

舌鳞状细胞癌中 DKK1 的表达及分子机制

孙 玥, 王宏浩, 李昕雨, 杨敏根, 黄汉潇, 后 军

摘要 目的 应用生物信息学和分子生物学实验探讨 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1) 在舌鳞状细胞癌 (TSCC) 中的表达及分子机制。方法 从 TCGA-TSCC 数据库下载患者信息, 利用 NetworkAnalysed 网站筛选正常组织和癌组织间的差异表达基因, 通过 Kaplan-Meier 分析和 Lasso 回归法寻找关键基因及临床预后, 应用 GO 和 KEGG 分析差异表达基因的功能和通路, 应用 UALCAN 数据库和免疫组化实验分析 DKK1 蛋白在 TSCC 中的表达, 并分析其与临床病理特征的关系, 应用 Western blot 实验检测 DKK1 在 TSCC 细胞中的表达, 利用 siRNA 敲低 Cal27 细胞中 DKK1 蛋白的表达。结果 NetworkAnalysed、Kaplan-Meier 分析和 Lasso 回归法筛选出的 3 个关键基因 DKK1、CYP19A1 和 IRX4 在 TSCC 中高表达, 且高表达组的患者生存率差。UALCAN 数据库分析显示 DKK1 的 mRNA 水平在 TSCC 组织中高于正常组织, 其高表达与 TSCC 患者的临床分期、组织学分级和淋巴结转移相关。免疫组化实验显示, DKK1 蛋白在临床分期 III + IV 期 TSCC 组织中的阳性率高于 I + II 期 TSCC 组织。与癌旁组织相比, DKK1 蛋白在 TSCC 组织中的表达水平升高。Western blot 实验显示 DKK1 蛋白在 TSCC 细胞 Cal27 中的表达高于正常口腔上皮细胞 HOEC。在 TSCC 细胞 Cal27 中敲低 DKK1 的表达后, β -catenin、p-p65 和 p65 蛋白表达量减少。结论 DKK1 在 TSCC 组织和细胞中高表达且发挥重要作用, 其可能作为 TSCC 早期诊断和药物治疗的新靶点。

关键词 舌鳞状细胞癌; DKK1; β -catenin; p-p65; p65

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0948-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.012

头颈部肿瘤占常见恶性肿瘤的第 6 位, 其中大多数为口腔鳞状细胞癌^[1]。舌鳞状细胞癌 (tongue squamous cell carcinoma, TSCC) 起源于舌复层鳞状上皮细胞, 约占口腔鳞状细胞癌的 1/3 ~ 1/2, 具有恶性程度高、早期易转移和预后差等特点。目前临

床治疗主要以手术切除为主, 以放疗和化疗为辅^[2]。然而由于舌周围的淋巴管和血管丰富, TSCC 生长速度快、早期易发生淋巴结和远处转移, 且缺乏有效的分子标志物, 患者的 5 年生存率仅 33% ~ 40%^[3]。因此, 探寻新的分子标志物对 TSCC 患者的早期诊断和治疗具有重要意义。Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1) 是一种 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制分子^[4], 其在多种肿瘤中表达异常, 并在肿瘤的进展和转移进程中发挥重要作用。关于 DKK1 在肿瘤如结肠癌^[5]、肺癌^[6]等方面的功能研究已有报道, 但 DKK1 在口腔鳞状细胞癌中的作用还不清楚。因此, 该研究通过分析 DKK1 在 TSCC 组织和细胞中的表达水平以及可能的分子机制, 为 DKK1 靶向治疗 TSCC 提供依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源 从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 中下载 TSCC 患者转录组核糖核酸测序 (RNA-seq) 数据和临床预后信息^[7]。收集到 162 例 TSCC 患者数据, 包含 147 例 TSCC 组织 (15 例原发肿瘤, 132 例病理类型不明) 和 15 例癌旁组织。UALCAN 数据库分析 520 例头颈部鳞状细胞癌组织和 44 例正常组织中 DKK1 的 mRNA 表达状况。

1.2 差异表达基因的筛选 NetworkAnalyst 网址^[8] (<https://www.networkanalyst.ca>) 可用于分析转录组基因表达数据。应用上述网址筛选 TSCC 患者的癌组织和癌旁组织之间的差异表达基因, 筛选的条件是 $P < 0.05$ 和 $|\text{Log}_2^{\text{Fold Change}}| \geq 4$ 。通过该网站绘制差异表达基因的聚类热图和火山图。

1.3 差异表达基因的生存分析 应用 Kaplan-Meier 分析方法筛选上述差异表达基因中与 TSCC 患者生存率相关的基因, 筛选的条件是 $P < 0.05$ 。采用 Lasso 回归法筛选 TSCC 患者中表达量与生存率呈负相关的代表性基因。应用 Ualcan TCGA analysis 网址 (<https://ualcan.path.uab.edu/>) 分析与 TSCC 患者生存相关的差异表达基因在 TSCC 组织与正常口腔组织中的表达状况。

1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 GO 功能

2023-03-11 接收

基金项目: 安徽省高校科学研究项目 (编号: YJS20210306); 安徽医科大学第一附属医院临床研究计划项目 (编号: LCYJ2021YB001)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院口腔科, 合肥 230022

作者简介: 孙 玥, 女, 硕士研究生;

后 军, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: houjun@ahmu.edu.cn

富集分析包括细胞组分(cellular component ,CC)、分子功能(molecular function ,MP)、生物过程(biological process ,BP) 而 KEGG 数据库用于分析差异表达基因的信号通路。通过可视化数据分析网站(the database for annotation visualization and integrated discovery , DAVID) 对 1.2 中筛选出的基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析(<https://david.ncicrf.gov/>)^[9]。

1.5 病例资料 收集 2020 年 12 月—2022 年 2 月经手术切除的 TSCC 组织 50 例标本, 样本均经病理检查确诊。其中, 男性 30 例, 女性 20 例; 年龄 < 60 岁者 23 例, 年龄 ≥ 60 岁者 27 例; 肿瘤直径 < 3.0 cm 者 39 例, 肿瘤直径 ≥ 3.0 cm 者 11 例; 分化程度: 高分化 20 例, 中分化 26 例, 低分化 4 例; 无淋巴结转移者 35 例, 有淋巴结转移者 15 例。

1.6 免疫组化实验

1.6.1 采用免疫组化 SP 法检测 DKK1 抗体在 TSCC 中的表达状况 免疫组化 SP(北京中杉金桥公司, SP-9000) ,DKK1 抗体(英国 Abcam 公司, 1 : 800 稀释, ab109416) ,石蜡组织切 4 μm 厚度, 65 ℃ 烤片 2 h, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 微波炉 EDTA 抗原修复液处理 2 min。之后步骤按照试剂盒说明书操作, 滴加一抗, 4 ℃ 过夜, 滴加二抗, DAB 显色, 中性树胶封片。选用一抗阳性染色切片作为阳性对照, 以 PBS 代替一抗的染色结果作为阴性对照。

1.6.2 免疫组化结果判读 DKK1 阳性染色评分标准以着色强度及着色细胞数综合判断。随机选择 5 个未出现重复视野的组织进行观察, 同时计数视野内的细胞。以半定量积分法作为判断结果, 同时采用双盲阅片法进行评分。按阳性细胞着色强度计分: 无阳性着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 按细胞阳性细胞数计分: 阳性细胞数 < 25% 为 0 分, 25% ~ 50% 为 1 分, 51% ~ 75% 为 2 分, 阳性细胞数 > 75% 为 3 分。将上述 2 项得分相乘作为最终评分: 0 分为阴性组, 评分 ≥ 1 分为阳性组。

1.7 细胞培养 HOEC 和 Cal27 细胞均购自 American Tissue Culture Collection 公司。细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基, 置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 待细胞密度约 70% ~ 80% 时, 收集细胞。

1.8 Western blot 实验 收集上述细胞沉淀, 加入高效 RIPA 裂解液提细胞蛋白, 采用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 转移蛋白至 PVDF 膜上。加入 DKK1(1 : 1 000)、β-catenin(1 : 1 000)、p-p65

(1 : 1 000)、p65(1 : 1 000) 和 β-actin(1 : 5 000) 低温过夜孵育, 再加入 HRP 标记的二抗(1 : 10 000) 常温孵育 1.5 h, 最后用凝胶成像仪曝光。

1.9 细胞转染实验 选取生长状态良好、细胞密度处于 50% 左右时进行实验。采用 Mate 转染试剂, 具体操作步骤参考试剂盒说明书, 转染 48 ~ 72 h 后提取细胞蛋白进行下游蛋白检测。DKK1-siRNA 序列: 5'-GAGGAAACCAUCACUGAAATT-3', 3'-UUU-CAGUGAUGGUUCCUCTT-5'。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, DKK1 蛋白表达与 TSCC 临床病理特征的相关性分析用采用 χ^2 检验法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异表达基因的筛选 通过下载 TCGA 中的 TSCC 患者数据, 实验获得 162 例 TSCC 样本的 RNA-Seq 测序数据和临床随访信息。之后, 实验应用 NetworkAnalyst 网站分析了 147 例 TSCC 组织与 15 例癌旁组织之间的差异表达基因, 共获得 7 150 个差异基因(以 $P < 0.05$ 和 $|\text{Log}_2^{\text{Fold Change}}| \geq 4$ 为筛选条件)。上述差异基因的表达情况通过 NetworkAnalyst 在线网站以火山图的形式进行呈现, 如图 1 所示。

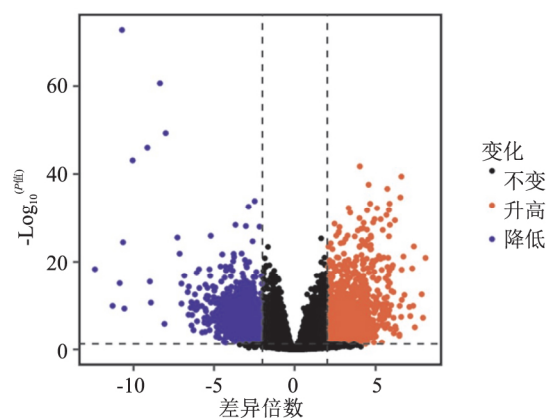


图1 TSCC 患者中的差异表达基因

2.2 生存分析 实验应用 Kaplan-Meier 分析方法筛选上述 7 150 个差异表达基因与 TSCC 患者生存率的关系(以 $P < 0.05$ 为筛选条件), 共获得 1 802 个基因与患者生存率相关。进一步分析显示, 在上述基因中, 有 761 个基因在 TSCC 组织中高表达, 并与患者的生存率密切相关。通过采用 Lasso 回归法在这 716 个基因中筛选关键基因, 实验获得 3 个在 TSCC 组织中表达量与生存率呈负相关的基因(表

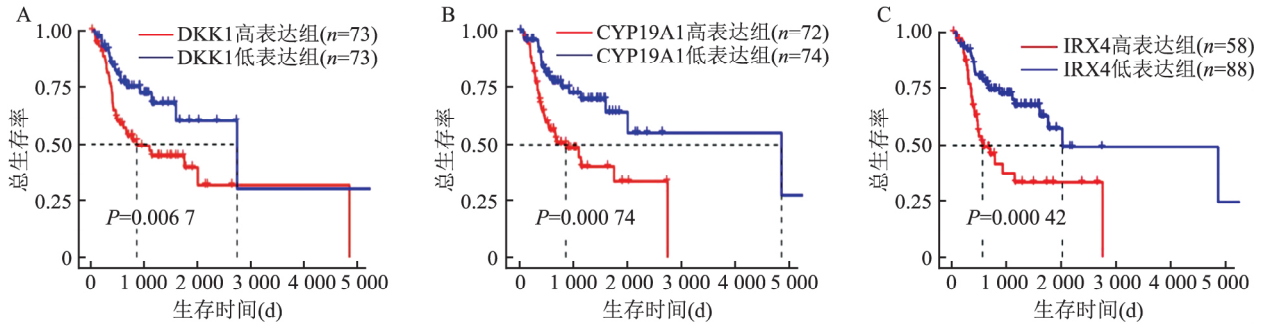


图2 关键基因的生存曲线
A-C: DKK1、CYP19A1、IRX4 的生存曲线图

达量越高,患者生存率越低),如图2所示。

2.3 差异表达基因的GO功能和KEGG通路富集分析 为更深入了解上述761个差异表达基因(在TSCC组织中高表达,并与患者生存率相关)的功能,实验利用David网站对其进行GO功能和KEGG通路富集分析。如图3A所示,BP结果显示差异基因主要富集于细胞外基质、细胞器裂变、细胞核分裂和核染色体分离等生物过程;CC结果显示,差异基因在质膜外侧面、黏着斑、细胞底物连接胶原蛋白和细胞外基质内质网腔等部分成分较为丰富。同时,KEGG通路富集分析表明,差异表达基因在细胞因子与受体间相互作用、中性粒细胞聚集、胶质瘤、细胞周期和细胞黏附分子等功能中较为活跃(图3B)。

2.4 DKK1在TSCC及正常口腔组织中的mRNA表达 通过UALCAN数据库分析520例HNSC组织和44例正常组织中DKK1的mRNA表达状况。结果显示,与正常组织相比,HNSC组织中DKK1的mRNA表达水平增加($P < 0.001$,图4A)。进一步分析DKK1的mRNA表达与HNSC临床病理特征的相关性,结果显示其与HNSC临床分期、组织学分级和淋巴结转移密切相关($P < 0.001$,图4B-D)。与正常组织组相比,DKK1的mRNA在不同临床分期($P < 0.001$,图4B)、组织学分级($P < 0.001$,图4C)和淋巴结转移状态($P < 0.001$,图4D)HNSC组织中的表达水平均增强。

2.5 DKK1在TSCC及癌旁组织中的蛋白表达 免疫组化结果显示,DKK1蛋白主要定位于胞质,其在癌旁组织中呈阴性或低表达,在TSCC组织中呈高表达(图5)。在50例TSCC组织中,DKK1蛋白的阳性率(84%,42/50)高于癌旁正常口腔组织(18%,9/50)($P < 0.001$)。见表1。

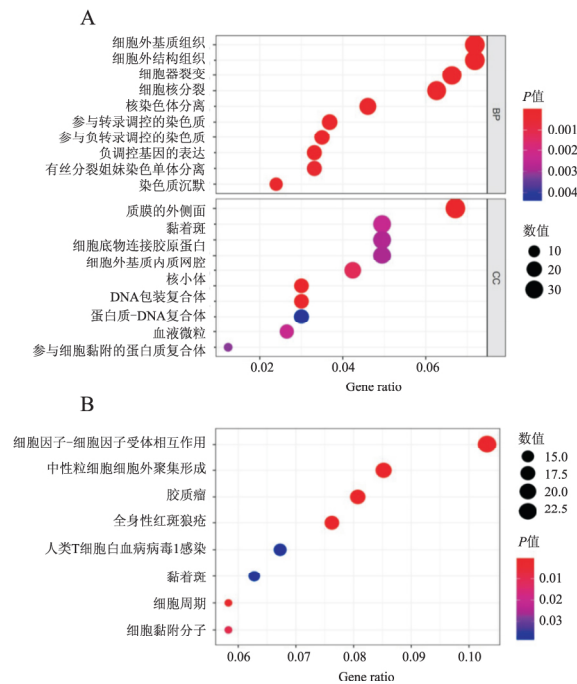


图3 差异表达基因的GO功能和KEGG功能富集分析
A: 差异表达基因的GO功能富集分析(BP:生物过程;CC:细胞成分); B: 差异表达基因的KEGG通路富集分析

表1 正常舌组织和TSCC组织中DKK1蛋白的表达
[n(%) n=50]

组别	DKK1 蛋白		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
正常组织	9(18)	41(82)	43.577	<0.001
TSCC 组织	42(84)	8(16)		

2.6 DKK1与TSCC临床病理特征的关系 通过分析DKK1表达与TSCC临床病理特征的相关性研究表明,DKK1表达与TSCC临床分期相关($P < 0.05$),而与TSCC患者性别、年龄、肿瘤直径、组织学分级、淋巴结转移无相关性($P > 0.05$)(表2),与UALCAN数据库分析结果相一致。其中DKK1蛋白在临床分期III+IV期TSCC组织中的阳性率(92.5%,37/40)高于I+II期TSCC组织(50%,

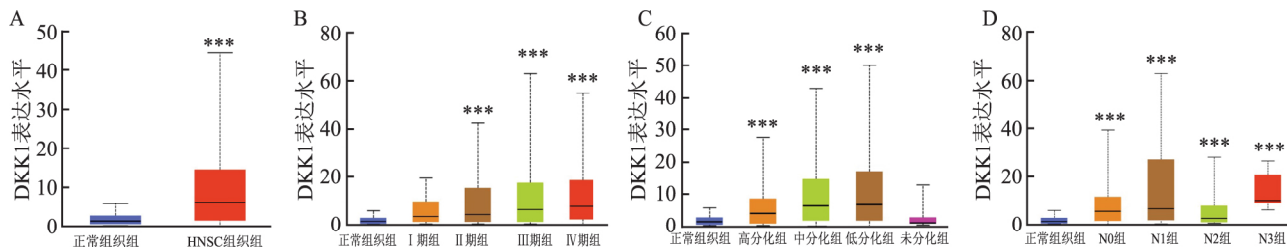


图4 UALCAN 数据库分析 DKK1 mRNA 在 HNSC 中的表达水平

A: DKK1 在正常组织和 HNSC 中的 mRNA 表达; B: DKK1 mRNA 表达与组织学分级的关系; C: DKK1 mRNA 表达与临床分期的关系; D: DKK1 mRNA 表达与淋巴结转移的关系; 与正常组织组比较: *** $P < 0.001$

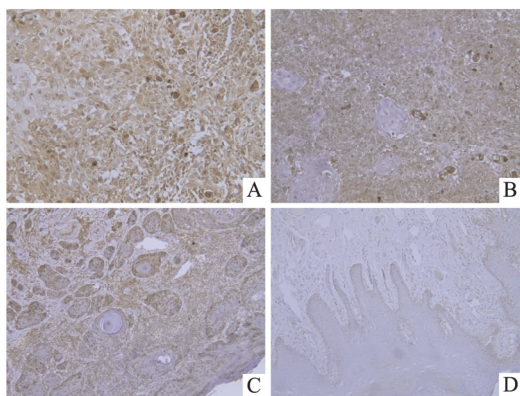


图5 TSCC 组织中 DKK1 蛋白的表达 ×100

A - C: DKK1 蛋白在低分化、中分化、高分化 TSCC 组织中的表达情况; D: DKK1 蛋白在癌旁组织中的表达情况

5/10) ($P < 0.05$) (表 2)。上述结果提示 DKK1 蛋白可能参与 TSCC 的恶性演进。

表 2 DKK1 蛋白表达与舌癌临床病理特征的关系 [n(%)]

临床病理参数	n	DKK1 阳性 (n = 42)	χ^2 值	P 值
性别			0.304	0.581
男	30	24		
女	20	18		
年龄(岁)			0.403	0.526
<60	23	18		
≥60	27	24		
肿瘤直径(cm)			0.040	0.842
≤4.0	46	38(82.6)		
>4.0	4	4(100.0)		
临床分期			7.822	<0.050
I + II	10	5(50.0)		
III + IV	40	37(92.5)		
组织学分级			2.125	0.346
高	5	3(60.0)		
中	26	22(84.6)		
低	19	17(89.4)		
淋巴结转移			0.574	0.449
无	15	14(93.0)		
有	35	28(80.0)		

2.7 敲低 DKK1 对 β -catenin、p-p65 和 p65 表达的影响 Western blot 实验显示,与正常口腔上皮细胞 HOEC 相比,DKK1 在 TSCC 细胞 Cal27 中的蛋白表达水平升高。为探索 DKK1 在 TSCC 肿瘤中潜在的作用机制,实验利用 siRNA 敲低 TSCC 细胞中的 DKK1 的表达。Western blot 实验结果显示,与对照组相比,DKK1 敲低组 Cal27 细胞中 β -catenin、p-p65 和 p65 蛋白表达水平下降。见图 6。

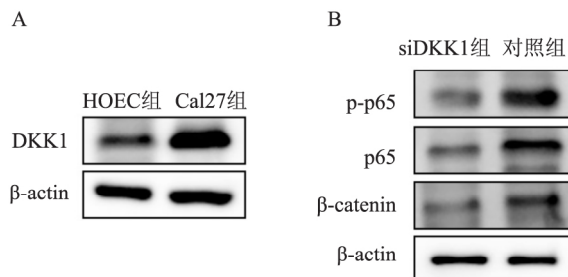


图6 DKK1 在 TSCC 细胞中的表达及其下游靶点

A: Western blot 实验检测 DKK1 蛋白在 HOEC 和 Cal27 细胞中的表达水平; B: Western blot 实验分析在 Cal27 细胞中敲除 DKK1 蛋白的表达后 β -catenin、p-p65 和 p65 的表达变化

3 讨论

DKK1 基因全称是“dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1”,其编码的 DKK1 蛋白是具有 2 个富含半胱氨酸结构域的分泌蛋白,属于 Dickkopf 家族^[10]。DKK1 蛋白通过与 LRP6 共受体结合,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路并参与胚胎发育、骨骼形成和多种癌症的发生发展过程^[11]。由于肿瘤微环境的不同和癌症复杂的调控机制,DKK1 蛋白对不同肿瘤中的不同发展阶段具有不同的影响^[12]。目前,DKK1 作为一个肿瘤相关性抗原,能激发特异性的 CD4⁺ 辅助 T 细胞、CD8⁺ CTL 的细胞免疫应答以及靶向 DKK1 的体液免疫应答。此外,DKN-01 是一种抑制 DKK1 蛋白的人源化单克隆抗体,与免疫

治疗药物替雷利珠单抗和化疗联合使用,治疗多发性骨髓瘤、胃癌和胃食管交界癌患者^[13]。DKK1 蛋白与甲胎蛋白的联合应用,可将肝细胞癌的总诊断率提高到 87.5%^[14]。DKK1 在多种肿瘤组织中高表达,可通过下调 NK 细胞功能和促进骨髓瘤源性抑制细胞 MDSCs 在癌组织中的聚集来抑制抗肿瘤免疫反应,促进肿瘤的生长与转移^[15]。

该研究采用生物信息学方法,通过 TCGA 数据库筛选到 162 例 TSCC 患者,通过癌组织和癌旁组织的 NetworkAnalysed 分析,共获得 7 150 个差异基因。通过 Kaplan-Meier 分析和 Lasso 回归法,实验筛选到 3 个表达量与生存率呈负相关的关键基因 DKK1、CYP19A1 和 IRX4。其中,UALCAN 数据库和免疫组化实验显示 DKK1 的 mRNA 和蛋白水平在 TSCC 组织中呈高表达,并且该蛋白与 TSCC 患者的临床分期相关,这提示 DKK1 可能促进 TSCC 肿瘤的发生和恶性演变等生物过程。此外,Western blot 实验显示 DKK1 蛋白在 TSCC 细胞 Cal27 中的表达高于正常口腔上皮细胞 HOEC。在 TSCC 细胞 Cal27 中敲低 DKK1 的表达后, β -catenin、p-p65 和 p65 的表达水平也发生相应下降,这提示 DKK1 可能通过下调 β -catenin、p-p65 和 p65 表达来调控 TSCC 肿瘤的恶性生物学进展过程。

参考文献

- [1] Chamoli A, Gosavi A S, Shirwadkar U P, et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: risk factors, mechanisms, and diagnostics [J]. *Oral Oncol*, 2021, 121: 105451.
- [2] Schoenfeld J D, Hanna G J, Jo V Y, et al. Neoadjuvant nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in untreated oral cavity squamous cell carcinoma: a phase 2 open-label randomized clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(10): 1563–70.
- [3] Naruse T, Yanamoto S, Okuyama K, et al. Immunohistochemical study of PD-1/PD-L1 axis expression in oral tongue squamous cell carcinomas: effect of neoadjuvant chemotherapy on local recurrence [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 735–42.
- [4] Zhuang X, Zhang H, Li X, et al. Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by Wnt signalling inhibitor DKK1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(10): 1274–85.
- [5] González-Sancho J M, Aguilera O, García J M, et al. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(6): 1098–103.
- [6] Sheng S L, Huang G, Yu B, et al. Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(9): 1656–64.
- [7] Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(1a): A68–77.
- [8] Zhou G, Soufan O, Ewald J, et al. Network Analyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W234–41.
- [9] Jiao X, Sherman B T, Huang Da W, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(13): 1805–6.
- [10] Giralt I, Gallo-Oller G, Navarro N, et al. Dickkopf proteins and their role in cancer: a family of Wnt antagonists with a dual role [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(8).
- [11] Yamamoto H, Sakane H, Yamamoto H, et al. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(1): 37–48.
- [12] Zhu G, Song J, Chen W, et al. Expression and role of dickkopf-1 (Dkk1) in tumors: from the cells to the patients [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 659–75.
- [13] Li R, Zheng C, Wang Q, et al. Identification of an immunogenic DKK1 long peptide for immunotherapy of human multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2021, 106(3): 838–46.
- [14] Shen Q, Fan J, Yang X R, et al. Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a large-scale, multicentre study [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(8): 817–26.
- [15] D'Amico L, Mahajan S, Capietto A H, et al. Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) regulates the accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in cancer [J]. *J Exp Med*, 2016, 213(5): 827–40.

Expression and molecular mechanism of DKK1 in tongue squamous cell carcinoma

Sun Yue, Wang Honghao, Li Tingyu, Yang Mingen, Huang Hanxiao, Hou Jun

(Dept of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression and molecular mechanism of dickkopf 1 (DKK1) in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) by bioinformatics method and molecular biology experiments. **Methods** The

网络出版时间: 2023-05-30 17:16:39 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1633.012.html>

APETx2 对感染后肠易激综合征小鼠内脏敏感性的作用及机制

肖红云¹ 李欢¹ 闫波² 潘颖² 田平平² 袁丽萍^{1,3}

摘要 目的 探讨酸敏感离子通道 3 特异性拮抗剂 (APETx2) 对感染后肠易激综合征 (PI-IBS) 小鼠内脏敏感性的调控作用及其机制。方法 采用旋毛虫感染 NIH 小鼠建立 PI-IBS 模型。通过测量首次排黑便的时间和 6 h 内收集的粪便颗粒数评估胃肠道运输功能; 腹壁回撤反射 (AWR) 评分评估小鼠内脏敏感性; 免疫组织化学法检测结肠组织中降钙素基因相关肽 (CGRP) 蛋白表达; 通过实时定量 PCR (qRT-PCR) 法检测结肠组织中脑源性神经营养因子 (BDNF)、CGRP mRNA 表达。蛋白质印迹法 (Western blot) 检测脑组织中酸敏感离子通道 3 (ASIC3)、CGRP、瞬时受体电位香草素 1 (TRPV1) 蛋白表达。结果 与对照组比较, PI-IBS 组首次排黑便时间显著降低, 6 h 内的粪便颗粒数, AWR 评

分均显著升高, 结肠组织中 CGRP 蛋白表达显著升高, BDNF、CGRP mRNA 显著升高, 脑组织中 CGRP、ASIC3、TRPV1 的蛋白表达显著升高; 与 PI-IBS 组比较, APETx2 组首次排黑便时间显著延长, 6 h 内的粪便颗粒数, AWR 评分均显著降低, 结肠组织中 CGRP 蛋白表达显著降低, BDNF、CGRP mRNA 表达显著降低, 脑组织中 CGRP、ASIC3、TRPV1 的蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 APETx2 可通过下调 BDNF、CGRP、ASIC3、TRPV1 的表达, 减轻 PI-IBS 小鼠的内脏敏感性并调节胃肠道运动。APETx2 可能为治疗 IBS 提供一个新的治疗选择。

关键词 感染后肠易激综合征; APETx2; 酸敏感离子通道 3; 降钙素基因相关肽; 脑源性神经营养因子; 瞬时受体电位香草素 1

中图分类号 R 574.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0953-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.013

感染后肠易激综合征 (post-infection irritable bowel syndrome, PI-IBS) 是一种常见的功能性胃肠道疾病, 其特征是在急性胃肠炎发作后出现慢性间

2023-03-02 接收

基金项目: 安徽省高校科学研究项目 (编号: KJ2020ZD67)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属阜阳医院儿科, 阜阳 236112

² 安徽医学高等专科学校医学技术系, 合肥 230601

³ 安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230022

作者简介: 肖红云, 女, 硕士研究生;

袁丽萍, 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: yuanliping3986@sina.com

patients information was download from TCGA-TSCC database, the differentially expressed genes between the cancer and normal tissues were screened by NetworkAnalysed site, the key genes and clinical prognosis were identified through Kaplan-Meier analysis and Lasso regression, the functions and pathways of differentially expressed genes were gained by GO and KEGG database, the expression of DKK1 mRNA and protein in TSCC as well as its relationship with clinicopathological features were analyzed by UALCAN database and immunohistochemistry. Western blot assay was conducted to detect the protein expression of DKK1 in TSCC cells, and siRNA was used to knock down the expression of DKK1 protein in Cal27 cells. **Results** The three key genes DKK1, CYP19A1 and IRX4, which were highly expressed in tongue squamous cell carcinoma and the survival rate of TSCC patients with high expression group was poor, were screened through NetworkAnalysed, Kaplan-Meier analysis and Lasso regression method. UALCAN database showed that the mRNA level of DKK1 in TSCC tissues was higher than that in normal tissues, and its high expression was significantly correlated with clinical stage, histological grade and lymph node metastasis of TSCC patients. The immunohistochemistry assay suggested that the positive rate of DKK1 protein in clinical stage III + IV TSCC tissues was significantly higher than that in stage I + II TSCC tissues. In addition, the expression level of DKK1 protein in TSCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues. Western blot assay also showed that the protein expression of DKK1 in TSCC cell Cal27 was much higher than normal oral epithelial cell HOEC. When knock down the protein expression of DKK1 in Cal27, the expression of β -catenin, p-p65 和 p65 were also reduced. **Conclusion** DKK1 is highly expressed in tongue squamous cell carcinoma tissues and cells and plays an important role. It may be a new target for early diagnosis and drug treatment of TSCC.

Key words tongue squamous cell carcinoma; DKK1; β -catenin; p-p65; p65