

论著·基础研究

口腔白斑癌变DNA损伤修复相关基因的芯片检测及表达验证

刘 伟¹, 朱敏闻², 吴 岚³

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院口腔颌面头颈肿瘤科, 国家口腔疾病临床研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011; 2. 上海市徐汇区牙病防治所口腔外科, 上海 200032; 3. 上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院口腔黏膜科, 国家口腔疾病临床研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011

[摘要] **目的**·研究口腔白斑 (oral leukoplakia, OL) 患者病变发生发展中的DNA损伤修复基因表达谱, 并验证关键基因共济失调毛细血管扩张症突变基因 (ataxia-telangiectasia mutated, *ATM*) 和组蛋白2A变异体家族成员X (histone variant H2A family member X, *H2AX*) 的mRNA和蛋白表达。**方法**·利用Affymetrix HTA 2.0芯片对口腔正常黏膜 ($n=3$)、低危白斑 ($n=4$)、高危白斑 ($n=4$)、早期鳞状细胞癌 (鳞癌, $n=6$) 进行转录组学的高通量检测, 利用基因本体数据库 (Gene Ontology, GO) 富集分析筛选出生物学功能为DNA损伤修复的相关基因 [差异倍数 (fold change, FC) 对数的绝对值 ($|\log_2 FC|$) ≥ 2.0 且 $P < 0.05$], 利用实时定量PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 和蛋白质印迹法分别对人正常口腔黏膜角化细胞 (HOK)、白斑细胞系 (Leuk1) 和鳞癌细胞系 (HN13) 中的关键基因 *ATM* 和 *H2AX* 进行mRNA和蛋白表达验证。**结果**·DNA损伤修复基因在白斑发生发展中存在异常表达, 从正常黏膜发展到低危白斑有7个 $|\log_2 FC| \geq 2.0$ 的基因, 从低危白斑发展到高危白斑有7个 $|\log_2 FC| \geq 2.0$ 的基因, 从高危白斑发展到鳞癌有52个 $|\log_2 FC| \geq 2.0$ 的基因。qPCR对关键基因验证结果显示, *ATM* 和 *H2AX* 基因在HOK细胞、Leuk1细胞和HN13细胞中的表达量均呈阶梯式升高 ($P < 0.05$)。蛋白质印迹法结果显示, 磷酸化H2AX (γ -H2AX) 蛋白在HOK细胞、Leuk1细胞和HN13细胞中亦逐步上调 ($P < 0.05$)。ATM蛋白在Leuk1细胞中的表达比在HOK细胞中表达明显增强 ($P < 0.05$), 但在HN13细胞中的表达明显降低 ($P < 0.05$)。**结论**·DNA损伤修复基因 *ATM* 和 *H2AX* 参与OL的发生发展。

[关键词] 口腔白斑; 鳞状细胞癌; DNA损伤修复; 共济失调毛细血管扩张症突变基因; 组蛋白2A变异体家族成员X

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.03.003 **[中图分类号]** R781.5⁹ **[文献标志码]** A

Array detection and expression verification of DNA damage repair related genes in oral leukoplakia cancerization

LIU Wei¹, ZHU Min-wen², WU Lan³

1. Department of Oral and Maxillofacial-Head and Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai Xuhui District Dental Center, Shanghai 200032, China; 3. Department of Oral Mucosal Diseases, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**·To study the gene expression profile of DNA damage repair in the occurrence and development of oral leukoplakia (OL) and to verify the expression of mRNA and protein of key genes, ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*) and histone variant H2A family member X (*H2AX*). **Methods**·Affymetrix HTA 2.0 array was used to detect the high-throughput transcriptome of normal mucosa ($n=3$), low-risk leukoplakia ($n=4$), high-risk leukoplakia ($n=4$) and early squamous cell carcinoma ($n=6$). Gene Ontology function analysis was used to screen out the genes related to DNA damage repair [$|\log_2(\text{fold change, FC})| \geq 2.0$ and $P < 0.05$]. Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blotting were used to verify the mRNA and protein expression of key genes (*ATM* and *H2AX*) in human normal oral mucosal keratinocytes (HOK), OL (Leuk1) and squamous cell carcinoma cell lines (HN13), respectively. **Results**·DNA damage repair genes abnormally expressed in the occurrence and development of leukoplakia. There were 7 genes with $|\log_2 FC| \geq 2.0$ from normal mucosa to low-risk leukoplakia, 7 genes with $|\log_2 FC| \geq 2.0$ from low-risk leukoplakia to high-risk leukoplakia, and 52 genes with $|\log_2 FC| \geq 2.0$ from high-risk leukoplakia to squamous cell carcinoma. qPCR revealed that the expression of *ATM* and *H2AX* in HOK cells, Leuk1 cells and HN13 cells increased stepwise ($P < 0.05$). Western blotting revealed that the expression of γ -H2AX protein was also up-regulated in the HOK cells, Leuk1 cells and HN13 cells ($P < 0.05$). ATM protein was up-regulated in Leuk1 cells compared with HOK cells, but down-regulated in HN13 cells ($P < 0.05$). **Conclusion**·DNA damage repair genes, *ATM* and *H2AX*, are involved in the occurrence and development of OL.

[Key words] oral leukoplakia (OL); squamous cell carcinoma; DNA damage repair; ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*); histone variant H2A family member X (*H2AX*)

[基金项目] 国家自然科学基金 (82074502); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZDCX20180901)。

[作者简介] 刘 伟 (1983—), 男, 主治医师, 博士; 电子信箱: liuwei@hotmail.com。

[通信作者] 吴 岚, 电子信箱: teana_wu@sina.com。

[Funding Information] National Nature Science Foundation of China (82074502); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZDCX20180901).

[Corresponding Author] WU Lan, E-mail: teana_wu@sina.com.



口腔白斑 (oral leukoplakia, OL) 是口腔黏膜的潜在恶性疾病之一, 是口腔鳞状细胞癌 (鳞癌) 的主要来源^[1]。调查^[2-4]显示, 国内OL患者的癌变率为4%~18%。上皮异常增生是OL的病理特征。白斑的发生发展到癌变的进程各阶段较明确, 是从上皮无异常增生、上皮单纯增生、轻度异常增生、中度异常增生、重度异常增生到癌变的过程, 因此成为口腔癌发生发展的良好研究模型。目前普遍认为口腔癌的发生是由遗传学、生物学和物理化学等多种因素综合作用所导致, 这些因素造成了基因的突变或缺失、异常扩增和表达^[5-7]。为维持基因组的稳定性, 机体会自动启动对DNA损伤的多种修复途径, 统称为DNA损伤修复^[5]。因此, 检测DNA损伤修复因子的基因表达或相关生化特性, 可能可以为白斑癌变的早期诊断及分级治疗提供新策略。

组蛋白2A变异体家族成员X (histone variant H2A family member X, H2AX) 和共济失调毛细血管扩张症突变基因 (ataxia-telangiectasia mutated, ATM) 是公认的DNA损伤修复特征性基因, 两者共同参与细胞内对于DNA双链断裂损伤修复的快速敏感的反应^[8]。H2AX是DNA损伤应答中的重要效应分子之一, ATM能在DNA断裂点附近丝氨酸残基处磷酸化H2AX形成磷酸化H2AX (γ -H2AX), ATM活化会进一步激活 γ -H2AX, 磷酸化修饰会启动DNA修复和激活检查点的相关途径, 从而阻止细胞周期的进展^[9]。鉴于白斑癌变与DNA损伤修复的研究报道较少^[10-11], 本研究拟利用人转录组芯片研究OL患者病损发生发展中DNA损伤修复的相关基因表达谱, 随后验证H2AX和ATM的表达。

1 对象与方法

1.1 研究对象及样本收集

本研究共纳入17例研究对象, 其中正常口腔黏膜患者3名、OL患者8名、口腔早期鳞癌 ($T_{1-2}N_0M_0$) 患者6名。研究对象均来源于2014年9—12月上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面头颈肿瘤科和口腔黏膜科就诊患者。收集研究对象的人口学资料, 包括年龄、性别、是否吸烟和是否饮酒。所有研究对象术前均未进行化学治疗 (化疗)、放射治疗 (放疗) 及激素等治疗手段, 且无自身系统性疾病和癌症史。

研究对象的组织样本为活检或手术后标本, 放入装有RNAlater液的冻存管, 于液氮浸没15 min, 放入-80℃冰箱保存。OL的病理学诊断为上皮单纯增生、轻度异常增生、中度异常增生和重度异常增生白斑。以上

诊断由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔病理科医师根据WHO组织病理学诊断标准^[12]确认。本研究将上皮单纯增生和轻度异常增生合并为低危白斑, 中度异常增生和重度异常增生合并为高危白斑。本研究获得上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会批准。研究对象均签署知情同意书。

1.2 细胞

人口腔鳞癌细胞系HN13和OL细胞系Leuk1由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔肿瘤实验室提供。人正常口腔黏膜角化细胞株HOK购自北京北方生物技术研究所。

1.3 主要试剂及仪器

TRIzol试剂 (Invitrogen, 美国), NanoDrop 2000分光光度计 (Thermo Scientific, 美国), DMEM培养基 (D5546, Sigma-Aldrich, 美国), KSFM培养基 (Lot1646135, Gibco Island, 美国), RPMI-1640培养基 (Thermo Scientific, 美国), 荧光定量PCR仪 (LightCycler® 480 II型, Roche, 瑞士)。

1.4 研究方法

1.4.1 组织样本的RNA抽提 按照TRIzol试剂常规提取OL、早期口腔鳞癌组织标本和正常口腔黏膜组织样本的总RNA。利用NanoDrop 2000分光光度计测定浓度及吸光度比值 [$D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$], 比率大于1.8为合格, 使用琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。纳入本研究的组织样本经NanoDrop ND-2000定量并经Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) 检测RNA完整性, 检测显示RNA的吸光度比值 [$D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$] 比率均在1.8以上, 显示RNA质量良好, 符合实验要求。

1.4.2 转录组芯片研究及数据分析 转录组芯片研究按照Affymetrix GeneChip® Human Transcriptome Array (HTA) 2.0标准流程执行。采用Affymetrix GeneChip Command Console软件处理提取原始数据和Expression Console软件对芯片进行gene level的标准化, 标准化算法为Robust Multi-array Average (RMA)。后续分析基因表达使用的软件为Genespring软件。差异基因利用 t 检验的 P 值和差异倍数 (fold change, FC) 的对数 ($\log_2\text{FC}$) 的绝对值进行筛选。筛选的标准为 $|\log_2\text{FC}| \geq 2.0$ 且 $P < 0.05$ 。接着, 对差异基因进行基因本体数据库 (Gene Ontology, GO) 富集分析, 以判定差异基因主要影响的生物学功能。

1.4.3 细胞培养 HN13使用DMEM高糖培养基培养, Leuk1使用KSFM培养基人角化上皮细胞培养基培养, HOK使用含15%胎牛血清的RPMI-1640培养。所有细胞培养均置于37℃、5%CO₂及饱和湿度的培养箱内。参照美国模式菌种积存库(American Type Cell Culture, ATCC)提供的标准培养条件培养细胞, 细胞生长至70%~80%时用于接种。

1.4.4 实时定量PCR验证基因表达 提取上述细胞总RNA, 反转录成互补DNA(complementary DNA, cDNA)。利用QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit试剂盒在荧光定量PCR仪上进行实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)反应。体系: SYBR® Premix Ex Taq, 10 μL; 引物0.4 μL(表1); cDNA, 1 μL; ddH₂O, 7.8 μL。PCR程序: 95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法测定相对表达水平, 实验重复3次。

表1 qPCR验证ATM和H2AX基因的引物序列

Tab 1 Primer sequence for ATM and H2AX genes by qPCR

Gene	Sequence
ATM	F: 5'-CGCCGCGGTTGATACTACT-3'
	R: 5'-ACGGCAGCAGATAAGCAGAT-3'
H2AX	F: 5'-CAACAAGAAGACGCGAATCA-3'
	R: 5'-CTGGATGTTGGGCAGGAC-3'
β-actin	F: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGAC-3'
	R: 5'-GAGGCGTACAGGGATAGACA-3'

1.4.5 蛋白质印迹法验证蛋白表达 提取上述细胞总蛋白, 加入RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂, 置于冰上裂解30 min, 加入loading-buffer及二巯基乙醇; 加样品于10%SDS-PAGE电泳分离蛋白样品, ATM蛋白350 mA恒流转膜2.5 h, γ-H2AX蛋白90V恒压1 h, PVDF膜用3%脱脂奶粉封闭1 h, 分别加入ATM和γ-H2AX一抗4℃孵育12 h; TBST漂洗3次, 10 min/次; 加入二抗37℃孵育1 h, TBST漂洗3次, 10 min/次; 超敏型ECL发光液显示阳性条带, 在Typhoon系统上扫描结果, Image J软件分析灰度值, 以β-tubulin为内参, 实验重复3次。

1.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 使用GraphPad 6.0作图。定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 正常黏膜、白斑和鳞癌3组间基因定量表达均数差别采用方差分析比较。定性资料以频数表示, 采用 χ^2 检验分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象人口学资料比较

正常黏膜、白斑和早期鳞癌3组患者的年龄、性别等人口学资料间差异均无统计学意义(表2)。

表2 3组研究对象人口学资料比较

Tab 2 Comparison of demographic data between the three groups

Item	Normal mucosa group (N=3)	Leukoplakia group (N=8)	Early squamous cell carcinoma group (N=6)	F/ χ^2 value	P value
Age/year	52.7±8.7	54.5±10.1	55.1±9.8	0.691	0.911
Gender/n				0.032	0.984
Male	2	5	4		
Female	1	3	2		
Smoking/n	1	3	3	0.314	0.855
Alcohol intake/n	1	3	3	0.314	0.855

2.2 白斑发生发展中的DNA损伤修复基因表达谱

本研究将OL发生发展的节点分为低危白斑、高危白斑和早期鳞癌。经Affymetrix HTA 2.0转录组芯片检测, 低危白斑与正常黏膜之间有855个 $|\log_2FC|\geq 2.0$ 的基因, 高危白斑与低危白斑有399个 $|\log_2FC|\geq 2.0$ 的基因, 早期鳞癌与高危白斑有797个 $|\log_2FC|\geq 2.0$ 的基因(均 $P<0.05$)。将白斑各阶段的差异基因进行GO功能分析。按照GO生物学作用分类, 筛选出生物学作用为DNA损伤与修复相关的基因(图1), 从正常黏膜发展到低危白斑有7个 $|\log_2FC|\geq 2.0$ 的基因, 从低危白斑发展到高危白斑有7个, 从高危白斑发展到鳞癌有52个(图2)。

2.3 DNA损伤修复关键基因的mRNA表达验证

本研究验证芯片中从正常黏膜到低危白斑的H2AX基因和从高危白斑发展到早期鳞癌的ATM基因, 选择人正常黏膜HOK、白斑Leuk1和鳞癌HN13细胞系对ATM和H2AX行qPCR的验证表达研究。结果(图3)显示β-actin在3组细胞中表达稳定, 统计分析显示ATM和H2AX的mRNA相对表达量在3组有显著差异, 且均呈阶梯式升高。

2.4 DNA损伤修复蛋白ATM和γ-H2AX表达验证

通过蛋白质印迹法(Western blotting)检测ATM和γ-H2AX在HOK细胞、Leuk1细胞和HN13细胞中的蛋白表达水平。结果(图4)显示: 内参蛋白β-tubulin在3组细胞系中的表达量一致; 相对于HOK细胞, ATM蛋白在

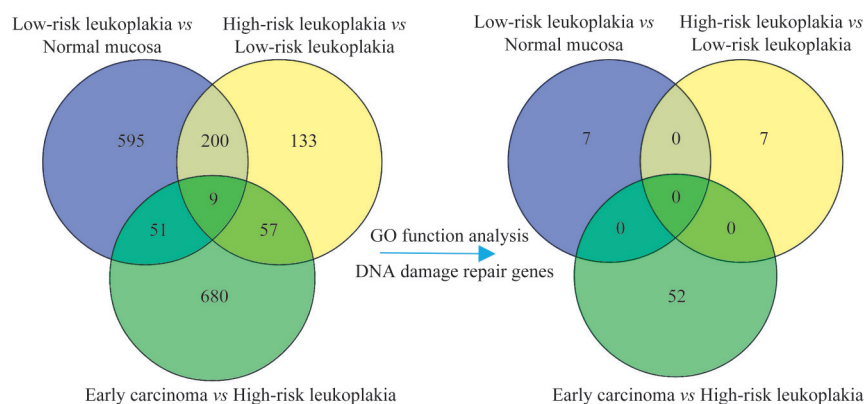
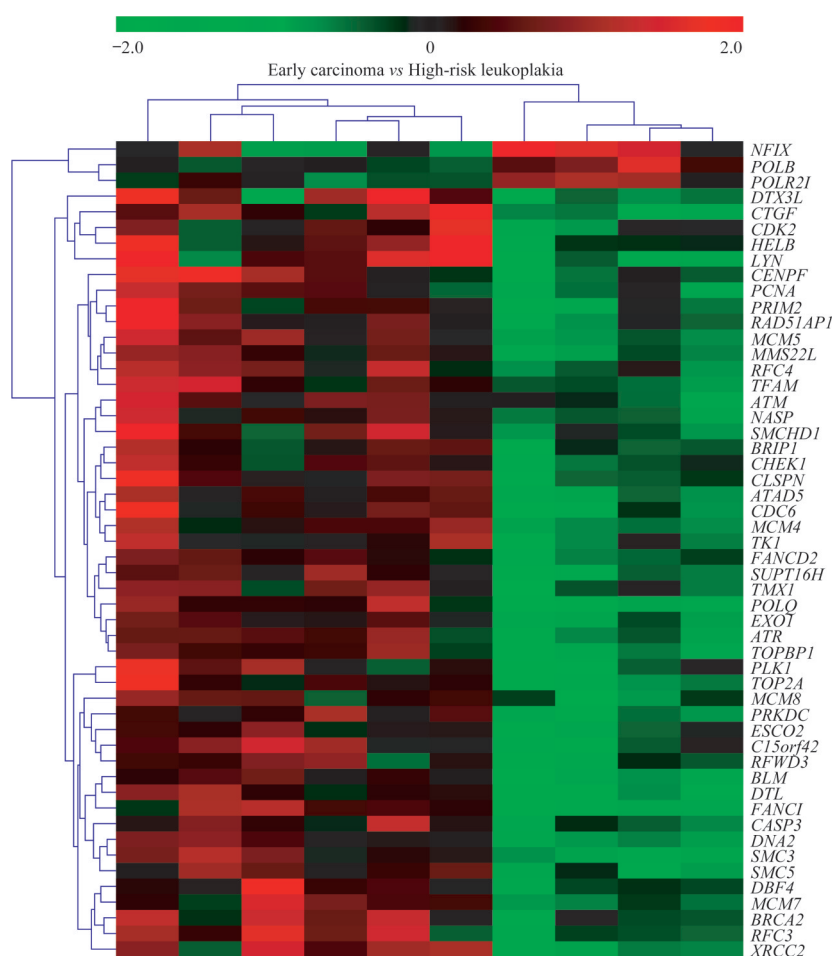


图1 从白斑发生发展各阶段的全部基因中筛选出DNA损伤修复基因

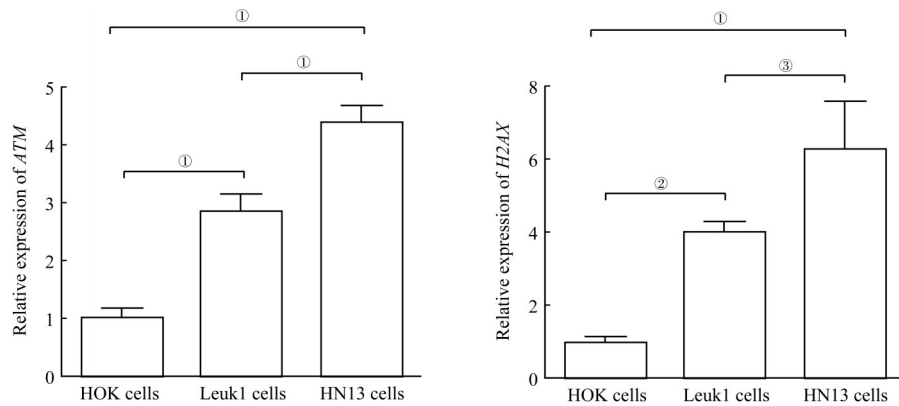
Fig 1 DNA damage repair genes were screened from all genes in the development and progression of leukoplakia



Note: *NFIX*—nuclear factor IX; *POLB*—DNA polymerase β; *POLR2I*—RNA polymerase II polypeptide I; *DTX3L*—deltex E3 ubiquitin ligase 3L; *CTGF*—connective tissue growth factor; *CDK2*—cyclin dependent kinase 2; *HELB*—DNA helicase B; *LYN*—LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; *CENPF*—centromere protein F; *PCNA*—proliferating cell nuclear antigen; *PRIM2*—DNA primase subunit 2; *RAD51AP1*—RAD51 associated protein 1; *MCM5*—minichromosome maintenance complex component 5; *MMS22L*—MMS22-like, DNA repair protein; *NASP*—nuclear autoantigenic sperm protein; *SMCHD1*—structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1; *BRIP1*—BRCA1 BRCA1 interacting helicase 1; *CHEK1*—checkpoint kinase 1; *CLSPN*—claspin; *ATAD5*—ATPase family AAA domain 5; *CDC6*—cell division cycle 6; *MCM4*—minichromosome maintenance complex component 4; *TK1*—thymidine kinase 1; *FANCD2*—FA complementation group D2; *SUPT16H*—SPT16 homolog, facilitates chromatin remodeling subunit; *TMX1*—thioredoxin related transmembrane protein 1; *POLQ*—DNA polymerase θ; *EXO1*—exonuclease 1; *ATR*—ATR serine/threonine kinase; *TOPBP1*—DNA topoisomerase II binding protein 1; *PLK1*—polo like kinase 1; *TOP2A*—DNA topoisomerase II α; *MCM8*—minichromosome maintenance 8 homologous recombination repair factor; *PRKDC*—protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit; *ESCO2*—establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2; *C15orf42*—chromosome 15 open reading frame 42; *RFW3*—ring finger and WD repeat domain 3; *BLM*—BLM RecQ like helicase; *DTL*—denticless E3 ubiquitin protein ligase homolog; *FANCI*—FA complementation group I; *CASP3*—caspase 3; *DNA2*—DNA replication helicase/nuclease 2; *SMC3*—structural maintenance of chromosomes 3; *SMC5*—structural maintenance of chromosomes 5; *DBF4*—DBF4 zinc finger; *MCM7*—minichromosome maintenance complex component 7; *BRCA2*—BRCA2 DNA repair associated; *RFC3*—replication factor C subunit 3; *XRCC2*—X-ray repair cross complementing 2.

图2 口腔早期鳞癌与高危白斑之间的52个差异基因聚类热图

Fig 2 Clustering heat map of 52 different genes between oral early squamous cell carcinoma and high-risk leukoplakia



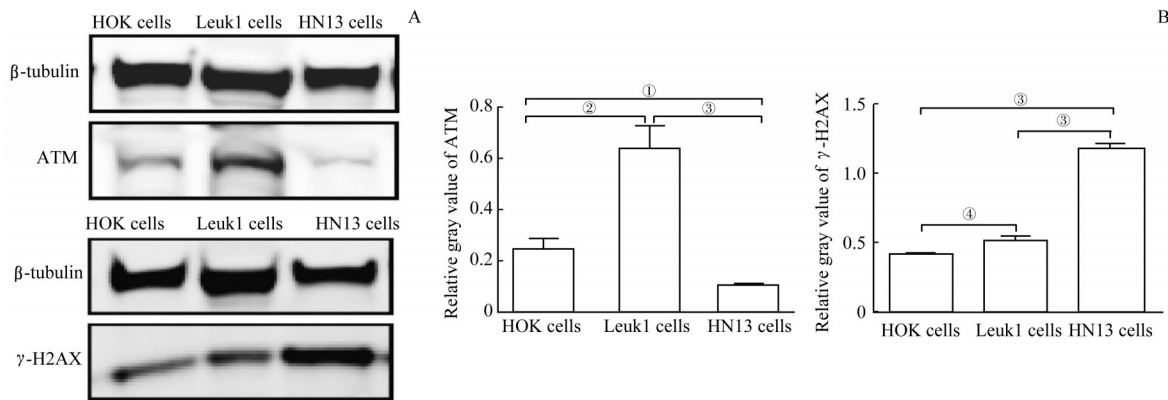
Note: ① $P=0.000$, ② $P=0.004$, ③ $P=0.008$.

图3 qPCR验证ATM和H2AX在人正常黏膜、白斑和鳞癌细胞系中的差异表达

Fig 3 qPCR confirmed the differential expression of ATM and H2AX in normal mucosa, leukoplakia and squamous cell carcinoma cell lines

Leuk1细胞中的表达明显增高,而在HN13细胞中的表达量明显降低,且是3种细胞中表达最弱的; γ -H2AX蛋白

在Leuk1细胞中的表达量略增加,在HN13细胞中的表达量明显上调。



Note: A. Western blotting. B. Gray analysis. ① $P=0.006$, ② $P=0.002$, ③ $P=0.000$, ④ $P=0.009$.

图4 Western blotting检测ATM和 γ -H2AX在HOK细胞、Leuk1细胞和HN13细胞中的表达

Fig 4 Western blotting examined the protein expression of ATM and H2AX in HOK cells, Leuk1 cells and HN13 cells

3 讨论

口腔黏膜白斑癌变的进程是由多个异常基因参与的组织结构和细胞功能改变的多步骤过程,高危白斑及其癌变的早期诊断及干预对改善预后尤为重要^[12]。以往对白斑的芯片研究,仅仅设置了2组对照研究,如王娟等^[13]对口腔正常黏膜($n=3$)和白斑($n=3$)进行的Affymetrix U133 plus 2.0基因芯片研究,张德保等^[14]对正常黏膜($n=10$)和白斑($n=10$)进行的Agilent基因组学芯片,陈显久等^[15]对白斑($n=3$)和鳞癌($n=3$)进行的SupperArray基因芯片研究。而本研究选取的Affymetrix HTA 2.0芯片包括近700万条探针,可检测超过28万条全长转录本。纳入转录组芯片的阶梯式病例设置是本研究的特色。针对白斑的发生发展,本研究共设置4组病例模拟白斑癌变的多步骤进程,包括正常黏膜组($n=3$)、低危白斑组($n=4$)、高危白斑组($n=4$)和早期

鳞癌组($n=6$),研究结果可反映白斑癌变不同阶段的基因组学特性。

DNA损伤修复功能的异常是肿瘤发生发展的机制之一,其中DNA双链断裂伴随细胞周期检查点的激活在其中发挥重要作用^[16]。本研究中转录组芯片筛选出白斑发生发展各阶段的DNA损伤修复相关基因,从正常黏膜到低危白斑的常见异常基因有CD44、鼠双微体基因2(murine double minute 2, MDM2)和 γ -H2AX等,从高危白斑发展到早期鳞癌的常见异常基因有胱天蛋白酶3(cysteine aspartic acid specific protease, CASP3)、细胞周期检测点激酶1(check point kinase 1, CHK1)、周期蛋白依赖性激酶2(cyclin dependent kinase, CDK2)和ATM等。本研究显示,共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关蛋白(ataxia-telangiectasia mutated and Rad 3 related protein, ATR)在高危白斑发展到鳞癌有差异表达,但并未检测发现明确的CHK2和ATR2差异表达,这

提示参与DNA单链断裂的损伤修复基因有待于进一步研究。段宁等^[17]对白斑($n=4$)和鳞癌($n=4$)进行单核苷酸多态性芯片研究,异常基因主要位于第3、5~9、11、13~15、17、18染色体,本研究筛选出的DNA损伤修复基因位点亦多位于这些染色体。

本研究结果显示,*H2AX*的mRNA和蛋白表达水平在HOK细胞、Leuk1细胞和NH13细胞中逐步上调,并存在组间显著差异,与芯片筛查结果基本相符。该结果提示正常上皮细胞处于相对静止状态,*H2AX*基因的表达水平很低,但当DNA损伤双链断裂形成后,其mRNA表达量会迅速上升,并磷酸化形成 γ -*H2AX*,在转录后的蛋白水平表达增强。因此,*H2AX*及其磷酸化应该是识别白斑发生发展中DNA损伤的早期事件之一^[18]。

本研究对*ATM*的qPCR实验结果显示,*ATM*的mRNA在HOK细胞、Leuk1细胞和NH13细胞中逐步上调,并存在组间显著差异,与芯片筛查结果基本相符。Western blotting实验结果显示,*ATM*蛋白相对于HOK细胞在Leuk1细胞中表达升高,但在NH13细胞中明显降低;该结果提示*ATM*蛋白的过表达是出现在癌变之前的白斑阶段,但在癌变之后的鳞癌中其表达降低,这与

*ATM*在眼咽型肌营养不良(oculopharyngeal muscular dystrophy, OPMD)和鳞癌中免疫表达结果相符^[19]。一般认为,一个有效的DNA损伤修复机制能确保修复顺利及时完成,维持基因组稳定性,它是癌症发生的保护屏障^[10]。但在癌症发生时,如果*ATM*无法完全修复DNA损伤,则会造成损伤的DNA双链积聚,则最终将促进癌症的发生。*ATM*在白斑癌变进程中基因表达上调和蛋白表达下降结果不一致的原因可能是,DNA损伤程度超出了*ATM*的修复能力范围或受到其他非编码RNA调控以致*ATM*蛋白失活,导致DNA损伤积累增加细胞恶性转化程度;这与Tu等^[19]利用免疫组织化学研究*ATM*在口腔癌前病损和鳞癌组织中的表达研究结果相一致。因此,*ATM*蛋白失活可能是白斑癌变的早期事件之一。

目前,DNA损伤修复基因在口腔癌变进程中的分子机制研究很少^[20]。本研究结果提示,*ATM*和*H2AX*等基因的异常改变在白斑发生发展中具有重要作用,白斑癌变微环境中*ATM*和*H2AX*等的信号通路和分子机制值得进一步研究。综上,本文通过研究DNA损伤修复的基因表达谱,为深入研究OL的发生发展机制、筛查标志性癌变基因、寻找OL早期诊断的分子标记提供了参考。

参·考·文·献

- [1] Chaturvedi AK, Udaltsova N, Engels EA, et al. Oral leukoplakia and risk of progression to oral cancer: a population-based cohort study[J]. J Natl Cancer Inst, 2020, 112(10): 1047-1054.
- [2] Lyu MY, Guo YS, Li S, et al. Hospital-based epidemiological and clinical characterisation of the malignant transformation of oral leukoplakia in a Chinese population[J]. Int Dent J, 2017, 67(4): 252-259.
- [3] Wang TJ, Wang L, Yang HF, et al. Development and validation of nomogram for prediction of malignant transformation in oral leukoplakia: a large-scale cohort study[J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(6): 491-498.
- [4] Liu W, Wang YF, Zhou HW, et al. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 685.
- [5] 周红梅, 杨娅, 周敏, 等. 口腔黏膜组织结构及DNA损伤修复功能的增龄性变化[J]. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(3): 177-179.
- [6] Zhang XY, Hu FL, Liu LH, et al. Effect of silencing of mediator of DNA damage checkpoint protein 1 on the growth of oral squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*[J]. Eur J Oral Sci, 2019, 127(6): 494-499.
- [7] Xie LP, Jia LM, Qu JY, et al. Expression and prognostic significance of the P53-related DNA damage repair proteins checkpoint kinase 1 (CHK1) and growth arrest and DNA-damage-inducible 45 α (GADD45A) in human oral squamous cell carcinoma[J]. Eur J Oral Sci, 2020, 128(2): 128-135.
- [8] Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, et al. DNA damage foci: meaning and significance[J]. Environ Mol Mutagen, 2015, 56(6): 491-504.
- [9] Leung EY, McMahon JD, McLellan DR, et al. DNA damage marker phosphorylated histone H2AX is a potential predictive marker for progression of epithelial dysplasia of the oral cavity[J]. Histopathology, 2017, 71(4): 522-528.
- [10] Farah CS, Jessri M, Bennett NC, et al. Exome sequencing of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma implicates DNA damage repair gene defects in malignant transformation[J]. Oral Oncol, 2019, 96: 42-50.
- [11] Chou SJ, Alawi F. Expression of DNA damage response biomarkers during oral carcinogenesis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011, 111(3): 346-353.
- [12] Slootweg PJ, Eveson JW. Tumours of the oral cavity and oropharynx: introduction[M]// Barnes L, Eveson JW, Reichart P, et al. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press, 2005: 166-179.
- [13] 王娟, 戴耀晖, 贾丽华, 等. 口腔黏膜白斑的基因表达谱分析[J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2010, 4(6): 590-596.
- [14] 张德保, 张国栋. 口腔黏膜白斑基因表达谱中重要致病差异表达基因的筛选及分析[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(3): 235-237, 240.
- [15] 陈显久, 刘玮玮, 史培荣, 等. 口腔黏膜白斑(OLK)癌变驱动基因研究[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(5): 345-349.
- [16] Vodicka P, Vodenkova S, Opatova A, et al. DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients[J]. Mutat Res, 2019, 843: 95-110.
- [17] 段宁, 王文梅, 蒋红柳, 等. 单核苷酸多态性芯片在口腔白斑癌变监测中的应用[J]. 临床口腔医学杂志, 2012, 28(12): 721-723.
- [18] Nikitakis NG, Rassidakis GZ, Tasoulas J, et al. Alterations in the expression of DNA damage response-related molecules in potentially preneoplastic oral epithelial lesions[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018, 125(6): 637-649.
- [19] Tu HF, Chen MY, Lai JC, et al. Arecoline-regulated ataxia telangiectasia mutated expression level in oral cancer progression[J]. Head Neck, 2019, 41(8): 2525-2537.
- [20] Zhu MW, Liu W, Shi LJ, et al. Expression of DNA doublestrand repair proteins in oral leukoplakia and the risk of malignant transformation[J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 9827-9835.

[收稿日期] 2020-03-30

[本文编辑] 包玲

