

·论著·

## 核激素受体家族在皮肤鳞状细胞癌细胞中的表达

刘林红<sup>1</sup>, 张华<sup>2</sup>, 张颖<sup>1</sup>, 胡美玲<sup>1</sup>, 张斌<sup>1\*</sup>

(1. 重庆市中医院皮肤科, 重庆 400011; 2. 山东省济南市天桥区疾病预防控制中心, 山东 济南 250031)

**【摘要】** **目的** 通过研究核激素受体家族成员在皮肤鳞癌 A431 细胞中的表达, 分析核激素受体家族成员在皮肤鳞癌发生机制中的作用。**方法** 使用 PCR Array 技术分别检测人皮肤角质形成细胞和皮肤鳞状细胞癌细胞中核激素受体成员 mRNA 的相对表达水平。使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算皮肤鳞状细胞癌细胞中核激素受体 mRNA 的相对变化。**结果** 核激素受体在角质形成细胞以及皮肤鳞状细胞癌细胞中均表达, RXR 二聚体家族成员如 VDR、RXR、RAR、PPAR 以及 LXR 等表达量较高。A431 细胞中多种受体的 mRNA 表达水平较正常角质形成细胞明显升高, 尤其是 RXR 二聚体家族成员。**结论** 在皮肤鳞状细胞癌细胞中存在大量核激素受体家族成员, 尤其是 RXR 异构二聚体类成员的高表达, 这些成员的异常表达可能在肿瘤发生发展中发挥作用, 也可能为肿瘤的治疗提供靶点。

**【关键词】** 核激素受体; 鳞状细胞癌

中图分类号: R715.02; R730.261 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1002-1310.2021.04.001

## Expressions of nuclear hormone receptor superfamily in skin squamous cell carcinoma A431 cells

LIU Lin-hong<sup>1</sup>, ZHANG Hua<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, HU Mei-ling<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Dermatology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine Chongqing 400011, China; 2. Centers for Disease Control and Prevention of Tianqiao District, Jinan, Shandong 250031, China)

**【Abstract】** **Objective** To detect nuclear hormone receptors expression in skin squamous cell carcinoma A431 cells and analyze its role in the pathogenesis of skin squamous cell carcinoma. **Methods** PCR Array was used to detect the mRNA expression levels of nuclear hormone receptor members in keratinocytes and skin squamous cell carcinoma cells. The relative changes of nuclear hormone receptor mRNA in skin squamous cell carcinoma cells were calculated by  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **Results** Nuclear hormone receptor expression was detected both in keratinocytes and in skin squamous cell carcinoma cells. The expression of RXR dimer family members such as VDR, RXR, RAR, PPAR and LXR was high. The mRNA expression levels of multiple receptors, especially the members of the RXR dimer family, were significantly higher in A431 cells than in normal keratinocytes. **Conclusion** High expression of a large number of nuclear hormone receptors, especially the members of the RXR isomeric dimer family might play a role in development or progression of skin squamous cell carcinoma, which might also provide potential targets of skin tumor therapy.

**【Key words】** Nuclear hormone receptor; Squamous cell carcinoma

皮肤鳞状细胞癌简称皮肤鳞癌, 是最常见的皮肤恶性肿瘤, 来源于皮肤表皮细胞或者皮肤附属器, 易在皮肤表面形成溃疡, 损毁患者容貌, 严重影响患者生存质量、威胁患者健康<sup>[1]</sup>。鳞癌的确切发病机制目前仍不十分清楚<sup>[2]</sup>。研究发现, 核激素受体家族成员在调节皮肤发育过程中发挥重要作用, 具有调节细胞代谢、增殖、分化、凋亡等作用并参与了炎症反应, 而其参与调节细胞过程的能力, 也使其成为调节人类皮肤疾病的有力的作用靶点<sup>[3-5]</sup>。

前期研究发现, 皮肤角质形成细胞中存在大量核激素受体家族成员的表达, 提示表皮是核激素受体的主要靶器官<sup>[6]</sup>。作为表皮来源的恶性肿瘤, 在皮肤鳞状细胞癌中, 核激素受体的表达水平如何? 与正常细胞相比, 两者之间受体的表达是否存在差别? 这种表达差异的了解无论对于了解鳞癌的发病机制或对肿瘤治疗都具有重要意义。因此, 本研究采用正常角质形成细

胞作为对照, 观察皮肤鳞癌 A431 细胞中核激素受体的表达情况, 探索核激素受体在正常细胞与肿瘤细胞表达的差异, 旨在加深对皮肤肿瘤发生的机制了解, 以选择性地采用更有效的靶向药物, 改善临床治疗效果。

### 1 材料与方法

1.1 实验材料 人皮肤正常角质形成细胞和人皮肤鳞状细胞癌细胞株 A431 细胞购自美国组织培养库 (American Tissue Culture Collection)。DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司)、角质形成细胞培养基 (ATCC)、青霉素 - 链霉素溶液 (美国 Cellgro 公司)、RNeasy Mini 试剂盒、RT2 First Strand 试剂盒、RT2 SYBR Green qPCR Mastermix 和 RT2 Profiler PCR Array Plate (美国 Qiagen 公司)。

1.2 实验方法 ① 细胞培养: 在 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的孵箱中, 用细胞专用培养基培养细胞, 每 2 天更换培养液 1 次, 当单层培养的细胞达到大于 90%

融合时,按细胞培养常规用 0.25% 胰蛋白酶液 +0.02% 乙二胺四乙酸消化细胞,用于传代,镜下观察,及时用胰蛋白酶终止液终止消化。② 细胞 RNA 的提取、逆转录、Real-time PCR: 以每孔  $2 \times 10^5$  细胞浓度将角质形成细胞和皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞接种于 6 孔板,待细胞接近 90% 融合时,裂解细胞后提取 RNA。使用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)分别测定波长为 260nm 与 280nm (A260 和 A280) 条件下 RNA 样本的吸光度值,系统自动计算 RNA 浓度(待测样本 A260/A280 比值在 1.8 ~ 2.0 范围内,提示 RNA 纯度较高)。提取的 RNA 参照 RT 试剂盒(RT2 First Strand Kit)说明进行逆转录(reverse transcription,RT)反应。按照 RT2 Profiler PCR Array Plate 试剂盒的操作说明配置反应体系,使用 LightCycler 480II 实时荧光定量 PCR 系统进行 Real-time PCR 扩增。

1.3 数据分析 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法对基因表达变化进行相对比较分析。从 PCR 系统中获取原始 CT 值后,带入 EXCEL 中计算各自基因的相对表达量。 $\Delta CT = CT_{\text{靶基因}} - CT_{\text{内参基因}}$ ,  $2^{-\Delta CT}$  所得数值即为各自基因的相对表达水平<sup>[7]</sup>。 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{A431} - \Delta CT_{KC}$ ,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  所得数值即为皮肤鳞癌 A431 细胞中与正常角质形成细胞相比,各对应核激素受体基因 mRNA 表达水平的倍数变化。

## 2 结果

### 2.1 正常人皮肤角质形成细胞和皮肤鳞状细胞癌细

胞中核激素受体家族成员的表达 正常人皮肤角质形成细胞和皮肤鳞状细胞癌细胞中均有核激素受体家族成员的表达,按照基因表达值的高低,可见正常角质形成细胞不同强度表达的基因在 A431 细胞中有不同的变化趋势(见表 1、图 1)。A431 细胞中表达量较高的受体中以 RXR 二聚体家族成员为主,如 VDR、RXR、RAR、PPAR 以及 LXR 等,还包括数个孤儿受体,如 NR2F2、NR2C1、NR2C2、NR1D2 等(见图 2)。

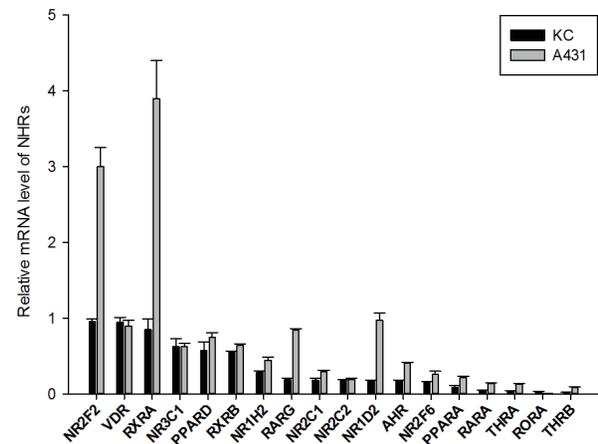


图 1 角质形成细胞和皮肤鳞状细胞癌细胞中核激素受体 mRNA 相对表达量 ( $2^{-\Delta CT}$ )

2.2 皮肤鳞状细胞癌细胞中核激素受体 mRNA 的相对表达变化 A431 细胞中多数 RXR 二聚体家族成员表达水平较正常角质形成细胞明显升高,其中以

表 1 角质形成细胞和皮肤鳞状细胞癌细胞中核激素受体的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

	角质形成细胞	皮肤鳞状细胞癌细胞 A431
NR2F2	0.954 0 ± 0.031	2.994 0 ± 0.252 2
VDR	0.946 5 ± 0.063 7	0.894 3 ± 0.078 6
RXR α	0.847 7 ± 0.001 4	3.899 9 ± 0.506 4
NR3C1(GR α)	0.625 1 ± 0.100 8	0.625 7 ± 0.041
PPAR δ	0.571 1 ± 0.116 8	0.746 9 ± 0.061 2
RXR β	0.546 6 ± 0.016 6	0.639 5 ± 0.018 3
NR1H2(LXR β)	0.286 1 ± 0.014 5	0.443 5 ± 0.042 5
RAR γ	0.184 1 ± 0.021 1	0.840 8 ± 0.021 9
NR2C1	0.178 4 ± 0.026 3	0.296 2 ± 0.015 5
NR2C2	0.176 5 ± 0.000 3	0.191 1 ± 0.013 7
NR1D2	0.171 6 ± 0.008 2	0.969 9 ± 0.097 7
AHR	0.167 9 ± 0.011 7	0.406 6 ± 0.011 9
NR2F6	0.156 1 ± 0.007 5	0.259 6 ± 0.040 6
PPAR α	0.085 1 ± 0.025 5	0.216 0 ± 0.012 9
RAR α	0.044 7 ± 0.003 5	0.132 6 ± 0.015 5
THRA	0.036 2 ± 0.000 1	0.131 2 ± 0.003 9
ROR α	0.026 3 ± 0.001 8	0.000 2 ± 0.000 6
THR β	0.019 3 ± 0.000 7	0.080 1 ± 0.011 6

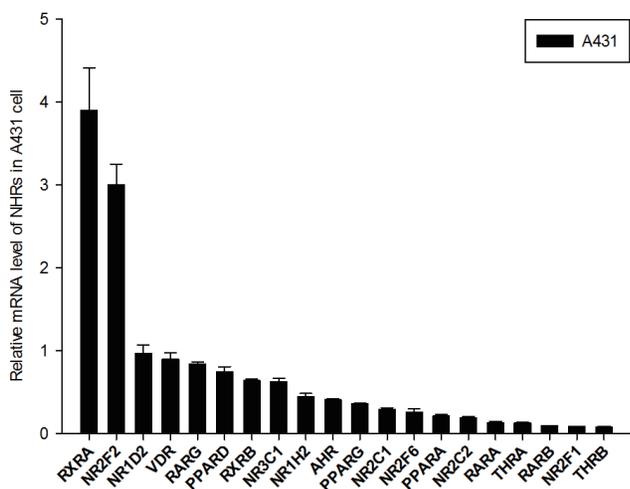


图2 皮肤鳞状细胞癌细胞中核激素受体 mRNA 相对表达量 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )

PPAR  $\gamma$ 、RXRs、RARs 变化水平最为显著。此外,大量孤儿受体在鳞癌 A431 细胞中的表达也显著升高,包括 NR4A1、NR2F1、NR2F2、NR1D2、NR1D1 等(见表 2)。

表 2 A431 中表达增高的核激素受体基因及其表达倍数(与 KC 相比)

Position	Gene Symbol	Fold Regulation
F05	PPAR $\gamma$	53.507 4
E09	NR4A1	12.000 3
E04	NR2F1	8.485 5
F11	RAR $\beta$	8.111 7
D07	NR1D2	5.553 3
D06	NR1D1	5.376 5
E11	NR6A1	5.193 4
G03	RXR $\alpha$	4.621 4
F12	RAR $\gamma$	4.578 9
E05	NR2F2	3.095 1
F10	RAR $\alpha$	2.911 3
F02	PPAR $\alpha$	2.716 3
A02	AR	1.763 4
D09	NR1H3(LXR $\alpha$ )	1.733 1
E01	NR2C1	1.674
D11	NR1H2	1.632
E06	NR2F6	1.605 8
D08	NR1H2(LXR $\beta$ )	1.526 3

注: Position 为相关基因在反应板上的位置标识。

### 3 讨论

核激素受体超家族是目前真核生物体内含量最丰富的转录因子超家族成员的一员,与一系列有效转录所必需的辅活因子或辅遏阻子发生相互作用,并与基础转录机制一起,调节不同靶基因的启动子、配体

或细胞类型特异性的表达。核激素受体家族成员参与胚胎发育、细胞分化和细胞内环境稳定等多种生理过程,并在相关靶基因的正性及负性调控中发挥着重要的作用。其中糖皮质激素、雄激素以及雌激素受体对皮肤的作用最早研究<sup>[8-9]</sup>,其配体已被大量应用于临床治疗。同源序列比对发现了相关受体的全部超家族成员,很多成员在维持皮肤平衡方面发挥了重要作用。其中一组与 RXR 形成异源二聚体的核激素受体亚群成员,在皮肤生理功能中发挥尤其关键的作用,其中包括 RARs、VDR、LXR 和 PPARs 等<sup>[10-12]</sup>。既往研究发现,在皮肤主要构成细胞中存在大量核激素受体成员的表达,提示该家族成员在皮肤发育中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。

有关核激素受体研究的积累已逐渐让人们认识到,核受体及其调控的代谢通路的紊乱也可导致糖尿病,肿瘤等许多病理过程。继 Q 蛋白耦联受体和离子通道之后,核受体已成为第三大类非酶性治疗靶点;而基于核激素受体成员与肿瘤发生关系的不同认识,肿瘤防治研究工作也逐渐将核受体这一作用靶点重视起来。比如,由雌激素受体  $\alpha$  介导的反应被证实是乳腺癌发病的重要病因。临床乳腺癌患者中,75% 以上肿瘤组织有 ER  $\alpha$  表达,这部分肿瘤对抗激素治疗敏感,预后也较好,反之,ER  $\alpha$  表达阴性的乳腺癌患者预后较差<sup>[13]</sup>,因此 ER  $\alpha$  已成为作为临床区分病人并采取不同治疗措施的重要参考指标之一。此外,在上皮细胞来源的前列腺癌的发生发展过程中,AR 在其中起到关键作用,原发前列腺癌细胞的增殖需要雄激素的刺激完成,雄激素耗竭疗法也因而成为临床上抑制前列腺癌发展的标准方案<sup>[14]</sup>。大量研究表明,多种肿瘤组织或相应细胞中存在着 RARs 以及 RXRs 的表达异常<sup>[15-16]</sup>。而作为目前已经有确定配体的核激素受体家族成员,其配体已被广泛用于对治疗头颈部、肺等部位癌前病变及降低继发性癌的发生率有很好疗效,在皮肤癌、乳腺癌以及宫颈癌等多种恶性肿瘤治疗中已进入临床研究阶段,我们的研究也发现在皮肤鳞状细胞癌细胞中,RXR 和 RAR 的表达水平均较正常细胞升高,根据核激素受体的特性,这也能解释临床上广泛使用的维甲酸药物治疗能明显抑制肿瘤生长,降低肿瘤的发病率。但同前所述,维甲酸的副作用在很大程度上限制了其在临床的广泛使用,为了研制出更加有效的维甲酸受体药物,从而得以进行更加有效的治疗,尤其需要针对与肿瘤相关的维甲酸受体的转录、翻译和磷酸化调节的分子机制开展深入的病理、生理学研究。随着对维甲酸作用机理认识的深入,寻找选择性更强,毒副作用更小的新型维甲酸配体用于靶向治疗,必将在未来的肿瘤治疗中发挥更大的作用。

我们的研究发现,在皮肤鳞状细胞癌细胞中也存在大量核激素受体成员,尤其是 RXR 异构二聚体家

族成员的表达,与正常角质形成细胞相比,多数 RXR 异构二聚体受体家族成员的 mRNA 表达水平升高,其中 PPAR  $\gamma$  在正常角质形成细胞中表达水平很低,但在皮肤鳞状细胞癌中表达明显升高,这种表达异常的升高是肿瘤发生的始动环节抑或为肿瘤治疗提供了特异性靶点,尚有待进一步研究证实。

除上述核激素受体外,皮肤鳞癌 A431 细胞中也存在大量孤儿受体的表达,且部分孤儿受体在 A431 细胞中的表达较正常细胞明显升高,比如 NR2F2、NR2F1、NR2D2 等成员,但由于目前针对这些受体的研究较少,尚不能确定这些受体在皮肤鳞癌发生及治疗中的可能作用。随着对孤儿受体结构和功能的确定,应用高通量筛选和虚拟高通量现代科技手段,以核受体为靶标的药物研究将成为现代药物研究的一大热点。

#### 参考文献:

- [1] Que S K T,Zwald F O,Schmults C D.Cutaneous squamous cell carcinoma:Incidence,risk factors,diagnosis,and staging[J].J Am Acad Dermatol,2018,78(2):237-247.
- [2] Ratushny V,Gober M D,Hick R,et al.From keratinocyte to cancer:the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma[J].J Clin Invest,2012,122(2):464-472.
- [3] Chen H,Pan J,Zhang L,et al.Downregulation of estrogen-related receptor alpha inhibits human cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation and migration by regulating EMT via fibronectin and STAT3 signaling pathways[J].Eur J Pharmacol,2018(825):133-142.
- [4] Dobrotkova V,Chlapek P,Mazanek P,et al.Traffic lights for retinoids in oncology:molecular markers of retinoid resistance and sensitivity and their use in the management of cancer differentiation therapy[J].BMC Cancer,2018,18(1):1059.
- [5] Bikle D D.The Vitamin D receptor as tumor suppressor in skin[J].Adv Exp Med Biol,2020(1268):285-306.
- [6] 何仁颖,何威,张斌.核激素受体在皮肤主要构成细胞中的表达[J].检验医学与临床,2019,16(17):2433-2436.
- [7] Kenneth J L,Thomas D.Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method[J].Methods,2001,25(4):402-408.
- [8] Epstein E H,Bonifas J M.Glucocorticoid receptors of normal human epidermis[J].J Invest Dermatol,1982,78(2):144-146.
- [9] Uzuka M,Nakajima K,Mori Y.Estrogen receptor in the mouse skin[J].Biochim Biophys Acta,1978,544(2):329-337.
- [10] Tang T,Wei Y,Kang J,et al.Tumor-specific macrophage targeting through recognition of retinoid X receptor beta[J].J Control Release,2019(301):42-53.
- [11] Ren L,Konger R L.Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  suppresses squamous carcinogenesis through anti-inflammatory signaling and regulation of the immune response[J].Mol Carcinog,2019,58(9):1589-1601.
- [12] Pontini L,Marinozzi M.Shedding light on the roles of liver X receptors in cancer by using chemical probes[J].Brit J Pharmacol,2020,4(5):doi:10.1111/bph.15200.
- [13] Sanchez R,Nguyen D,Rocha W,et al.Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors[J].Bio Essays,2002,24(3):244-254.
- [14] Gregory C W,Hamil K G,Kim D,et al.Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer is associated with increased expression of androgen-regulated genes[J].Cancer Res,1998,58(24):5718-5724.
- [15] Fan J,Lv Z,Yang G,et al.Retinoic acid receptor-related orphan receptors:critical roles in tumorigenesis[J].Front Immunol,2018(9):1187.
- [16] Martino O D,Ferris M Y,Gayla H,et al.Endogenous retinoid X receptor ligands act as tumor suppressors in MLL-AF9 mouse leukemia[J].Blood,2019,134(Supplement 1):2677.