

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 08. 024

JMJD3 与 CyclinD1 基因在喉鳞状细胞癌组织中的表达及意义

刘玉娟¹, 郭明艳^{2△}

杨凌示范区医院: 1. 耳鼻咽喉科; 2 检验科, 陕西咸阳 712100

摘 要:目的 探讨 Jumonji 结构域包含蛋白 3(JMJD3)与细胞周期素 D1(CyclinD1)基因在喉鳞状细胞癌组织中的表达及意义。方法 选取 2016 年 12 月至 2021 年 12 月该院肿瘤科收治的 80 例喉鳞状细胞癌患者作为研究对象,术中取喉鳞状细胞癌组织与癌旁正常组织,采用免疫组织化学染色法检测 JMJD3 和 CyclinD1 基因的表达情况,分析 JMJD3 和 CyclinD1 表达与临床病理特征的关系。结果 喉鳞状细胞癌组织与癌旁正常组织 JMJD3 阳性率分别为 48.75%、17.50%,CyclinD1 阳性率分别为 60.00%、20.00%,喉鳞状细胞癌组织 JMJD3 和 CyclinD1 的表达均高于癌旁正常组织,差异均有统计学意义($P<0.05$);不同年龄、性别、吸烟史的喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 和 CyclinD1 阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);非声门型、分化程度为中低分化、有淋巴结转移及 TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期的喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 与 CyclinD1 阳性率更高;癌组织 JMJD3 与 CyclinD1 表达呈正相关($r=0.661, P<0.05$)。结论 JMJD3 和 CyclinD1 基因在喉鳞状细胞癌组织中均呈过度表达,并且二者呈正相关,说明与癌细胞的病情进展、侵袭性、恶性程度有关,在癌细胞的发展过程中起重要作用。

关键词:喉鳞状细胞癌; Jumonji 结构域包含蛋白 3; 细胞周期素 D1
中图法分类号:R739.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2023)08-1126-04

Expressions and significance of JMJD3 and CyclinD1 in cancer tissues of laryngeal squamous cell carcinoma

LIU Yujuan¹, GUO Mingyan^{2△}

1. Department of Otolaryngology; 2. Department of Clinical Laboratory, Yangling Demonstration District Hospital, Xianyang, Shaanxi 712100, China

Abstract: **Objective** To investigate the expressions and significance of Jumonji domain-containing protein 3 (JMJD3) and CyclinD1 in tissues of laryngeal squamous cell carcinoma. **Methods** A total of 80 patients with laryngeal squamous cell carcinoma treated in department of oncology of the hospital from December 2016 to December 2021 were selected. Laryngeal cancer tissues and adjacent tissues were collected during surgery, and immunohistochemical staining was used to detect the protein expressions of JMJD3 and CyclinD1. The relationship between the expressions of JMJD3 and CyclinD1 and the clinicopathological characteristics were analyzed. **Results** The positive rates of JMJD3 in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and adjacent normal tissues were 48.75% and 17.50%, and the positive rates of CyclinD1 were 60.00% and 20.00% respectively. The expressions of JMJD3 and CyclinD1 in laryngeal squamous cell carcinoma tissues were higher than those in adjacent normal tissues ($P<0.05$). There were no statistical differences in age, gender and smoking history in patients with laryngeal squamous cell carcinoma ($P>0.05$). The positive rates of JMJD3 and CyclinD1 were higher among laryngeal squamous cell carcinoma patients with glottic type, moderate or poor differentiation degree, lymph node metastasis and Ⅲ-Ⅳ TNM stage ($P<0.05$). The expression of JMJD3 in cancer tissues was positively correlated with CyclinD1 expression ($r=0.661, P<0.05$). **Conclusion** Both JMJD3 and CyclinD1 genes are over-expressed in laryngeal squamous cell carcinoma tissues, and they are positively correlated with each other, indicating that they are related to the progression, invasiveness and malignancy of cancer cells, and play an important role in the development of cancer cells.

Key words: laryngeal squamous cell carcinoma; Jumonji domain-containing protein 3; CyclinD1

喉癌是指出现在喉部的常见恶性肿瘤,居头颈部肿瘤第 2 位,至今医学界还未明确喉癌致病的直接原因,但多认为慢性炎症反应、放射线、癌基因的激活等不利因素是喉癌发病的重要诱因^[1]。鳞状细胞癌是

喉癌的最常见类型,由于喉部承担着至关重要的呼吸通道作用,在针对喉癌的治疗方面不仅要保证准确切除肿瘤,同时还要保留喉功能^[2]。虽然近年来喉鳞状细胞癌的治疗手段有了明显提升,但仍然无法改善喉

癌患者 5 年生存率偏低的现状^[3]。不同的基因参与了癌症的发病及进展,有研究表明,Jumonji 结构域包含蛋白 3(JMJD3)作为组蛋白 H3K27 的去甲基化酶,对肿瘤既有促癌作用,也有抑癌作用,其在喉癌中的作用和效果具有一定参考价值^[4]。同时作为细胞周期调节因子之一的细胞周期素 D1(CyclinD1)也被认为与肿瘤发生及进展有关,其过度表达可能造成癌细胞的进一步增殖,使病情恶化^[5]。因此,本研究对喉鳞状细胞癌患者癌组织中 JMJD3 和 CyclinD1 基因的表达意义进行分析,对其意义和价值进行深度探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 12 月至 2021 年 12 月本院肿瘤科收治的 80 例喉鳞状细胞癌患者作为研究对象,其中男 68 例,女 12 例;年龄 31~78 岁,平均(58.19±9.18)岁;高分化鳞癌 50 例,中分化鳞癌 18 例,低分化鳞癌 12 例;TNM 分期^[6]:Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 27 例,Ⅲ期 24 例,Ⅳ期 17 例。纳入标准:(1)经过病理检查确诊为喉鳞状细胞癌的患者^[7];(2)进行手术治疗将癌症部分切除的患者;(3)病历资料完整的患者。排除标准:(1)喉腺癌患者;(2)合并其他部位恶性肿瘤的患者;(3)术前曾接受化疗、放疗等治疗的患者;(4)研究过程中退出或失访的患者。所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。本研究经本院伦理委员会审核批准。

1.2 组织标本处理 在患者术后将获取的癌组织与癌旁正常组织(距离癌组织 2 cm)直接放于液氮中保存,后经过 10%中性甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后切片,切片厚度保持在 4~5 μm。

1.3 免疫组织化学染色 将石蜡切片置于烤箱中烘烤 2 h 后放于二甲苯中浸泡进行脱蜡,最后依次放入梯度乙醇脱水,使用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,在枸橼酸缓冲液中煮沸 15 min,待冷却继续冲洗 3 次,最后置于过氧化氢阻断溶液阻断内源性过氧化物酶的活性,经过冲洗后使用山羊血清封闭,孵育 10 min。待封闭完成后去除山羊血清,加入 JMJD3 兔单克隆抗体/兔抗人 CyclinD1 单克隆抗体,在 4 ℃下孵育过夜后冲洗 3 次,再次加入兔二抗免疫组织化学试剂在室温下孵育 50 min,重复冲洗步骤。最后加入二氨基联苯胺显色液,在显微镜观察下等待 3~10 min 后停止染色后进行复染、返蓝,并使用自来水冲洗,最后使用梯度乙醇脱水并使用中性树胶封片。试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 免疫组织化学结果判定 选择 2 名资深病理科医生进行双盲阅片,首先在低倍镜下选定喉癌区域与癌旁区域,然后切换高倍镜进行观察,随机选择 5 个视野,JMJD3 与 CyclinD1 均以细胞核染色成为棕黄色颗粒为阳性细胞,并对阳性细胞百分比进行评判。染色强度:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为深黄色,3 分为棕黄色。阳性细胞百分比:0 分为阳性细胞<5%,1 分为 5%~25%,2 分为 >25%~50%,3 分

为>50%~75%,4 分为 >75%~100%。将 1~4 分归类为阳性细胞。

1.5 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析处理。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关对 JMJD3 与 CyclinD1 的相关性进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 喉鳞状细胞癌组织和癌旁正常组织 JMJD3 与 CyclinD1 的表达情况比较 喉鳞状细胞癌组织和癌旁正常组织 JMJD3 阳性率分别为 48.75%、17.50%,喉鳞状细胞癌组织和癌旁正常组织 CyclinD1 阳性率分别为 60.00%、20.00%,喉鳞状细胞癌组织 JMJD3 与 CyclinD1 的表达均高于癌旁正常组织,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 喉鳞状细胞癌组织和癌旁正常组织 JMJD3 与 CyclinD1 的表达情况比较[n(%)]

组别	n	JMJD3		CyclinD1	
		阳性	阴性	阳性	阴性
喉鳞状细胞癌组织	80	39(48.75)	41(51.25)	48(60.00)	32(40.00)
癌旁正常组织	80	14(17.50)	66(82.50)	16(20.00)	64(80.00)
χ^2		17.634		26.667	
P		<0.001		<0.001	

2.2 不同临床病理特征喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 阳性率比较 不同年龄、性别、吸烟史的喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);非声门型、分化程度为中低分化、有淋巴结转移及 TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期的喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 阳性率均高于声门型、分化程度为高分化、无淋巴结转移及 TNM 分期为Ⅰ~Ⅱ期的喉鳞状细胞癌患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同病理特征喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 阳性率比较[n(%)]

病理特征	n	JMJD3		χ^2	P
		阳性	阴性		
年龄(岁)				0.803	0.370
≥60	59	27(45.76)	32(54.24)		
<60	21	12(57.14)	9(42.86)		
性别				0.009	0.925
男	68	33(48.53)	35(51.47)		
女	12	6(50.00)	6(50.00)		
肿瘤部位				6.307	0.043
声门型	52	20(38.46)	32(61.54)		
非声门型	28	19(67.86)	9(32.14)		
分化程度				10.099	0.006
高分化	50	18(36.00)	32(64.00)		
中低分化	30	21(70.00)	9(30.00)		
淋巴结转移				8.451	0.004
有	34	23(67.65)	11(32.35)		
无	46	16(34.78)	30(65.22)		
TNM 分期				9.847	0.002
Ⅰ~Ⅱ期	39	12(30.77)	27(69.23)		
Ⅲ~Ⅳ期	41	27(65.85)	14(34.15)		

续表 2

不同病理特征喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 阳性率比较[n(%)]

病理特征	n	JMJD3		χ^2	P
		阳性	阴性		
吸烟史				0.374	0.541
有	57	29(50.88)	28(49.12)		
无	23	10(43.48)	13(56.52)		

2.3 不同临床病理特征喉鳞状细胞癌患者 CyclinD1 阳性率比较 不同年龄、性别、吸烟史的喉鳞状细胞癌患者 CyclinD1 阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);非声门型、分化程度为中低分化、有淋巴结转移及 TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期的喉鳞状细胞癌患者 CyclinD1 阳性率均高于声门型、分化程度为高分化、无淋巴结转移及 TNM 分期为Ⅰ~Ⅱ期的喉鳞状细胞癌患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 JMJD3 与 CyclinD1 阳性的影响因素 以是否阳性作为因变量(是=1,否=0),将表 2、表 3 中差异有统计学意义的指标作为自变量进行赋值,肿瘤部位(非声门型=1,声门型=0)、分化程度(中低分化=1,高分化=0)、淋巴结转移(有=1,无=0)、TNM 分期(Ⅲ~Ⅳ期=1,Ⅰ~Ⅱ期=0),纳入多因素 Logistic 回归方程,结果显示,肿瘤部位为非声门型、分化程度为中低分化、有淋巴结转移及 TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期是 JMJD3 与 CyclinD1 阳性的相关危险因素($P<0.05$)。见表 4、5。

表 4

喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 阳性的多因素分析

因素	β	SE	Wald χ^2	OR	95%CI	P
非声门型	0.711	0.229	9.640	2.036	1.300~3.189	0.002
中低分化	1.025	0.485	4.466	2.787	1.077~7.211	0.035
有淋巴结转移	0.867	0.403	4.628	2.380	1.080~5.243	0.032
TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期	0.818	0.339	5.822	2.266	1.166~4.404	0.016

表 5

喉鳞状细胞癌患者 CyclinD1 阳性的多因素分析

因素	β	SE	Wald χ^2	OR	95%CI	P
非声门型	0.836	0.381	4.815	2.307	1.093~4.868	0.029
中低分化	1.146	0.463	6.126	3.146	1.269~7.795	0.014
有淋巴结转移	1.006	0.427	5.551	2.735	1.184~6.315	0.019
TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期	1.223	0.501	5.959	3.397	1.273~9.070	0.015

表 6

JMJD3 与 CyclinD1 在喉鳞状细胞癌中表达的相关性(n)

JMJD3	CyclinD1		合计
	阳性	阴性	
阳性	33	6	39
阴性	15	26	41
合计	48	32	

3 讨 论

喉鳞状细胞癌的病因目前尚不清楚,但随着人们生活习惯的改变,患病率逐年上升,给患者的生活质量造成影响,如果出现淋巴结转移还可危及患者的生命安全^[8]。DNA 甲基化、细胞周期调控在恶性肿瘤

2.5 JMJD3 与 CyclinD1 在喉鳞状细胞癌中表达的相关性 癌组织 JMJD3 与 CyclinD1 表达呈正相关($r=0.661,P<0.05$)。见表 6。

表 3

不同病理特征喉鳞状细胞癌患者 CyclinD1 阳性率比较[n(%)]

病理特征	n	JMJD3		χ^2	P
		阳性	阴性		
年龄(岁)				1.819	0.177
≥60	59	38(64.41)	21(35.59)		
<60	21	10(47.62)	11(52.38)		
性别				0.016	0.898
男	68	41(60.29)	27(39.71)		
女	12	7(58.33)	5(41.67)		
肿瘤部位				7.110	0.029
声门型	52	29(55.77)	23(44.23)		
非声门型	28	19(67.86)	9(32.14)		
分化程度				15.704	<0.001
高分化	50	22(44.00)	28(56.00)		
中低分化	30	26(86.67)	4(13.33)		
淋巴结转移				12.310	<0.001
有	34	28(82.35)	6(17.65)		
无	46	20(43.48)	26(56.52)		
TNM 分期				18.420	<0.001
Ⅰ~Ⅱ期	39	14(35.90)	25(64.10)		
Ⅲ~Ⅳ期	41	34(82.93)	7(17.07)		
吸烟史				2.604	0.107
有	57	31(54.39)	26(45.61)		
无	23	17(73.91)	6(26.09)		

的发生和发展中起重要作用。本研究主要通过 JMJD3 与 CyclinD1 在喉鳞状细胞癌中表达差异进行比较,探讨其在喉鳞状细胞癌发展中的作用,从而为抑制肿瘤生长提供依据。

本研究收集了 80 例喉鳞状细胞癌患者的癌组织与癌旁正常组织,分别检测 JMJD3 与 CyclinD1 的表达情况,结果显示,JMJD3 与 CyclinD1 在癌组织中的表达分别为 48.75%、60.00%,均高于癌旁组织,说明 JMJD3 与 CyclinD1 在喉鳞状细胞癌的发展中可能起促进作用。JMJD 家族是重要的去甲基化酶,主要催化机体中组蛋白去甲基化,从而调节对应基因的表达,在多种细胞的致癌过程中发挥作用^[9-10]。作为

JMJD 家族中的一员, JMJD3 可以特异性催化组蛋白 H3K27me₂/me₃ 去甲基化, 从而参与胚胎发育、细胞分化与衰老等生物学过程, 激活相应基因表达^[11]。CyclinD1 是一种细胞周期调控蛋白, 主要与细胞周期各种蛋白结合并促进细胞周期从 G1 向 S 转化。CyclinD1 同时也是一种原癌基因, 目前已被证实其在胃癌中出现过度表达, 并且与肿瘤的发展程度相关, 可作为判断患者预后的独立指标^[12]。

本研究发现, 肿瘤部位处于非声门型、分化程度为中低分化、有淋巴结转移及 TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期的喉鳞状细胞癌患者 JMJD3 与 CyclinD1 阳性率更高, 并且以上均为 JMJD3 及 CyclinD1 阳性的危险因素, 与 GARG 等^[13] 研究结果类似。JMJD3 的致癌作用可能与 H3K27 去甲基化有关, H3K27 作为转录和抑制性转分化的标志, 在去甲基化后基因表达异常, 促使细胞正常分化功能障碍, 从而促进肿瘤疾病的发生^[14]。细胞周期与肿瘤的关系密切, 其调控机制受到破坏则可导致细胞分化不足与生长失控, 导致细胞无限增殖, 从而向肿瘤细胞转化^[15]。CyclinD1 作为细胞在 G1 向 S 期转化过程中的重要调控因子, 其表达失控可促进更多蛋白结合, 从而激活视网膜母细胞抑制蛋白早期磷酸化, 释放大转录因子启动 S 期相关基因转录, 缩短细胞周期过渡时间, 加快细胞分裂速度, 恶变为肿瘤^[16]。肿瘤分化程度主要指癌细胞的成熟程度, 分化程度越低的肿瘤恶性程度越高, 因此转移、侵犯到淋巴结的可能性相对较大, 在短时间内病情恶化, 分期进展迅速^[17]。随着分化程度降低, JMJD3 与 CyclinD1 表达随之升高, 符合肿瘤细胞内细胞生长旺盛的特点, 说明 JMJD3 与 CyclinD1 的异常激活与喉鳞状细胞癌的病情进展、侵袭性、恶性程度有关。同时在治疗过程中还需要多注意非声门型患者的日常监测, 有助于改善其预后。本研究还发现, 喉鳞状细胞癌组织 JMJD3 与 CyclinD1 表达呈正相关, 说明 JMJD3 可能与 CyclinD1 存在相互促进机制而使细胞进一步癌变, 可在后续研究中详细说明。因此, 可考虑选择 JMJD3 组蛋白去甲基化酶活性抑制剂, 通过促进细胞分化功能恢复正常来减缓癌细胞的发展。

综上所述, JMJD3 和 CyclinD1 基因在喉鳞状细胞癌组织中均呈过度表达, 并且与癌症细胞的病情进展、侵袭性、恶性程度有关, 在癌细胞的发展过程中起重要作用。可在后续研究中进一步探讨 JMJD3 和 CyclinD1 在喉癌中的作用机制, 为临床新药的开发提供更多依据。但本研究属于单中心研究, 且样本量较少, 存在样本偏倚问题, 并且未探讨 JMJD3 与 CyclinD1 表达在不同类型喉鳞状细胞癌中的差异, 可考虑在后续研究中扩大样本量进一步研究。

参考文献

[1] GAO W, WU Y, HE X, et al. MicroRNA-204-5p inhibits invasion and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma by suppressing forkhead box C1 [J]. J Cancer, 2017, 8(12): 2356-2368.

[2] SHEN Z, LIN L, CAO B, et al. LZTS2 promoter hypermethylation: a potential biomarker for the diagnosis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. World J Surg Oncol, 2018, 16(1): 42.

[3] LI X Y, LI J R, GUO H G. The effect of regional neck dissection on positive cervical lymph node of cNO laryngeal carcinoma [J]. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2017, 31(23): 1793-1796.

[4] 杜建波, 王玉敏. 靶向调控组蛋白去甲基化酶 JMJD3 与肿瘤治疗 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57(4): 258-263.

[5] 张维彬, 黄荣熙, 黄娅. 鼻咽癌组织中 PTTG 和 cyclinD1 蛋白的表达及临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(8): 1031-1033.

[6] CLARK J R, RUMCHEVA P, VENESS M J. Analysis and comparison of the 7th edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) nodal staging system for metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(13): 4252-4258.

[7] 李金忠, 郑家伟. NCCN 头颈癌诊治指南 (2007 版) [J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2008, 6(1): 75-80.

[8] LIU Y, LIU J, WANG L, et al. MicroRNA195 inhibits cell proliferation, migration and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting ROCK1 [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 7154-7162.

[9] 吕娟, 吕珊妹, 董学君. JMJD3 和 CD163 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 医学研究杂志, 2022, 51(1): 116-119.

[10] 彭晨, 覃刚, 吴莉莉, 等. 组蛋白去甲基化酶 JMJD3 对胃癌细胞增殖凋亡的影响 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(4): 517-520.

[11] IDRISOU M, DAURES M, JEMIA A B, et al. EZH2 histone methyltransferase and JMJD3 histone demethylase implications in prostate cancer [J]. Omics, 2017, 21(12): 751-753.

[12] 王军, 赵醒, 赵宇阳, 等. CyclinD1、细胞分裂周期蛋白 C25B 与胃癌的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(6): 1456-1458.

[13] GARG P, MAZUR M M, BUCK A C, et al. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts [J]. Orthop Surg, 2017, 9(1): 13-19.

[14] 唐艳珍, 臧传善, 秦作荣, 等. JMJD3 和 EZH2 在 45 例喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义分析 [J]. 肿瘤学杂志, 2021, 27(6): 505-509.

[15] BRODIE S, LEE H K, JIANG W, et al. The novel long non-coding RNA TALNEC2, regulates tumor cell growth and the stemness and radiation response of glioma stem cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 31785-31801.

[16] 王志强, 贺璇, 李思维, 等. Yes 相关蛋白、哺乳动物不育系 20 样激酶 1、细胞周期蛋白 D1 在鼻咽癌中的表达及临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(9): 39-43.

[17] 韦艳艳, 陈辉, 段智, 等. 鼻咽癌患者黏膜组织中 CyclinD1 和 p16 基因的表达及其临床意义 [J]. 医学临床研究, 2017, 34(11): 2091-2094.