这已经在人类宫颈癌、前列腺癌<sup>[6-10]</sup>等癌症中得到证实,并且 Nav1.6 通道的表达或点活动可显著影响肿瘤细胞的增殖和侵袭能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 组织标本收集和处理** 于安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科病房收集 50 例 OSCC 患者术中切除的癌症组织,被收集的病例要求仅患有口腔颌面部鳞状细胞癌,未曾患有其他癌症或疾病等。收集的所有标本术后病理诊断为鳞状细胞癌。患者年龄 40~70(60.21 $\pm$ 5.11)岁,男 30 例,女 20 例。高分化 15 例,中分化 19 例,低分化 16 例。舌癌 21 例,颊黏膜癌 18 例,牙龈癌等 11 例。另收集非癌症组织 16 例,如来自拔牙患者术中切除的牙龈组织、唾液腺囊肿等术中切除的非癌症组织。以上组织收集后均立即冻存于 -80 °C 冰箱。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 兔抗人 SCN8A(Nav1.6)多克隆抗体(北京博奥森生物有限公司);SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物科技公司);DL 2 000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司,批号: B7301A);TRIzol(美国 Invitrogen 公司,批号: 14105)。CH20BIMF 200 显微镜(日本 OLYMPUS 公司);K960 型 PCR 仪(杭州晶格科学仪器有限公司);LX300 型低速迷你离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);PIKOREAL 96 荧光定量 PCR 仪(芬兰 Thermo 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 荧光定量 PCR 法检测 Nav1.6 的表达** 将收集好的组织取一部分用作荧光定量 PCR。根据 Nav1.6 的基因序列设计并合成引物,上游引物:5'-CTTGTCATATTGTGGTTCCTTC-3',下游引物:5'-TGTGCCTCTTCCTGTTGCTTCTTA-3',引物长度 165 bp。 $\beta$ -actin 上游引物:5'-GGGAAATCGTGCCTGACATTAAGG-3',下游引物 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3',引物长度 185 bp。利用 TRIzol 分别提取非癌症组织和 OSCC 组织的 RNA。分别取 3  $\mu$ g 总 RNA 做逆转录反应。逆转录后再分别取 1  $\mu$ l 反应液做为荧光定量的模板。反应条件为:95 °C、5 min、95 °C、10 s、60 °C、30 s、40 个循环。反应结束由系统自动计算定量结果。

**1.2.2 免疫组化法检测 Nav1.6 的表达** 将收集好

2015-04-22 接收

基金项目:安徽省科技厅年度计划(编号:12070403062)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院口腔预防医学教研室,合肥 230032

作者简介:向娟,女,硕士研究生;

蒋勇,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: j6263@163.com

的组织取另一部分用做免疫组化。用 4% 甲醛溶液固定组织,石蜡包埋组织,制成蜡块,做 4 μm 厚连续切片,甲醛溶液浸泡切片溶解石蜡,放入 50 °C 电热干燥 20 min,放入梯度酒精中脱水,清水冲洗。再将切片放入柠檬酸钠溶液中,高温加热 10 min,冷却 10 min,再高温 5 min,冷却至室温。将每张切片拭干多余水分,滴加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 37 °C 恒温箱孵育 30 min; PBS 溶液冲洗 3 遍,滴加一抗,4 °C 冰箱放置过夜, PBS 冲洗后,滴加二抗; PBS 冲洗,滴加 DAB 显示剂,显微镜下观察,冲洗干净切片。苏木精行细胞核染色,冲洗干净后放入干燥箱干燥。封片后显微镜下观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

**1.2.3 免疫组化结果判定** 在光镜下观察,凡是细胞膜和细胞质出现黄色至棕黄色颗粒为阳性。在 200 倍视野下,每例切片随机选取 5 个不重复、不重叠的视野,采用双评分定量积分法<sup>[11]</sup>对非癌组织 and OSCC 组织中阳性细胞百分数和着色强度进行分析。即根据阳性细胞百分数评分: <5% (0 分); 6% ~ 25% (1 分); 26% ~ 49% (2 分); 50% ~ 74% (3 分); ≥74% (4 分)。再根据阳性细胞着色强度评分: 细胞无染色(0 分); 弱染色(1 分); 染色清楚(2 分); 强染色(3 分)。最后,以两者得分相乘判断免疫组化的结果,可以分为: 阴性(-): 0 分; 弱阳性(+): 1 ~ 4 分; 中度阳性(++): 5 ~ 8 分; 强阳性(+++): 9 ~ 12 分。为了使统计方便,将弱阳性、

中度阳性、强阳性统称为阳性。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,分别进行  $\chi^2$  检验。

**2 结果**

**2.1 荧光定量 PCR 法检测 Nav1.6 的表达** 经过熔解曲线(图 1)测定,得到了特异性的单峰扩增产物,并且解链温度在 80 °C 左右,产物单一,引物特异性较好,无非特异性扩增产物。各个样本的扩增曲线平行性好,扩增效率基本一致(图 1)。本次实验使用 relative quantification study 的方法分析,采用的指标为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。非癌组织、高分化鳞癌组、中分化鳞癌组、低分化鳞癌组中 Nav1.6 mRNA 平均相对表达量比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。方差分析后,非癌组与高、中、低分化鳞癌组方差分析  $F$  值分别为: 3.80、3.97、4.89,高分化组与中、低分化组方差分析  $F$  值分别为 3.50、4.07,中分化组与低分化组  $F$  值为 3.558。荧光定量 PCR 结果显示,非癌组织和 OSCC 组织中 Nav1.6 的表达量有明显差异,在 OSCC 组织中 Nav1.6 的表达量随着肿瘤的分化程度增加而降低,见表 1。

**2.2 免疫组化检测 Nav1.6 的表达** 免疫组化结果显示,Nav1.6 在非癌组织和 OSCC 组织中均有阳性表达,主要位于细胞膜和细胞质,阳性表达为黄色至棕黄色颗粒。对 16 例非癌组织观察发现,有

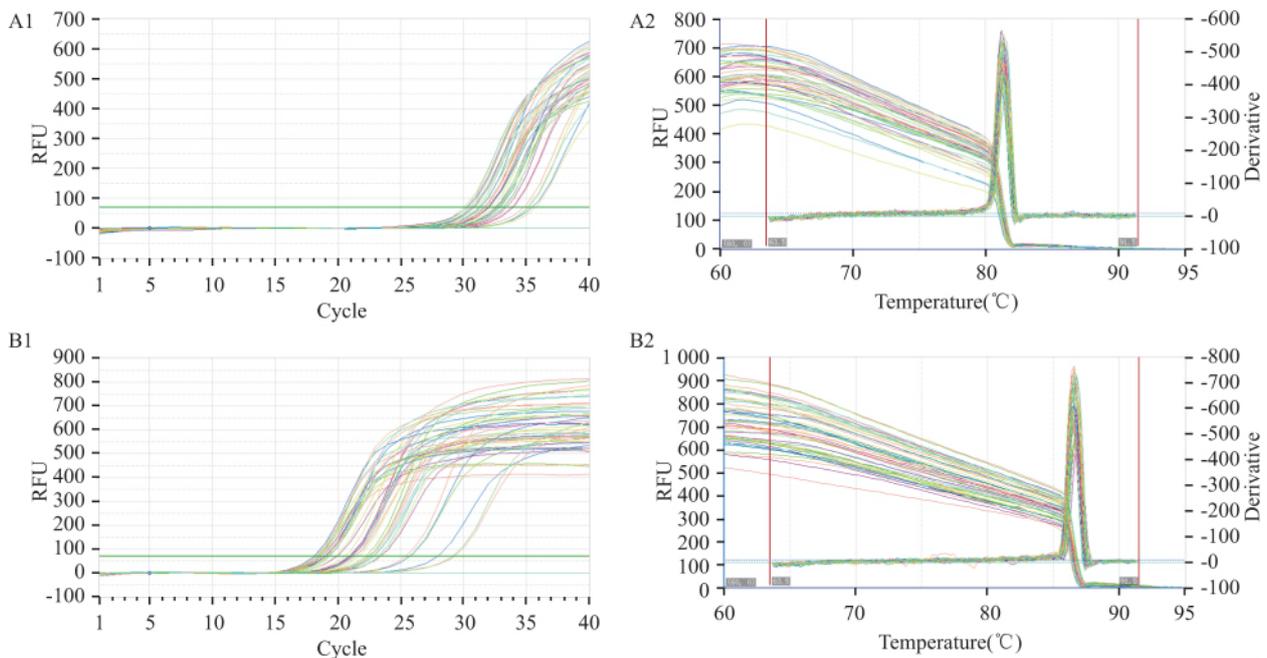


图 1 Nav1.6、β-actin 的扩增曲线和熔解曲线  
A: Nav1.6; B: β-actin; 1: 扩增曲线; 2: 熔解曲线

表1 非癌症组织和 OSCC 组织中 Nav1.6 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Nav1.6 平均相对表达量
非癌症	16	1.00 ± 0.14
OSCC		
高分化	15	2.31 ± 0.52*
中分化	19	4.46 ± 0.58*#
低分化	16	8.86 ± 1.63* <sup>△</sup>

与非癌症组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与高分化组比较: #  $P < 0.05$ ; 与中分化组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$

2 例偶有少量 Nav1.6 表达,呈淡黄色染色,见表 2。绝大多数非癌症组织呈阴性表达,见图 2A。50 例 OSCC 组织中,较强的染色多分布在癌巢、角化珠中。在癌症大部分间质中呈阴性表达,间质中浸润的炎性细胞也有少量染色。在这些癌症组织中,利用上述双评分定量积分法得出:高分化鳞癌中阳性 8 例(弱阳性 3 例、中度阳性 5 例)。中分化鳞癌中阳性 15 例(弱阳性 4 例、中度阳性 3 例、强阳性 8 例)。低分化鳞癌中阳性 16 例(弱阳性 5 例、中度阳性 5 例、强阳性 6 例)。总计得出,在 OSCC 中,阴性 11 例,阳性 39 例。Nav1.6 在不同性别( $P = 0.443$ )、不同部位( $P = 0.843$ )的表达情况差异均无统计学意义,淋巴结转移组和无淋巴结转移组之间差异也无统计学意义( $P = 0.571$ )。不同分化程度各组之间比较,差异有统计学意义( $P = 0.012$ )。可见 Nav1.6 在 OSCC 中的表达与患者的性别、肿瘤部位、有无淋巴结转移无相关性,与肿瘤的分化程度相关。见表 3、图 2。

表2 Nav1.6 在非癌症组织和 OSCC 中的表达

组别	n	阳性					$\chi^2$ 值	P 值
		阴性 (n)	+	++	+++	++++		
非癌症组织	16	14	2	0	0	12.5	24.75	0.00
OSCC	50	11	12	13	14	78.0		

表3 Nav1.6 在 OSCC 中的表达与临床病例参数之间的关系

分组	n	Nav1.6 的表达(n)		阳性率 (%)	$\chi^2$ 值	P 值
		阴性	阳性			
性别						
男	32	5	25	83.33	0.588	0.443
女	20	6	14	70.00		
部位						
舌	21	5	16	76.19		
颊	18	3	15	83.33	0.341	0.843
牙龈	11	3	8	72.72		
分化程度						
高	15	7	8	53.33		
中	19	4	15	78.95	8.795	0.012
低	16	0	16	100.00		
淋巴结转移						
有	23	7	16	69.57	0.322	0.571
无	27	4	23	85.19		

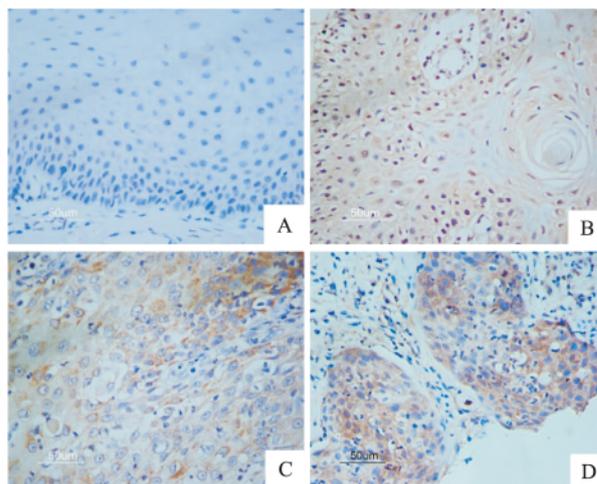


图2 Nav1.6 在非癌症组织和高、中、低分化鳞癌组织中的表达 ×200

A: 非癌症组织; B: 高分化鳞癌; C: 中分化口腔鳞癌细胞质及细胞膜; D: 低分化鳞癌的癌巢,肿瘤间质中表达弱,炎性细胞有阳性表达

### 3 讨论

Nav1.6 做为一种细胞形成动作电位过程中重要的组成构件,与多种疾病相关。目前研究<sup>[12]</sup>证实 Nav1.6 在各类癌症中,尤其是宫颈鳞状细胞癌中的高表达被认为是新型的肿瘤标志物。利用荧光定量 PCR 法以及免疫组化法等证实了在 OSCC 中也存在 Nav1.6 的表达,而且 OSCC 组织中的表达明显高于口腔非癌症组织,提示 Nav1.6 可能参与了 OSCC 的发病。Nav1.6 由 Schaller et al<sup>[13]</sup> 在大鼠的中枢及周围神经系统中发现,是由 SCN8A 基因编码的,编码 1 976 个氨基酸。在人类中,基因的染色体定位为 12q。Nav1.6 在中枢神经系统中广泛而均匀地表达,仅少数表达于周围神经系统。研究<sup>[6-10]</sup>显示 Nav1.6 在肿瘤细胞中也有明显的表达,这些已经在人类宫颈癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、恶性黑色素瘤和恶性胸膜间皮瘤中得到证实。但是目前对于 VGSC 促使癌症细胞侵袭、转移的机制仍然不完全清楚。有些学者认为,钠离子通道影响细胞的增殖途径可能与通过影响  $K^+$  或  $Ca^{2+}$  的通透性或电活动以及作用于细胞生长有关的信号转导通路有关<sup>[14]</sup>。

通过荧光定量 PCR,可以观察到在非癌症组织和 OSCC 组织中均有 Nav1.6 的表达。但 OSCC 组织中的平均相对表达量明显大于非癌症组的平均相对表达量,这一结果与 Hernandez-Plata et al<sup>[15]</sup> 在宫颈癌中的研究结果一致。提示 Nav1.6 可能与 OSCC 的发病有关,并且与 OSCC 的分化程度呈负相关。

性。

免疫组化结果进一步显示, Nav1.6 在 OSCC 组织中阳性表达率明显高于非癌症组织。Nav1.6 的表达量与 OSCC 组织分化程度相关。在高分化、中分化、低分化组织中其阳性表达率不同, 表达量与分化程度呈负相关性。研究还显示 Nav1.6 的表达与患者的性别、肿瘤生长的部位、有无淋巴结转移等因素无关。这与收集组织标本中患者的个体差异、实验样本量较小, 以及其他多种相关因素有关。需要扩大样本量继续验证, 也需要对患者进行长期跟踪随访, 以进一步观察 Nav1.6 与 OSCC 之间的关系。

### 参考文献

- [1] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 6版, 北京: 人卫生出版社, 2010: 274.
- [2] Kim E S, Hong W K, Khuri F R. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers [J]. *Annu Rev Med* 2002, 53: 223 - 43.
- [3] Jang S J, Choi H W, Choi D L, et al. *In vitro* cytotoxicity on human ovarian cancer cells by T-type calcium channel blockers [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(24): 6656 - 62.
- [4] Waxman S G, Merkies I S, Gerrits M M, et al. Sodium channel genes in pain-related disorders: phenotype-genotype associations and recommendations for clinical use [J]. *Lancet Neurol* 2014, 13(11): 1152 - 60.
- [5] 潘慧艳, 赵群, 詹阳等. 电压门控钠离子通道表达宫颈癌细胞增殖侵袭转移作用的研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(4): 189 - 93.
- [6] Diaz D, Delgado D M, Hernández-Gallegos E, et al. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer [J]. *J Cell Physiol* 2007, 210(2): 469 - 78.
- [7] Nakajima T, Kubota N, Tsutsumi T, et al. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells [J]. *Br J Pharmacol* 2009, 156(3): 420 - 31.
- [8] Roger S, Rollin J, Barascu A, et al. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39(4): 774 - 86.
- [9] Carrithers M D, Chatterjee G, Carrithers L M, et al. Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A [J]. *J Biol Chem* 2009, 284(12): 8114 - 26.
- [10] Fulgenzi G, Graciotti L, Faronato M, et al. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38(7): 1146 - 59.
- [11] Menéndez S T, Rodrigo J P, Allonca E, et al. Expression and clinical significance of the Kv3.4 potassium channel subunit in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas [J]. *J Pathol* 2010, 221(4): 402 - 10.
- [12] 潘慧艳, 赵群, 詹阳等. RNAi 干扰电压门控钠通道 SCN8A 基因对人宫颈癌 SiHa 细胞侵袭转移的影响 [J]. *首都医科大学学报* 2012, 33(3): 350 - 5.
- [13] Schaller K L, Krzemien D M, Yarowsky P J, et al. A novel abundant sodium channel expressed in nervous and glia [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(5 Pt 1): 3231 - 42.
- [14] Diss J K, Fraser S P, Djamgoz M B. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects [J]. *Eur Biophys J* 2004, 33(3): 180 - 93.
- [15] Hernandez-Plata E, Ortiz C S, Marquina-Castillo B, et al. Overexpression of Nav1.6 channel is associated with the invasion capacity of human cervical cancer [J]. *In J Cancer* 2011, 130(9): 2013 - 23.

## Expression of voltage-gated sodium channel Nav1.6 in oral squamous cell carcinoma

Xiang Juan, Cai Bohui, Wang Run, et al

(Dept of Preventive Dentistry, Stomatologic Hospital and College, Anhui Medical University & Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the expression of Nav1.6 in oral squamous cell carcinoma and the relationship between Nav1.6 and the development of oral squamous cell carcinoma. **Methods** Immunohistochemistry, real-time quantitative PCR were used to detect the expression of Nav1.6 in carcinoma and normal human oral tissue. The results were analyzed by using instruments. **Results** The results revealed that the expression of Nav1.6 in oral squamous cell carcinoma increased significantly in comparison with the normal oral tissue. The higher the degree of tumor differentiation, the less the expression of Nav1.6. And the expression of Nav1.6 had nothing to do with age, sex, the site of tumor and the metastasis of lymph nodes. **Conclusion** The up-regulated level of Nav1.6 mRNA in oral squamous cell carcinoma tissue is significantly associated with the pathogenesis of OSCC.

**Key words** oral squamous cell carcinoma; voltage-gated sodium channel; Nav1.6