

TIAM-1 蛋白在舌体鳞癌中的表达及临床意义

Expression and Clinical Significance of TIAM-1 in Tongue Squamous Cell Carcinoma

WANG Jia-feng, GE Ming-hua, ZHANG Quan

王佳峰¹, 葛明华¹, 张 论²

(1.浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022;

2.中山大学肿瘤防治中心, 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘 要: [目的] 探讨舌体鳞癌中 TIAM-1 蛋白表达与临床病理因素及预后关系。[方法] 应用免疫组化 SP 法检测 86 例舌体鳞癌、10 例舌上皮源性良性肿瘤以及 10 例口腔正常黏膜中 TIAM-1 蛋白的表达情况, 统计分析 TIAM-1 蛋白与舌体鳞癌临床病理因素及预后的关系。[结果] TIAM-1 蛋白在舌体鳞癌、舌上皮来源良性肿瘤以及口腔正常黏膜的阳性表达率分别为 62.8%、10.0% 和 0, TIAM-1 蛋白在舌体鳞癌中的阳性表达率高于正常口腔黏膜上皮和舌上皮源性良性肿瘤, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。T₃+T₄ 期、颈淋巴结转移组、临床 III+IV 期、中低分化舌体鳞癌 TIAM-1 蛋白的阳性表达率分别高于 T₁+T₂ 期、无颈淋巴结转移组、临床 I+II 期以及高分化舌体鳞癌, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TIAM-1 蛋白表达阳性组和阴性组舌体鳞癌复发率分别为 51.9% 和 28.1%, 差异有统计学意义 ($P = 0.032$); 两组 5 年无瘤生存率分别为 38.9% 和 71.9%, 差异有统计学意义 ($P = 0.003$)。[结论] TIAM-1 蛋白在舌体鳞癌中的阳性表达率高于正常口腔黏膜和舌上皮源性良性肿瘤。TIAM-1 蛋白的表达与舌体鳞癌的临床分期、有无淋巴结转移以及病理分级有关。TIAM-1 蛋白阳性表达的舌体鳞癌复发率较高, 预后较差。

主题词: 舌肿瘤; 鳞癌; T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 (TIAM-1); 免疫组织化学

中图分类号: R739.86 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)09-0655-05

侵袭和转移是恶性肿瘤最具有特征性的生物学行为, 也是临床上绝大多数肿瘤患者的致死因素。肿瘤侵袭转移是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程, 但与细胞本身所具有的迁移运动能力密切相关, 细胞骨架及其附属结构的变化是细胞发生迁移活动和肿瘤细胞转移的基础。T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子-1 (T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1, TIAM-1) 是一个重要的细胞骨架调节因子, 能够促进细胞运动和迁移。有研究显示, TIAM-1 在多种肿瘤中呈阳性表达, 并与其侵袭、转移密切相关。舌体鳞癌恶性度较高, 局部侵袭性较强, 容易发生淋巴结转移。本研究通过检测 TIAM-1 在舌体鳞癌中的表达, 探讨其与舌体鳞癌临床病理因素及预后关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集中山大学肿瘤防治中心病历档案库中

通讯作者: 张 论, 教授, 博士; 中山大学肿瘤防治中心头颈外科, 广东省广州市东风东路 651 号 (510060); E-mail: zhangq6@mail.sysu.edu.cn。

收稿日期: 2012-07-16; 修回日期: 2012-08-12

2001 年 1 月至 2005 年 12 月期间初治的舌体鳞状细胞癌; 均行手术治疗, 术前未行放化疗; 病理确诊且肿瘤组织石蜡块保存完好; 临床、病理、随访资料完善且随访时间 5 年以上或至患者死亡。遵照以上标准入选病例 86 例, 其中男性 57 例, 女性 29 例, 男女性比例 1.97:1; 年龄 24~80 岁, 中位年龄 50 岁。高分化鳞癌 65 例, 中分化 16 例, 低分化 5 例。按照第 7 版 AJCC 分期标准, I 期 12 例, II 期 32 例, III 期 31 例, IV 期 11 例。

收集中山大学肿瘤防治中心病理科标本库中石蜡块保存完好的舌上皮来源良性肿瘤 10 例、口腔正常黏膜 10 例作为对照组。

1.2 主要试剂及仪器

免疫组化试剂盒: Zymed SP-9000, 美国; 兔抗人 TIAM-1 多克隆抗体: abcam 公司, 美国 (ab70225); 羊抗鼠或羊抗兔 IgG: abcam 公司, 美国; 正常山羊血清: 北京中山生物技术公司产品, 北京, 4℃ 保存; PBS 液: 北京中山生物技术公司; DAB 显色剂: 北京中山生物技术公司。

1.3 免疫组化方法

取石蜡切片 3~4 μm, 连续切片 3~5 张, 置于载玻片上 60℃ 温箱烤片 3~4h 后, 做免疫组化染色。主

要步骤如下:石蜡切片 3~4 μ m,二甲苯脱蜡,无水乙醇、95%、80%、70%乙醇至水化;蒸馏水洗,抗原修复,采用高温高压修复(0.01mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液,pH6.0)2min;蒸馏水洗,PBS 液冲洗 5min $\times$ 3 次;3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 10min;PBS 液冲洗 5min $\times$ 3 次;5%~10%正常山羊血清封闭,室温孵育 10min,倾去血清,勿洗,滴加适当比例稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜;以 PBS 液代替一抗为阴性对照;PBS 液冲洗 5min $\times$ 3 次;滴加山羊抗鼠或兔抗体 IgG 多聚体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min;PBS 液冲洗 5min $\times$ 3 次;DAB 显色液室温下显色 1~3min,显微镜下控制反应,自来水充分冲洗。苏木素复染,80%、95%、无水乙醇脱水,二甲苯透明、中性树胶封片。

每组染色均以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,用已知阳性标本作为阳性对照。免疫组化判定由两位病理科医师独立阅片。参照文献[1]的判定标准,高倍镜下每张切片选择 10 个有代表性的视野,每个视野计数 100 个肿瘤细胞,共计数 1 000 个细胞。染色结果按染色强度和阳性细胞百分率分别计分,染色强度评分标准:不着色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。阳性细胞所占比例评定标准:0 分为阴性,阳性细胞数 $\leq$ 10%为 1 分,11%~50%者 2 分,51%~75%者 3 分,>75%者 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积 $>$ 3 分定义为免疫反应阳性, $\leq$ 3 分定义为免疫反应阴性。

1.4 随访及统计学处理

随访时间自确诊之日开始,随访截止至 2010 年

12 月 31 日,全部随访 5 年以上或至患者死亡。生存时间定义为从确诊时间到死亡时间或末次随访时间。无瘤生存时间定义为从确诊到肿瘤复发或转移时间或死亡时间或末次随访时间。应用 SPSS13.0 for Windows 软件包建立数据库及进行统计分析。率的比较采用 χ^2 检验和精确概率法,Kaplan-Meier 法计算生存率及绘制生存曲线,预后价值判断采用 Log-Rank 对数秩检验,Cox 比例风险模型进行多因素生存分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

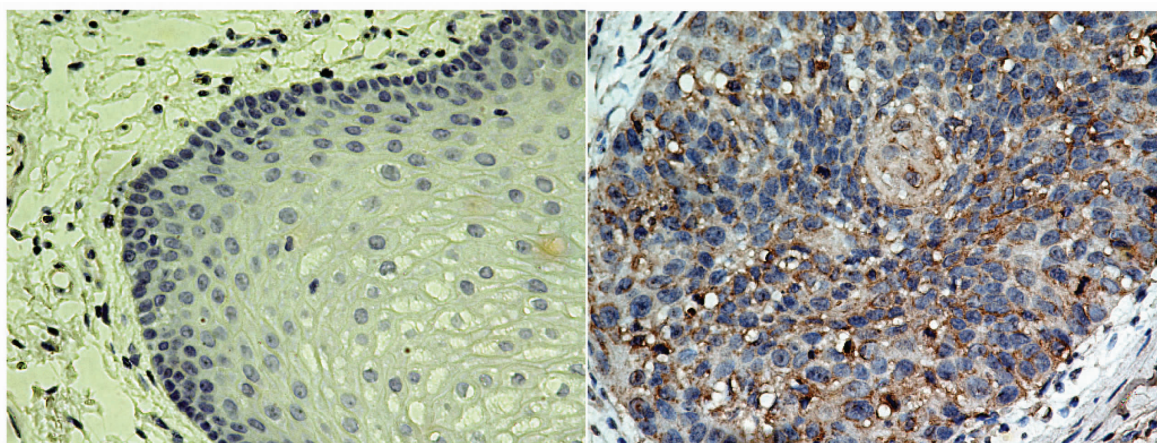
2 结 果

2.1 随访情况

全组病例随访 6~107 个月,中位随访时间 61 个月。至随访截止日期,86 例患者中复发 37 例(43.0%),其中原发灶复发 14 例,区域淋巴结复发 20 例,原发灶及颈部淋巴结复发 3 例;共 2 例发现远处转移;死亡 37 例,其中死于舌癌 34 例,死于其他原因 3 例。5 年总体生存率和无瘤生存率分别为 57.0%、51.2%。

2.2 TIAM-1 蛋白表达情况

TIAM-1 蛋白染色呈淡黄、棕黄或黄褐色颗粒,颜色浓淡不一,不均一地分布于鳞癌细胞的胞膜及胞质,横纹肌中 TIAM-1 蛋白呈阳性表达,86 例舌体鳞癌组织 TIAM-1 蛋白阳性表达为 54 例,阳性表达率为 62.8%;10 例正常口腔黏膜上皮组织无 TIAM-1 蛋白阳性表达,10 例舌上皮源性良性肿瘤仅 1 例



A TIAM-1 蛋白在正常舌上皮细胞阴性表达

B TIAM-1 蛋白在舌癌中性表达

图 1 TIAM-1 蛋白在正常舌上皮细胞及舌癌组织中的表达(SP $\times$ 400)

TIAM-1 蛋白阳性表达。TIAM-1 蛋白在舌体鳞癌中的阳性表达率高于正常口腔黏膜上皮和舌上皮源性良性肿瘤,差异有统计学意义($P<0.001$),见图 1。

2.3 TIAM-1 蛋白的表达与舌体鳞癌临床病理特征的关系

不同性别、年龄、病程以及有无浸润肌层中, TIAM-1 蛋白的阳性表达率差异无显著性;而在 T₃+T₄ 组、有颈淋巴结转移组、临床Ⅲ+Ⅳ期组、中低分化组, TIAM-1 蛋白的阳性表达率分别高于 T₁+T₂ 组、无颈淋巴结转移组、临床Ⅰ+Ⅱ期组以及高分化组, 差异有显著性, 见表 1。

2.4 TIAM-1 蛋白的表达与舌体鳞癌预后的关系

对 86 例舌体鳞癌的无瘤生存率进行单因素分析, 结果显示 T 分期、有无淋巴结转移、临床分期、有无浸润肌层、TIAM-1 表达情况对无瘤生存率的影响具有统计学意义, 结果见表 1。TIAM-1 蛋白表达阳性组复发 28 例, 复发率 51.9%; TIAM-1 蛋白表达阴性组复发 9 例, 复发率 28.1%, 两组差异有显著性($P=0.032$)。TIAM-1 蛋白表达阳性组和阴性组 5 年无瘤生存率分别为 38.9% 和 71.9%, 差异有显著性($P=0.003$), 见图 2。

将性别、年龄、病程、T 分期、有无淋巴结转移、临床分期、有无浸润肌层、病理分级以及 TIAM-1 表达 9 个变量引入 Cox 模型进行多变量分析, 显示舌体鳞癌独立预后因素为 T 分期、有无淋巴结转移, 见表 2。

3 讨 论

TIAM-1 最初是由荷兰癌症研究所 Habets 由 BW5147 小鼠 T 淋巴瘤细胞高侵袭变异株中分离鉴定, 继而由人体细胞分离并定位于第 21 号染色体的 q22.1 带^[2]。TIAM-1 作为 Rho 蛋白家族重要成员 Rac1 的特异性鸟苷酸转换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF), 促进 GDP 的释放以及 GTP 的结合, 进而激活 Rac1, 产生生物学效应。接受外界信号刺激后, TIAM-1 的苏氨酸残基磷酸化, 激活其 DH 工作域的 GEF 活性, 催化 GDP/GTP 转换, 激活

表 1 TIAM-1 蛋白的表达与舌体鳞癌临床病理特征的关系及无瘤生存率单因素分析

因素	例数	TIAM-1 表达			5 年无瘤生存	
		阳性	阴性	P 值	生存率(%)	P 值
性别						
男性	57	37	20	0.568	49.1	0.641
女性	29	17	12		55.2	
年龄(岁)						
≤45	30	18	12	0.695	56.7	0.439
>45	56	36	20		48.2	
病程(月)						
≤6	69	41	28	0.193	50.7	0.942
>6	17	13	4		52.9	
T 分期						
T ₁ +T ₂	55	30	25	0.035	61.8	0.006
T ₃ +T ₄	31	24	7		32.3	
淋巴结转移						
有	29	23	6	0.024	24.1	<0.001
无	57	31	26		64.9	
临床分期						
Ⅰ+Ⅱ	44	22	22	0.012	68.2	0.002
Ⅲ+Ⅳ	42	32	10		33.3	
浸润肌层						
有	68	46	22	0.070	45.6	0.049
无	18	8	10		72.2	
病理分级						
高分化	65	37	28	0.048	55.4	0.128
中低分化	21	17	4		38.1	
TIAM-1 表达						
阴性	54	—	—	—	71.9	0.003
阳性	32	—	—		38.9	

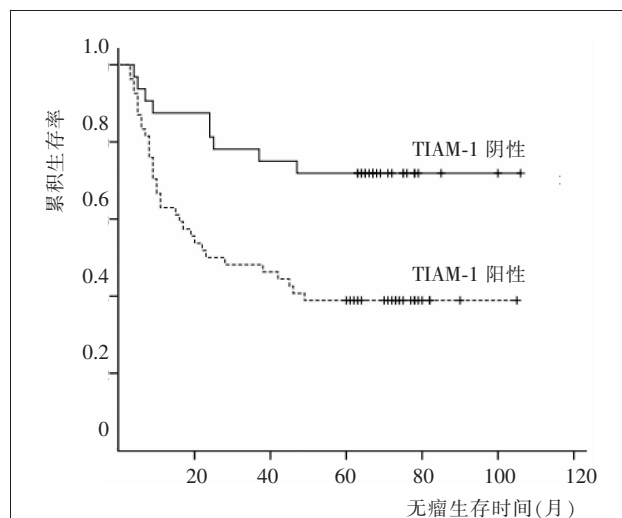


图 2 TIAM-1 蛋白表达阳性和阴性舌体鳞癌患者的生存曲线比较

表 2 86 例舌体鳞癌患者生存率多因素分析

变量	β 值	标准误	Wald 值	P 值	Exp(β)
T 分期	0.873	0.339	6.626	0.010	2.395
淋巴结转移	0.874	0.333	6.872	0.009	2.397
TIAM-1 表达	0.489	0.401	1.484	0.223	3.581

Rac1,再主要经由 JNK 激酶、p38MAPK 激酶等下游信号分子转导,实现其生物学功能,如:调节细胞骨架结构重组,影响细胞的形体极化过程,促进细胞运动和迁移,参与基因表达调控、细胞增殖与凋亡等^[3,4]。

在 TIAM-1 发现之初,Habets 等^[5]就通过对 T/B 细胞淋巴瘤、成神经细胞瘤、黑色素瘤、纤维肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、膀胱癌和胰腺癌等 40 多个人和啮齿类源性肿瘤细胞系的检测发现 TIAM-1 在所有的肿瘤细胞中都表达,且其表达水平依肿瘤细胞侵袭转移能力的增强而升高。体外实验中,将 *TIAM-1* cDNA 或只编码 DH 功能域的 cDNA 片段转染乳腺癌细胞,使其过量表达,可增强乳腺癌细胞的侵袭、转移能力。Liu 等^[6]研究显示敲除结肠癌细胞株 *TIAM-1* 基因能抑制其生长和侵袭能力。目前,关于 TIAM-1 在头颈鳞癌中的表达情况研究较少,在舌体鳞癌中的表达情况尚无研究。吴桂卿等^[7]研究显示 TIAM-1 在喉癌中阳性表达率为 65.2%,张香梅等^[8]研究报道 TIAM-1 在鼻咽癌中阳性表达为 63.3%。我们的研究发现 TIAM-1 在舌体鳞癌中阳性表达率为 62.8%,同前述研究结果相仿。

TIAM-1 基因是一个高度保守的基因,在正常组织中 TIAM-1 表达较低。李新元等^[9]研究显示, TIAM-1 蛋白在肾小管上皮、支气管黏膜上皮、肝细胞、心肌等组织低表达,平滑肌细胞呈中度表达,其余组织不表达。有研究显示正常组织中 TIAM-1 的低表达可增强 E-钙黏素介导的同质型黏附,不但不能导致细胞的侵袭,反而抑制侵袭,但在肿瘤细胞中, TIAM-1 高表达能持续活化 Rho 样蛋白,促进弹力纤维的形成以及病灶黏附复合物的形成,进一步诱导肿瘤细胞的侵袭转移^[10]。本研究显示 TIAM-1 蛋白在舌体鳞癌中的阳性率表达明显高于正常口腔黏膜上皮和舌良性肿瘤,显示 TIAM-1 蛋白在舌体鳞癌的侵袭转移中可能起着重要的作用。

侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的特征。尽管肿瘤侵袭转移是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程,但与细胞本身所具有的迁移运动能力密切相关,细胞骨架及其附属结构的变化是细胞发生迁移活动和肿瘤细胞转移的基础。TIAM-1 是一个重要的细胞骨架调节因子,能够促进细胞运动和迁移。本研究显示,在 T₃+T₄ 组、有颈淋巴结转移组、临床

Ⅲ+Ⅳ期组、中低分化组, TIAM-1 蛋白的阳性表达率均高于 T₁+T₂ 组、无颈淋巴结转移组、临床 I + II 期组以及高分化组。这进一步说明 TIAM-1 蛋白很可能具有诱导癌细胞迁移运动或增强癌细胞迁移运动的能力,致使舌体鳞癌细胞向周围组织浸润和发生淋巴结转移。TIAM-1 蛋白表达越强,舌体鳞癌的侵袭转移能力越强,恶性程度越高。目前研究认为, TIAM-1 诱导肿瘤浸润转移的机制有以下方面:①影响细胞骨架的组装:TIAM-1 能激活 Rac1,活化的 Rac1 则通过诱导 G 型肌动蛋白单体转变为 F 型肌动蛋白单体(F-actin)并聚合形成应力纤维,引发细胞骨架结构重组、细胞膜皱褶形成,以及局灶黏附复合物的组装。②对细胞黏附分子的影响:TIAM-1 能够调节细胞黏附,和 Rho 一起参与黏附复合物的组装,还能促进整合素介导的异型细胞之间以及细胞与基质之间的相互作用。③对肿瘤细胞凋亡的影响:下调 c-myc 的转录激活功能,进而抑制 c-myc 介导的促凋亡作用;也可通过激活 Rac1,诱导转录调节因子 NF-κB 和 STAT 活化,增强抗凋亡蛋白的转录与合成,从而促进细胞存活^[10-12]。

原发灶和颈部复发是否体鳞癌治疗最主要的失败原因。本文研究显示 TIAM-1 蛋白阳性表达组复发率高于阴性表达组,且 TIAM-1 蛋白阳性表达组 5 年无瘤生存率低于阴性表达组,差异有统计学意义。这说明 TIAM-1 蛋白表达越强,舌体鳞癌越容易复发,预后越差,因此检测舌体鳞癌 TIAM-1 的表达,可能有助于我们更好地判断舌体鳞癌患者的预后,为我们制定合理、个体化的治疗提供新的依据。但是,多因素分析显示舌体鳞癌独立预后因素为 T 分期、有无淋巴结转移, TIAM-1 蛋白的阳性表达尚不能成为舌体鳞癌独立预后因素,这可能因为肿瘤侵袭转移是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程, TIAM-1 介导的过程只是肿瘤侵袭转移的一个环节,此外与病例数较少也可能有关。尽管如此, TIAM-1 作为调控 Rho 蛋白鸟苷酸转换的上游分子,有可能成为舌体鳞癌新的基因治疗靶点与肿瘤良、恶性判断及预后估计的标志物。

参考文献:

- [1] 许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志,1996,6(4):229-231.

- [2] Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, et al. Identification of an invasion-inducing gene, TIAM-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins [J]. Cell, 1994, 77(4):537-549.
- [3] Minard ME, Kim LS, Price JE, et al. The role of the Guanine nucleotide exchange factor tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 84(1): 21-32.
- [4] Demarco RS, Struckhoff EC, Lundquist EA, et al. The Rac GTP exchange factor TIAM-1 acts with CDC-42 and the guidance receptor UNC-40/DCC in neuronal protrusion and axon guidance [J]. PLoS Genet, 2012, 8(4): e1002665.
- [5] Habets GG, van der Kammen RA, Stam JC, et al. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin [J]. Oncogene, 1995, 10(7):1371-1376.
- [6] Liu L, Zhang QL, Zhang YF, et al. Lentivirus-mediated silencing of Tiam1 gene influences multiple functions of a human colorectal cancer cell line [J]. Neoplasia, 2006, 8(11):917-924.
- [7] 吴桂卿, 田军, 孙静, 等. TIAM1 和 MTA1 在喉鳞癌组织中的表达及意义[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2012, 26(1):41-43.
- [8] 张香梅, 金贺, 陈娟芝, 等. Tiam-1 蛋白表达与鼻咽癌生物学行为的关系[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(1):26-28.
- [9] 李新元, 张建中, 王登顺, 等. 肿瘤侵袭诱导基因蛋白在正常及癌组织中的表达及意义[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(4): 294-295.
- [10] Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, et al. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI3K [J]. Nature, 1997, 390(6660): 632-663.
- [11] Zhong D, Li Y, Peng Q, et al. Expression of Tiam1 and VEGF-C correlates with lymphangiogenesis in human colorectal carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(8):689-695.
- [12] Matsuo N, Terao M, Nabeshima Y, et al. Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology [J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 24(1):69-81.

《肿瘤学杂志》投稿须知

1. 文稿务必材料可靠, 数据准确, 论点清楚, 论据充足, 结论明确。

2. 文字通顺、准确和简练, 重点突出, 层次清楚。论著需附结构式摘要, 包括目的、方法、结果、结论四部分。中文摘要 200~300 字; 英文摘要务必与中文摘要一一对应翻译。英文摘要前加英文文题、作者姓名汉语拼音、单位英文全称、所在城市名及邮政编码。

3. 所列参考文献限作者亲自阅读的已发表的近 3 年文献为主, 按文内引用先后顺序列于文末, 并在正文内引文处右上角以 [] 号注明序号。具体格式举例如下:

期刊: [序号] 作者 (3 位以下全部写出, 不同作者姓名中间加逗号, 英文文献作者为姓全称, 加名缩写; 3 位以上时只写前 3 位, 于后加 “, 等.” 或 “, et al.) 文题 [J]. 刊名 (英文为缩写), 年, 卷 (期): 起页-止页。

书籍: [序号] 作者. 书名 [M]. 版本. 出版地 (即城市名): 出版者, 出版年. 起页-止页。

学位论文: [序号] 作者. 学位论文名 [D]. 城市: 培养单位, 年。

电子文献: [序号] 作者. 题名 [电子文献类型]. 可获得的网址, 发表或更新的日期。

其中, 电子文献类型, 是网上期刊时, 用 [J/OL]; 是网上电子公告时, 用 [EB/OL]; 是网上联机数据库时, 用 [DB/OL]。

4. 有通讯作者的文稿, 请在文章首页左下角注明通讯作者职务/职称、学位、工作单位 (详细到科室)、详细通讯地址 (邮编) 和 E-mail。

5. 请 E-mail 投稿, E-mail: zlxzz04@126.com。请勿投寄给个人。文稿以 Word 排版、附件形式发送, 并在主页上注明单位及详细联系方式。同时请寄纸样打印稿 1 份、单位介绍信、基金证明复印件和稿件处理费 20 元。来稿内容若受国家或省、厅级项目资助请在正文首页脚注中说明, 并附基金资助证明复印件。

为了便于与作者 (通讯作者) 及时联系, 缩短文稿处理的时间, 请作者 (通讯作者) 务必在邮件主页留下手机号码、E-mail 地址! 本刊将主要通过电子邮件与作者 (通讯作者) 联系, 文稿投出后请随时查看所留 E-mail 地址的电子信箱。

6. 编辑部对来稿有文字修改权, 凡涉及内容的修改, 则提请作者考虑, 文责自负。文稿一般不退, 请作者自留底稿。来稿一经录用, 收取一定版面费, 发表后寄赠当期杂志 2 册并酌付稿酬。